T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK BİYOMİMETİK İSKELELERİN TASARIMI VE OSTEOSİTLER ÜZERİNE İNDÜKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KIYMET NURAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ NURAY EMİN

AĞUSTOS - 2021
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Kıymet NURAL tarafından hazırlanan "**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK BİYOMİMETİK İSKELELERİN TASARIMI VE OSTEOSİTLER ÜZERİNE İNDÜKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **02.08.2021** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN Kastamonu Üniversitesi	.....
Eş Danışman	Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR Ankara Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Nurdane YILMAZ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet AKKAŞ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ Hitit Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Kıymet NURAL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK BİYOMİMETİK İSKELELERİN TASARIMI VE OSTEOSİTLER ÜZERİNE İNDÜKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KIYMET NURAL

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ NURAY EMİN
EŞ DANIŞMAN:DOÇ. DR. AYSEL KOÇ DEMİR

Doku Mühendisliği çalışmalarının en önemli bileşenlerden biri, doku iskelesi olarak kullanılan biyomalzemedir. Biyopolimerik doku iskeleleri, hücrelere in vitro şartlarda üç-boyutlu (3B) yapay bir hücre dışı matriks (HDM) sunar. Bu sayede, anotomik boyutta doku organoidinin yüksek verimle oluşmasında birincil etkiye sahiptirler. Yürütülen tez çalışmasının amacı, kemik doku mühendisliğine yönelik biyomimetik kollajen-hiyaluronik asit-kondroitin sülfat-hidroksiapatit (KOL/HYA/KS-HA) kompozit iskeleler geliştirilmesidir. Bu doğrultuda, üretilen polimer-seramik kompozit iskelerinin ISO-EN-10993 numaralı standarda uygun olarak biyouyumluluk özellikleri araştırılarak, doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak kullanımının uygunluğu gösterildi. Tez kapsamında, 3B biyomimetik polimer iskeleler iki farklı yöntem kullanılarak hazırlandıktan sonra, SBF çözeltisi ile muamele edilerek yüzeylerinin hidroksiapatit (HA) ile kaplanması sağlandı. Polimer zincirleri arasında kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılmak yerine, mekanik stres altında çapraz bağlanmaların etkinliği araştırılarak iskelelerin biyouyumluluğu arttırılmaya çalışıldı. Elde edilen kompozit iskelelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri uygun analiz yöntemleri kullanılarak incelendi. Uygun özelliklere sahip olduğu belirlenen iskelelerin doku oluşturma kapasiteleri, sıçan kalvaria ve tibia kemiğinden izole edilen osteoblast hücreleri (sOB) ile test edildi. Hücre canlılığı ve çoğalması MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] analizi, osteojenik fenotipi alkalin fosfataz aktivitesinin tespiti ve histokimyasal boyamalar yapılarak, kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi. Karakterizasyon analizleri sonucunda çözelti halindeki polimer karışımlarından hazırlanan polimer-seramik kompozitlerin kemik doku mühendisliği için daha uygun olduğu tespit edildi. sOB kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, yapısında kollajen miktarı daha fazla olan iskelelerin kemik doku oluşumunu daha fazla indüklediği belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: Kemik Doku Mühendisliği, Kollajen, Hiyaluronik Asit, Kondroitin Sülfat, Hidroksiapatit, Doku İskelesi.

Ağustos 2021, 120 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

DESIGN OF BIOMIMETIC SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING AND INVESTIGATION OF INDUCTIVE EFFECT ON OSTEOCYTES

KIYMET NURAL

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING
SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. NURAY EMİN
CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. AYSEL KOÇ DEMİR

One of the most important components in tissue engineering studies is the biomaterial used as tissue scaffold. Biopolymeric scaffolds present cells with a three-dimensional (3D) artificial extracellular matrix (ECM) in vitro. In this way, they have a primary effect on the formation of tissue organoid of anatomical size with high efficiency. In this thesis, it was aimed to develop biomimetic collagen-hyaluronic acid-chondroitin sulfate-hydroxyapatite (KOL/HYA/KS-HA) composite scaffolds and to investigate their usability for bone tissue engineering. Accordingly, the biocompatibility properties of the produced polymer-ceramic composite scaffolds were investigated in accordance with the ISO-EN-10993 standard, and the suitability of their use as a biomaterial in tissue engineering was demonstrated. Within the scope of the thesis, after 3D biomimetic polymer scaffolds were prepared using two different methods, they were treated with SBF solution and their surfaces were coated with HA. Instead of using chemical crosslinkers between polymer chains, the efficiency of crosslinking under mechanical stress was investigated to increase the biocompatibility of the scaffolds. The physical and chemical properties of the obtained composite scaffolds were examined using appropriate analysis methods. In the determination of tissue forming capacity, osteoblast cells (sOB) isolated from rat calvaria and tibia bones were tested using scaffolds determined to have suitable properties. Cell viability and proliferation were evaluated qualitatively and quantitatively by MTT analysis and osteogenic phenotype was evaluated using alkaline phosphatase activity and histochemical staining. As a result of characterization analysis, it was determined that polymer-ceramic composites prepared from polymer blends in solution are more suitable for bone tissue engineering. In studies using sOB, it was determined that scaffolds which have a higher amount of collagen in their structure induced bone tissue formation much more.

KEYWORDS: Bone Tissue Engineering, Collagen, Hyaluronic Acid, Chondroitin Sulfate, Hydroxyapatite, Tissue Scaffold.

August 2021, 120 Page

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasını bana veren, TÜBİTAK ARDEB 119S123 numaralı proje kapsamında desteklenmesini ve tezimin hazırlanmasında bana gerekli olanakları sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, beni aydınlatan, hoşgörüsünü esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN'e,

Tez çalışmalarım sırasında bilgisiyle ve tecrübeleriyle deneysel sonuçlarımı yorumlayabilmemde değerli katkılarını gördüğüm, katkılarıyla çalışmalarımın daha hızlı ilerlemesini sağlayan çok değerli İkinci Tez Danışmanı Hocam Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR'e,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini gördüğüm Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde görevli değerli hocalarım Öğr. Gör. Sedat KURNAZ'a, Öğr. Gör. Dr. Cahit ÖREK'e, Öğr. Gör. Dr. Fevziye Işıl KESBİÇ'e ve Orhan GÜLSEVEN'e,

Her zaman yanımda olup bana her türlü desteği veren ve güler yüzünü eksik etmeyen ev arkadaşım, Salma Taher MOHAMMED'e, Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Elit ÖZELÇAĞLAYAN, Omar Khalıd ALSHAWI, Havva YAZAR, Nuri Furkan KERPİÇ, Funda KARAGÖZ ile her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli dostlarıma ve son olarak hayatım boyunca her zaman yanımda olup bana güvenen, öğrenim hayatımda maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

Yürütülen bu yüksek lisans tez çalışmasının tamamı TÜBİTAK ARDEB 119S123 numaralı araştırma projesi kapsamında desteklenmiş olup, ayrıca bursiyer desteği verilmiştir. TÜBİTAK Başkanlığına vermiş olduğu desteklerden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Yürütülen tez kapsamında yapılan hayvan deneyleri, 119S123 numaralı proje kapsamında Kastamonu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 19.02.2018 tarihli ve 2018.12 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmaları için ayrıca HADYEK izni alınmasına gerek olmadığı, KÜHADYEK Başkanlığı'nın 21.02.2021 tarihli ve 2021.6sayılı yazıları ile bildirilmiştir.

Kıymet NURAL

Kastamonu, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Kemik Anatomisi 1
1.2 Kortikal Kemik 3
1.3 Trabeküler Kemik 4
1.4 Kemik Dokusu Hücreleri 4
1.4.1 Osteoprogenitör Hücreler 4
1.4.2 Osteoblastlar 5
1.4.3 Osteositler 6
1.4.4 Osteoklastlar 7
1.5 Kemik Doku Matriksi 7
1.5.1 Organik Matriks 8
1.5.1.1 Kollajen 8
1.5.1.2 Proteoglikanlar 9
1.5.1.3 Glikoproteinler 10
1.5.2 İnorganik Matriks 13
2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ **15**
2.1 Kemik Büyümesi İçin Geçici Matrisler 17
2.1.1 Doku İskelelerinin Temel Özellikleri 18
2.1.1.1 Biyouyumluluk 18
2.1.1.2 Gözeneklilik 18
2.1.1.3 Mekanik özellikler ve biyobozunurluk 19
2.1.2 İşleme Teknikleri 19
2.2 Kemik Doku Mühendisliği için Hücre Kaynakları 20
2.3 Dinamik Kültür: Biyoreaktörler 20
3. KEMİK ONARIMI İÇİN BİYOMALZEMELER **22**
3.1 Polimerler 22
3.1.1 Kollajen 22
3.1.1.1 Kollajenin yapısı 24
3.1.1.2 Kollajenin biyomalzeme olarak kullanımı 25
3.1.1.3 Kollajenin biyouyumluluğu 27
3.1.1.4 Kollajenin biyobozunurluğu 27
3.1.1.5 Kollajenin mekanik özellikleri 27
3.1.1.6 Kollajenin sterilizasyon tekniği 28
3.1.1.7 Hiyalüronik asit 28
3.1.1.8 Hiyalüronik asidin kimyasal özellikleri 30

3.1.1.9 Hiyalüronik asitin biyomalzeme olarak kullanımı 31
3.1.1.9.1 Hiyalüronik asitin biyouyumluluğu 32
3.1.1.9.2 Hiyalüronik asitin biyobozunurluğu 32
3.1.1.9.3 Hiyalüronik asitin mekanik özellikleri 33
3.1.2 Kondroitin Sülfat 33
3.1.2.1 Kondroitin sülfatın kimyasal özellikleri 34
3.1.2.2 Kondroitin sülfatın biyomalzeme olarak kullanımı 35
3.1.2.2.1 Kondroitin sülfatın biyouyumluluğu 36
3.1.2.2.2 Kondroitin sülfatın biyobozunurluğu 36
3.2 Seramik Malzemeler 37
3.2.1 Hidroksiapatit 37
3.2.1.1 Hidroksiapatitin biyomalzeme olarak kullanımı 38
3.2.1.1.1 Hidroksiapatitin biyouyumluluğu 39
3.2.1.1.2 Hidroksiapatitin biyobozunurluğu 39
3.2.1.1.3 Hidroksiapatitin mekanik özellikleri 40
3.2.1.2 İskelelerde hidroksiapatitin oluşturulması 40
3.2.1.2.1 SBF ile hidroksiapatitin oluşturulması 41
3.3 Kompozit Malzemeler 43
4. MATERYAL VE METOD 44
4.1 Materyal 44
4.2 Metot 45
4.2.1 Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması 45
4.2.1.1 Kollajen çözeltisinin hazırlanması 45
4.2.2 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat İskelelerinin Hazırlanması 47
4.2.3 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat-Hidroksiapatit Kompozit İskelelerinin Hazırlanlaması 49
4.2.3.1 SBF çözeltisinin hazırlanması 49
4.2.3.2 Polimerik iskelelerin SBF içerisinde hidroksi apatit ile kaplanması 50
4.2.4 İskelelerin Karakterizasyonuna Yönelik Analizler 50
4.2.4.1 Biyobozunurluk analizi 51
4.2.4.2 Islanabilirilik analizi 52
4.2.4.3 Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre (FTIR) ile kimyasal yapı analizi 53
4.2.4.4 İyon salım analizi 53
4.2.4.5 Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile morfoloji analizi 54
4.2.4.6 Termogravimetrik analiz (TGA) 54
4.2.4.7 X-ışını difraksiyon analizi (XRD) 54
4.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları ve Analizleri 55
4.2.5.1 Hücre izolasyonu 55
4.2.5.2 İskelelerin sterilizasyonu ve ıslatılması 55
4.2.5.3 İskelelere hücrelerin tohumlanması 56
4.2.5.4 MTT analizi 56
4.2.5.5 Alkalin fosfataz test analizi 57
4.2.5.6 Histokimyasal analizler 58
4.2.5.6.1 Alizarin boyaması 58
4.2.5.6.2 Safranin-O boyaması 59
5. ARAŞTIRMA BULGULARI 60
5.1 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat İskelelerinin Hazırlanması ... 60

5.2 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat Kompozit İskelelerinin Hidroksiapatitle Kaplanması 62
5.3 Biyobozunurluk Süresinin Tespiti 65
5.4 Su Tutma Kapasitesinin Tespiti 67
5.5 FTIR Analizi 67
5.6 ICP-OES ile İyon Salınım Miktarının Tespiti 76
5.7 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Morfoloji Analizi 79
5.8 TGA Analizi 86
5.9 XRD Analizi 89
5.10 Hücresel Analizler 92
5.10.1 MTT Analizi 92
5.10.2 ALP Analizi Bulguları 96
5.10.3 Histokimyasal Analiz Bulguları 97
6. TARTIŞMA 100
7. SONUÇ 107
KAYNAKLAR 108
ÖZGEÇMİŞ 118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Kemik yapısı 2
Şekil 1.2 Kemiğin anatomik yapısı 2
Şekil 1.3 Kortikal kemiğin anatomik yapısı..... 3
Şekil 1.4 Kemik dokusu hücreleri. 4
Şekil 1.5 Kemik dokusunda yer alan hücreler. 6
Şekil 1.6 Kemik doku matriksi. 8
Şekil 1.7 Kemiğin yapısında bulunan kollajen fibrilleri arasına serpiştirilmiş mineral tabakaları 9
Şekil 2.1 Doku Mühendisliği. 16
Şekil 2.2 Gözenekli iskele yapısı 19
Şekil 2.3 Döner kap ve döner duvar hazneli (RWVR) biyoreaktör sistemleri..... 21
Şekil 3.1 Kollajenin yapısı 24
Şekil 3.2 Sıçan kuyruk tendonu elektron mikroskobu görüntüsü 26
Şekil 3.3 Kemik yapısında yer alan kollajen molekülünün yapısı 26
Şekil 3.4 Hiyalüronik asidin kimyasal yapısı..... 30
Şekil 3.5 Hiyalüronik asidin enzimatik bozunması..... 33
Şekil 3.6 Kondroitin 4-sülfat ve kondroitin 6-sülfatın şematik gösterimi. 35
Şekil 3.7 (a) Hidroksiapatitin atomik yapısı ve (b) c ekseni boyunca yansıması 38
Şekil 3.8 Kemiğin osteoklastik rezorpsiyonunun şematik gösterimi. 40
Şekil 3.9 SBF içerisinde yer alan örnek 42
Şekil 4.1 Wistar sıçan kuyruklarından tendon izolasyonu A. Yetişkin Wistar sıçana ait kuyruk, B,C. Kuyruk derisinin soyulması, D. Soyulan kuyruk derisinin %70'lik etil alkol ve saf su içerisinde yıkanması, E. Tendonun ayrıştırılarak saflaştırılması. 46
Şekil 4.2 Kollajen çözeltisinin hazırlanması. 46
Şekil 4.3 A. Vortex ile örneklerin hazırlanması. B. İskelelerin liyofilizatör cihazı ile hazırlanması. 48
Şekil 4.4 Biyobozunurluk analizi A. Hazırlanan iskelelere Hank'in dengeli tuz çözeltisi eklendikten sonraki görünümü. B. 24 saat sonunda kuyucuklardan alınan çözelti 52
Şekil 4.5 A. Kuru haldeki bir (K)KOL/HYA/KS-HA iskele (Örnek no-63), B. 24 saat saf su içerisindeki inkübasyonun sonundaki boyutsal değişiminin 2B-görüntüsü 53
Şekil 4.6 MTT reaktifi ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu öncesi (A) ve sonrası (B) görünümü. 57
Şekil 5.1 A. %0,5 kollajen ile hazırlanan iskelenin vortex sonrası görünümü. B. %0,5 kollajen ile hazırlanan iskelelerin liyofilizasyon sonrası görünümü. 60
Şekil 5.2 %1 kollajen ile hazırlanan iskelenin A. vortex işlemi sonrası iki fazlı görünümü ve B. liyofilizasyon sonrası oluşan iskelelerin görünümü. %2 kollajen ile hazırlanan iskelenin C. vortex işlemi sonrası iki fazlı görünümü ve D. liyofilizasyon sonrası oluşan iskelelerin görünümü. 61

Şekil 5.3 Kollajen konsantrasyonuna bağlı olarak yapıdaki çapraz bağlanmaların miktarı. A.%1Kollajen:%1Hiyalüronik asit:%0,1Kondoitin Sülfat B. %2Kollajen:%1 Hiyalüronik asit:%0,1Kondoitin Sülfat..... 61
Şekil 5.4 Kollajen çözeltisinde diğer KS ve HYA'nın çözünmesiyle hazırlana polimer karışımlarından (Tablo 4.4) 1-27 numaralı deney serisine ait iskelelerin SBF ile muamele öncesi ve sonrası görünümlerine ait fotoğrafların karşılaştırmalı olarak analizlenmesi. Genel olarak SBF muamelesi sonucu hacimsel olarak azalmanın olduğu ve 3B yapıda bozulmaların meydana geldiği belirlendi. 63
Şekil 5.5 Kol, KS ve HYA çözeltileri kullanılarak hazırlanan polimer karışımlarından (Tablo 4.4) 37-72 numaralı deney serisine ait iskelelerin SBF ile muamele öncesi ve sonrası görünümlerine ait fotoğrafların karşılaştırmalı olarak analizlenmesi. Genel olarak SBF muamelesi sonucu hacimsel olarak azalmanın olduğu ve buna karşın 3B yapının genel olarak korunduğu belirlendi. 64
Şekil 5.6 (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin biyobozunurluk oranları 65
Şekil 5.7 (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin biyobozunurluk oranlar..... 66
Şekil 5.8 İskele örneklerinin, kuru kütlelerine karşı su tutma kapasitesinin yüzdesel olarak gösterimi 67
Şekil 5.9 %0,5 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları..... 69
Şekil 5.10 %1 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları..... 70
Şekil 5.11 %2 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları..... 71
Şekil 5.12 %0,5 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. 4,5,6 (sağ sütun 2. sıra) 10 ve 12 (sağ sütun, 4. sıra) numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapısını kaybetmiştir. Bu nedenle analizi yapılamamıştır. 73
Şekil 5.13 %1 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. 16 (sağ sütun 2. sıra), 21(sağ sütun 3. sıra), ve 22 (sağ sütun 4. sıra), numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapısını kaybetmiştir. Bu nedenle, analizlenmemiştir. 74
Şekil 5.14 %2 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. SBFie muamele sonrasına ait, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,35 ve 36 numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapı kaybetmiştir. Bu nedenle, analizlenmemiştir. 75
Şekil 5.15 Polimerik iskelelerin SBF içerisinde HA ile kaplanması sonrasında Hank'in dengeli tuz çözeltisi içerisinde biyobozunurluk analizinde 1, 3 ve 7inci günlerdeki iyon salınım konsantrasyonlarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi. 78
Şekil 5.16 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-3 ve (E,G) örnek-9 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-3 ve (F,H) örnek-9'a ait SEM mikrografları 81

Şekil 5.17 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-15 ve (E,G) örnek-18 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-15 ve (F,H) örnek-18'e ait SEM mikrografları 82
Şekil 5.18 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-24 ve (E,G) örnek-27 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-24 ve (F,H) örnek-27'ye ait SEM mikrografları 84
Şekil 5.19 SBF ile muamele edilmiş (Ç)KOL/HYA/KS-HA kompozit iskelelerden örnek-67 (A,B), örnek-68 (C,D) ve örnek-69 (E,F) ile SBF muamelesi öncesi örnek-69 (G,H)'a ait SEM mikrografları. 85
Şekil 5.20 (K)KOL-HYA-KS-HA örneklerine ait TGA termogramları 87
Şekil 5.21 (Ç)KOL-HYA-KS-HA örneklerine ait TGA termogramları 88
Şekil 5.22 SBF çözeltisi içerisinde apatit çekirdeklenmesi yapıldıktan sonra biyobozunma verilerine göre değerlendirilerek seçilen 12 örnekten, baskın HA bileşimi içeren 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı örneklere ait XRD spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi 91
Şekil 5.23 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin MTT analizinin 570 nm'deki spektrofotometrik analiz sonuçları..... 92
Şekil 5.24 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin ALP aktivitelerinin günlere göre değişimi. 93
Şekil 5.25 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin Saf-O ile boyanması ve gelişen HDM ile hücrelerin günlere göre değişimi. 96
Şekil 5.26 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin AR ile boyanması ve gelişen HDM'deki kalsiyum birikiminin günlere göre değişimi. 97

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 İnsan kan plazması ile karşılaştırıldığında SBF'nin iyon konsantrasyonları. 42
Tablo 4.1 Çözelti halindeki polimer karışımlardan hazırlanan deney serisi. KS derişimi tüm çözeltilerde sabit olup, düşey sütun KOL derişimi, Yatay satır HYA konsantrasyonunu göstermektedir. Çözeltiler hacimsel olarak belirtilen oranlarda bir araya getirilerek hazırlandı. 47
Tablo 4.2 Kollajen çözelti içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfatın çözünmesiyle hazırlanan polimer karışımlarına ait deney serisi. 48
Tablo 4.3 500 ml SBF hazırlamak için gerekli reaktifler ve miktarları. 50
Tablo 4.4 Analizlenmek üzere hazırlanan iskele sistemlerinin numerik isimlendirilmesi 51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre
Å : Angstrom
cm : Santimetre
dk : Dakika
g : Gram
kDa : Kilodalton
ml : Mililitre
mm : Milimetre
mM : Milimolar
nm : Nanometre
s : Saniye

Kısaltmalar

3B : 3 Boyut
ALP : Alkalin Fosfataz
AR : Alizerin Red
B-ALP : Kemik Spesifik Alkalin Fosfataz
CD44 : Hiyalüronan Reseptörü
DMEM : Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı
DSC : Diferansiyel Termal Kalorimetri
EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
FBS : Fetal Sığır Serumu
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR : Fourier Dönüşümlü İnfrared
GAG : Glikozaminoglikan
Gly : Glisin
HA : Hidroksiapatit
HAS : Hiyolüronan Sintaz
HYA : Hiyalüronik Asit
Hyp : 4-Hidroksiprolin
ICP-OES : İndüktif Eşleştirilmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometrisi
KS : Kondroitin Sülfat
MMP : Matriksmetalloproteinaz
MTT : 3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PDGF : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGA : Poliglikolik Asit
PLA : Polilaktik Asit
PLGA : Polilaktikoglikolik Asit
Pro : Prolin

RGD : (Arg-Gly-Asp)
RWVR : Döner Duvar Hazneli Biyoreaktör
Saf-O : Safranin-O
SBF : Yapay Vücut Sıvısı
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA : Termogravimetrik Analiz
TGF-β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü
XRD : X-Işını Difraktometresi

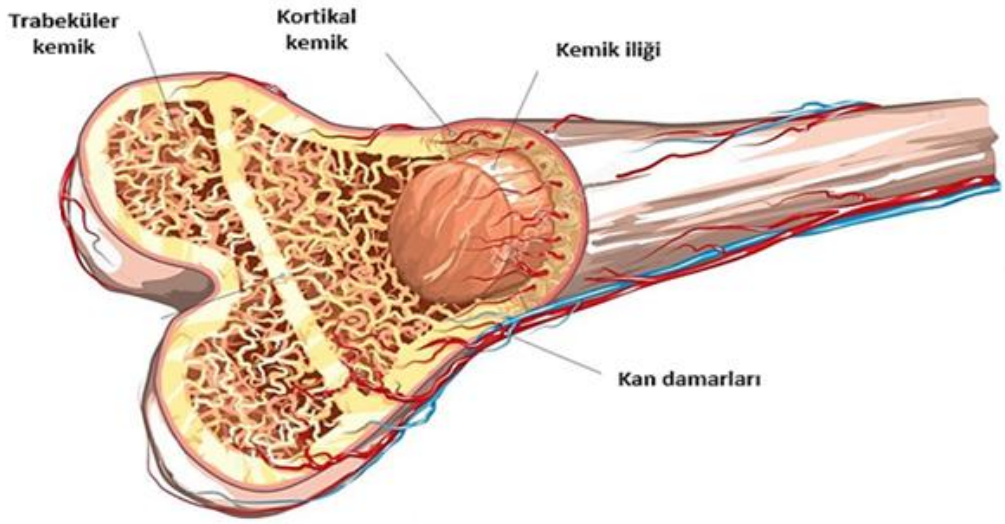
1. GİRİŞ

Kemik sert bir mineral matrikse gömülmüş, esnek protein liflerine sahip kompozit bir yapıdır. Dişlerin mine ve dentin tabakasından sonra vücutta bulunan en sert dokuyu oluşturmakla birlikte iskelet sisteminin ana parçasını oluşturan kemik; hücreler, lifler ve öğütülmüş maddelerden oluşan özel bağlayıcı bir dokudur. Diğer bağ dokularından farklı olarak hücre dışı bileşenleri mineralize edilmekte ve bu sayede yapıya sağlamlık kazandırılmaktadır (Topaloğlu vd., 2017; Fuchs vd., 2019).

Kemik organizmada hareketin gerçekleşmesini sağlayan kaslar için bağlantı yerleri oluşturma, yerçekimi kuvvetine karşı koyan iç desteği sağlama, yumuşak dokuları destekleme ve koruma, kalsiyum fosfat depolama ve kemik iliğini bulundurma gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Kemik dokusu yaşam boyunca sürekli oluşmakta ve yeniden şekillenmektedir. Başlangıçta kemiğin büyümesi, iskelet modellemesi olarak bilinen karmaşık bir işlemle boyut ve şekil artışı olarak görülmektedir. Ergenlik ve yetişkinlikte ise yeniden yapılanma adı verilen bir süreçle iskelet sürekli olarak yenilenmektedir (Safadi vd., 2009; Florencio-Silva vd., 2015; Johannesdottir ve Bouxsein, 2018).

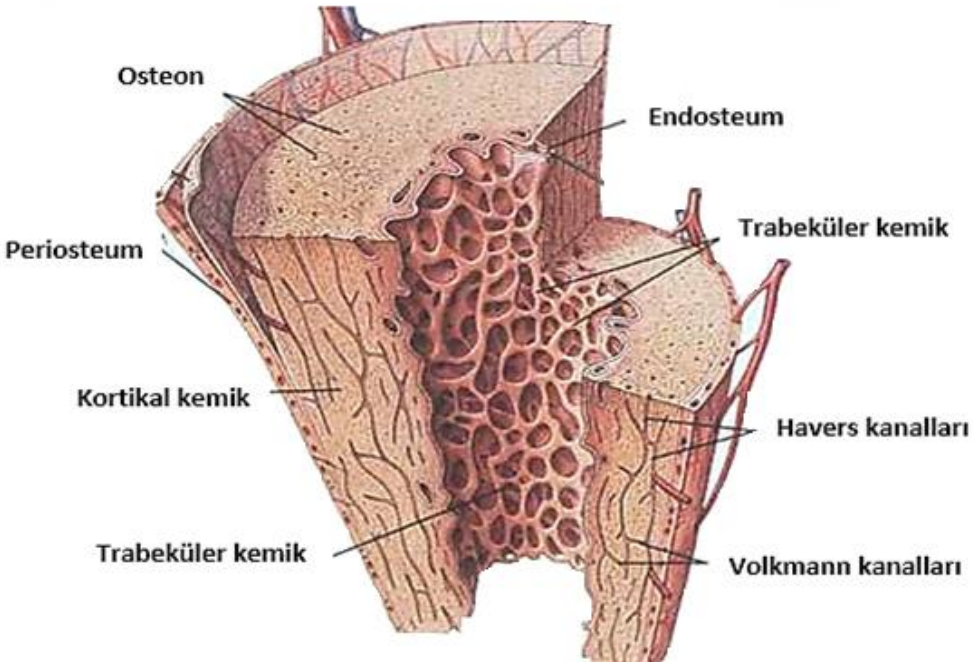
1.1 Kemik Anatomisi

İnsan iskelet sistemi, her biri farklı görünüme sahip 200'ün üzerinde kemik bulundurmaktadır. Vücutta bulunan diğer organ ve dokular gibi kemik dokusu da makro boyuttan nano boyuta değişen ölçülerde bileşenleri içeren hiyerarşik bir düzene sahiptir. Diyafiz olarak adlandırılan kemiğin gövdesi, ilik alanını çevreleyen yoğun ve kompakt kemikten ve içi boş silindirden oluşmaktadır. Bu bölgedeki kemik kortikal kemik olarak isimlendirilmektedir. Kemiğin sonunda eklemin arayüzünü oluşturan eklem kıkırdağını destekleyen epifiz yer almaktadır. Kemiğin daraldığı bölge epifizden diyafize kadar metafiz olarak adlandırılmaktadır. Uzun kemiklerin metafizinde, vertebralarda ve kaburgalarda bulunan süngerimsi kemik ise, trabeküler kemik olarak isimlendirilmektedir (Topaloğlu vd., 2017; Johannesdottir ve Bouxsein, 2018; Burr ve Allen, 2019).



Şekil 1.1 Kemik yapısı (URL-1)

Kemiğin dış yüzeyi periosteum ve iç yüzeyi endosteum tarafından kaplanmaktadır. Periosteum kortikal kemik ile üstteki yumuşak doku veya kas sistemi arasında geçişli bir lifli tabaka görevi görmektedir. Eklem yüzeyleri, tendon hariç çoğu kemiğin dış yüzeyini kaplamaktadır. Endosteum ise kemik iliğini çevrelemek için trabeküler kemik yüzeylerinde membran oluşumunu sağlamaktadır (Johannesdottir ve Bouxsein, 2018; Fuchs vd., 2019).

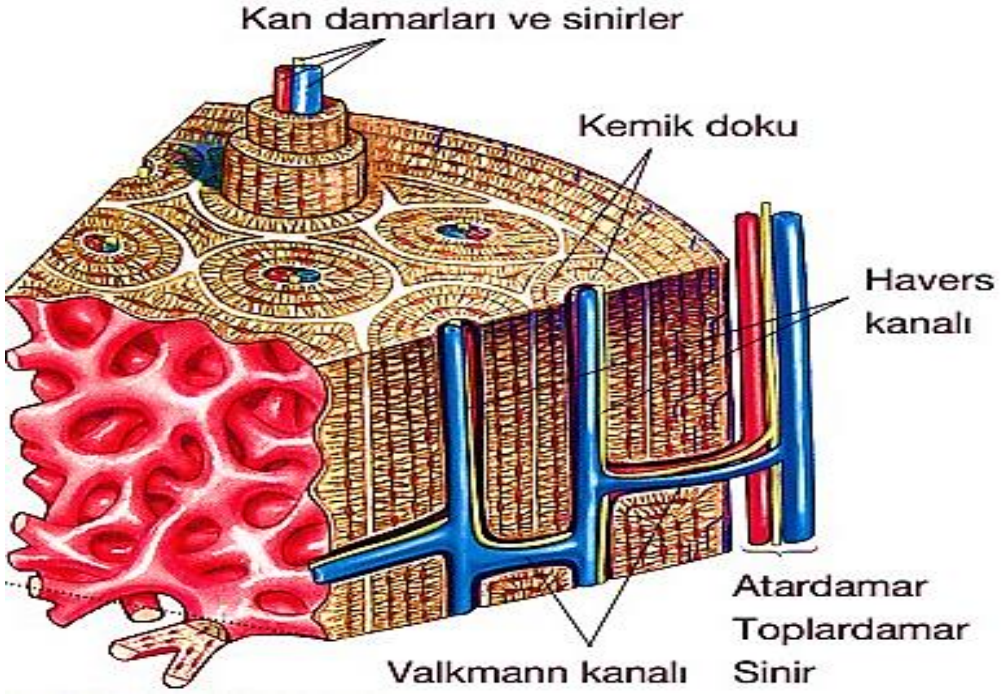


Şekil 1.2 Kemiğin anatomik yapısı (URL-2)

1.2 Kortikal Kemik

Kortikal kemik, toplam iskelet dokusu kütlesinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Hacimce yüksek matriks kütlesine ve düşük gözenekliliğe sahiptir. Kortikal kemik, kemik iliği ile dolu medüller kanalı çevreleyen korteks oluşturduğu diyafizlerde belirgindir. Ayrıca klinik olarak anlamlı bir rol oynadığı uzun kemiklerin epifiz ve metafizlerine doğru incelmektedir (Safadi vd., 2009; Burr ve Allen, 2019).

Kortikal kemikte silindirik birimlerden oluşan Havers ve Volkmann kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar 5 ila 15 eş merkezli lamellerden oluşan silindirik ünitelerdir. Her lamel birkaç mikron kalınlığında olmakla birlikte kanalın etrafında spiral bir şekilde ilerlemektedir. Havers kanalları kortikal kemiğin içinde dallanmış olarak bulunmakla birlikte yaklaşık 400 mm boyunda ve 200 mm genişliğindedir. Havers kanalı gevşek bağ dokusu içinde bulunan damarları ve sinirleri içermektedir. Komşu Havers kanalları kemik illiği, periosteum ve diğer kanallarla Volkmann kanalları sayesinde bağlantı kurmaktadır. Volkmann kanalları ise Havers kanallarını birbirine bağlayan enine küçük kanallardan oluşmaktadır (Safadi vd., 2009; Topaloğlu vd. 2017).



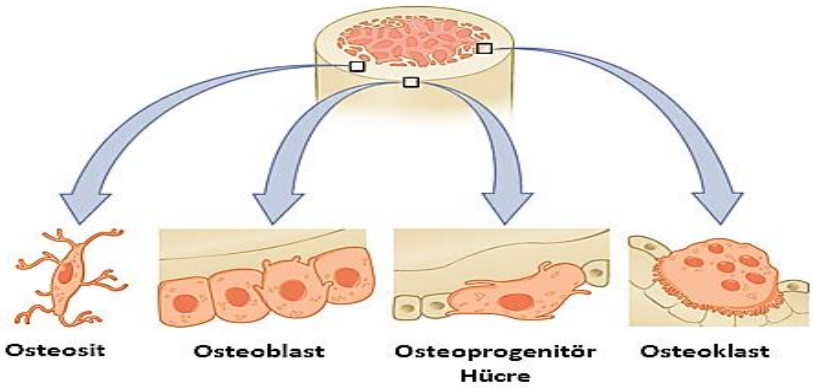
Şekil 1.3 Kortikal kemiğin anatomik yapısı (URL-3)

1.3 Trabeküler Kemik

Kortikal kemiğin düşük porozitesinin aksine trabeküler kemik, trabeküler kemik hacminin %50-90'ını oluşturan gözeneklerle yüksek gözenekliliğe sahiptir. Bununla birlikte kemik iliği, kan damarları ve bağ dokularında kemikle temas halinde olması için daha fazla yüzey alanı sağlamaktadır. Trabeküler kemik, kortikal kemiğin gücüne sahip olmamakla birlikte iç destek sağlayarak kemiğin mekanik rolüne katkıda bulunmaktadır. Bu destekleyici rolüyle kemiğin yükü eşit olarak dağıtmasına yardımcı olmaktadır (Burr ve Allen, 2019; Fuchs vd., 2019).

1.4 Kemik Dokusu Hücreleri

Kemik hücreleri mezenşimden farklılaşıp olgun kemik hücresi yapısını kazanmaları sırasında, bulundukları yer ile oluşum ve fonksiyon açısından yeni özellikler kazanmaktadır ve bu durum farklı hücre tipi halinde ayırt edilmelerine sebep olmaktadır. Gelişmekte olan ve erişkin kemik dokusunda dört farklı tipte hücre bulunmaktadır. Kemik dokusunda bulunan hücreler; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (Öber ve İzzetoğlu, 2006; Eroschenko, 2008).



Şekil 1.4 Kemik dokusu hücreleri (URL-4).

1.4.1 Osteoprogenitör Hücreler

Diğer destek dokular gibi, kemik dokusu da mezenkimal bağ dokusundan farklılaşmamış pluripotent kök hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler esas olarak kemik hücresi olma yönünde şartlanmış hücrelerdir. Yoğun kemik büyüme safhaları

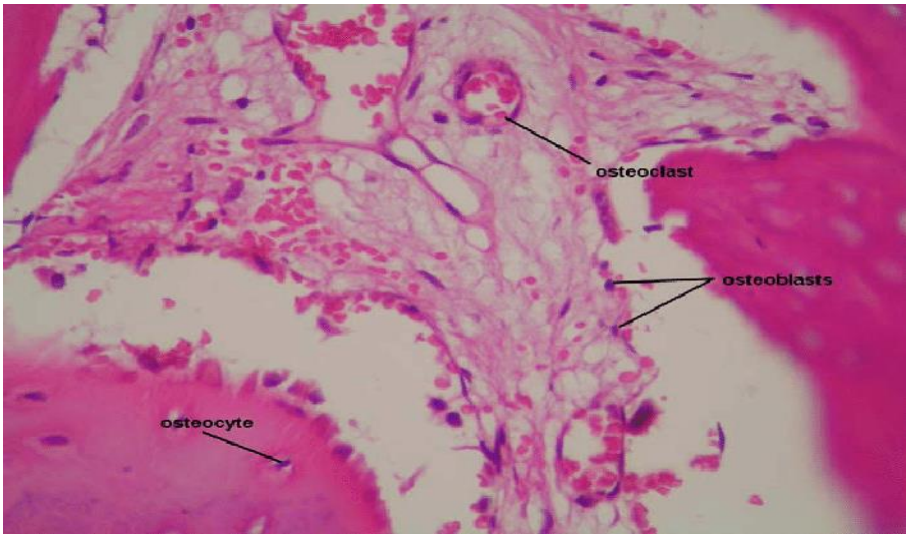
esnasında sayıları mitoz bölünme ile artarak osteoblastlara farklılaşmaktadır. Bu osteoprogenitör hücreler iğ şeklindedir ve uzamış nükleuslara sahip hafif asidofil veya çok soluk bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Bu hücreler olgun kemiklerin periosteum ve endosteumunda, bu kemiklerin içerdikleri Harves ve Volkmann kanallarının örtüsünde ve büyüyen kemiklerin kıkırdak matrisinin trabeküllerinde yerleşmiş halde bulunmaktadır.

Osteoprogenitör hücreler kemiklerin büyümesi sırasında aktiftir. Bu hücreler yetişkinlerde hareketsiz halde bulunurken, kemikte meydana gelen herhangi bir yaralanma veya kemiğin yeniden düzenlenmesi sırasında aktif hale gelerek mitozla bölünüp çoğalmaktadırlar. Böylece çoğalan bu hücreler kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşerek kemik dokusunun işlevinin yerine getirilmesinde yardımcı olmaktadırlar (Öber ve İzzetoğlu, 2006; Eroschenko, 2008; Akay, 2008).

1.4.2 Osteoblastlar

Kemik dokusunun oluşumundan sorumlu olan hücrelerdir. Osteoprogenitör hücrelerden türevlenen bu hücreler kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden bölgelerinde diziler halinde bulunmaktadır. Küresel çekirdekli ve kübikten silindiriğe yakın şekilli olan osteoblastlar, sitoplazmaları granüllü, endoplazmik retikulumca zengin hücrelerdir. İyi gelişmiş golgi kompleksi, çekirdek ile hücrenin tabanı arasında yer almakla birlikte mitokondrileri uzun ve oldukça fazla sayıdadır. Osteoblastlar bölünme özelliği olmayan hücrelerdir.

Osteoblastlar kemik matriksinin önemli bileşeni (kollajen fibrilleri, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikoproteinler) olan osteoidi salgılamaktadır. Osteoblastlar salgıladıkları osteoit içinde gömülü kalmaktadır. Osteoit kalsifiye olmamıştır ve herhangi bir mineral içermemektedir ancak çökeldikten sonra çok hızlı bir şekilde mineralize olarak kemikleşmeye başlamaktadır. Sentez aktivitelerinin sonlanması ile de morfolojilerinde değişim meydana gelerek osteosite farklılaşmaktadırlar (Öber ve İzzetoğlu, 2006; Eroschenko, 2008; Akay, 2008).



Şekil 1.5 Kemik dokusunda yer alan hücreler (URL-5).

1.4.3 Osteositler

Kemik matriksi içinde hapsolmuş osteoblastların olgun formu ve tamamen oluşmuş kemikte bulunan esas hücrelerdir. Osteositler oyuk benzeri görünüme sahip lakün içinde bulunmakla birlikte kan damarlarına çok yakın konumda yer almaktadırlar. Yassı şeklinde bir yapıya sahip olan bu hücreler ince sitoplazmik uzantılara sahiptir. Bu uzantılar kanaliküli denilen küçük kemik kanalcıkları içinden geçerek her yönde ışınsal olarak yayılmakta ve komşu hücrelerin benzer uzantılarıyla gaj junctionlar aracılığıyla bağlantı kurmaktadırlar. Bu bağlantılar sayesinde iyonlar ve küçük moleküllerin hücreden hücreye geçişi sağlanmaktadır. Kanaliküller, damarlar etrafında kompleks bir bağlantı sistemi ve etkili bir alışveriş mekanizması oluşturmaktadırlar. Osteositlerin çekirdek ve sitoplazmik özellikleri osteoblastlara çok benzerdir. Osteositlerde golgi bölgesi daha az belirgin olmasına rağmen bazik boyalarda sitoplazma daha az boyanmaktadır.

Osteositler kemiğin diğer hücrelerine dönüşebilmektedir. Kemik kırılmaları esnasında osteositler ölmektedir ve osteositi çevreleyen kemik matriksi osteoklastlar tarafından reabsorbe edilmekle birlikte kemik yüzeyine yakın yer alan lakünler içindeki hücrelerden yenileri farklılaşarak osteositleri oluşturmaktadır (Öber ve İzzetoğlu, 2006; Eroschenko, 2008; Akay, 2008).

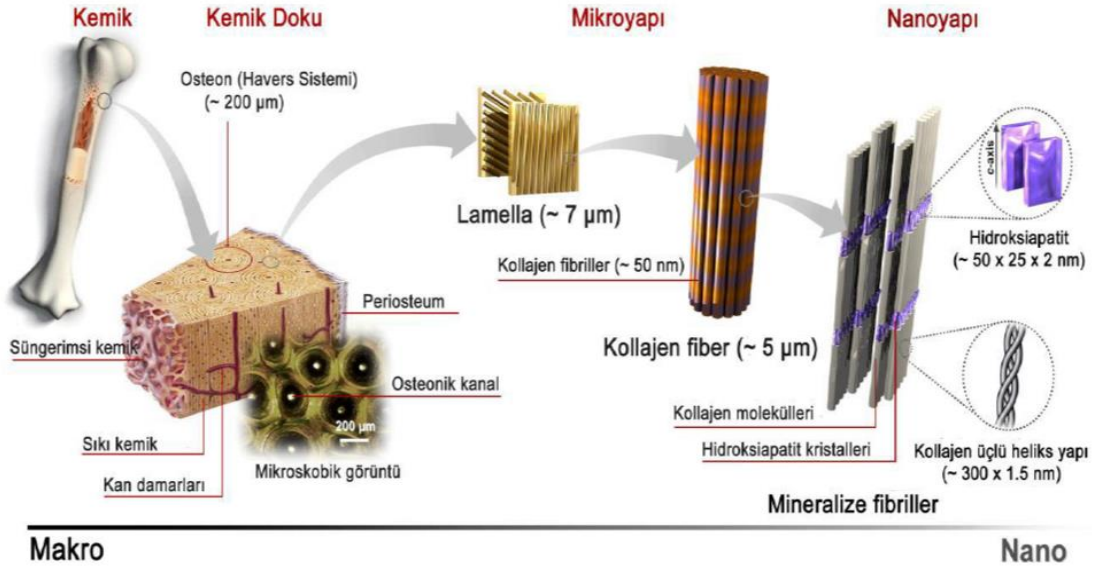
1.4.4 Osteoklastlar

Kemik sürekli olarak yıkıma uğrayan, yapısal gerilim ve vücudun kalsiyum gereksinimi gibi etkenlere bağlı olarak yeniden inşa edilen dinamik bir dokudur. Osteoklastlar, kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde çözünüp, çevre dokularca absorbe edilmesinden sorumlu olan hücrelerdir. Koloni uyarıcı faktör sayesinde mitoz aktivitesi artan hücreler birleşerek osteoklastları meydana getirmektedir. Özellikle kemik yıkımının olduğu bölgelere yakın bulunan 20-100 µm çapında ve 50' ye yakın çekirdeği bulundurabilen dev hücrelerdir. Osteoklastlar genellikle rezorbe edilmiş yüzeylerde ya da kemik matriksinin Howship lakünleri olarak isimlendirilen sığ oyuklarda yerleşik olarak bulunmaktadır. Osteoklastlar lizozomal aktivite açısından zengin hücrelerdir. Asit kollejenaz ve litik enzimleri salgılayarak matriks yapısını bozmaktadırlar. Yüzeylerinde koloni uyarıcı faktör, osteoklast uyarıcı faktör, kalsistonin, osteoprotegerin için reseptörler bulunmaktadır (Öber ve İzzetoğlu, 2006; Eroschenko, 2008).

Kemik dokusundan kalsiyumun kana salınmasında önemli rol oynayan osteoklastlar, kalsiyum derişiminin homeostatik düzenlenmesinde oldukça önemli görev almaktadırlar. Kandaki kalsiyum seviyesinin düzenlenmesi birbirine zıt çalışan parathormonu ve kalsitonin hormonları sayesinde olmaktadır. Parathormonu, kemik yıkımını uyararak kalsiyumun kana geçmesine neden olurken, kalsitonin hormonu kalsiyumun kemikte kalmasını baskılamaktadır (Akay, 2008; Eroschenko, 2008).

1.5 Kemik Doku Matriksi

Kemik matrisi, mekanik destek sağlayan kemik homeostazında önemli rol oynayan karmaşık ve organize bir yapıdan oluşmaktadır. Kemik organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir malzemedir. Kemiğin bileşimi işlevine, yaşa, diyete ve hastalığa bağlı olarak değişmektedir (Florencio-Silva vd., 2015; Johannesdottir ve Bouxsein, 2018; Fuchs vd., 2019).



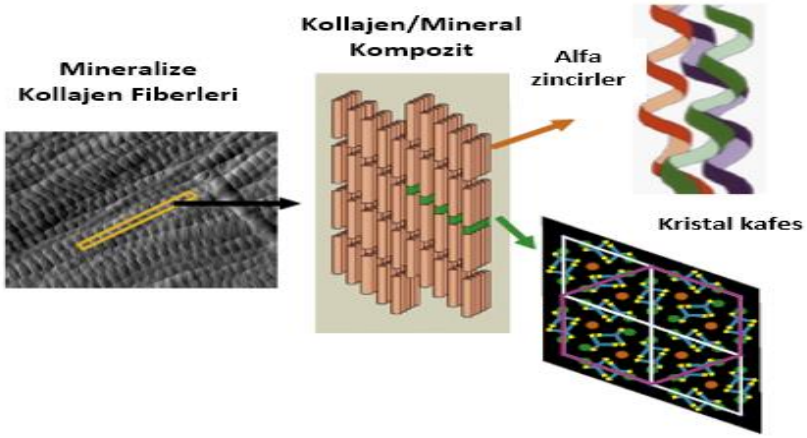
Şekil 1.6 Kemik doku matriksi (Topaloğlu vd., 2017).

1.5.1 Organik Matriks

Organik matriks, ıslak kemik ağırlığının %20'sini oluşturmakla birlikte kemiğin organik kısmının yaklaşık %90'ı tip I kollajendir. Kollajene ek olarak, organik matriksin %10'u proteoglikanlar, glikoproteinler ve osteokalsin gibi matriks bileşenlerinden oluşmaktadır. Kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanlar organik matriksin toplam kütlesine sadece küçük bir miktarda katkıda bulunurken, osteoblast farklılaşması, doku mineralizasyonu, hücre yapışması ve kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında birçok önemli fonksiyona hizmet etmektedir (Fuchs vd., 2019; Burr ve Allen, 2019).

1.5.1.1 Kollajen

Temel bir seviyede kemik, hem fibriller hem de mineral plakaları arasına serpiştirilmiş yüksek miktardaki tip I kollajen ve daha az miktarda bulunan tip III, V, X ve XII'den oluşmaktadır. Nanoyapısal düzeyde kemik, nanokristal hidroksiapatit ile mineralize edilmiş ve çapraz bağlanmış tip I kollajen matriksten oluşmaktadır. Tip I kollajen, kemiğin tüm kollajen içeriğinin yaklaşık %95'ini ve kemikte bulunan toplam proteinlerin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Kollajen, sert mineral yapıya esneklik ve süneklik kazandırmak üzere birleşmektedir (Henriksen ve Karsdal, 2016; Burr ve Allen, 2019; Fuchs vd., 2019).



Şekil 1.7 Kemiğin yapısında bulunan kollajen fibrilleri arasına serpiştirilmiş mineral tabakaları (Burr ve Allen, 2019)

Bir kollajen fibril, üçlü sarmal bir prokollojen molekülü oluşturan osteoblastlar içinde sentezlenen iki α1 ve bir α2 polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Prokollajen molekülü osteoblastlardan salgılanmakta ve daha sonra kollajen molekülleri kollajen fibrilleri oluşturmak için birleşmektedir. Bireysel kollajen fibrilleri daha sonra bir kollajen lifi oluşturmak için kendiliğinden birlikte gruplanmaktadır (Fuchs vd., 2019).

Kemik dokusu kollajen lifi düzenlenmelerine göre dokuma kemik ve lamelli kemik olmak üzere iki farklı tipte sınıflandırılabilmektedir. Dokuma kemiği çok sayıda osteoblast ve yan yana osteoprogenitör hücrelerin bulunduğu rastgele yönlendirilmiş kollajen liflerinden oluşmaktadır. Birim alan başına olgun kemikten daha fazla hücre içermesinin yanında gelişmekte olan fetüste ki ana kemik tipini oluşturmaktadır. Erişkinlerdeki ana kemik türü lameller kemik olmasına rağmen, dokuma kemik bölgeleri özellikle kemiğin yeniden şekillendiği erişkinlerde de mevcuttur. Lameller kemik polarize ışık mikroskobunda kolayca biriken kemiğin paralel çizgileri olarak tanımlanmaktadır. Biriktirme hızı yavaş olduğundan oluşan lameller kemik, iyi organize edilmiş bir kollajen lifi düzenine sahiptir (Safadi vd., 2009; Burr ve Allen, 2019; Fuchs vd., 2019).

1.5.1.2 Proteoglikanlar

Büyük moleküller olmakla birlikte kemik dokusunda kollajen olmayan moleküllerin %10' unu oluşturmaktadır. Proteoglikanlar değişken sayıda sülfatlanmış glikozaminoglikan yan zincirine kovalent olarak bağlanmış bir çekirdek protein

tarafından tanımlanan geniş bir molekül sınıfıdır. Kemikte bulunan proteoglikanlar, apatit çekirdeklenmesini ve büyümesini etkileyerek mineralleşmeyi düzenlemeye yardımcı olmaktadırlar (Hernandez-Gil vd., 2006).

Osteoid matriks dört farklı tipte proteoglikan molekülü içermektedir. Hyolüronan ve kondroitin sülfat, büyük moleküllerdir ve kemik morfogenezinin ilk aşamalarında yer almaktadır. Hyolüronan ve reseptörü CD44, iskelet gelişimini yönlendirmek için birlikte çalışmaktadır. Hyolüronan çoğunlukla periosteumda, kemiğin endokortikal yüzeyleri boyunca ve kemik matriksi içinde bulunan osteositlerin etrafında bulunmaktadır. Versikan ise, kıkırdak oluşumu için önemli olan kondroitin sülfat içeren bir proteoglikandır ve bu nedenle gelişmekte olan kemikte bulunmaktadır. Biblikan ve dekorin daha küçük moleküller olmakla birlikte kemik oluşumunun sonraki aşamalarında ortaya çıkmaktadır (Hernandez-Gil vd., 2006; Burr ve Allen, 2019).

1.5.1.3 Glikoproteinler

Kemikte çok sayıda glikoprotein bulunmakla birlikte en önemlileri; osteokalsin, osteonektin, alkalin fosfotaz ve Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid motifini içeren glikoproteinlerdir.

Osteokalsin, osteoblastlar ve osteositler tarafından sentezlenen küçük bir matriks proteinidir. Kalsiyumu bağlayan ve sentezi için K vitamini gerektiren bu matriks proteini kemik dokusunda kollajen olmayan matriks proteinlerinin %15'ini temsil etmektedir. 3 molekül karboksiglutamat içeren osteokalsin proteini kemik oluşumunun bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Osteokalsin kalsiyum bağlanmasını arttırarak kemik dokusunda mineral birikimini kontrol etmektedir (Hernandez-Gil vd., 2006; Burr ve Allen, 2019).

Osteonektin, kollajen tip I, kalsiyum ve hidroksiapatit için güçlü afiniteye sahip bir glikoproteindir. Kemik dokusunda kollajen olmayan proteinlerin %25'ini temsil etmektedir. Hidroksiapatit, kollajen ve vitronektine bağlanarak mineral kristallerinin çekirdeklenmesini teşvik etmektedir. Matriks ve hücreler arasındaki hücresel yapışmanın düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmekle birlikte kemikte normal

mineralizasyon için oldukça önemlidir (Hernandez-Gil vd., 2006; Burr ve Allen, 2019).

Alkalin fosfotaz, inorganik fosfatı fosforik esterlerden serbest bırakan, mineralizasyon için gerekli olan enzimdir. Alkalin fosfotaz kemik oluşumu için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Kemik dokusunda mineral kristallerine bağlanarak mineral birikimini önleyen pirofosfatları hidrolize etmektedir. Pirofosfatların kemikte nötralize edilmesi sonucu mineralleşme gerçekleşmektedir. Kemik minerali, zayıf kristal yapıya sahip karbonat apatitten oluşur. Apatit, delik bölgeleri adı verilen kollajen fibrilleri arasındaki boşlukta çekirdeklenmeye başlar ve kollajen fibrillerine paralel olarak hizalanarak yanal büyüyen disk benzeri bir yapı oluştururlar. Başlangıçta mineral, amorf kalsiyum karbonat iken kemik dokusunun olgunlaşması sırasında karbonat oranı azalarak mineral kristalleri kalsiyum fosfat şeklinde birikmektedir (Hernandez-Gil vd., 2006; Burr ve Allen, 2019).

SIBLING olarak da isimlendirilen N-bağlı glikoprotein temelde beş proteini içermektedir ve bunlar osteopontin, kemik sialoprotein, fibronektin, trombospondin ve vitronektindir. Bu glikoproteinler osteoblast ve osteoklast tarafından tanınan bir RGD sekansı ile kemik yenilenmesi ve yeniden yapılanma süreçleri için gerekmektedir. Ayrıca, hücrelerin hücre dışı matrikse yapışmasına izin veren sinyalleri aktive eden kemik hücresi yüzey reseptörleri olarak işlev görmektedir (Hernandez-Gil vd., 2006; Burr ve Allen, 2019).

Osteopontin, kemiğin hücre dışı matriksinde tespit edilen 34 kDa ağırlığında salgılanan bir fosfoglikoproteindir. Osteopontin osteoklastlar, osteoblastlar, kondrositler, makrofajlar, aktive edilmiş T-hücreleri, düz kas hücreleri ve epitel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanmaktadır. Kemik, böbrek, plasenta, düz kaslar gibi çeşitli dokularda bulunmaktadır. Kemik hücreleri, kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında fizyolojik olarak osteopontin salgılamaktadırlar. Osteopontinin osteoklastlardaki işlevi kemik rezorpsiyonu sırasında hücre yapışmasını ve kemotaksiyi teşvik etmektir. Ek olarak osteoblastik farklılaşmayı, proliferasyonu ve ALP aktivitesini arttırmaktadır (Jang ve Kim; 2006; Choi vd., 2008; URL-6).

Kemik sialoprotein osteoblast ve osteoklast benzeri hücreler tarafından sentezlenen asidik, fosforile edilmiş bir glikoprotein olmakla birlikte kemik, dentin, ve kalsifiye kıkırdak gibi mineralleşmiş dokuların bir bileşenidir. Kemik sialoproteininin kemik hücre dışı matrisinin önemli bir bileşeni olduğu ve kemikte bulunan tüm kollajen olmayan proteinlerin yaklaşık %8'ini oluşturduğu bilinmektedir. Bir SIBLING protein olan kemik sialoproteininin işlevi tam olarak anlaşılmamasına rağmen, in vitro olarak kalsiyum ve fosfat iyonlarının hızlı ve kendiliğinden birleşmesi için esnek bir şablon görevi görerek hidroksiapatit kristallerinin büyümesine ve çekirdeklenmesine aracılık ettiği düşünülmektedir. Dolaşımda az miktarda bulunmasından dolayı kemik sialoproteini potansiyel bir kemik biyobelirtecidir (Cremers vd., 2008; URL-7).

Fibronektin hücre dışı matrisin bir bileşenidir ve integrin ile etkileşimi osteoblast farklılaşmasının erken evrelerinde gereklidir. Fibronektin hücre yüzeyi reseptörlerinin integrin ailesine bağlanarak birçok biyolojik işlemi düzenlemektedir. Fibronektin molekülündeki RGD'den başka bir sekansa bağlanan ve ayrıca bazı osteoblastik hücreler tarafından eksprese edilen fibronektin reseptörü, $a_4\beta_1$ ekspresyonu ile de iyi bir şekilde ilişkilidir. Fibronektin-$\alpha_4\beta_1$ bağlanmasının aracılık ettiği hücre-matriks etkileşimleri, osteoblastik soydaki hücrelerin olgunlaşma dizisinde rol oynamaktadır (Robey, 2008; Lee vd., 2015).

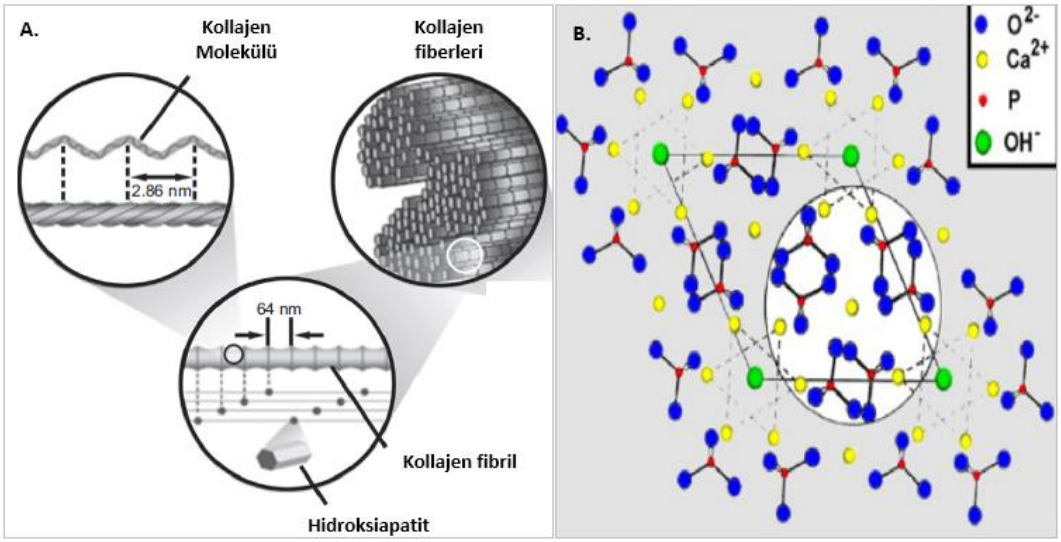
Trombospondinler, çok sayıda matris proteinine ve hücre yüzey proteinine bağlanma dahil olmak üzere birçok aktiviteye sahiptir. Trombospondin-1 ve Trombospondin-2, kemik oluşumunun erken evrelerinde ve kıkırdak gelişimi sırasında mezenkimal kök hücreler ve kondrositler tarafından sentezlenmektedir. Osteoblastlar kıkırdak dokusunun yerini aldıkça, trombospondin-2 ekspresyonu kondrositlerde azalarak kemikleşen bölgelerdeki matrikste artmaktadır. Trombospondin-1 ve trombospondin-2 güçlü antianjiyogenik faktörlerdir bu nedenle kemik oluşturmada kan damarı organizasyonunun kontrolünde de rol oynamaktadırlar (Burr ve Allen, 2015).

Vitronektin, integrin α_v-β_3'e bağlanarak hücre yapışmasını ve yayılmasını desteklemektedir. Hücre dışı matrikste tek bir zincir formunda veya bir disülfit bağı ile bir arada tutulan, iki zincir formunda bulunmaktadır. Ayrıca vitronektinin hemostaz ve tümör malignitesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Robey, 2008).

1.5.2 İnorganik Matriks

Kemik dokusunda bulunan inorganik matriks ağırlıklı olarak fosfat ve kalsiyum iyonlarından oluşmaktadır. Bununla birlikte az miktarda olmak üzere sodyum, potasyum, sitrat, magnezyum, florit ve çinko gibi bileşiklerde inorganik matriks içerisinde yer almaktadır (Florencio-Silva vd., 2015).

Kemik minerali kollajen fibrillerinin uçları arasındaki boşluk bölgeleri boyunca çekirdeklenme gösteren zayıf kristalli karbonatlı apatit mineralinden oluşmaktadır. Kalsiyum fosfat iyonları [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] kimyasal formülü ile temsil edilen hidroksiapatit kristallerini oluşturmak üzere çekirdeklenmektedir. Mineral başlangıçta çok miktarda kalsiyum karbonat ile birlikte amorf bir kalsiyum fosfat olarak biriktirilmektedir. Kemik dokusu olgunlaştıkça karbonat içeriği azalmakta ve mineral kristaller yanal olarak büyümektedir. En son evrede ise kalsiyum fosfat ya çok ince plakalar ya da 13-30 A^0 kalınlığında, yaklaşık 400 A^0 uzunluğunda çubuk şekilli kristaller halinde kollajen fibrillerine paralel olarak yönlenmektedir. Bu yönelim, kollajenin gerilme kuvvetlerine ve kalsiyum hidroksiapatitlerin basınç kuvvetlerine karşı direncini maksimuma çıkarmaktadır (Akay, 2008; Safadi vd., 2009; Florencio-Silva vd., 2015; Burr ve Allen, 2019).



Şekil 1.8 Kemik dokusunda bulunan hidroksiapatit. A. Kollajen fibrillerinin uçları arasındaki boşluk bölgeleri içinde yer alan hidroksiapaptit (Fuchs vd. 2019). B.Hidroksiapaptit mineralinin kimyasal yapısı (Johannesdottir ve Bouxsein, 2018).

Kemik dokusunda sitrat iyonu $(C_6H_5O_7)^{-3}$ ve karbonat iyonu $(CO_3)^{-2}$ önemli miktarlarda bulunmaktadır. Sitrat, kristallerin yüzeyinde bulunurken; apatit kristalleri şeklinde bulunan karbonatın yeri tam olarak bilinmemektedir. Florür iyonu da (F^-) kemikte apatit kristallerinde yer almaktadır. Ek olarak vücut sıvılarının normal elementlerinden olan magnezyum ve sodyum da kemiğin inorganik matriksinde yer almaktadır (Akay, 2008).

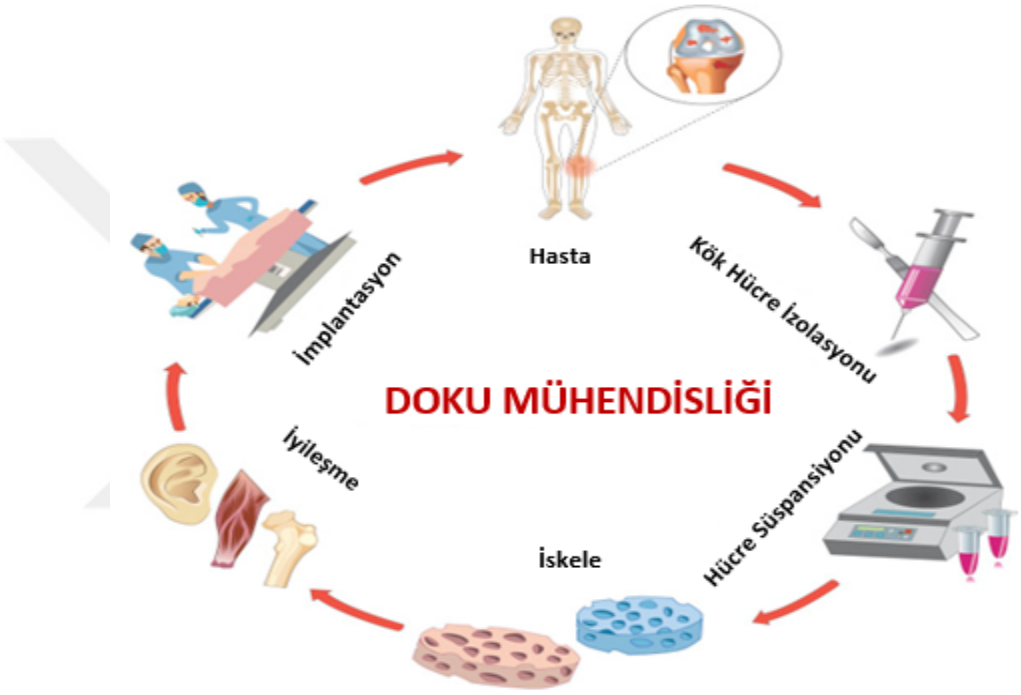
2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kemik, bir yaralanmadan sonra kan damarlarının, hücrelerin ve hücre dışı matrisin dahil olduğu bir yanıt oluşturmaktadır. Travmanın ardından, kırmızı kan hücreleri, trombositler ve fibrin ile iltihaplı bir yanıt ve hematom oluşmaktadır. İnflamasyon fazında hasarlı, nekrotik dokular yok edilerek inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler anjiyogenezi uyarır. Travma bölgesindeki kemikte bulunan mezenkimal ve osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar, endosteal yüzeydeki osteoblastlar çoğalarak kallus dokusu oluşumunu sağlar. İşlem temel olarak kemik oluşturan hücrelerin kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşması, matris benzeri osteoidi salgılaması ve fibröz kallusun aşamalı olarak değiştirilmesi ile gerçekleşmektedir. Kırık uçları arasında santral bölgede ve periostumun dış kısmında daha çok fibröz ve kıkırdak dokudan oluşan yumuşak kallus meydana gelir. Kıkırdak matriksin mineralizasyonu, kondrositlerin apoptozu, damarlanma, osteoblastların çoğalması ile sert kallusa dönüşür. Sert kallus dokusu stabiliteyi sağlayan bir yapı olmasına karşın normal kemiğin biyomekanik özelliklerine sahip değildir. Son aşamada sert kallusu lamellar kemiğe dönüştüren yeniden şekillenme süreci ise kırık onarımının 3–4. haftalardan itibaren başlayarak klinik iyileşme sonrasında yıllarca devam edebilir (Hernandez-Gil vd., 2006; Tanrıkulu ve Gönen, 2017; Qui vd., 2019).

Kemik defekti yaygın bir klinik defekttir ve travma, kemik tümörleri, dejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar gibi çeşitli nedenlerden dolayı oluşmaktadır. Küçük kemik defektleri (genellikle 8 mm'den az) kendilerini iyileştirebilirken kemik defektleri çok büyük olduğunda veya daha küçük kemiklerde meydana geldiğinde kendiliğinden tamamen iyileşmesi oldukça zordur.

Langer ve Vacanti tarafından tanımlandığı gibi doku mühendisliği, doku işlevini geri kazandıran koruyan veya geliştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ilkelerini ve yaşam bilimlerini uygulayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Klasik biyomalzeme yaklaşımının aksine, doku oluşumu ve yenilenmesi anlayışına dayanır ve sadece yeni yedek parçalar yerleştirmek yerine yeni fonksiyonel dokular oluşturmayı amaçlamaktadır. Araştırmacı, bu amacı fizik, kimya,

mühendislik, malzeme bilimi, biyoloji ve tıptan elde edilen bilgileri entegre bir şekilde birleştirerek gerçekleştirmektedir Doku mühendisliği, hastalık veya travma nedeniyle zarar görmüş dokuların yapısını ve işlevini eski haline getirmek için iskelelerin, biyomoleküllerin veya hücrelerin kullanılmasını içermektedir. Doku mühendisliği alanı içinde kemik doku mühendisliği en gelişmiş ve kapsamlı araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır (Langer ve Vacanti, 1993; Kneser vd., 2006; Baldwin vd., 2017).



Şekil 2.1 Doku mühendisliği (URL-10).

Paslanmaz çelik veya titanyum implantlar, defekt bölgesini dengeleyerek mekanik yük taşımasına izin vermektedir. Bununla birlikte, bu yaklaşımın ana sınırlamaları implantların emilebilir olmamasıdır. İmplantasyon için amaçlanan materyaller geçmişte "biyolojik olarak inert" olacak şekilde tasarlanırken, bilim insanları şimdi biyolojik moleküller veya hücrelerle bütünleşen ve dokuları yeniden oluşturan kasıtlı olarak "biyolojik olarak aktif" materyallerin tasarımına yönelmiş bulunmaktadır. Biyolojik açıdan bakıldığında uygun kemik dokusunu oluşturabilmek için hücrelere, hücre dışı matrikslere, hücreler arası iletişimlere, hücre-matriks etkileşimlerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, kemik üç boyutlu (3B) konfigürasyona sahiptir ve hücreler in vitro ortamda 3B tarzında büyümemektedir. Bu

nedenle kemik yapısını taklit eden 3B bir iskele, kullanılmalıdır. Kemik doku mühendisliğinde başarılı bir sonuç elde etmek için, bu tek hücre bileşenlerinin hepsinin iyi koordine edilmiş mekansal ve zamana bağlı bir şekilde birleştirilmiş olması gerekmektedir (Bashutski vd., 2009; Black vd., 2015; Baldwin vd., 2017).

Kemik biyobelirteçleri, kemik iyileşmesinin farklı evrelerinde, erken kemik hücresi tepkimeleri ile başlayan, ardından kemik matrisi biriktirme ve son olarak matris mineralizasyonu ve yeniden şekillendirmesi ile devam eden kemik hücresi aktivitesinin yan ürünleri olarak oluşturulmaktadır. Kemik oluşum belirteçleri osteoblastlardan, özellikle osteoid sentezi sırasında elde edilmekle birlikte en sık olarak toplam ALP aktivitesi, B-ALP (Kemik spesifik Alkalin Fosfotaz) aktivitesi osteokalsin ve prokollajen tip I konsantrasyonlarının ölçümünü içermektedir. Kemik biyobelirteçlerini tanımlamanın faydası, sadece kemik yenilenmesini değerlendirmenin doğruluğunu arttırmakla kalmaz, aynı zamanda başarılı sonuçların erken tespit edilmesini de sağlamaktadır (Albeshri vd., 2018).

2.1 Kemik Büyümesi İçin Geçici Matriksler

Matriks, in vivo ortamda hücreler için dokuya özgü bir ortam ve mimari sağlayan 3B iskeledir. Ayrıca, su, besin maddeleri, sitokinler, büyüme faktörleri için bir rezervuar görevi görmektedir. Bu anlamda, kemik dokusunu ve işlevini yeniden oluşturabilmek için yeni kemiksi doku tamamen onarılıncaya kadar ortaya çıkan kemik büyümesi, hücre çoğalması ve hücre dışı matriks birikimi için geçici bir matriks görevi görecek bir iskeleye ihtiyaç duyulmaktadır (Kneser vd., 2006).

Bununla birlikte kemik doku mühendisliği için kullanılacak olan biyomalzemenin, doku mühendisliği amaçlarını uygun kılan bir dizi özelliğe sahip olması gerekmektedir. Malzeme seçiminin yanı sıra, malzemelerin makro ve mikro yapısal özellikleri oldukça önemlidir. Bu özellikler sadece hücrenin hayatta kalmasını, sinyal vermesini, büyümesini, çoğalmasını ve yeniden düzenlenmesini değil aynı zamanda gen ekspresyonlarını ve fenotiplerinin korunmasını etkilemektedir (Leong vd., 2003).

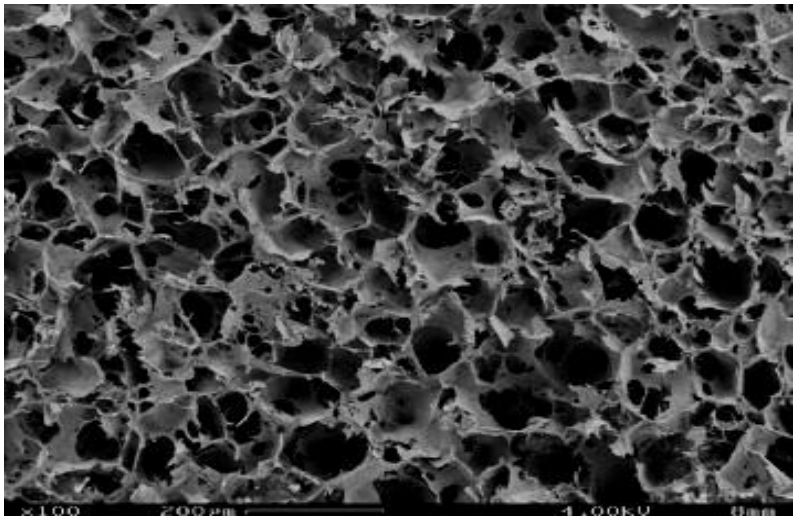
2.1.1 Doku İskelelerinin Temel Özellikleri

2.1.1.1 Biyouyumluluk

İskeleler, bir bağışıklık tepkisi göstermeden konakçının dokusuna iyi bir şekilde entegre olabilmelidir. İstenmeyen bir immün reaksiyonu ortaya çıkarmamalı ve toksik yan ürünler üretmeden parçalanmalıdır. Ayrıca kemik iliğinin yeniden şekillenmesini ve onarımını da desteklemelidirler (Yang vd., 2001; Leong vd., 2003).

2.1.1.2 Gözeneklilik

İskeleler, gözenekli yapı boyunca hücrenin büyümesine ve hücre dağılımına olanak sağlayacak şekilde yapının çevresindeki neovaskülarizasyonu kolaylaştırmalı ve geniş yüzey alan hacmine sahip tamamen birbirine bağlı bir geometriye sahip olmalıdır. Gözeneklilik ve ara bağlantı noktaları, besinlerin ve gazların doğru bir şekilde difüzyonu ve bu arada iskele içinde büyümüş olan hücrelerin aktivitesinden kaynaklanan metabolik atıkların giderilmesi için oldukça önemlidir. Bu, kemik doku mühendisliği için özel bir öneme sahiptir, çünkü kemik metabolik özelliklerinden dolayı in vitro kültür koşullarında bile yüksek kütle transfer oranları gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte, gözeneklilik derecesi her zaman, mekanik stabilitesi gibi iskelelerin diğer özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle dokunun mekanik ihtiyaçları ile dengelenmesi gerekmektedir. Ek olarak gözenek boyutu da diğer önemli bir konuyu oluşturmaktadır. Eğer kullanılan gözenekler küçükse hücrelerin çoğalmasını takiben gözenekler tıkanacak ve bu durum hücresel penetrasyonu, hücre dışı matris üretimini ve iskelenin iç alanlarının neovaskülarizasyonunu önleyecektir. Kemik dokusu mühendisliği için gözenek boyutunun 200-900 μm aralığında olması gerektiği kabul edilmektedir (Maquet ve Jerome, 1997; Vunjak-Novakovic, 1998; Burg vd., 2000; Salgado vd., 2004).



Şekil 2.2 Gözenekli iskele yapısı (Gelinsky vd., 2008)

2.1.1.3 Mekanik özellikler ve biyobozunurluk

İn vitro olarak iskeleler, hidrostatik basınçlara dayanabilmek ve hücre büyümesi ile matris üretimi için gerekli boşlukları korumak için yeterli mekanik kuvvete sahip olmalıdır. Kemik her zaman stres altında olduğundan, implante edilen yapının mekanik özellikleri ideal olarak doğal kemik dokusu ile eşleşmelidir. Ayrıca iskelelerin bozunma hızı, dokunun büyüme hızına uygun bir şekilde ayarlanmalı, öyle ki yaralanma bölgesi tamamen yenilendiğinde, iskele tamamen bozunmalıdır (Langer ve Vacanti, 1993; Hutmacher, 2000; Leong vd., 2003).

2.1.2 İşleme Teknikleri

Kemik doku mühendisliği için kullanılacak malzemenin seçiminden sonraki adım, uygun bir işleme tekniğinin geliştirilmesi veya seçilmesidir. Kemik doku mühendisliği için yeterli özelliklere sahip iskeleler üretmek amacıyla kalıba dökme partikül uzaklaştırma, dondurarak kurutma, faz ayrımı, elyaf bağlama, erime bazlı teknolojiler, yüksek basınç bazlı yöntemler gibi bir dizi işlem tekniği geliştirilmiştir. Seçilen işleme tekniğinin, tüm iskele özelliklerinin biyouyumluluk ve kimyasal özellikler gibi malzemelerin özelliklerini olumsuz yönde etkilemediğinden emin olunmalıdır. İşleme tekniği gözeneklilik, gözenek büyüklüğü, gözenek dağılımı ve ara bağlantı özellikleri bakımından doğru ve tutarlı olmalıdır. Farklı iskele grupları, aynı işlem parametreleri

ve koşul kümesinde işlendiklerinde özelliklerinde minimum değişiklikler göstermelidir (Leong vd., 2003; Salgado vd., 2004).

İlk olarak Mikos ve arkadaşları tarafından tarif edilen kalıba dökme partikül uzaklaştırma yöntemi kemik doku mühendisliği yapı iskelelerinin hazırlanması için muhtemelen en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan yöntemlerden birisini oluşturmaktadır. Bu yöntem, polimer bir çözelti içerisindeki kalibre edilmiş mineral (sodyum klorür, sodyum sitrat vb.) veya organik (sakkaroz) parçacıklarından oluşmaktadır. Bu dispersiyon daha sonra, gözenekli iskeleler üretmek için döküm ya da dondurarak kurutma yoluyla işlenmektedir. Sonunda tuz parçacıkları, gözenekli bir polimer matrisi üretmek için seçici çözünme ile ayrılmaktadır. Gözeneklilik, kullanılan porojen/polimer oranına ve kullanılan kristallerin boyutundaki gözenek büyüklüğüne bağlı olarak değiştirilebilmektedir. Bu metodoloji kullanılarak birbiri ile bağlantılı yüksek gözenekliliğe sahip iskeleler elde edilebilmektedir (Mikos vd., 1994; Agrawal vd., 2000; Murphy vd., 2002).

2.2 Kemik Doku Mühendisliği için Hücre Kaynakları

İstenilen gözenekli yapının geliştirilmesinden sonraki adım, izolasyonlarına ve yüksek pasaj sayılarına kolayca ulaşabilen uygun hücre kaynağının seçimidir. İdeal bir hücre kaynağı, yüksek pasajlara kolayca ulaşabilen, immünojenik olmayan, ve rejenere edilecek dokuya benzer bir protein ekspresyon yeteneğine sahip olmalıdır. Kemik doku mühendisliğinde primer osteoblastlardan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine kadar değişen hücre kaynakları kullanılmış ve bugüne kadar hayvan modellerinde birçok başarıya ulaşılmıştır (Heath, 2000; Salgado vd., 2004; Stevens, 2008).

2.3 Dinamik Kültür: Biyoreaktörler

Kemik yüksek yapılandırılmış mekanik olarak aktif 3B bir dokudur. Osteoblastların gerçek biyolojik ortamı, mekanik kuvvetler altında yaşayan aktif hücreler ve sürekli değişen bir 3B matris mimarisi arasındaki dinamik bir etkileşimden türetilmektedir. Doku mühendisliği ürünlerinin in vitro olarak geliştirilmesi için, in vivo ortamın dinamiklerini taklit eden yeterli hücre/iskele kültürü sistemlerine ihtiyaç

duyulmaktadır. Günümüzde doku mühendisliği uygulamalarında döner kaplar (spinner flask) ve döner duvar hazneli (RWVR) biyoreaktör sistemleri tercihen kullanılmaktadır. Döner kaplarda iskeleler, şişenin kapağından sarkan iğnelere tutturulmakta ve manyetik bir karıştırıcı çubuk tarafından oluşturulan konvektif kuvvetler, iskeleleri çevreleyen ortamın sürekli karışmasını sağlamaktadır. Döner duvar hazneli biyoreaktör sisteminde ise hücrelerin mikro gravite durumunda kalmasını sağlanmakla birlikte düşük bir akışkan kayma gerilimi sunmaktadır. Mikro-gravite durumunda hücre/yapı iskelelerinde hücre birikmesi önlenerek hücresel etkileşimleri teşvik edilmektedir (Bancroft, 2002; Sikavitsas vd., 2002; Franceschi ve Xiao, 2003).



Şekil 2.3 Döner kap ve döner duvar hazneli (RWVR) biyoreaktör sistemleri (URL-11)

3. KEMİK ONARIMI İÇİN BİYOMALZEMELER

Kemik söz konusu olduğunda, malzemeler tercihen osteoindüktif (progenitör hücrelerin bir osteoblastik soydan aşağı doğru farklılaşmasını destekleyebilmeli), osteokondüktif (kemik büyümesini ve çevre kemik dokunun büyümesini destekleme) ve osteointegrasyon (çevre kemiğe entegre olma) kabiliyetine sahip olmalıdır. Otolog veya allojenik kemiğe olan ihtiyacı ortadan kaldırmak için amaçlanan birçok kemik ikamesi materyali son 20 yılda değerlendirilmiş olup genel olarak, bunlar biyoaktif seramikler, doğal veya sentetik polimerler veya bunların kompozitlerinden oluşmaktadır (Stevens, 2008; Black vd., 2015; Lyles vd., 2015; Baldwin vd., 2017; Boyan vd., 2017; Qui vd., 2019).

3.1 Polimerler

Kemik dokusu mühendisliği için birçok polimerik malzeme türü kullanılmıştır. Polimer malzemeler doğal polimerler (kollajen, hiyolüronik asit, fibrin vb) ve sentetik polimerler (polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) olarak sınıflandırılabilmektedir. Kollajen ve hiyalüronik asit gibi doğal polimerler doku mühendisliği için hücre bağlanmasını ve kemotaktik tepkileri destekleyerek hücrelere doğal biyolojik bilgi rehberliği sağlamaktadır. Sentetik polimerler, mukavemet, kontrol edilebilir bozunma oranı gibi özelliklere sahiptir. Bu nedenle sentetik biyobozunur polimerler, doku mühendisliği yapı iskeleleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Hench ve Polak, 2002; Stevens, 2008).

3.1.1 Kollajen

Hücre dışı bağ dokusu matriksi, yapısal bütünlüğü ve çeşitli fizyolojik fonksiyonları tanımlayan çeşitli protein ailelerinin değişken elemanlarının kompleks bir karışımını içermektedir. Hücre dışı matriks kompozisyonu ve yapısı, farklı bağ doku tipleri arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Yapısal proteinlerin ve glikoprotein bileşenlerinin dokuya özgü ekspresyonu ve sentezi, farklı lokasyonlarda benzersiz fonksiyonel ve biyolojik karakteristiklere neden olmaktadır. Hücre dışı matristeki en bol bulunan proteinler, kollajen ailesinin üyeleri olmakla birlikte tendonların, bağların,

korneanın ve kemiğin organik bileşenlerinin çoğunu oluşturmakta ve cilt, kan damarları ve insan vücudundaki çoğu hücre dışı matrikste yer almaktadır. Dokuya mekanik stabilite, güç ve tokluk sağlamaktadır. Kemik ve dentin gibi özel dokularda ise minerallerin katılımı ile sertlik kazanmaktadır (Gelse vd., 2003; Correlo vd., 2011; Wagermaier ve Fratzl, 2016; Sheehy vd., 2018).

Kollajen, denizanası ve mercan gibi ilkel hayvanlarda evrimin ilk aşamasında ortaya çıkmıştır. Hücre dışı matriks bağ dokusunda en bol bulunan yapısal proteindir ve vücuttaki hücre bağlanması için doğal yapı iskelesi görevi görmektedir. İnsanlarda, kollajen toplam proteinin üçte birini ve cildin kuru ağırlığının dörtte üçünü oluşturmaktadır (Lee vd., 2001; Shoulders ve Raines, 2009; Correlo vd., 2011; Sorushanova vd., 2017).

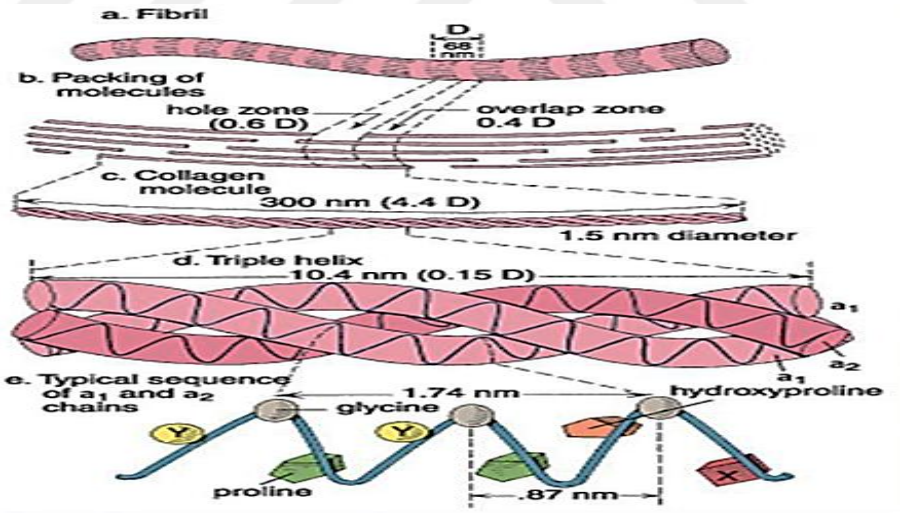
Kollajen, üç polipeptid zincirinin karakteristik üçlü bir sarmalı oluşturan yapıdan oluşmaktadır. Kollajen ailesinin tüm üyeleri, hücre dışı matrikste bu supramoleküler yapıları oluşturmaktadır. Ancak bunların büyüklüğü, fonksiyonu ve doku dağılımı önemli ölçüde değişebilmektedir. Şimdiye kadar genetik olarak farklı 29 kollajen tipi tanımlanmıştır. Hücre dışı matrikste bulunan kollajen tipleri farklı dokularda değişiklik göstermektedir. Örneğin, kollajen tip I kemik ve tendonda bulunurken, kollajen tip II kıkırdakta bulunmaktadır (Gelse vd., 2003; Shoulders ve Raines, 2009; Wagermaier ve Fratzl, 2016; Sheehy vd., 2018).

Farklı kollajen tipleri, yapıları, ekleri, heliksel olmayan alanların varlığı ve işlevleri bakımından önemli karmaşıklık ve çeşitlilik ile ilişkilendirilmektedir. Toplam kollajenin yaklaşık %90'ına sahip en bol ve en yaygın kollajen ailesi, fibril oluşturan kollajenlerle temsil edilmektedir. Tip I ve V kollajen fibrilleri kemiğin yapısal omurgasına tip II ve XI kollajenleri ise ağırlıklı olarak eklem kıkırdağının fibriller matrisine katkıda bulunmaktadır. Burulma stabiliteleri ve çekme dayanımları, bu dokuların stabilitesine ve bütünlüğüne yol açmaktadır. IX, XII ve XIV tipleri gibi kesik üçlü fibril ile ilişkili kolajenler, büyük kollajen fibrillerine sahip tek moleküller olarak birleşmekte ve muhtemelen kollajen fibrillerinin çapını düzenlemede rol oynamaktadır. Bu kolajen fibrilleri, bütün bağ dokularının ana yapısal elemanlarıdır ve dokuların ve organların mekanik stabilitesine katkıda bulunmaktadır. Fibril

oluşturan kollajenlerin burulma stabilitesi ve gerilme direnci, kemik, tendon ve ligament gibi dokuların stabilitesine ve bütünlüğüne yol açmaktadır. Biyomekanik rolüne ek olarak, morfogenez, onarım ve tadilat gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır (Gelse vd., 2003; Sheehy vd., 2018).

3.1.1.1 Kollajenin yapısı

Kollajen eşsiz bir yapıya, boyuta ve amino asit dizisine sahiptir. Kollajen molekülleri, moleküler yapıları nedeniyle bir araya toplanan üç polipeptit zincirinden oluşmakla birlikte yaklaşık 300 nm uzunluğunda ve 1,5 nm çapındadır. Bu üç polipeptit zinciri bir çok hidrojen bağı ile stabilize edilmiş bir kuaterner yapı olan "süper sarmal" halinde bir araya getirilmektedir. Her zincirin zıt yönlerde ayrı bir bükümü bulunmaktadır. Bir kollajen üçlü sarmalındaki her bir polipeptit zinciri, bin kadar amino asit kalıntısı içermektedir (Lee vd., 2001; Parenteau-Bareil vd., 2010; Chattopadhyay ve Raines, 2014; URL-8).



Şekil 3.1 Kollajenin yapısı (URL-12)

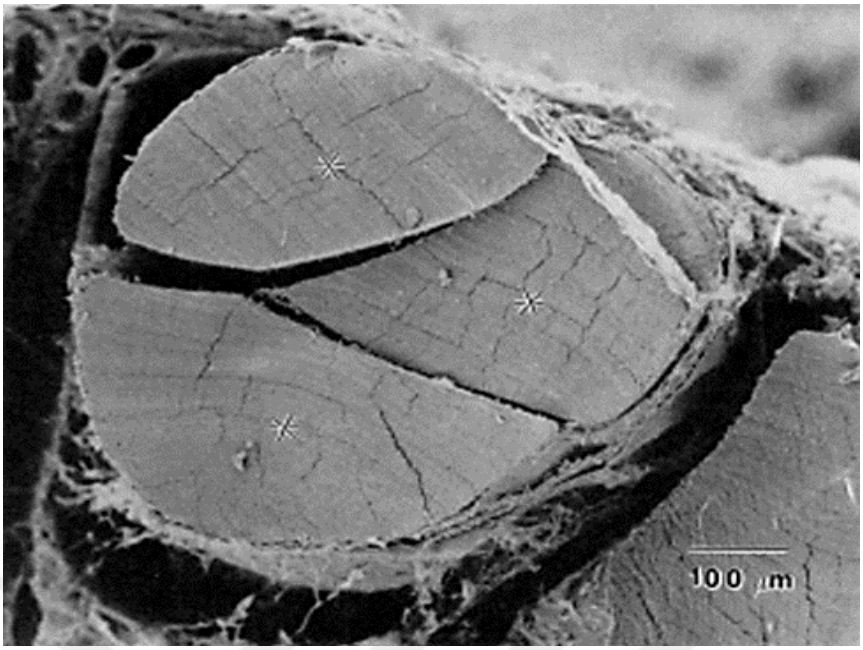
Kollajen Gly-X-Y dizisini içeren binden fazla amino asitten oluşmaktadır. X ve Y konumları çoğunlukla prolin (Pro) ve 4-hidroksiprolin (Hyp) ile doldurulmaktadır. Gly-Pro-Hyp, kollajendeki en yaygın üçlüdür. Kollajenin sarmal yapısında oluşmasını etkileyen temel özellik, yüksek miktarda glisin (Gly) ve amino asit içeriğidir. Kollajenin yüksek Gly içeriği, kollajen liflerinin molekül içinde çok yakın bir şekilde birleşmesine izin vermekte böylelikle hidrojen bağlanmasını ve moleküller arası

çapraz bağların oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bu tür düzenli tekrarlama ve yüksek Gly içeriği, ipek fibroini gibi sadece birkaç başka lifli proteinde bulunmaktadır. Glisin, yan zinciri olmayan en küçük aminoasit olduğundan, lifli yapısal proteinlerde benzersiz bir rol oynamaktadır (Shoulders ve Raines, 2009; Parenteau-Bareil vd., 2010; Silver vd., 2018; URL-8).

3.1.1.2 Kollajenin biyomalzeme olarak kullanımı

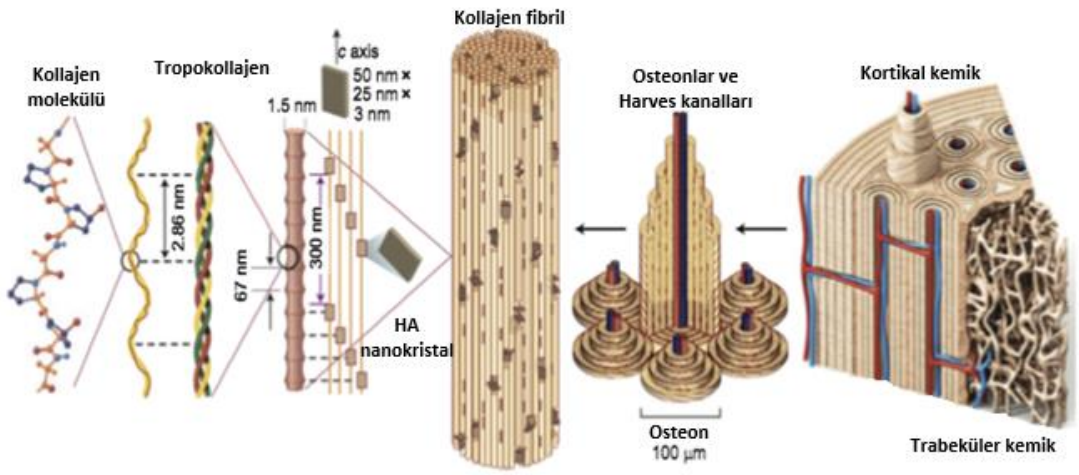
Geleneksel sentetik malzemelerle karşılaştırıldığında doğal polimerler, hücre bağlanmasını destekleyen ve kemotaktik tepkileri destekleyen üstün kimyasal özellikler, çok yönlülük, mükemmel biyobozunurluk ve gelişmiş biyolojik performans sergilemektedir. Kollajen, doğal biyouyumluluk ve biyobozunurluk nedeniyle 1881'den beri tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Süngerler, lifler ve boncuklar dâhil olmak üzere çeşitli şekillerde hazırlanabilmektedir. Kollajen, asitli sulu ortamlarda sulu bir çözelti halinde çözünebilmektedir (Lee vd., 2001; Correlo vd., 2011; Chattopadhyay ve Raines, 2014; Rodriguez vd., 2019).

Çeşitli kollajen tiplerinden sadece birkaçı, kollajen esaslı biyomalzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Fibriller kollajenler tropokollajen üçlü heliksleri, lif oluşturmak üzere fibrillere birleşmektedir. Bu fibril oluşturucu kollajenler, büyük homolog sekans bölümlerine sahip olmakla birlikte yara iyileşmesi ve doku mühendisliği amaçları için en yaygın kullanılan kollajen esaslı biyomalzeme formlarını oluşturmaktadır. Tip I kollajen, hayvanlarda en bol bulunan tiptir ve tıpta sıklıkla kullanılmaktadır. Kollajen hemen hemen her canlı hayvanda çeşitli dokulardan ekstrakte edilebilmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan kollajen için bazı yaygın kaynaklar arasında sığır derisi, sıçan kuyruğu tendonları ve domuz derisi bulunmaktadır (Parenteau-Bareil vd., 2010; Chattopadhyay ve Raines, 2014; Sheehy vd., 2018; Rodriguez vd., 2019).



Şekil 3.2 Sıçan kuyruk tendonu elektron mikroskobu görüntüsü (Silver vd., 2018)

Kollajenin üçlü sarmal yapısı, enzimler tarafından parçalanmasını önlemekte ve hücre dışı matriksin uygun şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır. Demineralize kemik kollajen, kendi başına veya hidroksiapatit ile kombinasyon halinde kemik greft materyali olarak kullanılmıştır. Demineralize kemik kollajeninin hidroksiapatit ile kombinasyonu sonucu elde edilen malzemenin halinde mükemmel bir osteoindüktif malzeme olduğunu ve bir kemik ikamesi olarak kullanılabileceği görülmüştür (Lee vd., 2001; URL-8).



Şekil 3.3 Kemik yapısında yer alan kollajen molekülünün yapısı (Rodriguez vd., 2019)

3.1.1.3 Kollajenin biyouyumluluğu

Kollajen biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük immünojeniklik, hücresel bağlanma, büyümeyi destekleme kabiliyeti, çekme dayanımı ve su ile afinitesi gibi bazı önemli özelliklere sahiptir. Doku ve organların oluşumunda ve hücrelerin çeşitli fonksiyonel ifadelerinde rol oynamaktadır. Bağışıklık tepkisi göstermeden, konak dokusuna iyi bir şekilde entegre olabilmekte ve istenmeyen bir immün reaksiyon veya toksik yan ürünler üretmeden parçalanabilmektedir. Ayrıca polipetit omurgası boyunca fonksiyonel grupların bolluğu onu büyüme faktörlerinin ve diğer biyolojik moleküllerin bağlanmasına karşı oldukça duyarlı hale getirmektedir. Bu özellikleri doku mühendisliği yapı iskelelerinde kollajenin bir biyomalzeme olarak sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır (Chattopadhyay ve Raines, 2014; Rodriguez vd., 2019).

3.1.1.4 Kollajenin biyobozunurluğu

Doğal üçlü sarmallar, pepsin, tripsin veya kimotripsin gibi proteazlara karşı dirençleri ile karakterize edilmekte ve sadece spesifik kollajenaz tipleri ile bozulabilmektedir. İnterstisyel kollajenaz olan Kollajenaz A (MMP-1), çok çeşitli hücreler tarafından eksprese edilmekle birlikte MMP-1 doku remodelinginde yara iyileşmesi sırasında merkezi olarak yer aldığı düşünülmektedir. Kollajenaz B (MMP-8) ise nötrofil granülositlerine büyük ölçüde spesifiktir ve bu nedenle doku tahribatında akut enflamatuar süreçler sırasında yer aldığı düşünülmektedir. Kollajenaz C (MMP-13), kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar ile ifade edilmekte ve bu nedenle büyük olasılıkla kıkırdak ve kemik tadilatında önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek biyouyumluluk ve endojen kollajenlerin iç biyolojik parçalanabilirliği, ekzojen kollajenin biyomedikal uygulamalarda kullanımını ideal kılmaktadır. Ek olarak kollajen I-III tiplerinin bozunma ürünlerinden bazıları insan fibroblastlarının kemotaksisini indüklemekte böylelikle doku tadilatını teşvik ettiği düşünülmektedir (Gelse vd., 2003; Chattopadhyay ve Raines, 2014).

3.1.1.5 Kollajenin mekanik özellikleri

Kollajen, iskeletin yapısal bütünlüğünden ödün vermemesinden dolayı kemiklerde kullanım için idealdir. Kollajen üçlü sarmal bir yapıya sahiptir ve bu üçlü heliksler

genellikle yüksek gerilme mukavemeti sağlayan fibriller halinde düzenlenmektedir. Kolajen lifleri viskoelastiktir ve zamana bağlı mekanik davranış sergilemektedirler. Viskoelastisite, özellikle kas iskeletindeki darbe yüklerine karşı direnç göstermede oldukça önemlidir (Lee vd., 2001).

3.1.1.6 Kollajenin sterilizasyon tekniği

Çapraz bağlanmış veya hücresizleştirilmiş kollajen doku iskelelerinin yapısı, nispeten kırılgandır ve sıcaklığa duyarlıdır. Bu nedenle, otoklavlanamazlar ve kullanımlarından önce alternatif bir spesifik sterilizasyon işlemi gerektirmektedirler. Düşük konsantrasyolarda kollajen yapı iskelelerinin sterilizasyonu için perasetik asit içerisine daldırılması en yaygın kullanılan yöntemdir. Etanole daldırma, laboratuvarda fiziksel olarak çapraz bağlanmış olan kollajen yapı iskelelerini sterilize etmek için kullanılan tekniklerdendir. Ek olarak formik asidin de kollajen için potansiyel bir sterilizasyon ajanı olabileceği gösterilmiştir (Parenteau-Bareil vd., 2010).

3.1.2 Hiyalüronik Asit

Hücre dışı matriks üç ana sınıf biyomolekül içermektedir. Bunlar; yapısal proteinler, özelleşmiş proteinler ve proteoglikanlardır. Proteoglikanlar bir veya daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinin bağlandığı bir çekirdek (core) protein içermektedir. İnsan vücudunda bulunan GAG; hiyalüronik asit, heparan sülfat, heparin, kondroitin sülfat, keratan sülfat I ve II ile dermatan sülfattır (Aytekin ve Çaylak, 2009).

Hiyalüronik asit (HYA) hücre dışı matriksin bir polisakkaritidir. Vücutta birçok yapısal, reolojik, fizyolojik ve biyolojik fonksiyonlara sahip olan çok görevli bir rol oynamaktadır. Eskiden HYA olarak bilinen Hyaluronan, hücre dışı alanda (özellikle hücre dışı matrikste) her yerde bulunan bir ana glikozaminoglikandır. HYA diğer GAG'lardan önemli ölçüde farklıdır. İlk olarak, HYA hücre dışı matriksdeki tek sülfatlanmamış GAG'dır. İkincisi, diğer GAG'lar endoplazmik retikulum ve golgi cisiminde sentezlenip birleştirildikten sonra proteoglikan çekirdek proteinlerine kovalent olarak bağlanırken, HYA, plazma zarının iç yüzeyinde serbest lineer bir

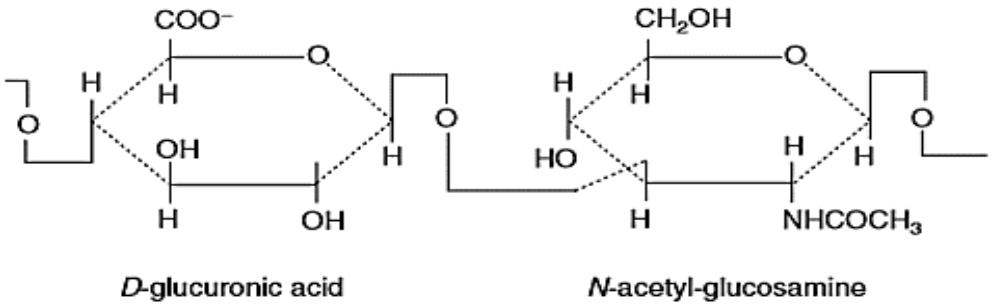
polimer olarak sentezlenmektedir (Campoccia, 1998; Fallacara vd., 2018; Gallo vd., 2019).

HYA, doğada; insanlarda, hayvanlarda ve bakterilerde bulunmakla birlikte, mantarlarda, bitkilerde ve böceklerde bulunmamaktadır. HYA insan vücudunda sinovyal sıvı, göbek kordonu gibi sulu dokularda maksimum konsantrasyonuna ulaşmakta ve ayrıca ciltte, tendonlarda, kıkırdakta, kalp kapakçıklarında ve arter duvarlarında bulunmaktadır. HYA birçok hücre tarafından üretilebilmekle birlikte mezenkimal hücrelerin, HYA üretiminde baskın kaynak olduğu düşünülmektedir (Manasa vd., 2012; Fallacara vd., 2018; Gallo vd., 2019).

HYA doku dehidrasyonunda, yağlamada ve hücresel fonksiyonda önemli bir rol oynar. Vücutta doğal olarak üretilmektedir. Sadece üç boyutlu hücre dışı matriks moleküler ağının basit bir yapısal bileşeni olarak bağlayıcı proteinler, proteoglikanlar ve büyüme faktörleri gibi diğer aktif moleküllerle etkileşime girmekle kalmaz aynı zamanda ozmotik basınç ve akış direncine etki ederek plazma ve matriks proteinlerinin difüzyonunu sağlamakta ve aktif olarak su dengesinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Diğer alanlarda, yüksek viskozitesi nedeniyle, eklem kıkırdak yüzeylerini kayma geriliminden koruyan bir yağlayıcı gibi davranmaktadır. Moleküler düzeyde ise HYA serbest radikaller için temizleyici bir molekül olan ek bir fonksiyon gerçekleştirmektedir. Tüm bu özelliklerin yanı sıra HYA, CD44 gibi spesifik hücre reseptörleri tarafından tanınmakta ve belirli hücre tiplerinin yapışmasını, büyümesini, farklılaşmasını, ve aktivasyonunu düzenlemektedir. Ek olarak HYA, nemi hücre dışı matrikse kilitleyerek kollajen ve elastini nemli tutmakta böylece genç bir görünüm kazandırmaktadır. Zamanla vücuttaki tüm vitamin ve besinlerle olduğu gibi, HYA sentezi de azalmaktadır (Campoccia, 1998; Manasa vd., 2012).

3.1.2.1 Hiyalüronik asidin kimyasal özellikleri

HYA doğrusal bir polisakkarit olmakla birlikte tekrarlayan β-1,4-bağlı D-glukuronik asit ve β-1,3-bağlı N-asetil-D-glukozamin disakkarit birimlerinden oluşmaktadır. Bu basit yapı nispeten tüm memelilerde korunmakta olup, HYA'nın önemli bir biyomolekül olduğunu göstermektedir. HYA, 103-104 kDa arasında değişen bir ortalama moleküler ağırlığa ve 2-25 mm uzatılmış uzunluğa sahiptir. Basit bir boşluk doldurucu olmaktan uzak, fizyolojik ortamda farklı roller oynamaktadır. Ayrıca suda çok viskoz çözeltiler oluşturan çözünür bir moleküldür. Her iki şeker de β konfigürasyonundayken, tüm hidrojen atomları daha az eksenel pozisyonları işgal etmekte ve bu durum HYA disakkaritinin yapısını enerji olarak çok kararlı kılmaktadır. Molekülün anyonik karakteri, karboksilat gruplarının varlığından dolayı onu yüksek oranda hidrofilik hale getirmektedir. (Campoccia, 1998; Allen, 2006; Necas vd., 2008; Manasa vd., 2012; Dicker vd., 2014; Sudha ve Rose, 2014; Allison ve Grande- Gallo vd., 2019).



Şekil 3.4 Hiyalüronik asidin kimyasal yapısı (Fiyat vd., 2005)

HYA polielektrolittir ve sulu çözeltilerdeki reolojik özellikleri iyonik kuvvet, pH ve sıcaklıktan da etkilenmektedir. Bu faktörler arttıkça, HYA viskozitesi belirgin şekilde azalır ve bu da polimer zincirleri arasındaki etkileşimlerin zayıfladığını göstermektedir. Özellikle, pH değişikliklerine karşı HYA oldukça hassastır. Asitli ve alkali ortamlarda pH 5 veya 4'den daha düşük olduğunda, HYA hidrolizle bozunmaktadır. Alkali koşullarda, bu etki HYA zincirlerinin yapısal organizasyonunda yer alan H bağlarının bozulmasından dolayı daha belirgindir (Fallacara vd., 2018).

Nötr bir sulu çözeltiye dahil edildiğinde, su molekülleri ile bitişik karboksil ve N-asetil grupları arasında hidrojen bağı oluşumu meydana gelmektedir. Bu polimere, esnekliğini sınırlayan konformasyonel bir sertlik kazandırmaktadır. Hidrojen bağı oluşumu, polimerin kendine özgü su bağlama ve tutma kapasitesine neden olmaktadır. HYA'in biyolojik olarak en önemli özelliklerinden birisi, suyu emme kabiliyetidir. HYA, birçok karbonhidrat alt biriminden dolayı, jel benzeri olmasına neden olan büyük miktarlarda suyu emebilmektedir. HYA'nın gramı başına altı litreye kadar su bağlanabilmektedir (Fiyat vd., 2005; Manasa vd., 2012).

Fizyolojik pH'ta HYA, her bir karboksil grubu, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi bir mobil katyon ile dengelenebilen oldukça yüklü bir moleküldür. HYA viskozitesinin, zincirlerin uzunluğu ile ilişkili olduğu görülmektedir. Yüksek moleküler kütleli HYA çözeltileri, polimer zincir dolaşmalarından dolayı oldukça viskozdur. HYA molekülünün aşırı uzunluğu, yüksek hidrofilik doğası ile birlikte, dokularda, HYA zincirlerinin moleküller arası ve moleküller arası hidrojen bağları ile dolaştığı ve stabilize edildiği, retiküler ya da ağ yapısında düzenlenmesine izin vermektedir. Bu tür dolaşmış ağlar, hızlı ve geçici sıvı akışına maruz kaldıklarında elastik özellikler sergileyen ve daha uzun süreli yavaş sıvı akışına maruz kaldıklarında viskoz sıvı olarak davranan zamana bağlı viskoelastisite göstermektedir (Fiyat vd., 2005; Dicker vd., 2014; Fallacara vd., 2018; Huang ve Chen, 2019; Gallo vd., 2019).

3.1.2.2 Hiyalüronik asitin biyomalzeme olarak kullanımı

Araştırma veya tıbbi amaçlar için kullanılan bir malzeme olarak HYA, çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Yaygın olarak kullanılan iki kaynak horoz tarakları ve Streptococcus bakterisidir. İleri araştırmalarda ve tıbbi uygulamaların çoğunda kullanılırken, ikincisi gençleştirme ürünlerinde kullanılmaktadır. Ticari olarak kullanıldığında iki ürün, muhtemelen üretim süreci nedeniyle farklı reolojik özelliklere sahip gibi görünmektedir. HYA, özellikle biyomalzemelerde ilave kullanımları yardımcı olabilmektedir ancak suda çözünürlüğü, hızlı rezorpsiyon ve dokuda kısa kalma süresi gibi, saflaştırılmış formunda bazı fiziksel ve biyolojik özellikleri, olası uygulamalarını sınırlamaktadır. Glikozaminoglikanlara ait olan HYA, memeli hücre dışı matriksinde her yerde bulunmakta ve doku gelişimi, onarımı ve

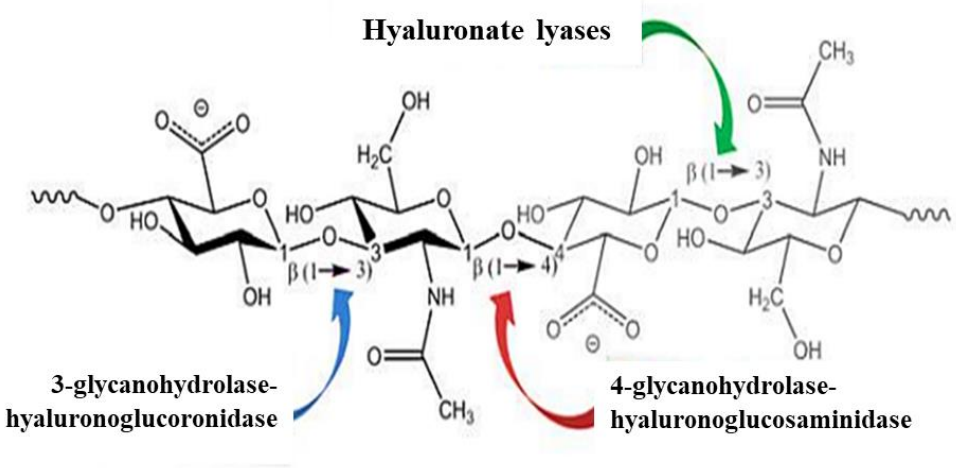
fonksiyonunda anahtar rol oynamaktadır (Campoccia, 1998; Fiyat vd., 2005; Dicker vd., 2014).

3.1.2.2.1 Hiyalüronik asitin biyouyumluluğu

HYA'nın çeşitli dokularda bulunması, doğal biyouyumluluk ve biyobozunurluğu ile birlikte, araştırmacıları doku bazlı büyüme, onarım ve rejenerasyon için HYA bazlı materyallerin kullanımını araştırmaya motive etmiştir. Doku hasarı ve onarım süreci, matriks bileşenlerinin miktarı ile karakterize edilir ve HYA, bu dinamik süreçte önemli ve çok yönlü rol oynamaktadır. HYA ile sinyal alıcıları arasındaki etkileşimler, enflamatuar tepkileri başlatmakta, yapısal hücre bütünlüğünü korumakta ve doku hasarından geri kazanımını teşvik etmektedir (Campoccia, 1998; Fiyat vd., 2005; Dicker vd,. 2014).

3.1.2.2.2 Hiyalüronik asitin biyobozunurluğu

HYA'nın hücresel sentezi, eşsiz ve oldukça kontrollü bir işlemi beraberinde getirmektedir. HYA, omurgalıların üç türüne sahip olan, HAS1, HAS2 ve HAS3 hiyalüronan sintaz adı verilen bir sınıf zar proteini sınıfı tarafından doğal olarak sentezlenmekle birlikte hiyalüronidaz, β-D-glukuronidaz ve β-N-asetil-heksosaminidaz enzimleri ile enzimatik bozunması gerçekleşmektedir. Vücut boyunca bu enzimler hücre içi ve serumda çeşitli şekillerde bulunmaktadır. HYA'nın bozunma ürünleri, oligosakkaritler ve çok düşük moleküler ağırlıklı hiyalüronan, pro-anjiyojenik özellikler göstermektedir. Ayrıca HYA, enzimatik olmayan asidik ve alkalin hidroliz, ultrasonik parçalanma, termal ayrışma ve oksidanlar yoluyla da bozunması gerçekleşmektedir (Necas vd., 2008; Ivanov, 2015; URL-9).



Şekil 3.5 Hiyalüronik asidin enzimatik bozunması (Ivanov, 2015)

3.1.2.2.3 Hiyalüronik asitin mekanik özellikleri

HYA, kemik doku mühendisliğinde geniş bir araştırma ve uygulama yelpazesine sahiptir. Kemik dokusunun yenilenmesini teşvik etmek için iskele veya moleküler taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir. Kim ve arkadaşları, gözenekli iskelelerden oluşan HYA' in in vivo olarak kemik büyümesini destekleyebileceğini göstermiştir. HYA'nın mekanik özellikleri, insan doğal kemiklerinden daha zayıf olduğu için, bir iskele malzemesi olarak tek başına HYA kullanımı, hücre iskelesi kompozitini desteklemek için yeterli değildir. Bu nedenle başka malzemelerle bileşik haline getirilmesini gerektirmektedir (Kim ve Valentini, 1996; Patterson vd., 2010; Cai vd., 2017).

3.1.3 Kondroitin Sülfat

GAG'ler, hiyalüronik asit gibi sülfatlanmamış GAG'ler ve heparin sülfat, kondroitin sülfat (KS), dermatan sülfat ve keratin sülfat gibi sülfatlanmış GAG'lar olarak sınıflandırılabilmektedir. GAG zincirleri, HYA hariç proteoglikanları oluşturmak için merkezi bir proteine bağlanmaktadır. GAG'lar polielektrolit yapıları nedeniyle büyük miktarlarda su emebilmekte ve bu ozmotik şişme basınç dayanımı sağlamaktadır (Olson, 2013; Kwon ve Han, 2016).

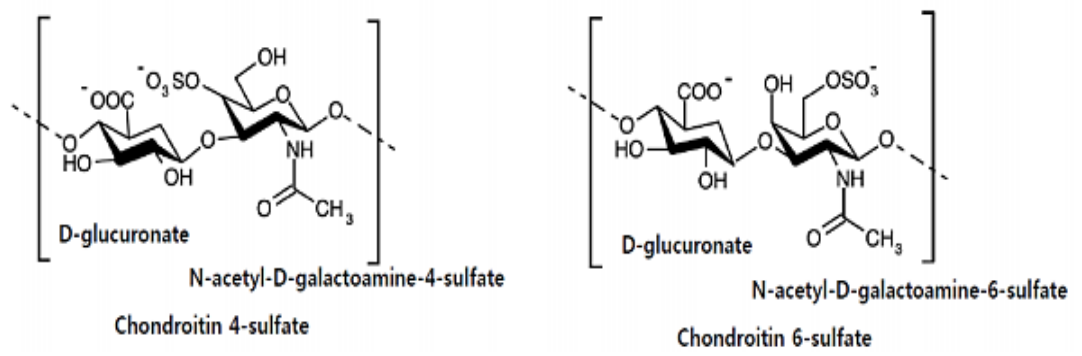
Kondroitin sülfat, değişken şeker zincirinden oluşan beş glikozaminoglikan sınıfından birisini oluşturmaktadır. Glikozaminoglikanlar bir amino şekerden ve bir üronik asit

veya galaktozdan oluşan tekrarlayan bir disakkarit birimi içeren uzun, doğrusal polisakaritlerdir. Kondroitin sülfat doğal olarak bağ dokularının hücre dışı matrisinde, örneğin kemik, kıkırdak, cilt, bağ ve tendonlarda bulunmaktadır. Sülfat içeriğine ve sülfatlama pozisyonuna bağlı olarak yaklaşık 25 kondroitin sülfat bulunmaktadır. Bu polisakkaritin çıkarılması için birçok memeli ve omurgasız kaynağı kullanılabilmektedir. Ticari olarak temin edilebilen kondroitin sülfat esas olarak domuz, sığır, kümes hayvanları ve köpekbalığı kıkırdaklarından ekstrakte edilmekte ve daha sonra saflaştırılmaktadır (Martel Pelletier vd., 2015; Khwaldia, 2019).

Genellikle bir proteoglikanın parçası olarak proteinlere kovalent olarak bağlı bulunmaktadır. Bir kondroitin zinciri, her biri değişken pozisyonlarda ve miktarlarda sülfatlanabilen 100'den fazla bireysel şekere sahip olabilmektedir. Kondroitin sülfat, kıkırdakta önemli bir yapısal bileşendir ve kompresyona karşı direncinin çoğunu sağlamaktadır. Glukozamin ile birlikte, kondroitin sülfat, osteoartrit tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir diyet takviyesi haline gelmiştir. Kondroitin, diyet takviyelerinde osteoartriti tedavi etmek için alternatif bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Avrupa ve diğer bazı ülkelerde bu hastalık için semptomatik yavaş etkili bir ilaç olarak onaylanmakta ve düzenlenmektedir (Olson, 2013).

3.1.3.1 Kondroitin sülfatın kimyasal özellikleri

Lineer ve negatif yüklü bir polisakkarit olan kondroitin sülfat, alternatif D-glukuronik asit ve N-asetil-D-galaktozamin disakkarit tekrarlayan birimlerden oluşan bir sülfatlanmış glikozaminoglikandır. Her kondroitin sülfat zinciri, bir disakkarit karışımı içerebilir ve değişken uzunlukta olabilmektedir. Dolayısıyla, doğal olarak meydana gelen kondroitin sülfatın moleküler ağırlığı, 50 ila 100 kDa arasında değişmektedir. Kondroitin sülfat bu nedenle, kimyasal özelliklerini ve biyolojik/farmakolojik aktivitelerini etkileyebilen, değişken yük yoğunluğu ve moleküler ağırlığı olan karmaşık, heterojen bir polisakarittir (Martel Pelletier vd., 2015; Khwaldia, 2019).



Şekil 3.6 Kondroitin 4-sülfat ve kondroitin 6-sülfatın şematik gösterimi (Kwon ve Han, 2016).

Kondroitin sülfat, hücre içi olarak sentezlendikten sonra sülfatlanmaktadır. Daha sonrasında hücre dışı olarak salgılanan kondroitin sülfat, agrekan ve versikan gibi proteoglikanları üretmek için çekirdek proteinlere glikozidik olarak eklenmektedir. Hücre içi olarak sentezlenen bu doğal glikozaminoglikan, hücrelerin, dokuların ve organların yapısal bileşenidir ve birçok biyolojik işlemin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kondroitin sülfat, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'ler), fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler), epidermal büyüme faktörleri (EGF'ler) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-β) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve kemokinlerin sinyalleşme fonksiyonlarında yer aldığı bilinmekte ve bu gelişim süreçlerinde kritik roller oynamaktadır (Kwon ve Han, 2016; Khwaldia, 2019).

3.1.3.2 Kondroitin sülfatın biyomalzeme olarak kullanımı

Hücre dışı matriksten oluşan doğal polimerler, doku mühendisliği için biyomalzemelerin hazırlanmasında potansiyel yapı taşlarını oluşturmaktadır. Bunun nedeni doğal polimerlerin kimyasal ve biyolojik performansa sahip olmasından ileri gelmektedir. Hücre dışı matriksin bileşenleri arasında GAG'lar, hücre büyümesinde, farklılaşmasında, morfogenezinde, hücre göçünde ve bakteriyel/viral enfeksiyonlarda önemli roller oynayan karmaşık polisakaritlerdir (Olson, 2013; Kwon ve Han, 2016).

Bununla birlikte, suda çözünür yapısı, bir biyomateryal olarak uygulanmasını sınırladığından, kondroitin sülfatın özelliklerini uyarlamak için diğer kararlı polimerlerle birleştirmek için çapraz bağlama işlemi gerekmektedir. Ayrıca,

polielektrolit doğası nedeniyle kondroitin sülfat, biyomedikal uygulamalar için biyopolimer bazlı sert hidrojeller oluşturmak için kondroitin sülfat bazlı hidrojel kullanılmaktadır. Çift ağ jeli, zıt fiziksel yapılar ve özelliklere sahip iki iç içe geçen ağ tarafından oluşturulabilmektedir (Kwon ve Han, 2016; Da Silva vd., 2017).

Kondroitin sülfat, hem kondrogenezi hem de osteogenezi kolaylaştırabilen daha fonksiyonel kompozit biyomalzemeler oluşturmak için biyopolimerler ile birlikte kullanılmıştır. Kondroitin sülfat yapısı ve özellikle de sülfatların kondroitin sülfat omurgası üzerindeki yeri, hücrelere bağlanma ve farklılaşmalarını yönlendirme kabiliyetini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca kondroitin sülfat gibi sülfatlanmış GAG'lerin hidroksiapatit gibi kalsiyum fosfatları bağladığı bilinmektedir. Kondroitin sülfat kemik dokusu mühendisliğinde osteoblast yapışmasını arttırmak için kullanılmış ve yapılan araştırmalar sonucu kondroitin sülfatın osteoblastik hücre hattının hem osteokondüktivitesini hem de osteoindüktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, kondroitin sülfat iskelet doku mühendisliği için büyük bir umut vadetmektedir (Rees, 2002; Mathews vd., 2012; Dinoro vd., 2019).

3.1.3.2.1 Kondroitin sülfatın biyouyumluluğu

Kondroitin sülfat çeşitli dokularda bulunması, doğal biyouyumluluk ve biyobozunurluğu ile birlikte, araştırmacıları doku bazlı büyüme, onarım ve rejenerasyon için kondroitin sülfat bazlı materyallerin kullanımını araştırmaya motive etmiştir. Kondroitin sülfatın diğer polimerler ile birleşmesi, büyüme faktörlerini emebilen, iyi hücre yapışması gösterebilen ve uygulama alanlarında istenmeyen inflamatuar reaksiyonlardan kaçınabilen güvenilir iskele malzemeleri ile sonuçlanmaktadır. Kondroitin sülfat güçlü negatif yükleri olan bir polielektrolittir. Bu nedenle negatif yükleri hücre dışı matristeki proteinlerle kolayca etkileşime girmektedir (Kwon ve Han, 2016; Da Silva vd., URL 2017).

3.1.3.2.2 Kondroitin sülfatın biyobozunurluğu

Kondroitin sülfat, D-glukuronik asit ve N-asetil-D-galaktozamin disakkarit tekrarlayan birimlerden oluşan bir sülfatlanmış glikozaminoglikandır. Toksik olmayan oligosakaritlere parçalamaktadır ve bu nedenle immünojenik değildir. Biyobozunurluk

özelliği ile tanımlanmış fiziksel ve kimyasal özellikleri kondroitin sülfatın doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasına neden olmaktadır (Doppalapudi vd., 2014).

3.2 Seramik Malzemeler

Kemiğin mineral faz bileşimine benzer olan çeşitli biyoaktif inorganik maddeler (trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit, biyoaktif camlar ve bunların kombinasyonları) klinik olarak ilgi çekmektedir. Seramikler yapay vücut sıvısına batırıldığında, biyolojik dokuya yapışabilen hızlı bir şekilde biyoaktif bir hidroksikarbonatlı apatit tabakası üretebilmektedir. İlginç özellikleri, osteokondüktif ve osteoindüktif olmaları nedeniyle, kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için sıklıkla kullanılmaktadır (Hench ve Polak, 2002; LeGeros, 2002; Jell ve Stevens, 2006).

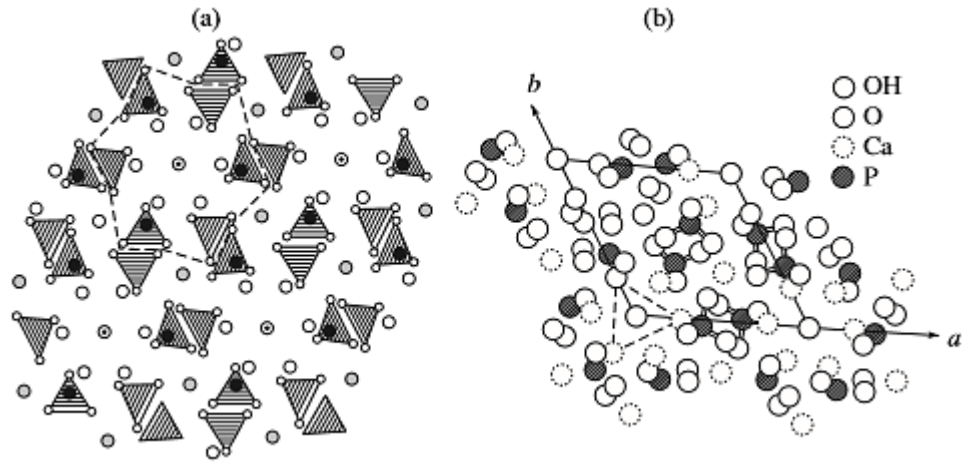
3.2.1 Hidroksiapatit

Seramikler hastalıklı veya hasarlı doku parçalarının onarımı ve yeniden inşası için kullanılan malzemelerdir. Biyoinert, biyobozunur, biyoaktif olmalarının yanında gözenekli, yoğun, şekilsiz veya kristalli formlarda üretilebilmektedir. Biyomedikal mühendisliğinde kullanılan tüm seramikler arasında kalsiyum hidroksiapatit, kemik doku mühendisliği için en çok tercih edilen biyoseramiktir. HA kemiğin ağırlığının yaklaşık %50'sini içeren doğal olarak oluşan kalsiyum apatit mineral formudur. HA'i biyomalzeme olarak kullanmanın avantajı kemik ve dişin inorganik bileşenine kimyasal olarak benzemesinden ileri gelmektedir. HA'nın biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve biyoaktivitesi nedeniyle kemik doku mühendisliği için önemli bir materyal olduğu bilinmektedir (Pokhrel, 2018; Puad vd., 2019; Yılmaz vd., 2019).

HA $Ca_{10}(PO_4)_6$ $(OH)_2$ kimyasal formülüne sahip doğal olarak oluşan bir kalsiyum apatit mineral formudur. Doğal kaynaklardan elde edilebilmekle birlikte kimyasal olarak da sentezlenebilmektedir. Doğal HA genellikle biyolojik kaynaklardan; yumurta kabuğu, mercan, sığır kemiği vb. elde edilmektedir. Saf HA tozu beyaz olmakla birlikte doğal olarak oluşan apatitler, demir safsızlıklarından dolayı kahverengi, sarı veya yeşil olabilmektedir. Ayrıca HA kimyasal olarak ıslak çökeltme,

biyomimetik çökeltme, sol-jel gibi birkaç yöntemle sentezlenebilmektedir (Rigano ve Lionetti, 2016; Pokhrel, 2018; Puad vd., 2019).

HA kimyasal yapısı Ca ve P iyonlarının sitokiyometrik bileşimidir. HA hekzagonal bir yapıya sahiptir ve birim hücre boyutları a=9,432 Å ve c=6,881 Å'dır. HA esas olarak iki bölgeye dağılmış olan Ca^{+2} atomundan oluşmaktadır. Bunlardan dördü bir bölgede, altısı ise bu sütunlardaki hidroksillerle ilişkili diğer bölgede bulunmaktadır. HA ideal Ca:P oranı 10:6 ve hesaplanan yoğunluğu 3,219 g/cm^3'tür. Mohs sertlik ölçeğinde beşinci sırada yer almaktadır. Vücut sıvısında termodinamik olarak stabildir ve vücut sıvısında çok benzer bir bileşime sahiptir (Rigano ve Lionetti, 2016; Puad vd., 2019; Yılmaz vd., 2019).



Şekil 3.7 (a) Hidroksiapatitin atomik yapısı ve (b) c ekseni boyunca yansıması (Orlovski vd., 2002)

3.2.1.1 Hidroksiapatitin biyomalzeme olarak kullanımı

HA, birkaç fizyolojik mineralden biri olan insan vücudunun dişlerinde ve kemiklerinde bulunabilmektedir. Bu nedenle, birçok çalışmada kemiğin yerini almak için bir dolgu maddesi olarak veya kemik büyümesini desteklemek için kaplama olarak kullanıldığını bildirmiştir. Ayrıca yapılan araştırmalar sonucu HA ile kaplanan biyomateryallerin kemikleşmeye katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur. Doğal veya sentetik hidroksiapatit, çoğunlukla doğal kemikle olan yakın benzerlikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği için bir malzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Mükemmel biyoaktivite, yeterli mekanik yapı, osteokondüktivite, anjiyojenik

özellikler, biyobozunurluk, enflamatuar veya antijenik reaksiyonların olmaması ortopedik ve dental uygulamalar için implant materyali olarak geniş çapta kullanımına neden olmuştur (Rigano ve Lionetti, 2016; Granito vd., 2018).

Biyolojik apatit doğada sitokiyometrik değildir. Küçük kristallerden oluşmakla birlikte düşük kristalli ve sitokiyometrik hidroksiapatite göre nispeten yüksek çözünürlük ile karakterize edilmektedir. Bu kristallerin kimyasal bileşimi Ca ve P'dan oluşmakla birlikte Mg^{+2}, Zn^{+2}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, F^{-} ve CO_3- gibi kristal yüzeyinde adsorbe olan çeşitli iyonların eser miktarlarından oluşmaktadır. Bu iyonlar kemik doku metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Sentetik HA, doğal sert dokularda düzenli olarak bulunan iz iyonlarının varlığından yoksun olan Ca/P oranı 1,67 olan sitokiyometrik bir malzemedir. Bu nedenle sentetik HA'nın yapısına, biyolojik apatitin kimyasal bileşimini taklit etmek için bu iyonlar kısmen dahil edilmektedir. İz elementler kemiğin yenilenmesinde esastır ve kemik oluşumu sürecini hızlandırmaktadır (Puad vd., 2019; Yılmaz vd., 2019).

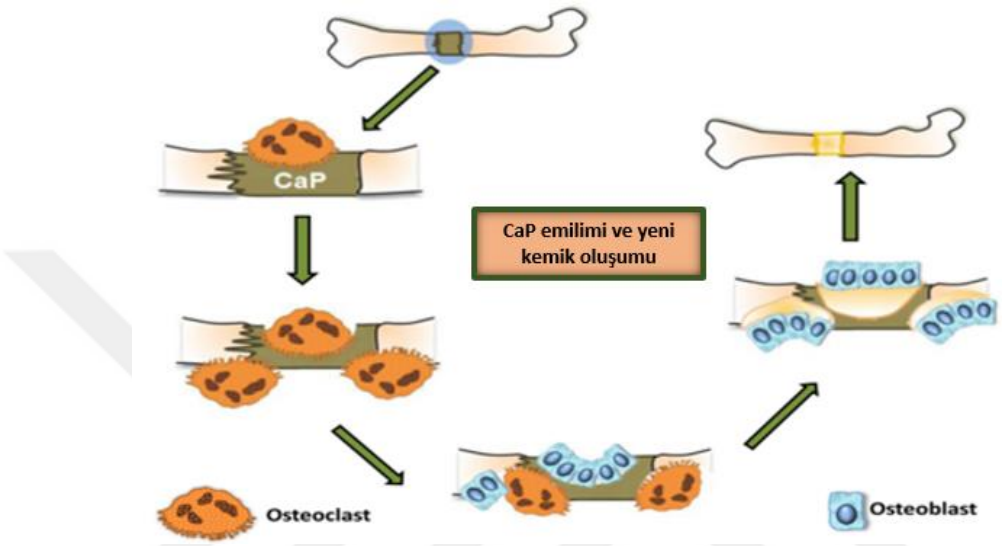
3.2.1.1.1 Hidroksiapatitin biyouyumluluğu

Sentetik HA özellikle yüksek üretim maliyetleriyle ilgili olarak dikkat çekmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için doğal kaynaklardan üretilen HA klinik uygulamalar için umut verici bir alternatif olabilmektedir. Doğal malzemeler, hücre bağlanması ve büyümesi için daha iyi etkileşimli bir yüzey sunduğundan doğal HA'nın sentetik olandan daha iyi metabolik aktivite özelliği sergilediği bilinmektedir. Mükemmel biyouyumluluk ve hidroksiapaptinin biyoaktivitesi literatürde sürekli olarak bildirilmiştir. Hem in vitro hem de in vivo modeller, HA'nın kemik ikameleri olarak başarıyla uygulanabildiği ve birçok ticari ürünle sonuçlandığını kanıtlamıştır (Roy vd., 2017; Granito vd., 2018).

3.2.1.1.2 Hidroksiapatitin biyobozunurluğu

HA yapı iskelelerinin biyobozunurluğu makrofaj ve osteoklastların fagositoz aktivitesi ile çözülme veya parçalanması ile gerçekleşmektedir. Biyolojik olarak çözünebilir CaP'ler hem fiziksel hem de hücre aracılı hareketlerle fizyolojik durumda yavaşça bozulmakta ve yeni kemiğin büyümesine izin vermektedir. İdeal olarak

hidroksiapatitin çözünürlüğü Ca/P oranı azaldıkça artmaktadır. Ayrıca, belirli bir Ca/P oranının çözünürlüğü de yapıya katyonlar eklenerek değiştirilebilmektedir. Örneğin, hidroksiapatitin yapısına Sr ve Mg iyonlarının eklenmesi, çözünürlüğünde artışa yol açmaktadır. Çözünürlük ayrıca kristalliği, tane büyüklüğünü ve yoğunluğunu azaltarak da arttırılabilmektedir (Rumpel vd., 2006; Olszta vd., 2007; Roy vd., 2017).



Şekil 3.8 Kemiğin osteoklastik rezorpsiyonunun şematik gösterimi (Roy vd., 2017).

3.2.1.1.3 Hidroksiapatitin mekanik özellikleri

Biyomalzemelerin geliştirilmesinde büyük önem taşıyan en önemli nokta malzemelerin mekanik güçleridir. Biyosemikler kemik dokusuna benzer özellikte olup dayanıklı olmaları gerekmektedir. Seramikler özellikle insan organizmasının aşındırıcı ortamında, hem statik hem de dinamik yükler altında yüksek yorulma direnci göstermektedir (Orlovski vd., 2002).

3.2.1.2 İskelelerde hidroksiapatitin oluşturulması

HA kaplı implantlar ortopedi ve diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çimento içermeyen sabitleme tekniği biyomalzemelerin dayanıklılığını, esnekliğini ve üretim kolaylığını HA ile ilişkili artan biyouyumluluk ile birleştirmektedir. HA implante edildiğinde, daha önce ve daha yüksek sabitleme mukavemeti elde edilmekte, iyileşme süresini ve ağrı seviyelerini azaltmak için doğrudan kemiğe bağlanma yeteneği sergilemektedir. Kabul edilebilirliğinin nedeni kemik ve diş minesinin

mineral fazına benzer bir bileşime sahip olmasıdır. Godley ve arkadaşları, bir biyomalzemenin canlı kemikle bağlanması için gerekli bir koşulun, yüzeyinde biyolojik olarak aktif bir kemik benzeri apatit oluşumu olduğunu bildirmektedir (Tsui vd., 1998; Godley vd., 2004).

HA kaplamaları; daldırarak kaplama, elektroforetik biriktirme, sıcak izostatik presleme, iyon demeti püskürtme, plazma püskürtme, gibi çeşitli yöntemlerle uygulanabilmektedir. Ancak bu yöntemler arasında kemiğe en yakın bileşimde HA üretimi daldırarak kaplama yöntemi ile sağlanmaktadır. Daldırarak kaplama yöntemi, diğer apatit kaplama yöntemleri ile karşılaştırıldığında özel ekipmanlara ya da yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymama, kolay ve hızlı olma gibi bazı avantajları sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Daldırarak kaplama yöntemiyle; insan vücut sıvısı iyon derişimine eşit olan sentetik vücut sıvısından (SBF) hidroksiapatit üretimi gerçekleştirilmektedir. Fizyolojik pH ve uygun sıcaklıklarda SBF kendiliğinden nano boyutlu, karbonatlı ve kemik benzeri hidroksiapatit çekirdeklenmesi ile sonuçlanmaktadır. SBF'nin çökelme hızı osteoindüktif materyaller üzerinde Ca/P oluşumu 2-3 hafta kadar zaman almaktadır. Daha kısa sürede hidroksiapatit üretimi sağlanması için iyon derişimleri, kan plazmasından n=1, 5, 2, 5, 10 katı kadar fazla olan çeşitli SBF çözeltileri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hidroksiapatit ve kollajen kompozit malzemelerin SBF içerisinde bekletilerek kalsiyum fosfatın oluşumu, çökelmesi ve birikmesi teşvik edilerek kemik-matris arayüzünün geliştirilmesi sağlanmıştır (Tsui vd., 1998; Godley vd., 2004; Mavis vd., 2009; Pasinli ve Aksoy, 2010; Choundhury, 2012; Demirtaş vd., 2015).

3.2.1.2.1 SBF ile hidroksiapatitin oluşturulması

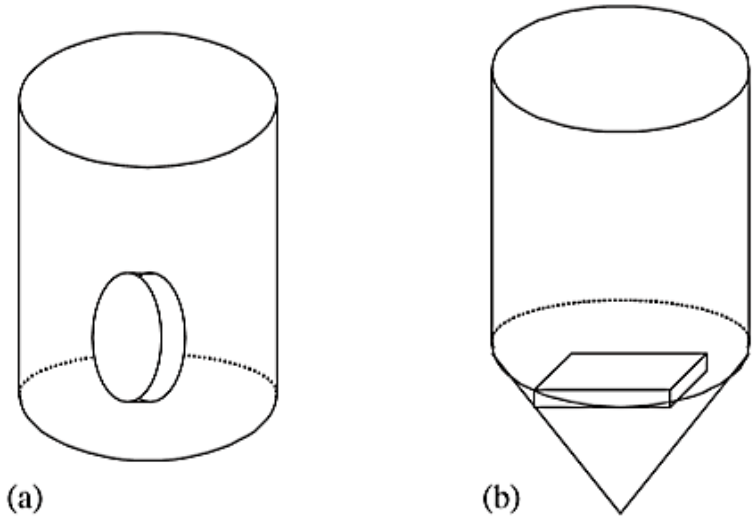
İnsan kan plazmasına yaklaşık olarak eşit iyon konsantrasyonlarına sahip simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF), biyomalzemelerin biyoaktivitesinin in vitro değerlendirmek ve çeşitli substratlar üzerinde kemik benzeri apatit oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemik dokusu olarak kullanılacak malzemelerin yüzeyinin apatit ile kaplanması için 36,5°C'de 4 hafta boyunca SBF içerisinde beklemesi gerekmektedir (Cho vd., 1996; Oyane vd., 2003; Kokubo ve Takamada, 2006).

Tablo 3.1 İnsan kan plazması ile karşılaştırıldığında SBF'nin iyon konsantrasyonları.

İyon	**İyon konsantrasyonu (mM)**	
	Kan Plazması	**SBF**
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO_3^-	27,0	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5
pH	7,2–7,4	7,40

İnce bir malzeme için aşağıdaki denklem kullanarak SBF hacmi hesaplanmaktadır. Gözenekli malzemeler için SBF hacmi hesaplanan SBF hacminden daha büyük olmalıdır. SBF 36,5°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra, Şekil 3.9'da gösterildiği gibi örnek SBF'ye yerleştirilir. Bazı durumlarda, apatit SBF içinde homojen bir şekilde çökelebilir ve bir numunenin yüzeyinde birikebilir. Bu nedenle, örneklerin Şekil 3.9'da gösterildiği gibi SBF'ye yerleştirilmesi tavsiye edilmektedir. Tüm numune SBF'ye batırılmalıdır (Kokubo ve Takamada, 2006).

$$\textbf{SBF(ml)} = \frac{\textbf{Numune yüzey alanı } (\boldsymbol{mm^2})}{\textbf{10}}$$



Şekil 3.9 SBF içerisinde yer alan örnek (Kokubo ve Takamada, 2006)

3.3 Kompozit Malzemeler

Her ne kadar çeşitli polimerik malzemeler mevcut olsa ve kemik doku mühendisliği için araştırılmış olsa da, tek bir biyolojik olarak parçalanabilir polimer kemik doku mühendisliği yapı iskelelerinin tüm gereksinimlerini karşılamamaktadır. Her polimer malzemenin kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Öte yandan, kompozit malzemeler çoğu zaman, mukavemet ve tokluk arasında mükemmel bir denge ve geliştirilmiş özellikler sergilemektedir. Kemik inorganik hidroksiapatit kristalleri ve organik kollajen liflerinin karışımından oluşan kompozit bir malzeme olduğundan kompozit malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamaları için dikkat çekici adayları temsil etmektedir. Kompozit malzemeler kemiğin kompozit yapısını "taklit etmeyi" amaçlayan inorganik-organik kompozitler, geliştirilmiş mekanik özelliklere ve bozunma profillerine sahip biyoaktif malzemeler üretmek için inorganik olanın basınç dayanımı ile polimer fazının tokluğunu birleştirmektedir. Hidroksiapatit ile PLA, PLGA, jelatin, kitosan ve kollajen dahil olmak üzere çeşitli polimerlerin kompozitleri kemik doku mühendisliği için başarılı bir şekilde üretilmiştir. Yapılan tüm in vitro ve in vivo sonuçlar kemik oluşumunda artış olduğunu göstermektedir. Bu malzemelerin biyomimetik olduğu ve simüle edilmiş vücut sıvısından (SBF) kalsiyum fosfatın oluşumunu, çökelmesini ve birikmesini teşvik ettiği ve böylece kemik-matriks arayüzünün kuvvetinin artmasına neden olduğu kabul edilmektedir (Rodrigues vd., 2003; Zhang vd., 2003; Wei, 2004; Kim vd., 2006; Chesnutt vd., 2009).

4. MATERYAL VE METOD

4.1 Materyal

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda yerine göre analitik saflıkta yerine göre daha yüksek saflıkta reaktifler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan kollajen, Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesindeki deney hayvanları laboratuvarında bulunan Wistar sıçanlarının kuyruk tendonlarından elde edilmiştir. Hiyalüronik asit (Sigma, ABD) ve kondroitin sülfat (Sigma, ABD) satın alınarak kullanılmıştır.

Biyobozunurluk süresinin tespiti için Hanks'in dengeli tuz çözeltisi (Sıgma-Aldrıch, ABD) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında, besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) Low Glikoz (Sigma, ABD), besiyeri katkısı olarak L-askorbik asit, non-esansiyel aminoasit çözeltisi (Sigma), β-gliserofosfat (Sigma), dexametasone (Sigma), L-glutamin (Euroclone), penisilin-streptomisin (Euroclone), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

Hücrelerin canlılık analizleri, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitelerini ölçmeye dayalı MTT kiti (Serva, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.

İskelelerden belirlenen zaman noktalarında alınan örnekler için dondurma medyumu olarak doku dondurma medyumu (Leica, Almanya) kullanılmıştır. Histokimyasal analizlerde alizarin kırmızısı (Sigma, ABD), safranin-O (Sigma) boyaları kullanılmıştır. Ayrıca belirli zaman noktalarında alınan iskele örneklerindeki Alkalin fosfatazın tespit edilebilmesi için Alkalin Fosfataz Test kiti (quantocrome) kullanılmıştır.

4.2 Metot

Tez çalışması kapsamında yapılacak işlemlerde belirli bir düzen takip edilmiştir. Bu işlemler aşağıda listelenmiş olup söz konusu işlemlerin sonrasında elde edilen iskelelerin karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

- Polimer çözeltilerinin hazırlanması
- Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat iskelelerinin hazırlanması
- Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat iskelelerinin Hidroksiapatitle kaplanması
- Karakterizasyon analizleri
- Hücre kültürü çalışmaları ve analizleri

4.2.1 Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak olan kollajen, Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesindeki deney hayvanları laboratuvarında bulunan Wistar sıçanlarının kuyruk tendonlarından elde edildi. Hiyalüronik asit (Sigma) ve kondroitin sülfat (Sigma) satın alınarak kullanılmış olup, hazırlanacak olan iskeleler içerisindeki miktarları aşağıdaki tabloda verilen oranlara uygun olacak şekilde tartımı yapılarak hazırlandı.

4.2.1.1 Kollajen çözeltisinin hazırlanması

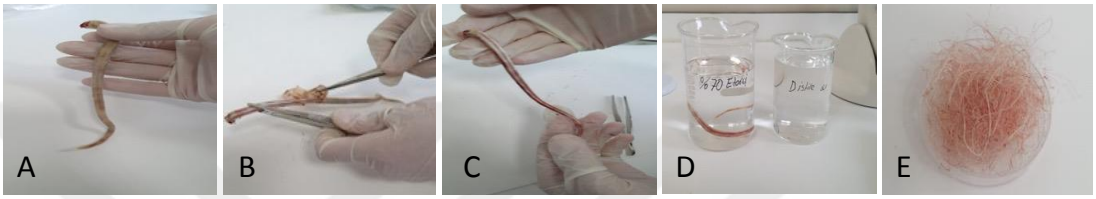
Deneysel prosedürler sonunda ötenazi uygulanan yetişkin Wistar sıçanların kuyruklarından elde edilen tendon izolasyonu aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirildi.

A. Kuyruğun üzerindeki deri dokusu bistüri kullanılarak uzaklaştırıldı.

B. %70'lik etil alkol çözeltisi içerisinde 1-2 dakika bekletildi. Süre sonunda kuyruk %70'lik etil alkol çözeltisi içerisinden alınarak saf su içerisinde 1-2 dakika süreyle yıkandı.

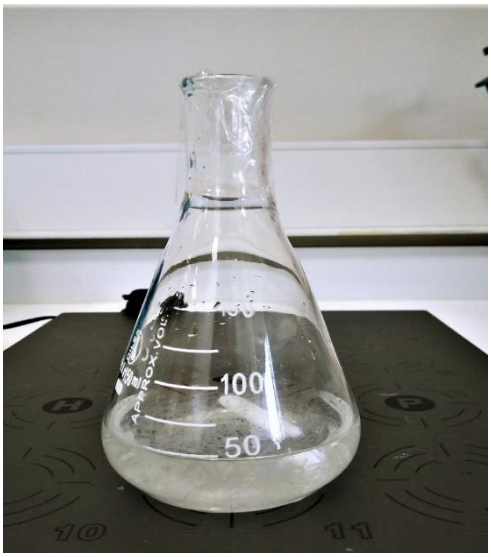
C. Kuyruk içerisinde yer alan tendonlar pens yardımı ile ayrıldı.

D. Üzerindeki kas ve yağ dokusu parçaları uzaklaştırılarak saf tendon dokusu elde edildi.



Şekil 4.1 Wistar sıçan kuyruklarından tendon izolasyonu A. Yetişkin Wistar sıçana ait kuyruk, B,C. Kuyruk derisinin soyulması, D. Soyulan kuyruk derisinin %70'lik etil alkol ve saf su içerisinde yıkanması, E. Tendonun ayrıştırılarak saflaştırılması.

Kuyruklardan ayrıştırılarak saflaştırılan tendonlar kurutulduktan sonra, yapısındaki kollajen molekülleri asetik asitte çözülerek izole edildi. Bu amaçla tendonlar %0,1'lik asetik asit içerisinde çözüldükten sonra elde edilen kollajenden %2, %1 ve %0,5'lik kollajen çözeltileri hazırlandı.



Şekil 4.2 Kollajen çözeltisinin hazırlanması.

4.2.2 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat İskelelerinin Hazırlanması

İskelelerin hazırlanmasında polimer karışımlar iki farklı yöntemle hazırlandı. İlk yöntemde Tablo 4.1'de gösterildiği gibi hazırlanan kollajen çözeltileri istenilen konsantrasyonlarda hazırlanan hiyalüronik asit ve %0,1 kondroitin sülfat çözeltisi ile 8:1:1 (KOL:HYA:KS) oranında toplam hacim 5ml olacak şekilde hazırlandıktan sonra vortex yardımıyla karışması sağlandı. İkinci yöntemde, Tablo 4.2'de verildiği şekilde 5 ml toplam hacimde %kollajen çözeltisine, istenilen konsantrasyonu sağlayacak gramajda hiyalüronik asit ve %0,1 oranını sağlayacak miktarda (0,005g) kondroitin sülfat ilave edilerek kollajen çözeltisi içerisinde çözünmeleri ile polimer karışımlar elde edildi. Her polimer karışımından, 3 farklı karıştırma süresi ile 3 farklı iskele numunesi hazırlandı.

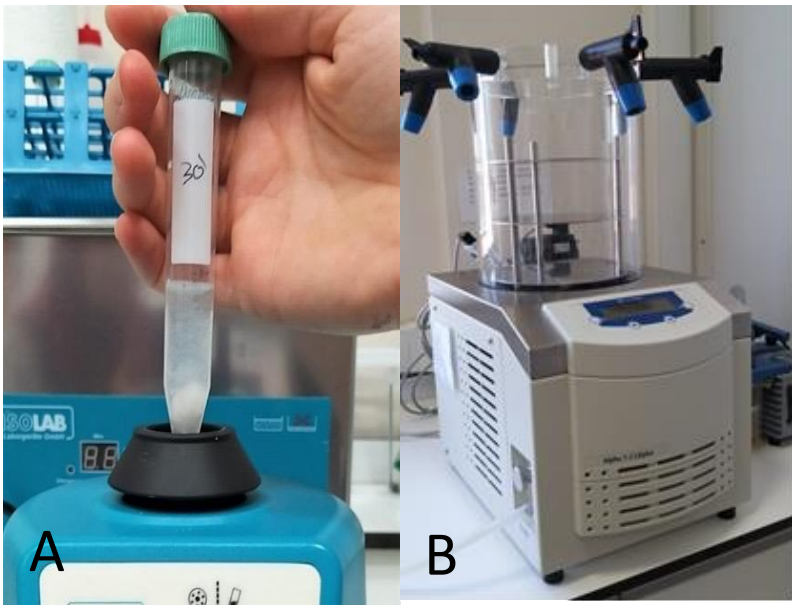
Tablo 4.1 Çözelti halindeki polimer karışımlardan hazırlanan deney serisi. KS derişimi tüm çözeltilerde sabit olup, düşey sütun KOL derişimi, Yatay satır HYA konsantrasyonunu göstermektedir. Çözeltiler hacimsel olarak belirtilen oranlarda bir araya getirilerek hazırlandı.

KOL:HYA:KS	**Karışımdaki HYA konsantrasyonu**				**Karıştırma Süresi**
	%1	**%1,5**	**%2**	**%2,5**	
%0,5	8:1:1	8:1:1	8:1:1	8:1:1	10 dakika
					20 dakika
					30 dakika
%1	8:1:1	8:1:1	8:1:1	8:1:1	10 dakika
					20 dakika
					30 dakika
%2	8:1:1	8:1:1	8:1:1	8:1:1	10 dakika
					20 dakika
					30 dakika

Tablo 4.2 Kollajen çözelti içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfatın çözünmesiyle hazırlanan polimer karışımlarına ait deney serisi.

KOL:HYA:KS		Karışımdaki son HYA konsantrasyonu				Karıştırma Süresi
		%1	%1,5	%2	%2,5	
KOL Konsantrasyonu	%0,5	0,05009 g HYA 0,00513 g KS	0,07503 g HYA 0,00514 g KS	0,10013 g HYA 0,00519 g KS	0,12537 g HYA 0,00515 g KS	10 dakika
		0,05014 g HYA 0,00507 g KS	0,07509 g HYA 0,00508 g KS	0,10026 g HYA 0,00516 g KS	0,12520 g HYA 0,00507 g KS	20 dakika
		0,05020 g HYA 0,00516 g KS	0,07512 g HYA 0,00514 g KS	0,10013 g HYA 0,00507 g KS	0,12521 g HYA 0,00504 g KS	30 dakika
	%1	0,05007 g HYA 0,00514 g KS	0,07524 g HYA 0,00509 g KS	0,10037 g HYA 0,00505 g KS	0,12504 g HYA 0,00513 g KS	10 dakika
		0,05025 g HYA 0.00509 g KS	0,07517 g HYA 0,00512 g KS	0,10021 g HYA 0,00503 g KS	0,12514 g HYA 0,00506 g KS	20 dakika
		0,05021 g HYA 0.00511 g KS	0,07506 g HYA 0,00507 g KS	0,10016 g HYA 0,00508 g KS	0,12508 g HYA 0,00512 g KS	30 dakika
	%2	0,05022 g HYA 0,00512 g KS	0,07503 g HYA 0,00518 g KS	0,10017 g HYA 0,00504 g KS	0,12514 g HYA 0,00505 g KS	10 dakika
		0,05008 g HYA 0,00503 g KS	0,07512 g HYA 0,00509 g KS	0,10022 g HYA 0,00511 g KS	0,12506 g HYA 0,00513 g KS	20 dakika
		0,05010 g HYA 0,00517 g KS	0,07505 g HYA 0,00502 g KS	0,10006 g HYA 0,00510 g KS	0,12509 g HYA 0,00505 g KS	30 dakika

Hazırlanan karışımlar 6-kuyucuklu petrilere konuldu ve örnekler 4 saat -20°C'de bekletildikten sonra 12 saat -80°C'de bekletildi. Dondurularak hazırlanan iskeleler 24 saat süreyle liyoflizatörde kurutuldu.



Şekil 4.3 A. Vortex ile örneklerin hazırlanması. B. İskelelerin liyofilizatör cihazı ile hazırlanması (Christ alfa 1-4, ABD).

4.2.3 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat-Hidroksiapatit Kompozit İskelelerinin Hazırlanlaması

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'ye göre hazırlanan KOL/HYA/KS polimer karışımları vorteks yardımıyla üç farklı karıştırma süresine tabi tutulduktan sonra liyofilizasyon ile katı forma getirildi. Mikrogözenekli olarak elde edilen iskele yapıların hidroksiapatit (HA) ile kaplanarak KOL/HYA/KS-HA polimer-seramik iskelelerin hazırlanmasında SBF çözeltisinde çekirdeklendirme yöntemi kullanıldı.

4.2.3.1 SBF çözeltisinin hazırlanması

Uyarlanmış vücut sıvısı olarak ifade edilen SBF çözeltisi Tablo 4.3'te verilen bileşiklerin ultra saf suda sırasıyla ve sürekli karıştırma ile çözünmesiyle aşağıda verilen protokole göre hazırlandı. Tablo 4.3'te verilen ilk sekiz madde çözündükten sonra ortamın pH değeri Tris ilavesi ile 7,4'e ayarlandı.

- 500 ml'lik plastik şişe içerisine 350 ml ultra saf su konularak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi.

- Tablo 4.3'de verilen 1-8 reaktifler istenilen miktarda tartılarak verilen sıraya göre ultra saf su içerisine eklendi ve sırasıyla çözüldü (Her reaktif yalnızca bir öncekinin tamamen çözünmesinden sonra çözüldü).

- 9. reaktif Tris'i çözmeden önce çözelti hacmi ultra saf su ile 450 ml'ye tamamlandı.

- İstenilen miktarda Tris tartıldı ve çözelti içerisinde yavaş yavaş çözünmesine dikkat ederek pH 7,40 olana dek çözeltiye eklendi.

- Tris ile pH 7,40' a ayarlandıktan sonra çözelti hacmi ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

- Hazırlanan çözelti ağzı kapatıldıktan sonra parafilmlendi ve +4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 4.3 500 ml SBF hazırlamak için gerekli reaktifler ve miktarları.

	Reaktifler	**Miktar**	**Moleküler ağırlık**
1	137,8 mM NaCl	4,0267 g	58,4430
2	4,2 mM $NaHCO_3$	0,17642 g	84,01
3	3 mM KCl	0,11182 g	74,55
4	1 mM K_2HPO_4	0,08709 g	174,18
5	1 mM $MgCl_2$	500 µl	-
6	1,0 M-HCl	19,5 ml	-
7	2,5 mM $CaCl_2$	0,18376 g	147,01
8	0,5 mM $MgSO_4.7H_2O$	0,06162 g	246,48
9	50 mM Tris	3,0275 g	121,10

4.2.3.2 Polimerik iskelelerin SBF içerisinde hidroksi apatit ile kaplanması

Kemik dokusu oluşumuna yönelik olarak kullanılması planlanan polimer iskeleler, yüzeylerinin hidroksiapatit ile kaplanması için 36,5°C'de 28 gün süreyle SBF içerisinde bekletildi. Bu işlem için öncelikli olarak hazırlanan iskeleler küçük parçalar halinde bistrü yardımı ile kesildi ve kütle tartımı yapılarak 48 kuyucuklu petrilere konuldu. SBF 36,5°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra, her bir örnek için kuyucuklara 500 µl SBF eklendi. 28 gün boyunca günlük olarak SBF çözeltisinin değişimi yapıldı. 28'inci günün sonunda örnekler kurutuldu ve son kütleleri tartılarak toplam kütle değişimi belirlendi.

4.2.4 İskelelerin Karakterizasyonuna Yönelik Analizler

Kollajen/hiyalüronik asit/kondroitin sülfat kullanılarak hazırlanan ve sonrasında hidroksiapaptit ile kaplanan farklı yapıdaki 72 adet KOL/HYA/KS-HA iskelelerin kimyasal yapısı, morfolojisi, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerinin belirlenmesi amacıyla karakterizasyon analizlerine verilen sırayla başlanmış olup, yetersiz özelliği tespit edilen iskelelerin ileri analizleri yapılmamıştır. Her bir deney serisine ait numunelere numaralandırma yapılarak (Tablo 4.4) analiz sonuçları bu numaralar ile verildi. Analizler ücreti karşılığında Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

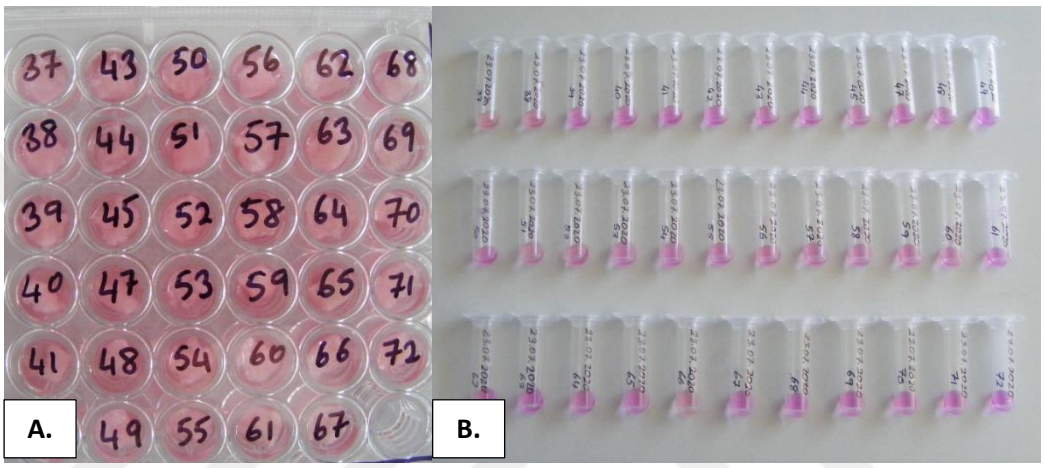
Tablo 4.4 Analizlenmek üzere hazırlanan iskele sistemlerinin numerik isimlendirilmesi

Kod	İskele Özelliği (K)KOL/HYA/KS	Kod	İskele Özelliği (Ç)KOL/HYA/KS
1	%0,5 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	37	%0,5 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10 '
2	%0,5 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	38	%0,5 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20 '
3	%0,5 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	39	%0,5 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30 '
4	%0,5 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	40	%0,5 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-10'
5	%0,5 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	41	%0,5 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-20'
6	%0,5 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	42	%0,5 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-30'
7	%0,5 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10 '	43	%0,5 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
8	%0,5 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	44	%0,5 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
9	%0,5 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30 '	45	%0,5 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30'
10	%0,5 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	46	%0,5 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-10'
11	%0,5 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	47	%0,5 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-20'
12	%0,5 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	48	%0,5 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)-30'
13	%1 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	49	%1 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
14	%1 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	50	%1 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
15	%1 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	51	%1 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30 '
16	%1 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	52	%1 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
17	%1 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	53	%1 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
18	%1 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	54	%1 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30'
19	%1 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	55	%1 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10 '
20	%1 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	56	%1 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20 '
21	%1 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	57	%1 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30 '
22	%1 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	58	%1 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
23	%1 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	59	%1 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
24	%1 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	60	%1 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30'
25	%2 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	61	%2 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
26	%2 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	62	%2 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
27	%2 Kollajen+0,05gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	63	%2 Kollajen+%1 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30 '
28	%2 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	64	%2 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
29	%2 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	65	%2 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20 '
30	%2 Kollajen+0,075gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	66	%2 Kollajen+%1,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30 '
31	%2 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	67	%2 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
32	%2 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	68	%2 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
33	%2 Kollajen+0,1gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	69	%2 Kollajen+%2 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30'
34	%2 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 10'	70	%2 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 10'
35	%2 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 20'	71	%2 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 20'
36	%2 Kollajen+0,125gr Hyalüronikasit+0,005gr Kondroitin Sülfat 30'	72	%2 Kollajen+%2,5 Hyalüronikasit+%0,1 Kondroitin Sülfat (8:1:1)- 30'

4.2.4.1 Biyobozunurluk analizi

Tablo 4.4'e göre hazırlanan KOL/HYA/KS-HA iskelelerinin biyobozunurluk süresinin tespiti için fizyolojik ortam koşullara yakın özellikte olması nedeniyle Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi (Sigma-Aldrich, UK) kullanıldı. Hidroksiapatitle

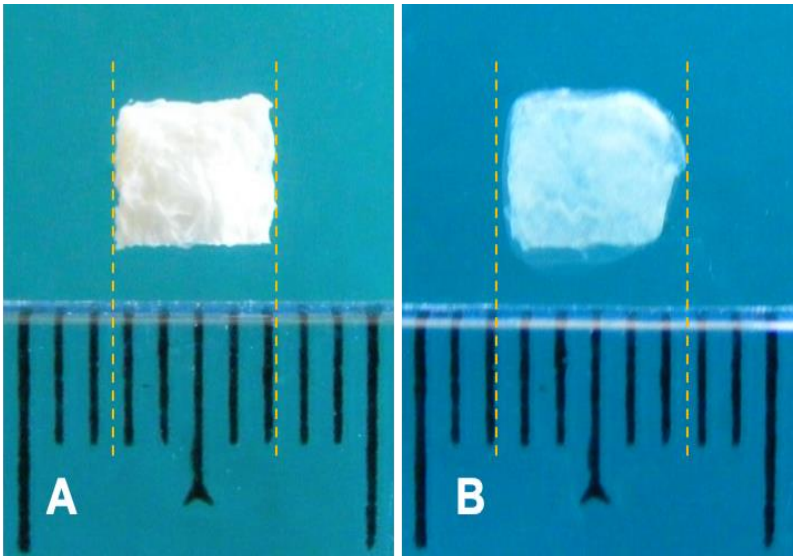
kaplanan iskeleler bistrü yardımı ile kesildi. Kesilen örnekler işlemlere başlamadan önce tartımı yapılarak 96 kuyucuklu petrilere konuldu. Her bir iskele için kuyucuklara 250 µl Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi eklendi ve 37° C'ye ayarlı etüvde inkübe edildi. İşlemin başlama saati dikkate alınarak 24 saat sonunda kuyucuklardaki çözelti alınarak iskeleler etüvde yaklaşık 4 saat boyunca kuruması için bekletildi ve her bir iskele için kütle değişimi tartılarak tespit edildi. İşlemlere aynı analitik terazi (Precisa, Switzerland) kullanılarak 14 gün süreyle devam edildi.



Şekil 4.4 Biyobozunurluk analizi A. Hazırlanan iskelelere Hank'in dengeli tuz çözeltisi eklendikten sonraki görünümü. B. 24 saat sonunda kuyucuklardan alınan çözelti

4.2.4.2 Islanabilirlik analizi

KOL/HYA/KS-HA iskelelerinin su tutma kapasiteleri saf su su içerisinde test edildi. Hazırlanan iskeleler bistrü yardımı ile kesildi. Kesilen örnekler, analitik terazide tartımı yapılarak kütleleri belirlendikten sonra 96 kuyucuklu petrilere konuldu. Her bir iskele için kuyucuklara 250 µl saf su eklendi ve 37°C'ye ayarlı etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda iskelelerin üzerindeki suyun fazlası uzaklaştırıldı ve ıslak kütleleri tartımı yapılarak belirlendi. Kuru kütleye karşı %su tutma kapasitesi hesaplanarak grafiğe geçirildi.



Şekil 4.5 A. Kuru haldeki bir (K)KOL/HYA/KS-HA iskele (Örnek no-63), B. 24 saat saf su içerisindeki inkübasyonun sonundaki boyutsal değişiminin 2B-görüntüsü

4.2.4.3 Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre (FTIR) ile kimyasal yapı analizi

İskelelerin yapılarında bulunan molekülleri ve iskele üretimi sırasında homopolimerik yapılara göre meydana gelen değişimleri tespit etmek amacıyla, Polimer kompozit iskeleler (KOL/HYA/KS) ile 28 gün SBF içerisinde inkübe edilen iskelelerin (KOL/HYA/KS-HA) kimyasal yapıları FTIR ile analizlendi. Bu amaçla analizi yapılacak örnekler kurutulduktan sonra kütlelerinin yaklaşık yüz katı kadar kristal KBr (Sigma) ile karıştırılıp, agat havanda ince toz haline gelene kadar öğütüldü; kontrollü olarak arttırılan basınç altında özel kalıplar arasında disk haline getirildi. Örnekler, elektromanyetik spektrumunda 4000-450 cm-1 dalga boyu arasında Bruker alpha marka-model ATR-FTIR cihazı ile incelendi.

4.2.4.4 İyon salım analizi

SBF içerinde mineralize edilerek yüzeyinde başarılı şekilde apatit kaplaması olan kompozit iskeleler, 96 kuyucuklu petri kap içerisine konuldu ve üzerine Hank'in dengeli tuz çözeltisi eklendi, 37°C'ta 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda vasat değişimi yapıldı ve eski vasat ependorf tüp içerisine alınarak etiketlendi, element analizi için oda sıcaklığında saklandı. Bu işlem günlük olarak 7 gün süreyle devam ettirildi ve element salımı değerleri hücre canlılık analizleri ve proliferasyon döngüsü

de dikkate alınarak 1, 3 ve 7inci günler için SPECTRO BLUE II marka Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopi (ICP-OES) cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen değerler element bazında değerlendirilerek, örnekler arasında karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirildi.

4.2.4.5 Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile morfoloji analizi

İskelelerin morfolojik yüzey analizi için KOL/HYA/KS ve KOL/HYA/KS-HA iskelelerden belirli boyutlarda örnekler kesilerek numune tutuculara sabitlendi. Örnekler altın-paladyum ile kaplandıktan sonra Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta FEG 250) ile yapıları incelendi. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

4.2.4.6 Termogravimetrik analiz (TGA)

Termogravimetrik yöntem, hazırlanan iskeleler üzerinde sıcaklık değişiminin neden olduğu değişimleri belirlemek amacıyla yapıldı. Artan sıcaklığın numune kütlesinde değişim oluşturması, büyük ölçüde bozunma ve yükseltgenme reaksiyonlarının gerçekleşmesinin yanısıra buharlaşma, süblimleşme ve desorpsiyon gibi fiziksel değişimlerden de kaynaklanmaktadır. Polimerik yapıların termal özellikleri ve ısı karşında gösterdikleri davranışları, HITACHI marka STA7300 model termogravimetrik analiz (TGA) sistemi kullanılarak incelendi.

Örneklerden belirli miktarlara tartılarak alüminyum pan içerisine yerleştirildi. Numuneler için deney koşulları, oda sıcaklığından (21°C) 600°C'ta kadar 10°C/dk ısıtma hızı ile azot/kuru hava karışımının kullanılması ile oluşturuldu. Sıcaklık artışına karşı kütle değişim verileri istatistiki olarak incelenmiş olup, kütledeki yüzdesel değişim tespit edilerek sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi.

4.2.4.7 XRD analizi

(K)KOL/HYA/KS-HA ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin kristal yapıları, X-ışını difraksiyon spektroskopisi (XRD) yöntemine göre, Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi envanterindeki Bruker D8 Advance marka-model

XRD cihazı ile gerçekleştirildi. Numunelerin, X-ışını kırınım deseni elde edildikten sonra yapılan yarı-kantitatif analizlerde seramik yapıların bileşim oranları ile sistem kütüphanesinde bulunan veriler ile karşılaştırma yapılarak fazların belirlenmesine çalışıldı. Örneklerin kristal yapıları ve örgüyü oluşturan bileşenler XRD cihazı ile 2q: 5-90° aralığında, 0,05° artış ve 1,2 s/°tarama hızı parametrelerine göre analizlendi.

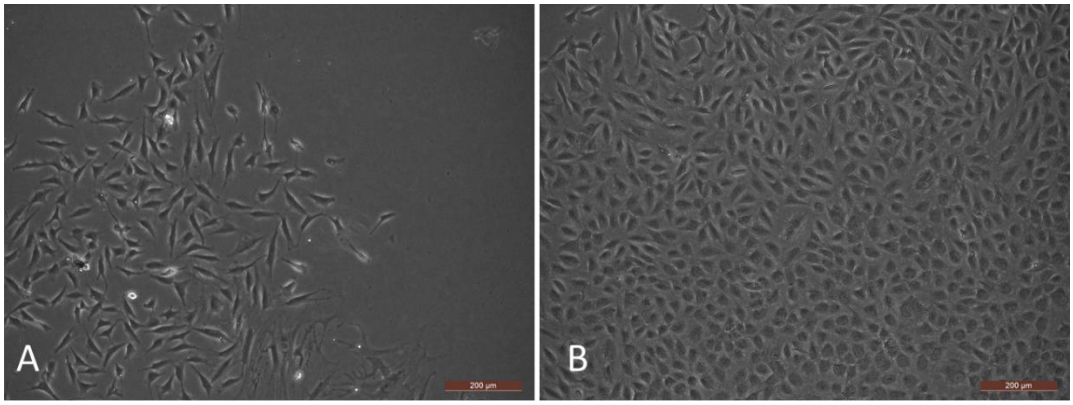
4.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları ve Analizleri

4.2.5.1 Hücre izolasyonu

Deneylerde kullanılacak olan osteosit hücreleri Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesindeki deney hayvanları laboratuvarında bulunan Wistar sıçanlarının kalvaria ve tibia kemiğinden elde edildi. Wistar sıçanlarından aseptik koşullarda çıkartılan kemik örnekleri taşıma çözeltisi içerisinde Doku Kültür Laboratuvarına getirildi ve işlemlere steril ortamda devam edildi. Örnekler, PBS ile yıkanarak pens ve makas yardımı ile üzerindeki kas ve doku parçaları dikkatli bir şekilde temizlendi. Kemik temizlendikten sonra epifizleri kesilerek kemik içerisinde bulunan kemik iliği PBS ile uzaklaştırıldı. Temiz diyafizler makas kullanılarak yaklaşık 1-2 mm'lik küçük parçalar halinde kesildi ve hücre dışı matriksin dekompozisyonu için kollajenaz/pronase içeren enzim çözeltisi içerisinde 37°C'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Süre sonunda elde edilen süspansiyon pipetaj uygulanarak dağıtıldı ve +4°C'de 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 4 ml PBS eklendi ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek yıkama yapıldı. Elde edilen hücre pelleti vasat ortamı ile resüspanse edilerek hücre çoğaltımı için T-75 doku kültür kaplarına ekilerek 37°C'de %5 CO_2 ve %95 nem ayarlı inkübatöre yerleştirildi.

4.2.5.2 İskelelerin sterilizasyonu ve ıslatılması

Hazırlanan iskeleler 90 dk ön yüzü, 90 dk arka yüzü ve 1 saatte petri kapağı kapalı bir şekilde UV ışık altında muamele edilerek steril edildi. Hücre ekimi öncesinde steril iskeleler %20 FBS içeren DMEM Low Glikoz içerisinde 2 saat bekletilerek yüzeylerinin ıslanması sağlandı.



Şekil 4.6 A.İzole edilen sOB'lerin 3. gün hücre kültürü B. Çoğaltılan sOB'lerin dikdörtgen yamuk şekilli morfolojisi

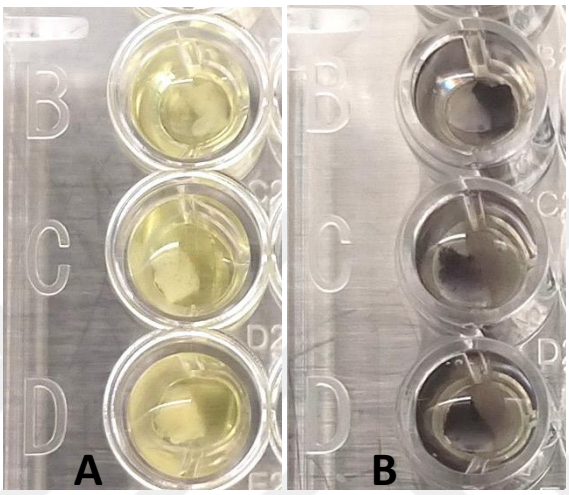
4.2.5.3 İskelelere hücrelerin tohumlanması

Osteojenik hücreler (Şekil 4.6) tripsin-EDTA kullanılarak T-75 kaplarının yüzeyinden kaldırıldı ve enzimi uzaklaştırmak için DMEM ile 1100 rmp'de 10 dk süreyle santrifüjlenerek yıkandı. Yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti vasatta çözüldü. Hücre ekimi öncesinde %20 FBS içeren vasatla ıslatılan iskeleler 24 kuyucuklu petriler içerisine konularak üzerine $5x10^3$/iskele olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeye yapışması için 1 saat beklendikten sonra osteojenik tam vasat kullanılarak hacim tamamlandı. Osteojenik vasat olarak %10 FBS, %1 Penicilin streptomicin, %1 Askorbik asit, %1 β-gliserofosfat, %1 Aminoasit, %1 L-Glutamin, %1 Dexametasone içeren DMEM Low Glikoz kullanıldı ve gün aşırı vasat değişimi yapıldı. Kültür işlemi, 37°C, %5 CO_2, %95 hava ve %90 nem içeren inkübatörde 28 günlük gerçekleştirildi.

4.2.5.4 MTT analizi

Hücre canlılık analizi mitokondriyal dehidrogenaz aktivisitesine dayalı kolorimetrik MTT test kiti (Serva, Almanya) kullanılarak kalitatif ve yarı-kantitatif olarak haftalık zaman noktalarında gerçekleştirildi. Analiz işlemi için her bir iskeleden aynı boyutta ve yüzey alanından kesilen örnek parçaları steril pens yardımı ile alınarak 96 kuyucuklu petri içerisine konuldu. Her bir kuyucuk içerisine 225µl DMEM low glikoz (%1 penisilin/streptomisin içeren), 25µl MTT reaktifi eklendi ve 4 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi (Şekil 4.7).

Süre sonunda oluşan formazan kristalleri invert faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi. Sonrasında oluşan formazan kristalleri 250 µl %1'lik HCl (isoprapanolde) çözeltisi ile muamele edilerek çözüldü ve 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucusu (Biotek, ABD) kullanılarak absorbans ölçümü yapıldı. Her bir iskele için ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 4.7 MTT reaktifi ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu öncesi (A) ve sonrası (B) görünümü.

4.2.5.5 Alkalin fosfataz test analizi

İskele-hücre örneklerinde gelişen kemiksi yeni dokunun gelişimini takip etmek için kemik doku biyoişaretleyicilerinden alkalin fosfataz aktivitesi takip edildi. Belirli zaman noktalarında (7., 14., 21., 28. gün) alınan örnekler Alkalin Fosfataz Test kiti (Bioassay Systems) ile muamele edilerek spektrofotometrik olarak analizlendi. İskele-hücre örneklerinin bulunduğu kuyucuktan kirli vasat dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak kuyucuğa 1 ml PBS eklendi ve pipetaj ile yıkama yapıldı. PBS içerisine hücre kalıntıları geçebileceğinden karışım ependorf tüp içerisine konularak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süre sonunda süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 250 µl %0,2 Triton-X eklendi. Ayrıca petri içerisinde PBS ile yıkanan iskele üzerine de 250 µl %0,2 Triton-X eklenerek her iki örnek aksiyel karıştırıcı üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda her iki örnek tek bir ependorf tüp içerisinde birleştirilerek -20°C'de analiz edilinceye kadar bekletildi.

$$ALP\ Aktivitesi = \frac{(OD_4 - OD_0)xRV}{(OD_{kalibratör} - OD_{su})xSVxt} x35{,}3 \quad (4.1)$$

Örneğin 405 nm'deki, OD_4, t=4 dk daki optik yoğunluğu, OD_0, t=0 dk daki optik yoğunluğu; RV, reaksiyon hacmi; SV, örnek hacmi.

28. gün sonunda ALP analizi için toplanan tüm örnekler -20°C'den çıkarılarak çözüldü. 96-kuyucuklu petri içerisine 50 µl numune çözeltisi, 150 µl çalışma solüsyonu eklenerek 405 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucusu (Biotek, ABD) kullanılarak absorbans değeri ölçüldü. Bulunan değerler denklem 4.1'de yerine konularak ALP aktivitesi hesaplandı ve sonuçlar grafiğe geçirilerek değerlendirildi.

4.2.5.6 Histokimyasal analizler

Histokimyasal analizler dondurarak kesit alma yöntemine göre yapıldı. Belirli zaman noktalarında alınan iskele-hücre örnekleri histokimya analizleri için %15'lik sükroz çözeltisinde +4°C'ta fikse edildi. Akabinde, doku dondurma kaplarına dondurma çözeltisinden (Tissue freezing medium, Jung, Almanya) eklendi ve fiksasyonu tamamlanan örnekler içerisine yerleştirilerek 30'ar dakika bekletildi. Süre sonunda üzerine tekrar dondurma çözeltisi eklendi ve -20°C'ta dondurularak kesit almaya hazır hale getirildi. Hazırlanan örneklerden dondurarak kesit alma cihazı (Leica CM 1860 UV, Wetzlar, Almanya) kullanılarak 8 µm kalınlığında kesitler cam slaytlar üzerine alınarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesit alma işleminden sonra örnekler alizarin kırmızısı (Sigma) ve Safranin-o (Sigma) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

4.2.5.6.1 Alizarin boyaması

Dondurarak kesit alma yöntemine göre hazırlanan iskele-hücre preperatları yapıdaki kalsiyum miktarının tespiti için alizarin kırmızısı ile boyandı. Standart boyama protokolü takip edilerek örnekler boyandı ve ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında 10X büyütme ile incelendi.

- Dondurma mediumunun uzaklaştırılması için kesitler PBS ile yıkandı.

- Kesitler 5 dk alizarin kırmızısı ile muamele edildi.

- Boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla örnekler saf su ile yıkandı.

- Örnekler kuruduktan sonra ışık mikroskobunda 10X büyütme ile görüntülendi.

4.2.5.6.2 Safranin-O boyaması

İskeleler üzerinde gelişen yeni kemik dokusunun yapısındaki toplam protein miktarının tespiti için kesitler safranin-o ile boyandı. Standart boyama protokolüne göre boyanan örnekler ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında 10X büyütme ile incelendi.

- Dondurma mediumunun uzaklaştırılması için kesitler PBS ile yıkandı.

- Kesitler 7 dk Weigert's demir hematoksilen çözeltisi ile muamele edildi.

- Boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla örnekler saf su ile yıkandı.

- 3 dk fast green çözeltisi ile muamele edildi.

- Süre sonunda hızlıca %1'lik asetik asit çözeltisi ile 10-15 s yıkandı.

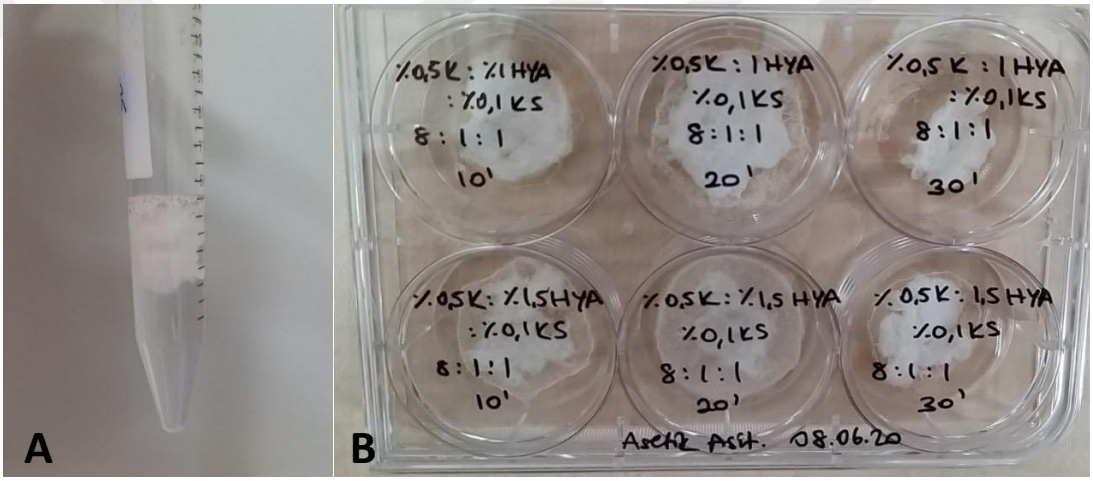
- 5 dk %0,1 safranin-o çözeltisi ile muamele edildi.

- Örnekler kuruduktan sonra ışık mikroskobunda 10X büyütme ile görüntülendi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

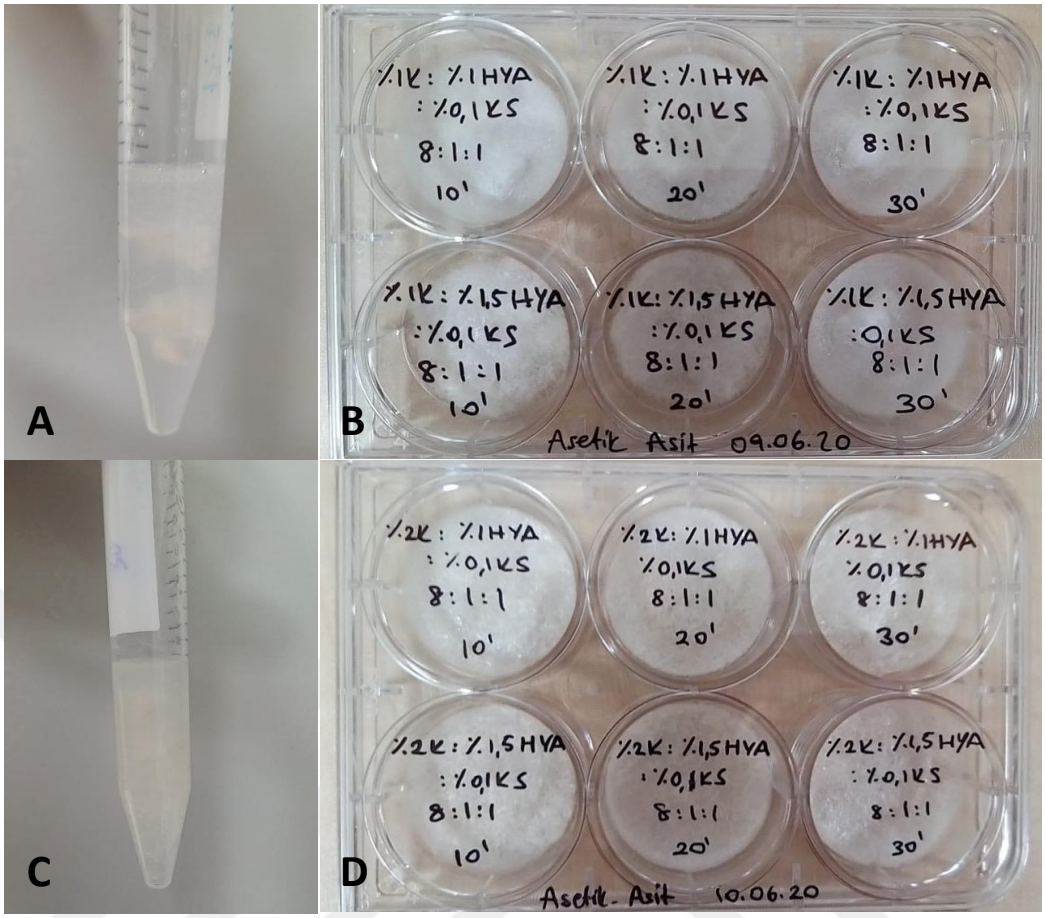
5.1 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat İskelelerinin Hazırlanması

Karıştırma süresine bağlı olarak iskelelerdeki çapraz bağlanma ve zincir dolanlamaları sonucu iskele yapıların stabilitesinde artış gözlemlendi. Tüm çözeltilerin vortex ile karıştırılması sonrası çözeltinin katı-jel formunda süspansiyon ile sudan oluşan 2 faza ayrıldığı görüldü. Örneklerden %0,5 kollajen ile hazırlanan iskelelerin, liyofilizasyon işleminden sonra diğer örneklere kıyasla hacimce küçüldüğü görüldü.



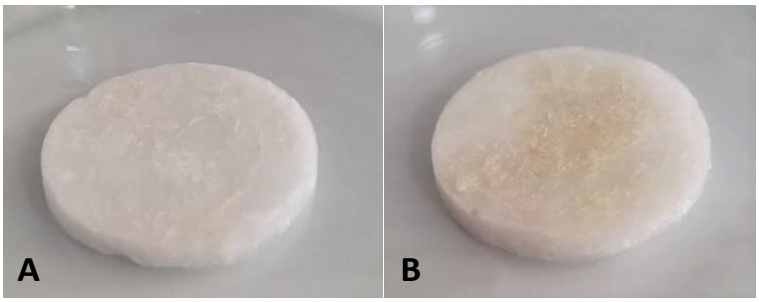
Şekil 5.1 A. %0,5 kollajen ile hazırlanan iskelenin vortex sonrası görünümü. B. %0,5 kollajen ile hazırlanan iskelelerin liyofilizasyon sonrası görünümü.

Örneklerden, %1 ve %2 kollajen kullanılarak hazırlanan karışımlarda da benzer bir durum gözlenmekle birlikte artan kollajen oranıyla orantılı olarak faz ayrımının daha az olduğu, buna karşın jelimsi yapının daha fazla oranda oluştuğu ve dolayısıyla liyoflizasyon sonucu homojen yapıda 3-boyutlu poröz iskeleler elde edildiği belirlendi.



Şekil 5.2 %1 kollajen ile hazırlanan iskelenin A. vortex işlemi sonrası iki fazlı görünümü ve B. liyofilizasyon sonrası oluşan iskelelerin görünümü. %2 kollajen ile hazırlanan iskelenin C. vortex işlemi sonrası iki fazlı görünümü ve D. liyofilizasyon sonrası oluşan iskelelerin görünümü.

Artan kollajen miktarına bağlı olarak polimer karışımlarda vortekle karıştırma işlemlerinde faz ayrılmaları daha az gözlenmesine karşın, liyofilizasyon sonrasında elde edilen katı iskele yapılarda tersi bir durumla yüksek kollajen içeriğinde heterojenitenin daha fazla olduğu görüldü.



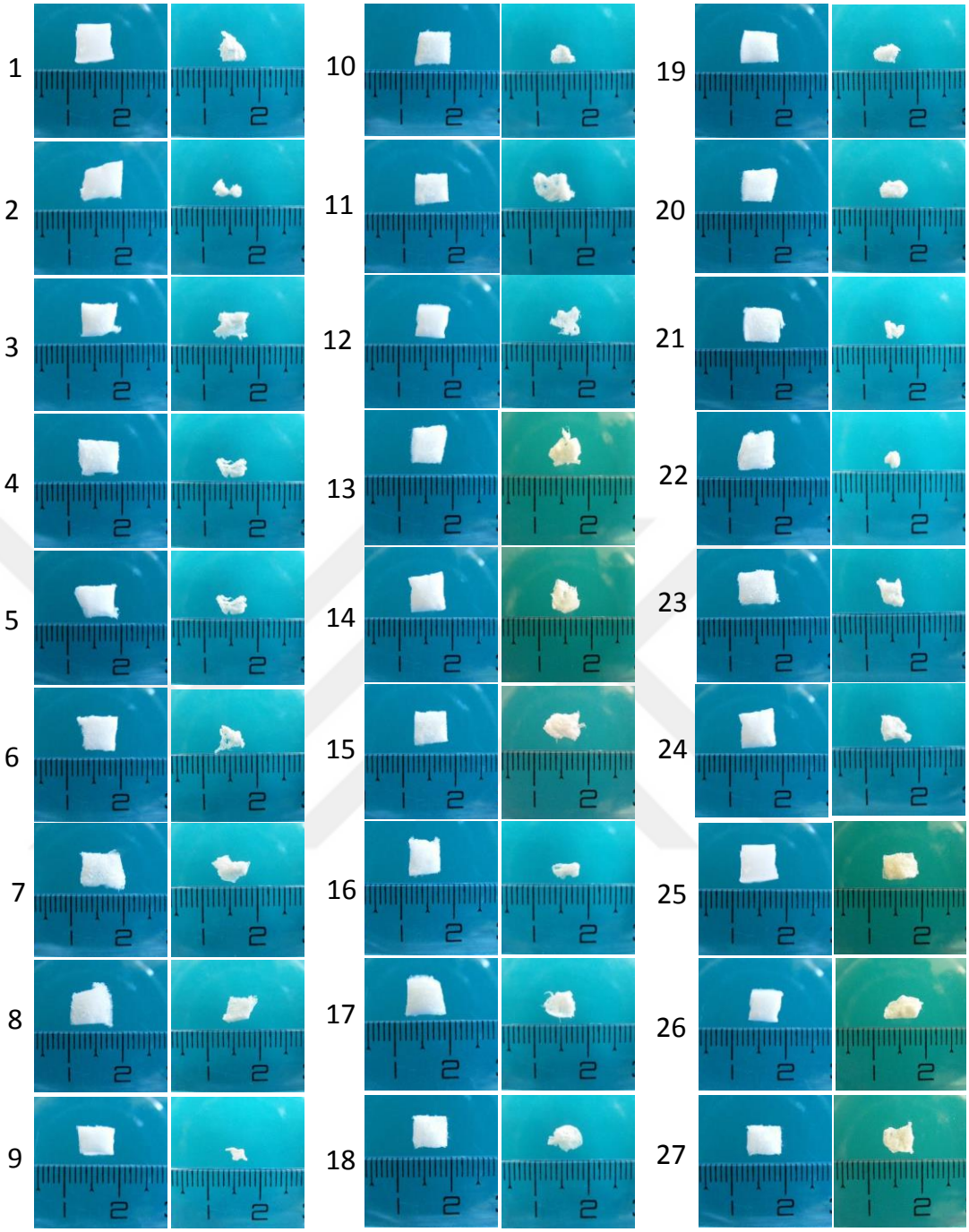
Şekil 5.3 Kollajen konsantrasyonuna bağlı olarak yapıdaki çapraz bağlanmaların miktarı. A.%1Kollajen:%1Hiyalüronik asit:%0,1Kondoitin Sülfat B. %2Kollajen:%1 Hiyalüronik asit:%0,1Kondoitin Sülfat.

5.2 Kollajen/Hiyalüronik Asit/Kondroitin Sülfat Kompozit İskelelerinin Hidroksiapatitle Kaplanması

SBF içerisine konulmadan önce eşit parçalar halinde kesilerek tartımları yapılan iskelelerin kütlelerinin yoğunluklarının farklı olmasına bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlendi. SBF içerisinde bekletilen örneklerin morfolojik değişimlerini gözlemlemek amacıyla numuneler haftalık olarak fotoğraflandı.

Çözelti halindeki polimer karışımlardan (Tablo 4.4) hazırlanan deney serisine ait iskelelerin; kollajen çözelti içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan polimer karışımları ile hazırlanan deney serisine ait iskelelere kıyasla SBF içerisinde bozunmadan daha stabil halde kaldıkları gözlemlendi (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5). Buna karşın kollajen çözelti içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan deney serisine ait iskeleler SBF içerisine konulduktan 1 gün sonra SBF değişimi sırasında SBF çözeltisinin viskozitesinde artış gözlemlendi.

SBF de bekletilmesi için 48-kuyucuklu petri içerisine konulan 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 numaralı örneklerin, SBF de bir gece bekletilmesinden sonra 3B yapısının hızla bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu iskelelerin SBF değişimi sırasında parçalandığı ve SBF içerisinde çözündüğü gözlemlendi. Bu nedenle bu iskelelerin HA kaplamları gerçekleştirilemediğinden daha ileri analizleri de yapılamadı.



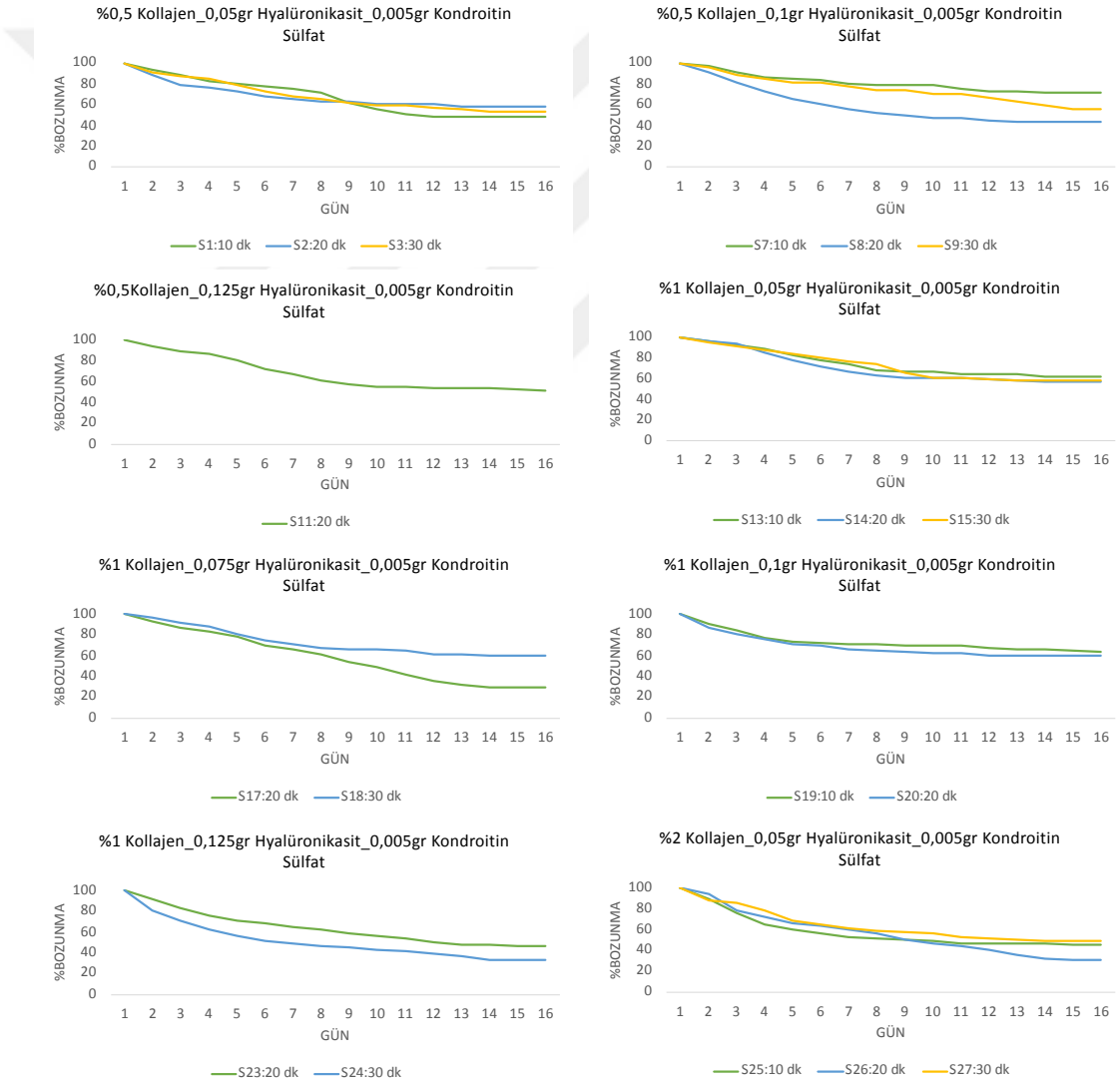
Şekil 5.4 Kollajen çözeltisinde diğer KS ve HYA'nın çözünmesiyle hazırlana polimer karışımlarından (Tablo 4.4) 1-27 numaralı deney serisine ait iskelelerin SBF ile muamele öncesi ve sonrası görünümlerine ait fotoğrafların karşılaştırmalı olarak analizlenmesi. Genel olarak SBF muamelesi sonucu hacimsel olarak azalmanın olduğu ve 3B yapıda bozulmaların meydana geldiği belirlendi.



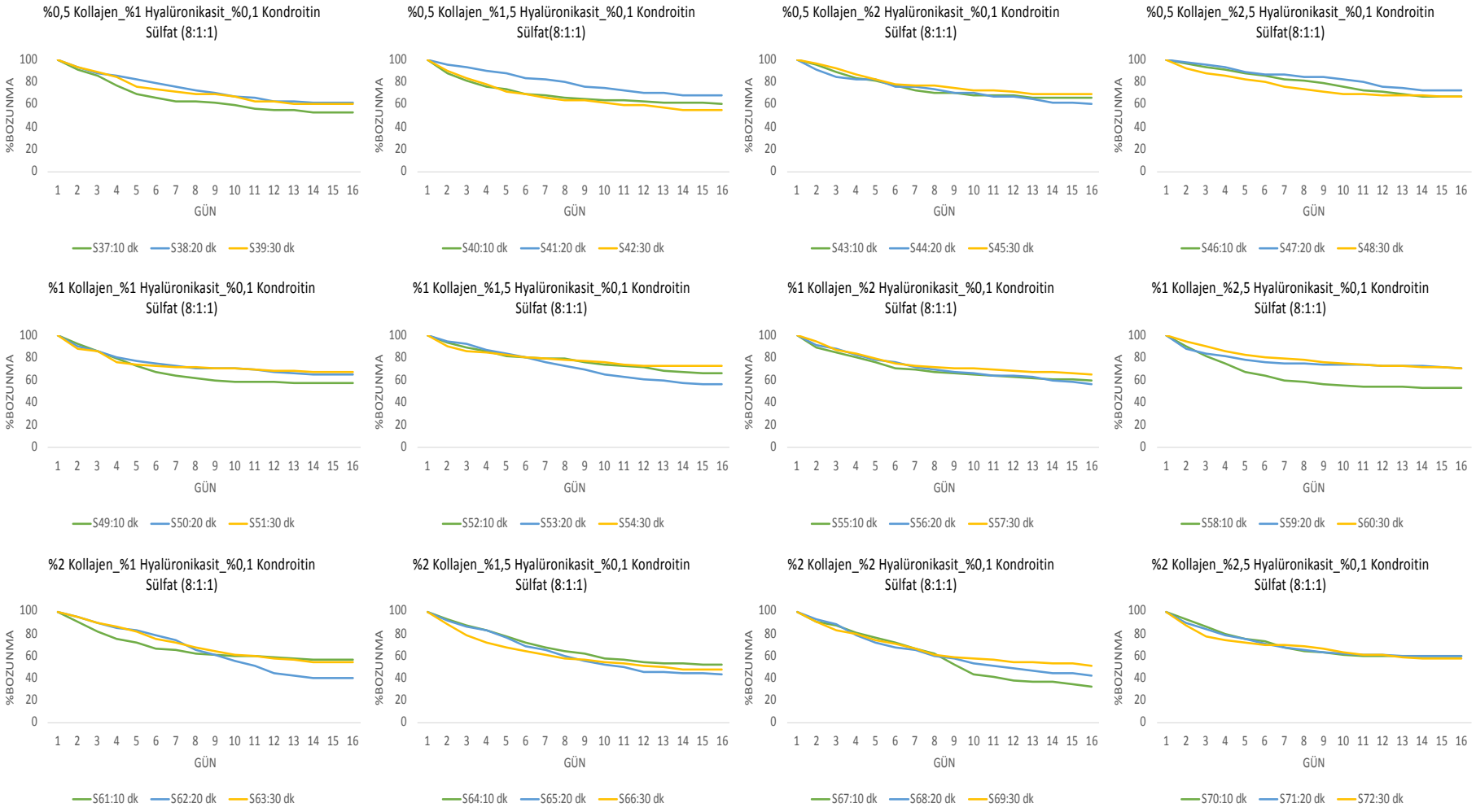
Şekil 5.5 KOL, KS ve HYA çözeltileri kullanılarak hazırlanan polimer karışımlarından (Tablo 4.4) 37-72 numaralı deney serisine ait iskelelerin SBF ile muamele öncesi ve sonrası görünümlerine ait fotoğrafların karşılaştırmalı olarak analizlenmesi. Genel olarak SBF muamelesi sonucu hacimsel olarak azalmanın olduğu ve buna karşın 3B yapının genel olarak korunduğu belirlendi.

5.3 Biyobozunurluk Süresinin Tespiti

Hazırlanan örneklerde meydana gelen kütle değişimi gravimetrik olarak belirlendi ve kuru kütle değişimi yüzdesel olarak hesaplanarak grafiğe geçirildi (Şekil 5.6 ve Şekil 5.7). İskelelerin bozunma oranı karşılatırıldığında en yüksek bozunma oranına sahip iskelenin %30 bozunma oranıyla kollajen çözelti içerisinde katı HYA ve KS çözündürülmesiyle hazırlanan 17 numaralı iskele olduğu tespit edilirken en düşük bozunma oranına sahip iskelenin ise %72 bozunma oranıyla 47 ve 54 numaralı iskele olduğu tespit edildi.



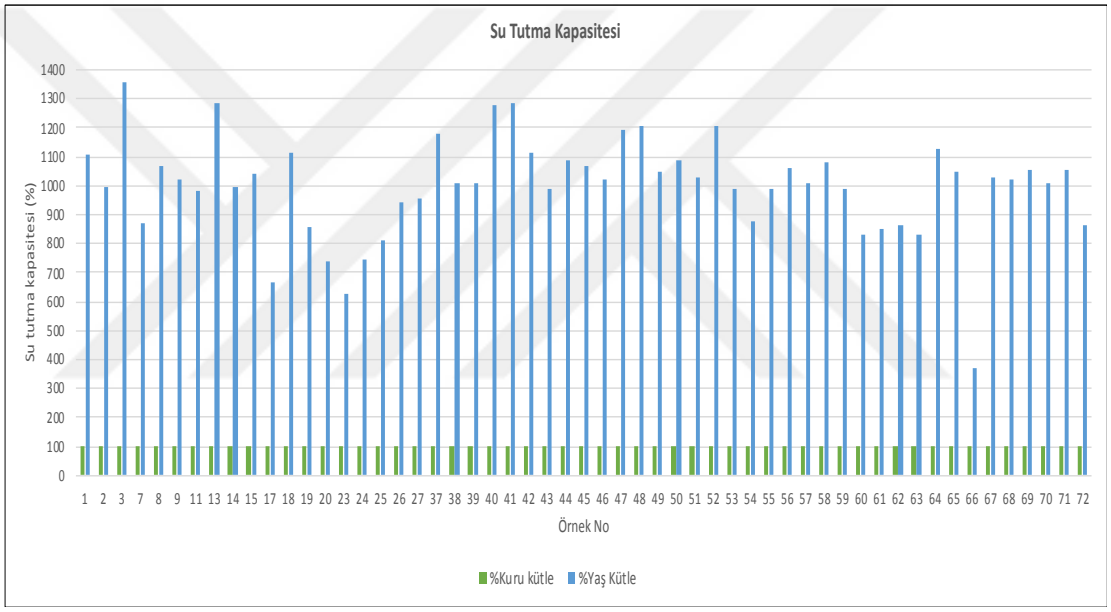
Şekil 5.6 (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin biyobozunurluk oranları



Şekil 5.7 (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin biyobozunurluk oranları

5.4 Su Tutma Kapasitesinin Tespiti

Kollajen/hiyalüronik asit/kondroitin sülfat kullanılarak Tablo 4.4'e göre hazırlanan ve hidroksiapaptitle kaplanması sonucu elde edilen iskelelerin 24 saat süreyle saf su içerisinde inkübasyonu ile gerçekleştirilen su tutma kapasiteleri gravimetrik olarak ölçüldü ve sonuçlar yüzde miktar olarak hesaplanarak grafiğe (Şekil 5.8) geçirildi. Şekil 5.8'de görüldüğü üzere, en yüksek su tutma kapasitesine sahip numunenin 3 numaralı iskele olduğu, en düşük su tutma kapasitesine sahip numunenin ise 66 numaralı iskele olduğu tespit edildi.



Şekil 5.8 İskele örneklerinin, kuru kütlelerine karşı su tutma kapasitesinin yüzdesel olarak gösterimi

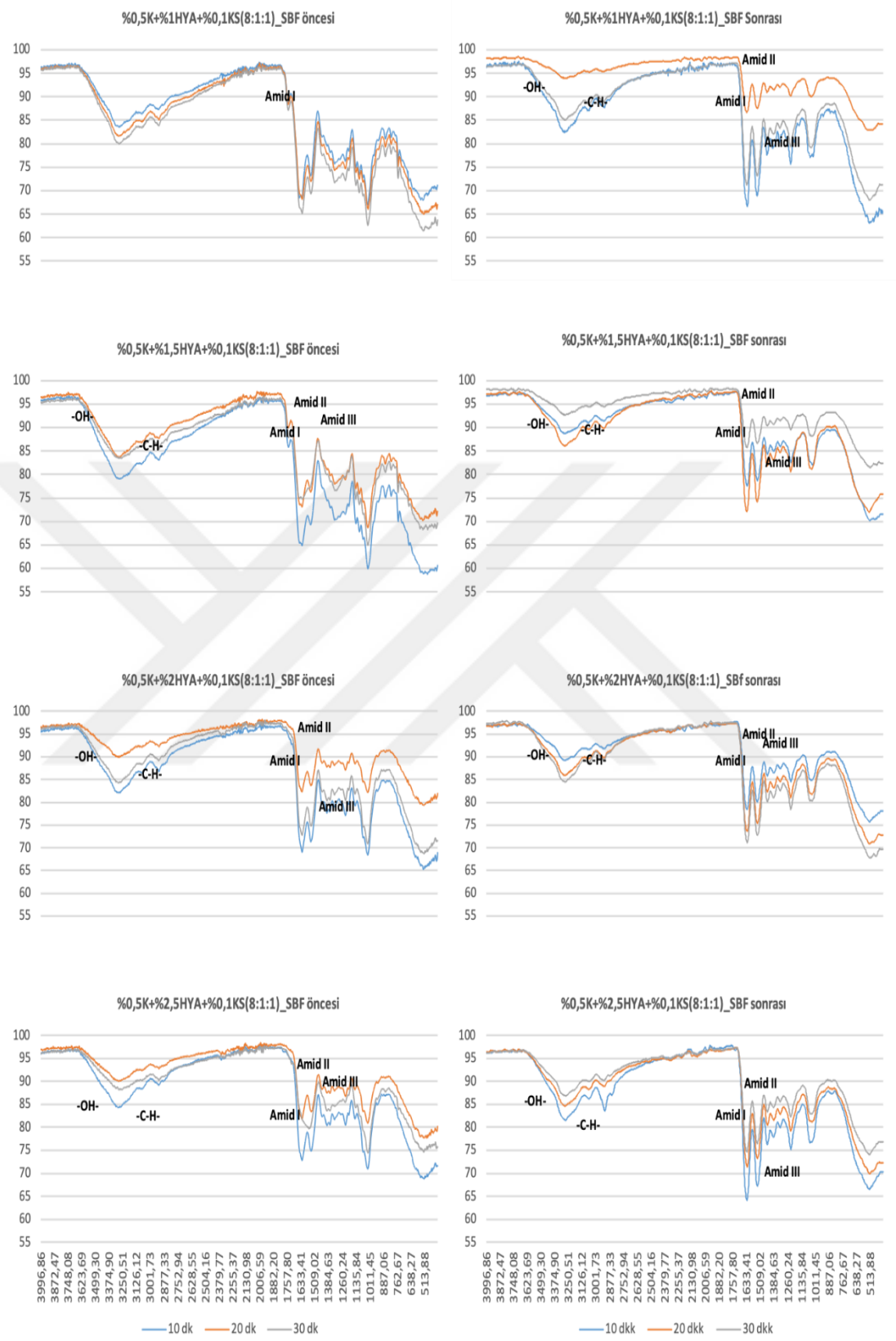
5.5 FTIR Analizi

Hazırlanan iskelelerin HA kaplanmadan önceki ve sonraki kimyasal yapıları FTIR ile incelenerek sonuçları Şekil 5.9-14'te verildi. %0,5, %1 ve %2 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS iskelelerin SBF ile muamele öncesi FTIR spektrumları (Şekil 5.9-11) incelendiğinde –OH bölgesinde görülen piklerin benzer bölgelerde olduğu ve alan değerlerinin her grupta farklı olduğu görüldü. Karıştırma süresine bağlı olarak iskelelerin –CH bölgesinde farklı şiddette pik verdiği verdiği gözlendi. FTIR spektrumlarında–OH bölgesi, -CH bölgesi, amid I, II, III ve parmak izi bölgelerinde

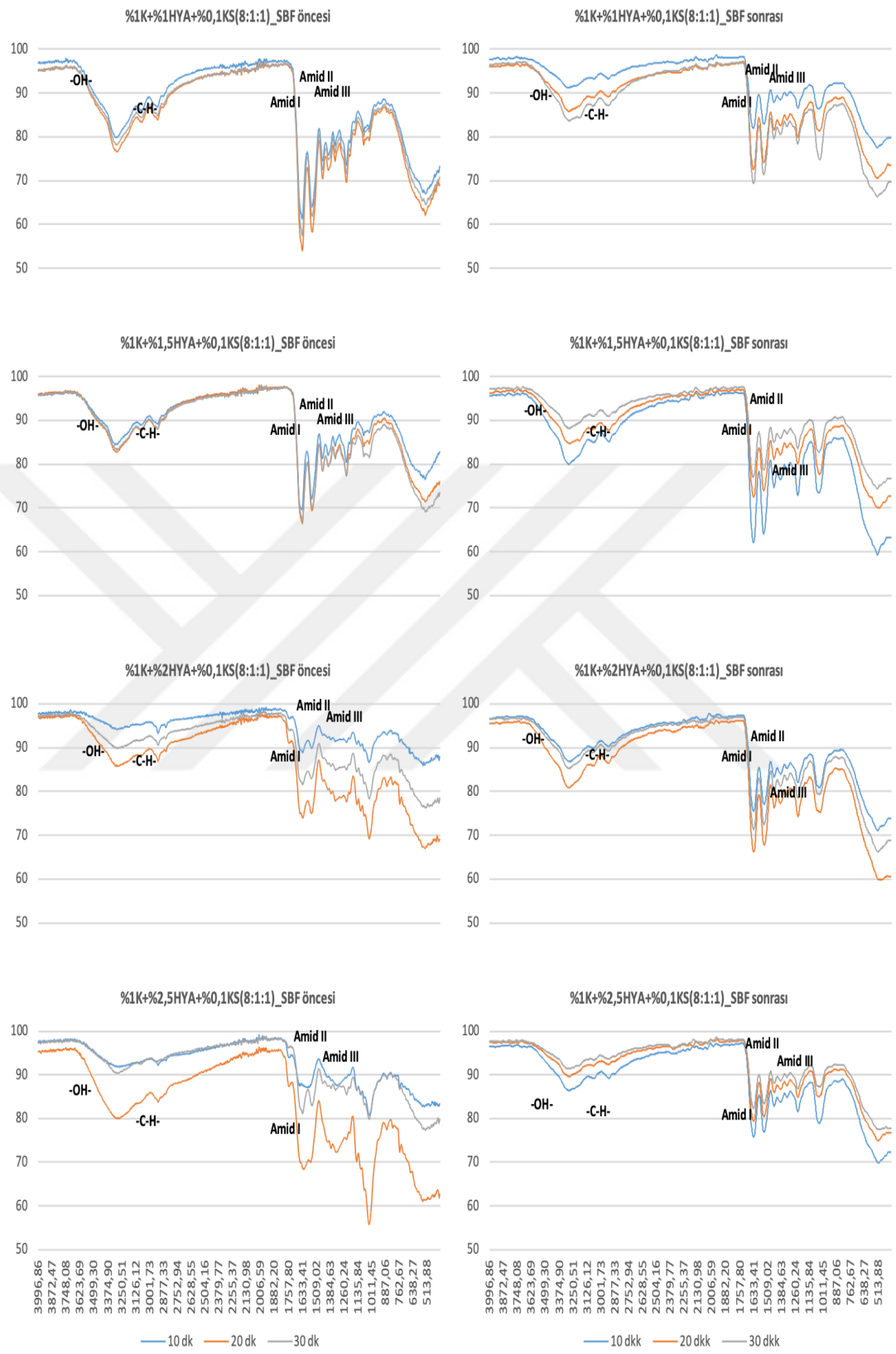
kullanılan polimerlere özgü ait pikler gözlendi. Elde edilen spektrumlarda genel olarak numunelerin parmak izi bölgeleri hariç, diğer bölgeleri benzer pikler görüldü.

Polimer karışımında %0,5, %1 ve %2 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS iskelelerin SBF ile muamele sonrası FTIR spekturumları incelendiğinde yaklaşık aynı bölgelerde benzer piklerin oluştuğu ancak, karıştırma süresi değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetinde değişikliklerin meydanan geldiği belirlendi. FTIR spektrumlarında –OH bölgesi, -CH bölgesi, Amid I, II ve kompozitteki her bileşene ait parmak izi bölgesi pikleri gözlendi. –OH bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer frekans değerlerinde ortaya çıktığı ve alan şiddetlerinin her grupta farklı olduğu, –CH bölgesinde ise karıştırma süresine bağlı olarak iskelelerin benzer frekanslarda farklı şiddette pik verdiği gözlendi.

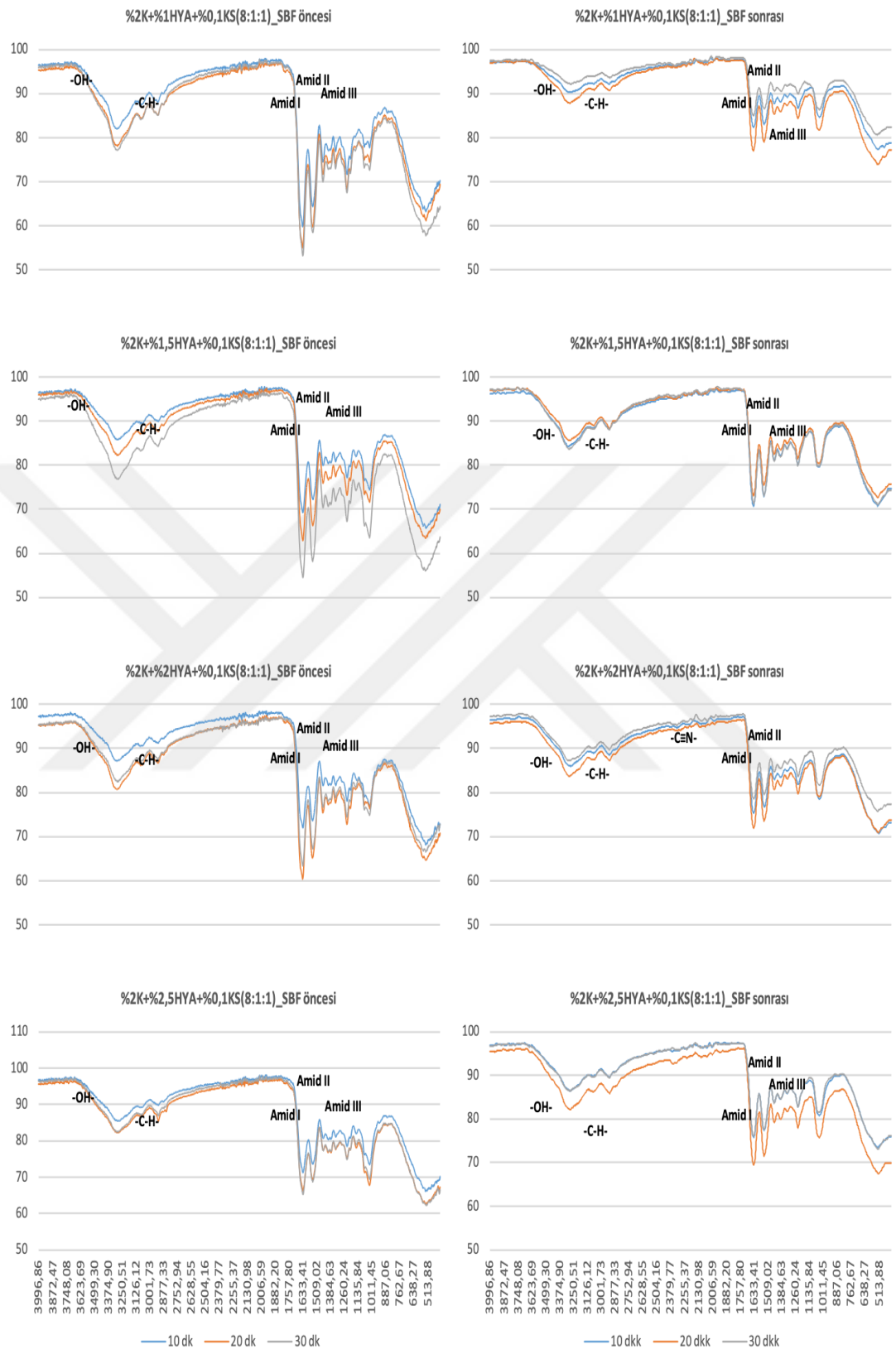
SBF ile muamele öncesi numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler ortaya çıktığı halde, SBF ile muamele sonrası numunelerin parmak izi bölgesinde sadece 500-600 cm^{-1} arasında birbirine benzer pikler oluştuğu belirlendi. SBF öncesinde iskelelerde düşük alan şiddetine sahip olarak gözlenen bu piklerde, SBF sonrasında alan şiddetinde önemli ölçüde artış meydana geldi.



Şekil 5.9 %0,5 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları



Şekil 5.10 %1 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları

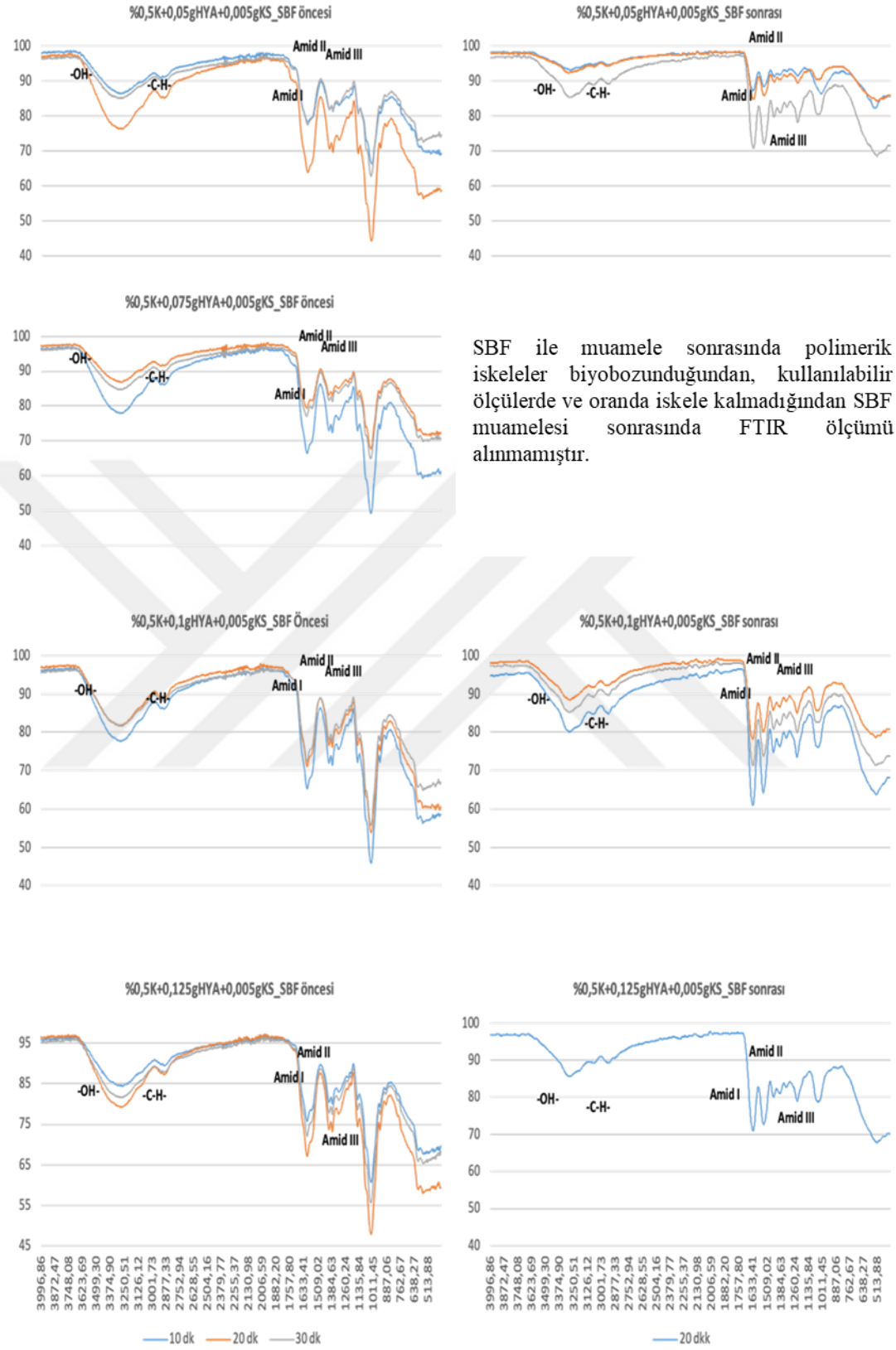


Şekil 5.11 %2 Kollajen ile üretilen (Ç)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları

Polimer karışımında %0,5, %1 ve %2 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS iskelelerin SBF muamelesi öncesi FTIR spektrumları (Şekil 5.12-14) incelendiğinde –OH bölgesinde görülen piklerin benzer frekanslarda oluştuğu ve alan değerlerinin her grupta farklı olduğu görüldü. Karıştırma süresine bağlı olarak iskelelerin –CH bölgesinde farklı şiddette pik verdiği verdiği gözlendi. FTIR spektrumunda, %0,5, %1 ve %2 kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS iskelelerde genel olarak amid II bağı gözlenmediği, bununla birlikte örneklerin parmak izi ve amid bölgesi hariç diğer bölgelerinde benzer pikler verdiği görüldü.

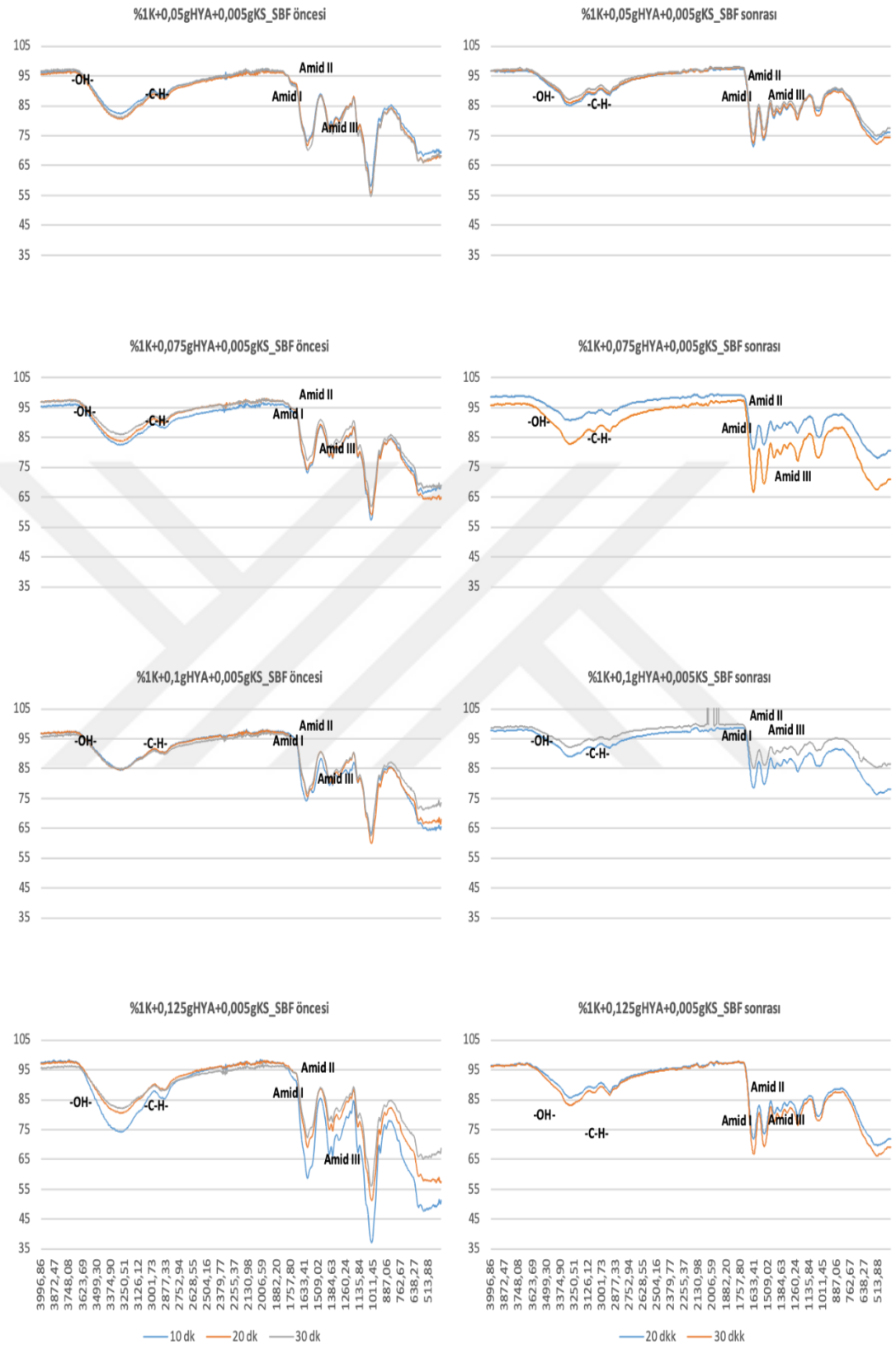
%0,5, %1 ve %2 kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS iskelelerin SBF ile muamele sonrası FTIR spektrumları incelendiğinde yaklaşık aynı frekans değerlerinde pik oluştuğu ancak, değişen karıştırma süresine bağlı olarak pik şiddetinin değiştiği belirlendi. –OH bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer ve alan şiddetlerinin her grupta farklı olduğu görüldü. –CH bölgesinde ise farklı karıştırma süresine sahip olan iskelelerin farklı şiddette aynı frekansta pik verdiği gözlendi.

SBF ile muamele öncesinde farklı karıştırma süresine sahip olan iskelelerde Amid II bağının gözlenmediği, SBF ile muamele sonrasında ise aynı bölgede farklı şiddette pik oluştuğu gözlemlendi. Seramik içermeyen numunelerin parmak izi ve amid bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler ortaya çıkmasına karşın, SBF muamelesi sonrasında numunelerin parmak izi bölgesinde 500-600 cm-1 arasında birbirine yakın pikler gözlendi. Seramik kaplanmamış iskelelerde düşük alan şiddetine sahip olarak gözlenen bu piklerde HA kaplanmasıyla birlikte piklerin alan şiddetinde önemli ölçüde artış meydana geldiği belirlendi.

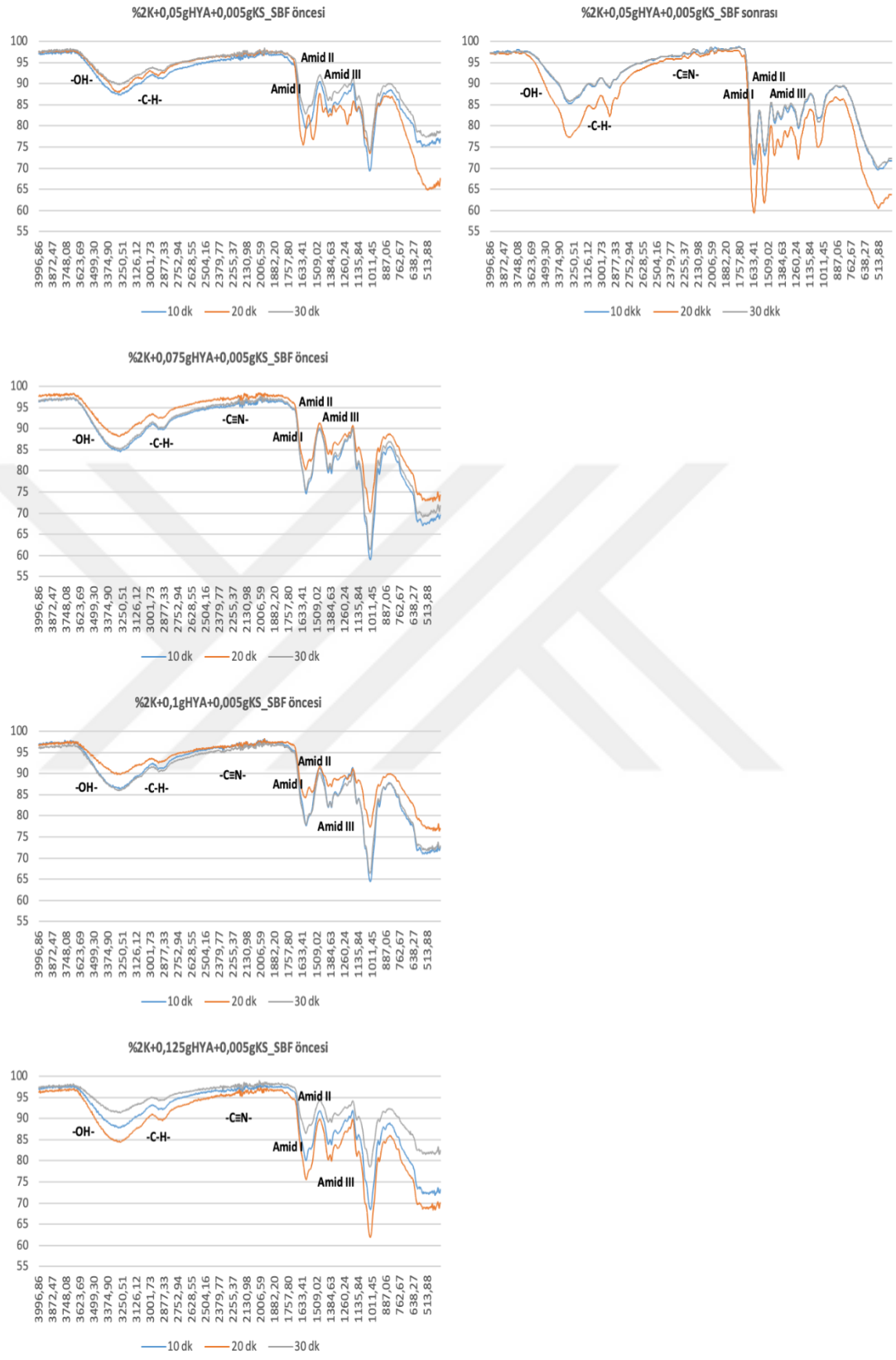


SBF ile muamele sonrasında polimerik iskeleler biyobozunduğundan, kullanılabilir ölçülerde ve oranda iskele kalmadığından SBF muamelesi sonrasında FTIR ölçümü alınmamıştır.

Şekil 5.12 %0,5 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. 4,5,6 (sağ sütun 2. sıra) 10 ve 12 (sağ sütun, 4. sıra) numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapısını kaybetmiştir. Bu nedenle analizi yapılamamıştır.



Şekil 5.13 %1 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. 16 (sağ sütun 2. sıra), 21(sağ sütun 3. sıra), ve 22 (sağ sütun 4. sıra), numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapısını kaybetmiştir. Bu nedenle, analizlenmemiştir.



Şekil 5.14 %2 Kollajen ile üretilen (K)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin FTIR spektrumları. SBFie muamele sonrasına ait, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,35 ve 36 numaralı örneklerin alt malzemesi olan polimerler SBF içerisinde yüksek oranda bozunmuş ve 3B yapı kaybetmiştir. Bu nedenle, analizlenmemiştir.

5.6 ICP-OES ile İyon Salınım Miktarının Tespiti

Polimerik iskelelerin SBF içerisinde HA ile kaplanması sonrasında Hank'in dengeli tuz çözeltisi içerisinde biyobozunurluk analizi sırasında 1, 3 ve 7inci günlerdeki kalsiyum, fosfat, magnezyum, potasyum, sodyum ve kükürt iyon salınım konsantrasyonları ICP-OES ile ölçülerek grafiğe geçirildi ve Şekil 5.15'te verildi. Hidroksiapatit kimyasal bileşimi Ca ve P'dan oluşmakla birlikte Mg^{+2}, Zn^{+2}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, F^{-} ve CO^{3-} gibi kristal yüzeyinde adsorbe olan çeşitli iyonların eser miktarlarından oluşmaktadır. Özellikle Ca ve P iyonlarının konsantrasyonu kompozit yapıda bulunan ve Hank'in dengeli tuz çözeltisine salınan hidroksiapatitin tespit edilmesinde oldukça önemlidir.

1. gün Ca iyon salınımı incelendiğinde 2, 3, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 26, 27, 41, 50, 51, 55 ve 56 numaralı iskelelerde kayda değer kalsiyum iyon salınımı tespit edilmekle birlikte 3. ve 7. günde kalsiyum için kayda değer iyon salınımı gözlemlenmedi. P iyon salınımı grafiği incelendiğinde genel olarak 1. Gün salınan iyon konsantrasyonu 10-15 ppm arasında iken 3. ve 7. günlerde iyon konsantrasyonunun 20-30 ppm arasında yükseldiği tespit edildi. Ayrıca 3. ve 7. günlerdeki P konsantrasyonunun birbirine benzer sonuçlar gösterdiği tespit edildi.

Sodyum (Na) için iyon salınımı incelendiğinde 1. gün 11 numaralı iskelenin en yüksek, 8 numaralı iskelenin ise en düşük Na iyon salınımı gösterdiği tespit edildi. Genel olarak Hank çözeltisi içerisinde bekletilen iskelelerin 1. gün en yüksek Na iyon salınımı gösterdiği tespit edilirken 3. ve 7. günlerde iyon salınım miktarının azaldığı gözlendi.

Kükürt (S) için iyon salınım grafiği incelendiğinde 1. gün 11 numaralı iskelenin en yüksek, 68 numaralı iskelenin ise en düşük S iyon salınımı gösterdiği tespit edilmekle birlikte bazı iskelelerde 1. gün S iyon salınımı tespit edilemedi. Genel olarak iskelelerin 1. gün düşük S iyon salınımı gösterdiği tespit edilirken 3. ve 7. günlerde iyon salınım miktarının zamanla arttığı gözlemlendi.

Magnezyum (Mg) için iyon salınım grafiği incelendiğinde 7, 8, 17, 19, 26, 41, 45, 50, 51, 55, 56 numaralı iskelelerin 1. gün yüksek Mg iyon salınımı gösterdiği tespit edildi.

Genel olarak 3. ve 7. günde iskelelerde birbirine yakın miktarlarda Mg iyon salınımı gösterdiği tespit edildi.

Son olarak potasyum (K) için iyon salınım grafiği incelendiğinde 1, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 37, 38, 39, 41 numaralı iskelelerin 1. Gün yüksek K iyon salınımı gösterdiği tespit edildi. Diğer örnekler için genel olarak 1. ve 3. günlerde K iyon salınımı birbirine yakın değerler verirken 7. gün iyon salınım miktarının azaldığı belirlendi.



Şekil 5.15 Polimerik iskelelerin SBF içerisinde HA ile kaplanması sonrasında Hank'in dengeli tuz çözeltisi içerisinde biyobozunurluk analizinde 1, 3 ve 7inci günlerdeki iyon salınım konsantrasyonlarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi.

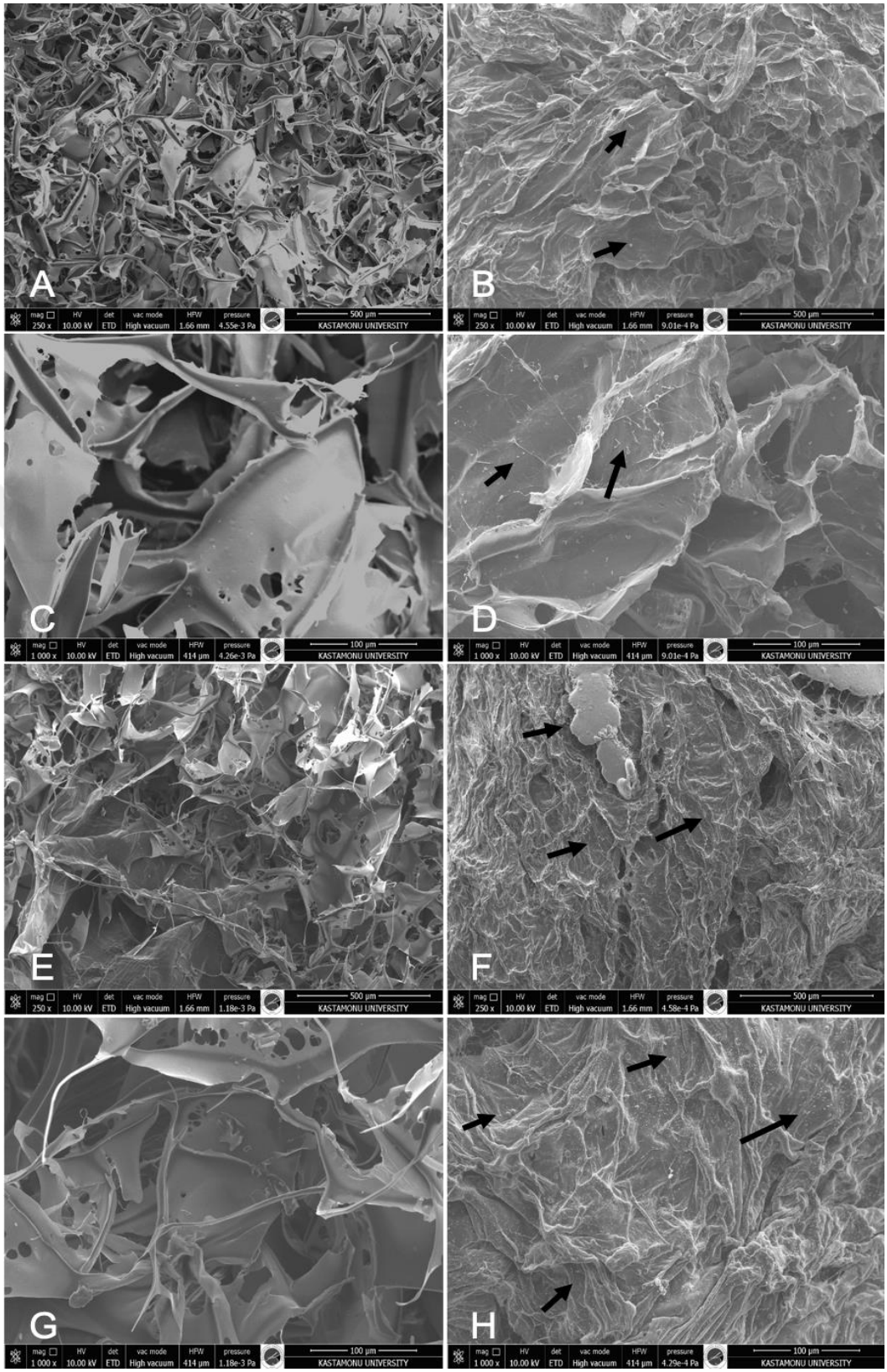
5.7 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Morfoloji Analizi

Tablo 4.4'e göre hazırlanan polimer kompozit iskelelerin ve bu iskelelerin HA kaplanması ile elde edilen polimer-seramik kompozit iskelelerin morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. Örneklerden %0,5 kollajen çözeltisi içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan iskelelerin SEM görüntüsü incelendiğinde %1 hiyalüronik asit oranına sahip 3 numaralı iskelenin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü. Ek olarak yapıda mikro ve makro gözenekler gözlemlendi. 3 numaralı iskelenin SBF ile muamele sonrası SEM görüntüsü incelendiğinde, yapısal bütünlüğün korunduğu ve birbirine bağlı gözenekli yapıların birbiriyle bağlantıları SBF ile muamele öncesi kadar net şekilde tespit edilemezken, SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi ise net olarak görüldü (Şekil 5.16).

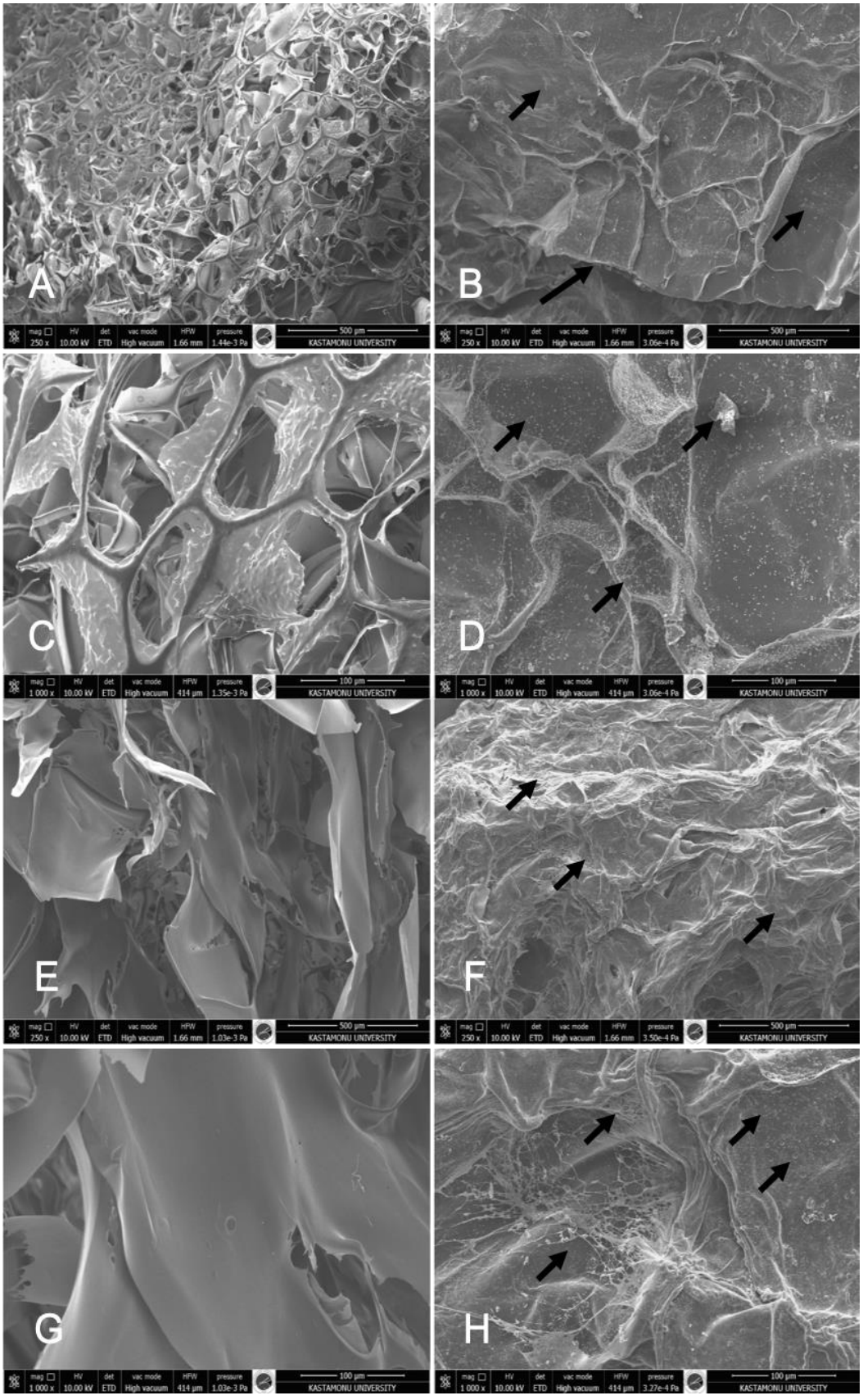
Yapısında %2 hiyalüronik asit oranına sahip 9 numaralı iskelenin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüsü incelendiğinde 3 numaralı örneğe benzer şekilde yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü.Yapıda mikro ve makro gözeneklilik görülmekle birlikte SBF ile muamele sonrası bu açık gözeneklerin kapandığı tespit edildi. Ayrıca SBF ile muamele sonrası 9 numaralı iskelenin yüzeyinde yüksek oranda hidroksiapatit çekirdeklenmesi olduğu tespit edildi (Şekil 5.16).

Örneklerden %1 kollajen çözelti içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan iskelelerin SEM görüntüsü incelendiğinde %1 hiyalüronik asit oranına sahip 15 numaralı iskelenin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli, %0,5 kollajenle hazırlanmış 3 ve 9 numaralı örneklere göre daha homojen dağılıma sahip yapıların oluştuğu görüldü (Şekil 5.17). SEM görüntüleri incelendiğinde gözenekli yapıların köşeli yapıda olduğu gözlemlenirken, SBF ile muamele sonrası bu gözeneklerin büyük ölçüde seramikle kaplanarak çaplarının azaldığı tespit edildi. Ayrıca SBF ile muamele sonrası 15 numaralı iskelenin yüzeyinde hidroksiapatit çekirdeklenmesi olduğu açık şekilde görülmektedir. %1,5 hiyalüronik asit oranına sahip 18 numaralı iskelenin SBF

ile muamele öncesi SEM görüntüsü incelendiğinde ise yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü. Yapıda mikro ve makro gözenek görülmekle birlikte 18 numaralı iskelenin SBF ile muamele sonrası SEM görüntüsü incelendiğinde, yapısal bütünlüğün korunduğu ve yapıların SBF ile muamele öncesi gibi açık gözenekli olmadığı tespit edildi. SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi SEM görüntüleriylede desteklendi.



Şekil 5.16 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-3 ve (E,G) örnek-9 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-3 ve (F,H) örnek-9'a ait SEM mikrografları

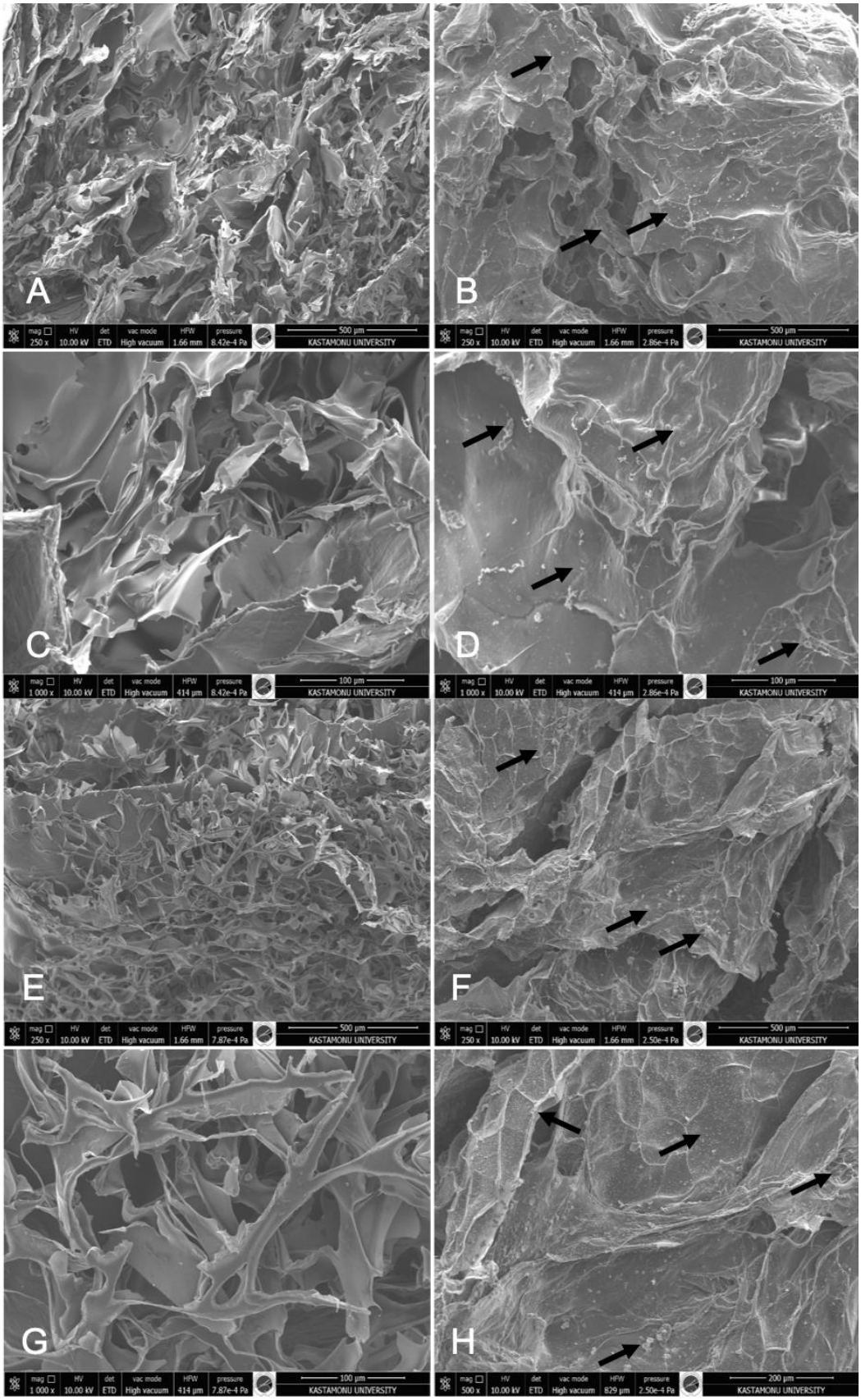


Şekil 5.17 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-15 ve (E,G) örnek-18 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-15 ve (F,H) örnek-18'e ait SEM mikrografları

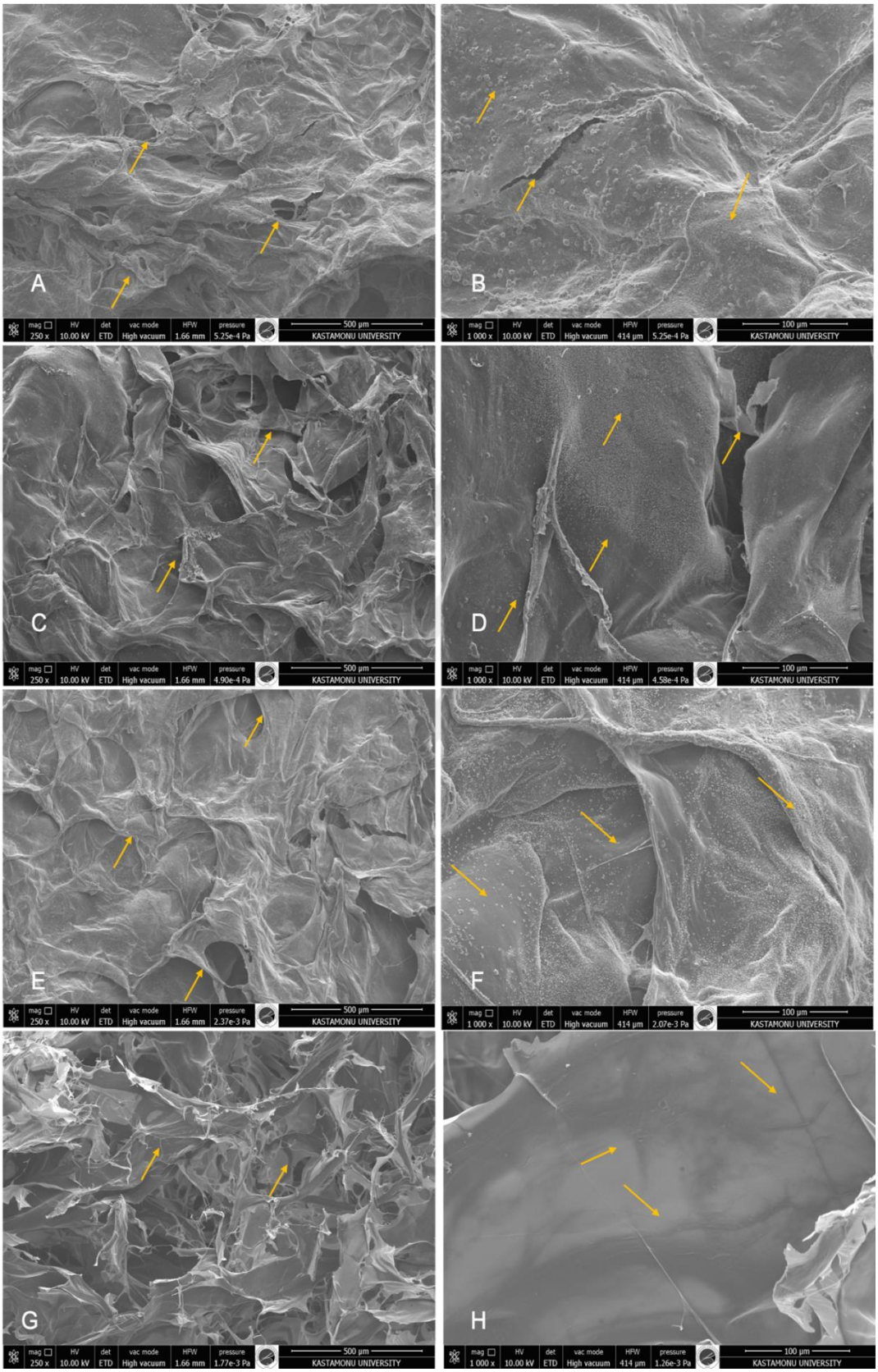
İskele örneklerinden %1 kollajen çözeltisi içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan iskelelerden yapısında %2,5 hiyalüronik asit içeren 24 numaralı iskelenin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu ve birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü. Yapıda mikro ve makro gözenek gözlemlenirken diğer iskelelere göre daha dağınık bir gözenek yapısı olduğu görüldü. 24 numaralı iskelenin SBF ile muamele sonrası SEM görüntüsü incelendiğinde, yapısal bütünlüğün korunduğu ve birbirine bağlı gözenekli yapıların SBF ile muamele öncesi kadar açık gözenekli olmadığı tespit edildi. Ek olarak SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi SEM görüntüleriylede desteklendi.

Üretimi %2 kollajen çözeltisi içinde, katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfatın çözünmesiyle gerçekleştirilen iskelelerin SEM görüntüsü incelendiğinde, %1 hiyalüronik asit oranına sahip 27 numaralı iskelenin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü. 27 numaralı iskelenin SBF ile muamele sonrası SEM görüntüsü incelendiğinde, yapısal bütünlüğün korunduğu ve birbirine bağlı gözenekli yapıların kısmen açık gözenekli olduğu tespit edildi. Ayrıca SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi SEM görüntüleriylede desteklendi.

Çözelti halindeki polimer karışımlardan hazırlanan 67, 68 ve 69 numaralı iskelelerin SBF ile muamele sonrası SEM görüntüsü incelendiğinde yapısal bütünlüğün korunduğu ve birbirine bağlı gözenekli yapıların kısmen açık gözenekli olduğu tespit edildi. SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi SEM görüntüleriyle de desteklenirken apatit çekirdeklenmesinin diğer iskelelere oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca 69 numaralı örneğin SBF ile muamele öncesi SEM görüntüleri incelendiğinde yapısal bütünlüğün korunduğu, birbirine bağlı açık gözenekli yapıların olduğu görüldü. Yapıda mikro ve makro gözenek gözlemlenirken diğer iskelelerden farklı olarak iskelenin yapısında damarlanma benzeri yapılar tespit edildi.



Şekil 5.18 SBF ile muamele öncesi (K)KOL/HYA/KS kompozit iskelelerden (A,C) örnek-24 ve (E,G) örnek-27 ile SBF ile muamele sonrası (B,D) örnek-24 ve (F,H) örnek-27'ye ait SEM mikrografları

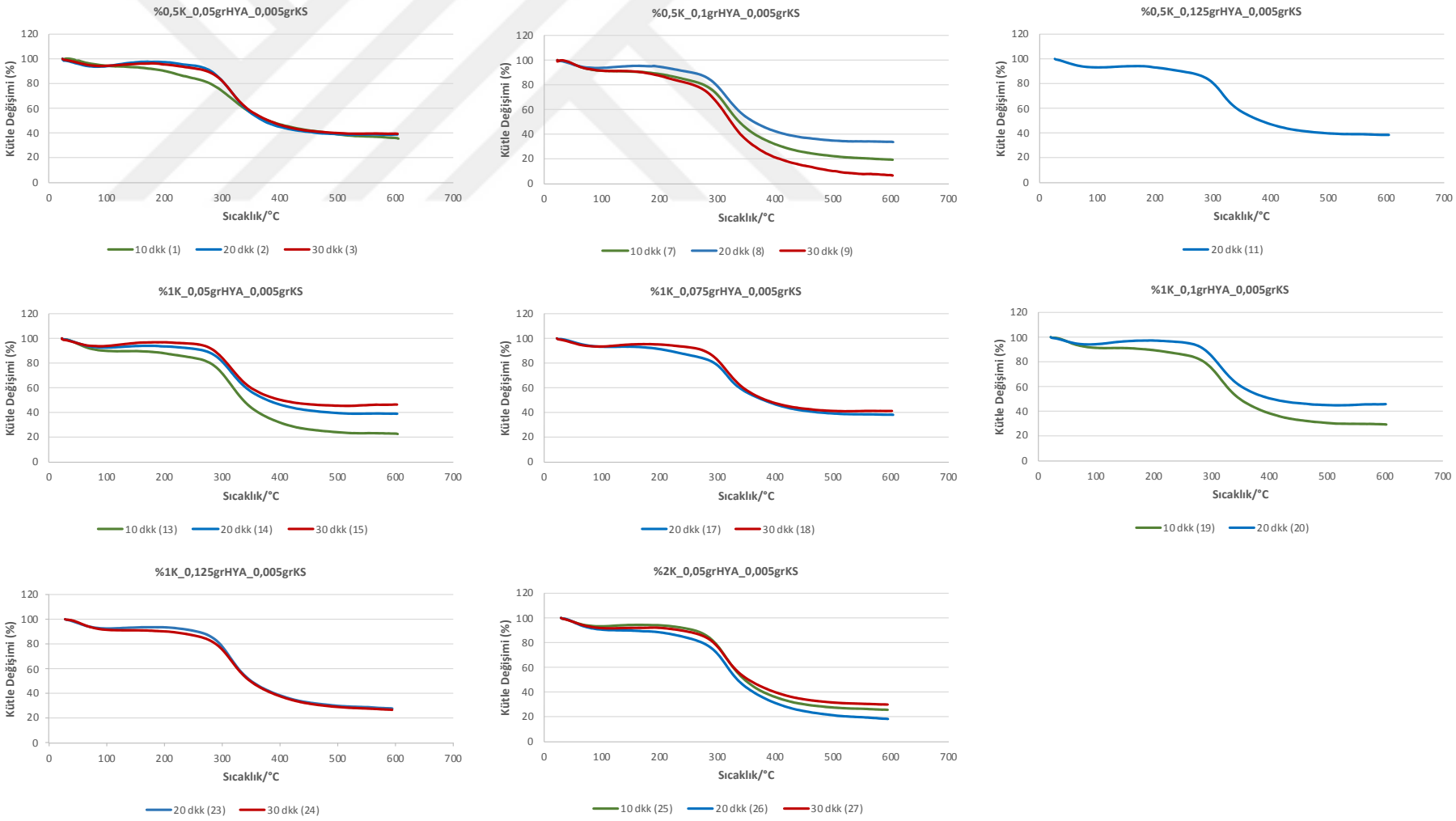


Şekil 5.19 SBF ile muamele edilmiş (Ç)KOL/HYA/KS-HA kompozit iskelelerden örnek-67 (A,B), örnek-68 (C,D) ve örnek-69 (E,F) ile SBF muamelesi öncesi örnek-69 (G,H)'a ait SEM mikrografları.

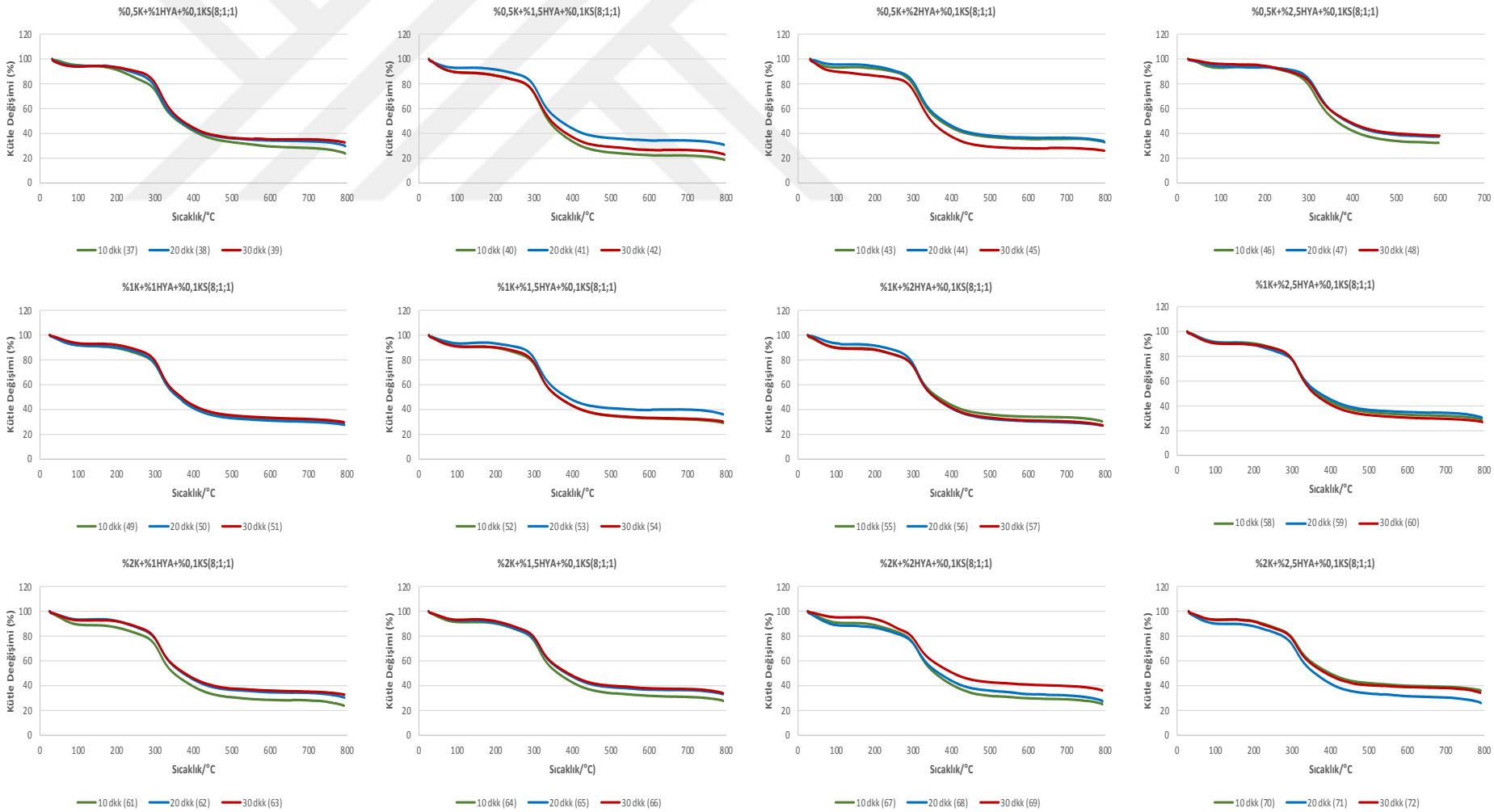
5.8 TGA Analizi

TGA analizi numunede bulunan nem ve uçucu bileşiklerin miktarının, ağırlık kaybının ve termal bozulmanın ölçülebilir bir analizini sunarak bozulma mekanizmasının belirlenmesine yardımcı olur. Elde edilen (Ç)KOL/HYA/KS-HA ve (K) KOL/HYA/KS-HA iskelelerin ağırlık kaybı modellerini sıcaklığın bir fonksiyonu olarak belirlemek için bir TGA yöntemi kullanıldı. Kompozit yapı iskelelerin termal bozunma davranışını gösteren TGA eğrileri Şekil 5.20 ve 5.21'de gösterilmiştir. Hazırlanan numunelere ait termogramlarda, termal bozunmanın 2 aşamada gerçekleştiği tespit edildi. İlk aşama fiziksel olarak emilen suyun uzaklaştırılmasını ikinci aşamada ise yapısal suyun uzaklaştırılmasını göstermektedir. Ayrıca 400-700°C aralığında gözlemlenen küçük ağırlık kayıplarının iskelelerin yapısında bulunan organik bileşenlerin yanması ile ilişkilidir.

Yapıların termogravimetrik değişimleri incelendiğinde genel olarak birbirine benzer sonuçlar elde edildi. İskele hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında en yüksek termal bozunma oranı kollajen çözelti içerisinde katı HYA ve KS çözündürülmesiyle hazırlanan %0,5K:%2HYA:%0,1KS örneğinden elde edildi. Genel olarak 30 dakika karıştırma süresine sahip iskelelerin bozunma oranının daha düşük olduğu tespit edilmekle birlikte, her numune için aynı şey söz konusu değildir. Şekil 5.20 ve 5.21'deki ortak desenlenmeye bakıldığında, genel olarak üretim yönteminden bağımsız olarak, numunelerin sıcaklıkla bozunma hızlarının birbirine çok yakın olduğu görüldü. Ancak iskelelerin hazırlanma yöntemlerinin karıştırma sürelerine bağlı olarak termal bozunma hızında ve oranında kısmen de olsa farklılık gösterdiği belirlendi.



Şekil 5.20 (K)KOL-HYA-KS-HA örneklerine ait TGA termogramları



Şekil 5.21 (Ç)KOL-HYA-KS-HA örneklerine ait TGA termogramları

5.9 XRD Analizi

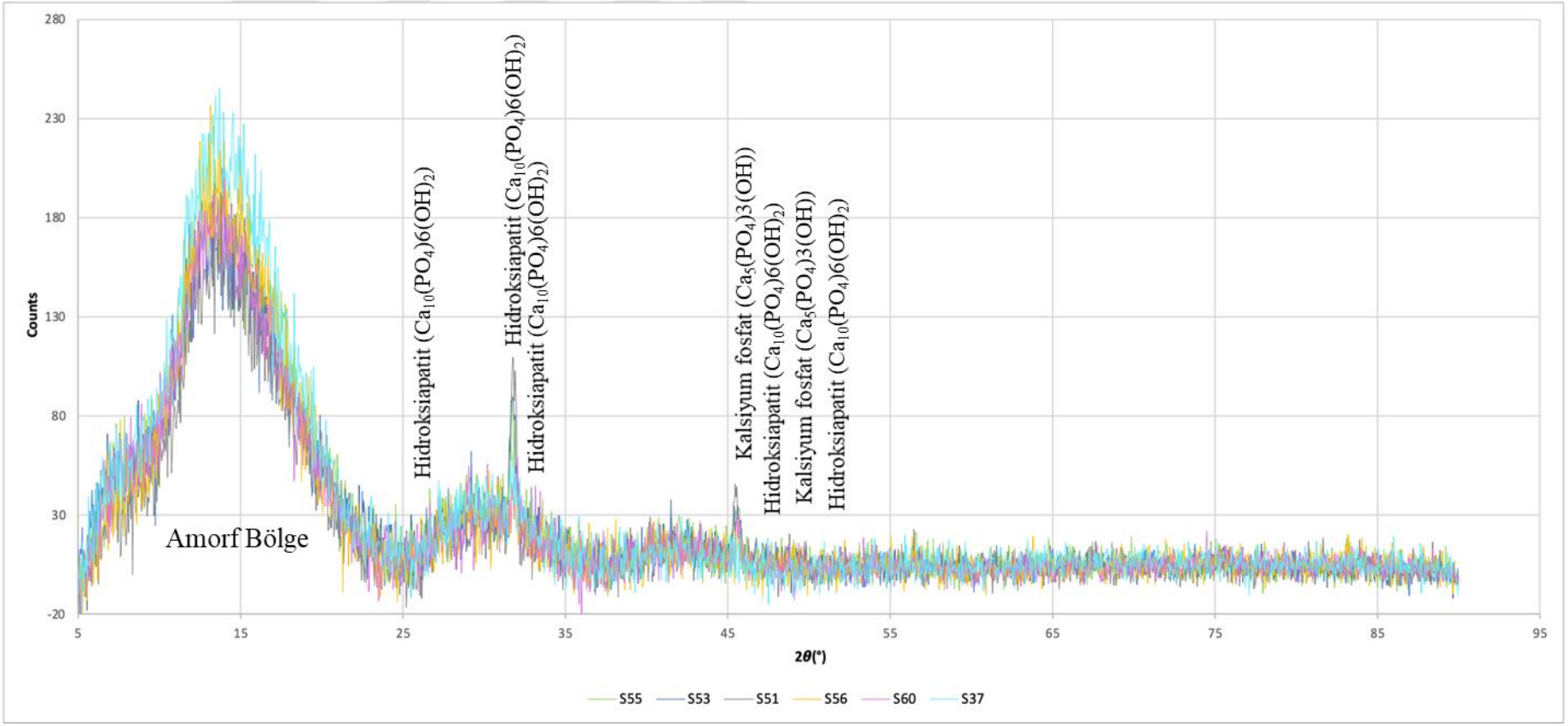
XRD analizi ile elde edilen spektrumlar genel olarak benzer sonuçlar vermiş olup, pik şiddetlerinde ve genişliklerinde nispi farklılıklar gözlendi. Elde edilen spektrumlarda 5-25 2q(°) aralığındaki pik değeri, yapıdaki amorf bölgeyi dolayısıyla polimerik yapıyı göstermektedir. Özellikle 31-35 2q(°) civarında görülen pikler hidroksiapatite özgü pik değerine karşılık gelmektedir.

Farklı iki yöntemle polimerik iskeleleri hazırlanan örneklerin, kristal yapılarında farklılıklar olduğu görüldü. 1-36 numaralı örneklerin XRD desenleri ile 37-72 numaralı örneklerin XRD desenleri arasında bariz farklılıklar gözlemlendi. İlk 36 örneğin, XRD desenlerinde amorf bölgeye ait pik şiddetinin genel olarak daha düşük, pik genişliğinin de daha dar ve 2 kısımdan oluştuğu gözlendi. Ayrıca, amorf desenlenmenin görüldüğü bölgede, 2 farklı pik görülmesi ve amorf bölgenin içinde ve hemen devamında kristal piklerin görülmesi polimerin yarı kristal yapıda olduğunu işaret etmektedir. Seramik desenlenmeler incelendiğinde ise kalsiyum hidroksiapatit yapısının yanı sıra önemli ölçüde kalsiyum fosfat yapılarının da oluştuğu görüldü.

Amorf piklerin şiddetinin düşük olması yapıdaki polimerlerin miktarının azalmış olduğu şeklinde yorumlandı. 2, 11, 15 ve 27 numaralı örneklerde polimer miktarının çok azaldığı ve seramik yapının ağırlıklı olarak bulunduğu belirlendi. 27 numaralı örnekte hidroksiapatitin hekzagonal fazının ($Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2$) yanında monoklinik kristal yapısı ($Ca_5(PO_4)3(OH)$) da tespit edildi. 11 ve 18 numaralı örnekler de ise kalsiyum fosfat kristallerinin yansıra, hidroksiapatitin sadece monoklinik kristal yapısı ($Ca_5(PO_4)3(OH)$) tespit edildi. 9 ve 19 numaralı örneklerde, serideki diğer örneklere kıyasla polimere ait amorf pik şiddetinin belirgin şekilde artığı, seramik fazın yapısında da esas olarak hekzagonal hidroksiapatit ile kalsiyum fosfat kristalleri bulunduğu belirlendi.

Tüm polimerik bileşenlerin çözelti halinde hazırlanarak kullanıldığı 37-72 numaralı örneklerin XRD desenlerinin, 46 numaralı örnek hariç, benzer olduğu görüldü. 46 numaralı örnekte, polimere ait amorf bölgenin çok düşük pik şiddeti vermesi, polimerik yapının büyük oranda bozulduğunu işaret etmektedir. Buna karşın seramik

bölgede, hekzagonal hidroksiapatit ile monoklinik kalsiyum fosfatın kristal bölgeleri oluşturduğu görüldü. Serideki diğer örneklerin XRD desenlerinde ise biyobozunurluk ve gravimetrik analizlere uyumlu şekilde amorf pik şiddetlerinin, 1-36 numaralı örnek serisine oranla daha yüksek olduğu tespit edildi. Diğer analizlerde göz önüne alındığında en iyi sonuçların elde edildiği 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı örneklere ait XRD spektrumları Şekil 5.22'de verilmiştir.



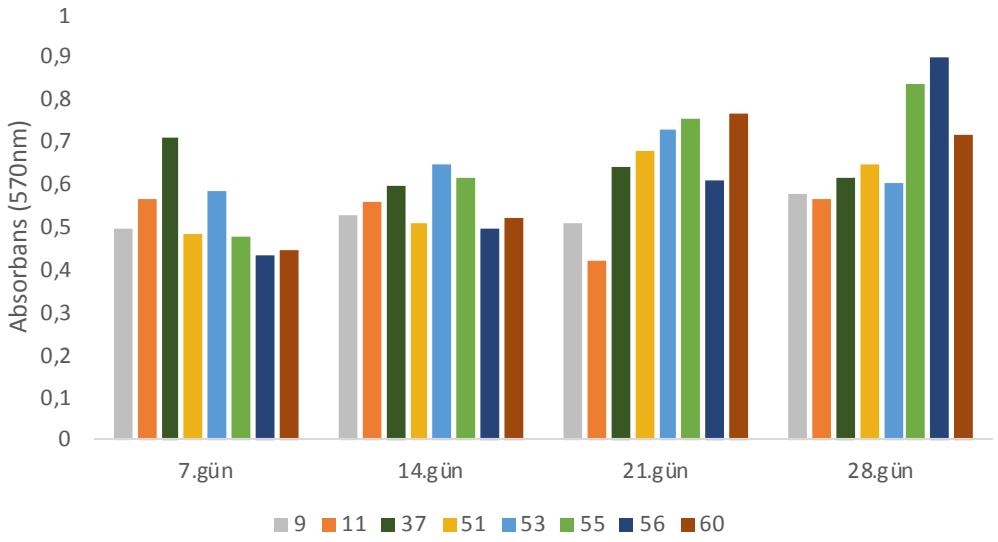
Şekil 5.22 SBF çözeltisi içerisinde apatit çekirdeklenmesi yapıldıktan sonra biyobozunma verilerine göre değerlendirilerek seçilen 12 örnekten, baskın HA bileşimi içeren 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı örneklere ait XRD spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi

5.10 Hücresel Analizler

5.10.1 MTT Analizi

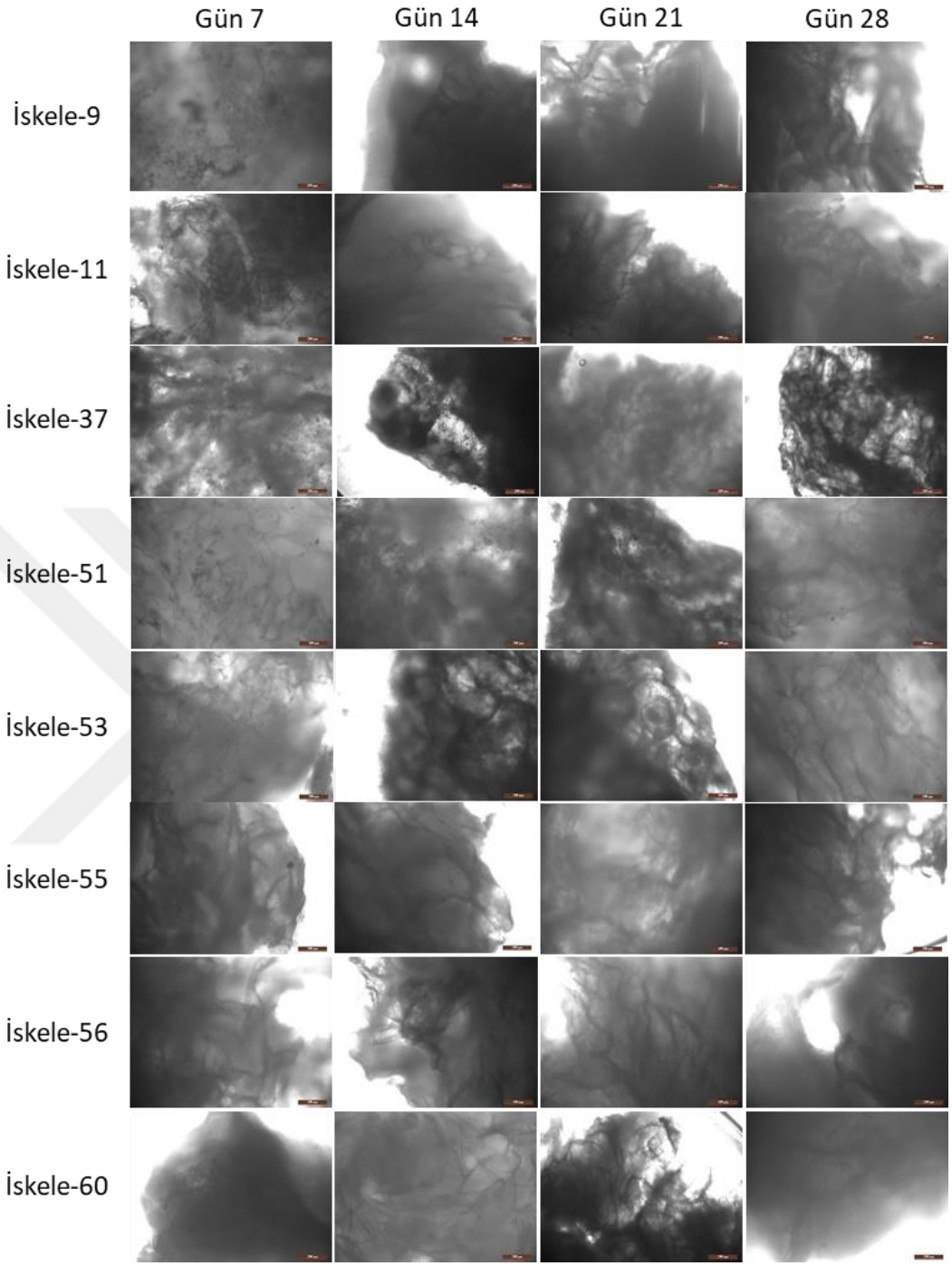
MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. NADPH bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin tetrazolyum boyası MTT'yi mor renkli çözünmeyen formazana indirgeme kabiliyetine dayanmaktadır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde mümkün olmakla birlikte formazan miktarı bu hücrelerin sayısı ile orantılıdır.

Hazırlanan iskelelerin 7., 14., 21., ve 28. günlerde MTT testi ile prolifere olan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılıkları takip edildi. 96 kuyucuklu petri içerisine taze hazırlanmış serumsuz vasat konularak üzerine %10 konsantrasyonda MTT kiti eklendi. Kuyucukların her birine eşit büyüklükte numuneden alınan örnekler konularak 4 saat süresince inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun öncesinde ve sonunda formazan kristallerinin oluşumu faz-kontrast mikroskobunda incelendi (Şekil 5.24 ve Şekil 5.25). Koyu mavi formazan kristalleri MTT çözücüsü ile çözülerek 570 nm'de UV-spektrofotometresinde absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 5.23).

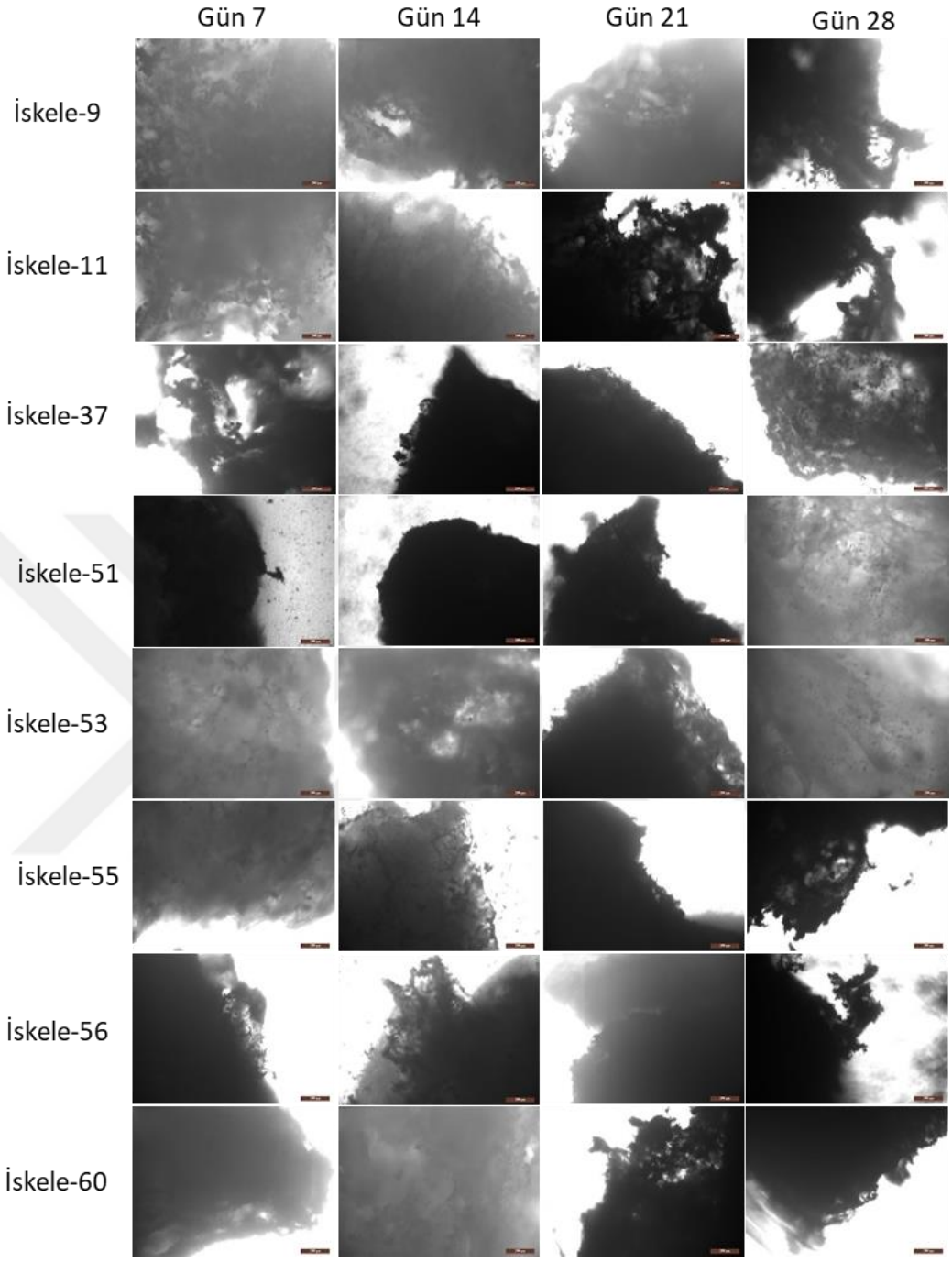


Şekil 5.23 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin MTT analizinin 570 nm'deki spektrofotometrik analiz sonuçları.

Formazan kristallerinin renk şiddetinin spektrofotometrik olarak tespiti ile elde edilen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek değerlendirildi (Şekil 5.23). Spektrofotometrik ölçümlerde mitokondriyal aktivitenin zaman içerisinde arttığı ancak her iskele için bu artışın farklı oranlarda olduğu tespit edildi. En yüksek mitokondriyal aktiviteye 56 numaralı iskelenin sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca 55, 56 ve 60 numaralı iskelelerde genel olarak 28. günde mitokondriyal aktivitenin yüksek olduğu görülmekle birlikte 37, 51, 53 numaralı iskelelerde mitokondriyal aktivitenin azaldığı gözlendi. 9 ve 11 numaralı iskelelerin mitokondriyal aktiviteleri incelendiğinde genel olarak 28 gün boyunca birbirine benzer metabolik aktivite gösterdiği tespit edildi. 9 ve 11 numaralı iskelelerin diğer iskeleler ile hazırlanış yöntemindeki farklılık osteositlerin proliferasyonuna da etki ettiğini göstermektedir. Ayrıca MTT öncesinde ve sonrasında hücrelerin faz kontrast mikroskop görüntüleri incelendiğinde MTT analizi sonucu formazan oluşumu gözlendi. MTT analizi sonucu elde edilen veriler ile mikroskop görüntüleri birbirini desteklemektedir.



Şekil 5.24 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı sOB hücre yüklü iskelelerin MTT analizi öncesi faz kontrast mikroskop görüntü incelemeleri

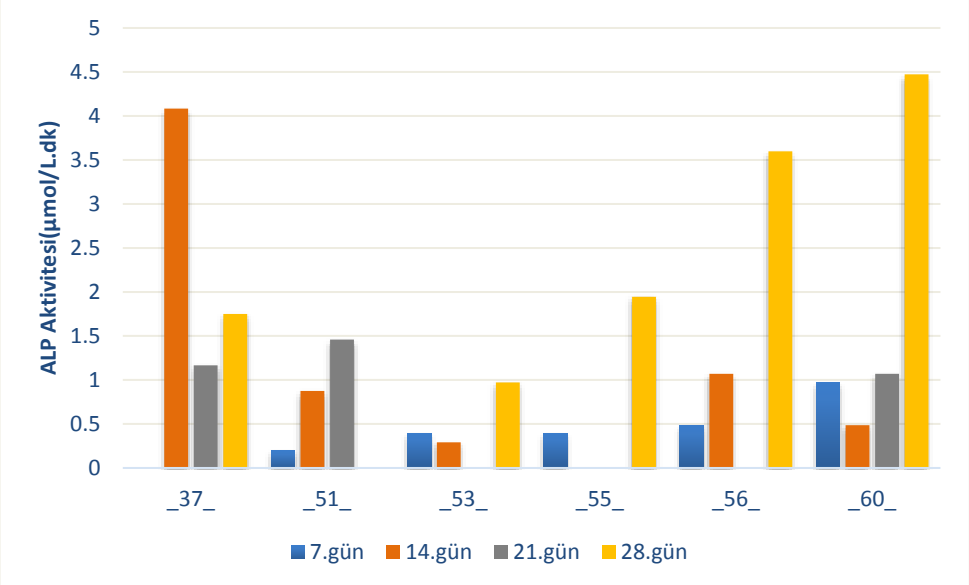


Şekil 5.25 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı sOB hücre yüklü iskelelerin MTT analizi sonrası formazan kristallerinin oluşumu.

5.10.2 ALP Analizi Bulguları

Kollajen/hiyalüronik asit/kondroitin sülfat kullanılarak hazırlanan iskeleler ve bu iskelelerin SBF içerisinde bekletilmesiyle hidroksiapaptit kaplanması sonucu elde edilen sOB-iskele örneklerinin 7., 14., 21., ve 28. günlerde ALP aktiviteleri takip edildi. 405 nm'deki absorbans değerleri ölçümlerinin sonucunda hesaplanan ALP aktivitesi grafiğe geçirilerek değerlendirildi (Şekil 5.26).

Bazı numuneler için (37 numaralı iskele 7.gün, 51 numaralı iskele 28.gün, 53 numaralı iskele 21.gün, 55 numaralı iskele 14 ve 21. Gün, 56 numaralı iskele 21.gün) örnekler alınamamış olup bu numunelerin ALP aktivitesi ölçülememiştir. Spektrofotometrik ölçümlerde genel olarak ALP aktivitesinin zaman içerisinde arttığı ancak her iskele için bu artışın farklı oranlarda olduğu tespit edildi. 60 numaralı iskelenin 28.günde en yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu tespit edilirken 37 numaralı iskele hariç genel olarak en yüksek ALP sonuçları 28. günde ölçüldü. 53 ve 60 numaralı iskele için en düşük ALP aktivitesi 14. günde gözlemlenirken 21 ve 28. günlerde ALP aktivitesinde önemli bir artış gözlendi. 51, 55 ve 56 numaralı iskeleler için 7. günden 28. güne kadar ALP aktivitesinde önemli bir artış gözlemlendi. Ayrıca ALP aktivitesinin, diğer 3 iskeleden daha yüksek bir aktivite ile sonuçlandığı tespit edildi.



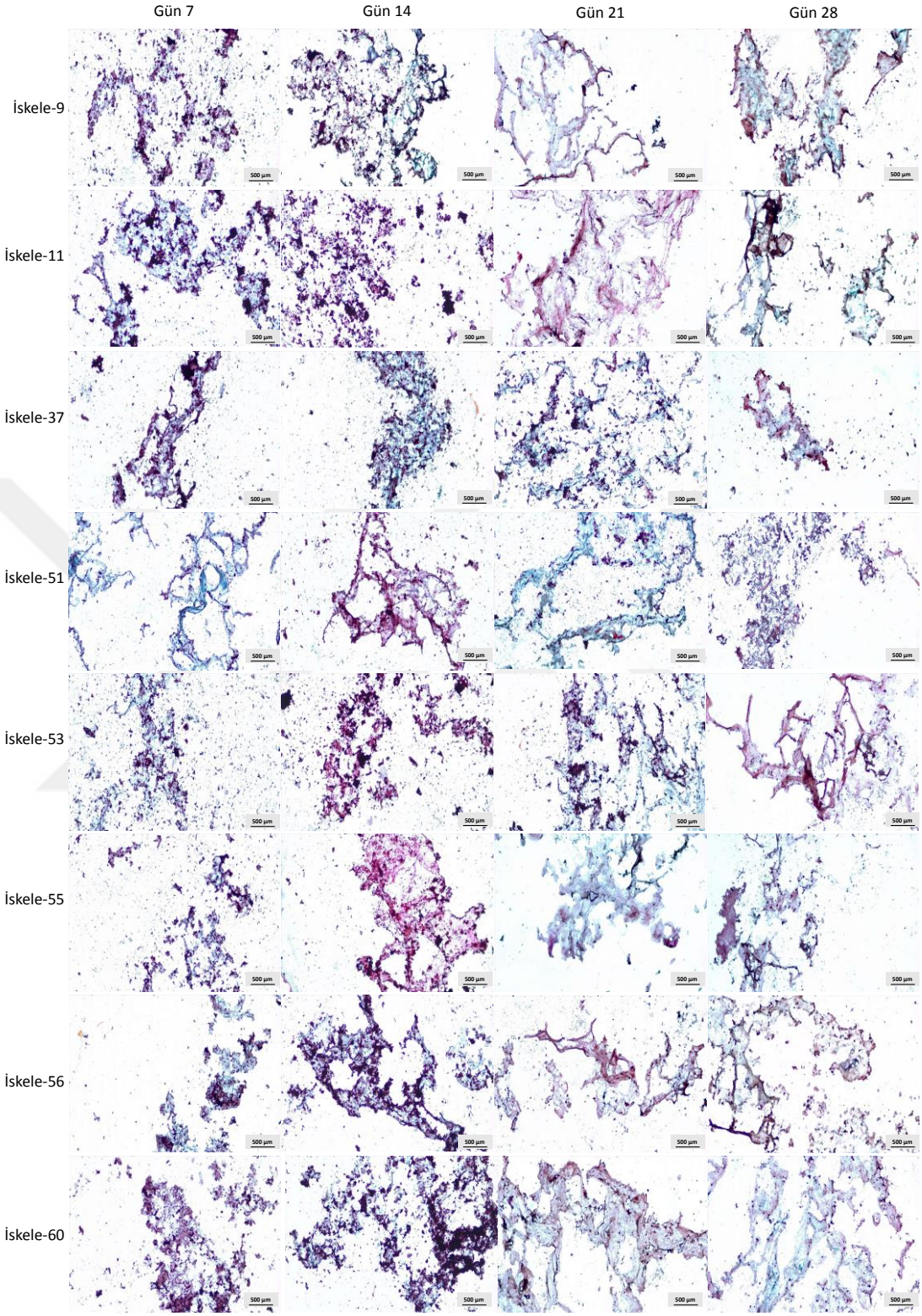
Şekil 5.26 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin ALP aktivitelerinin günlere göre değişimi.

5.10.3 Histokimyasal Analiz Bulguları

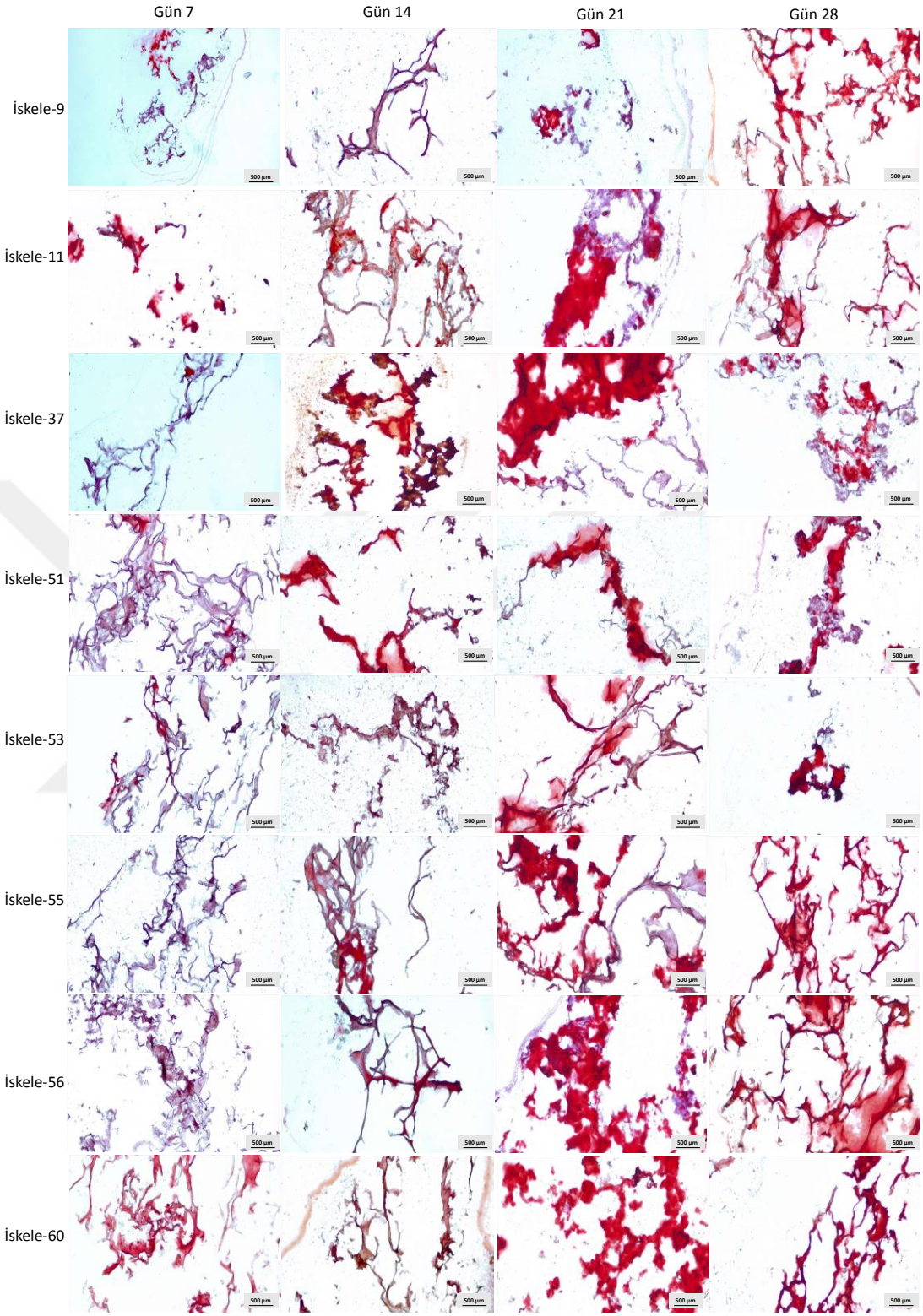
Dondurarak kesit alma yöntemine göre hazırlanan örneklerde histolojik analizler; hücre proliferasyonunu ve yeni oluşan organoidin HDM'sini göstermek amacıyla safranin-O (Saf-O) ve osteojenik fenotipte kalsifikasyonu belirlemek için alizarin kırmızısı (AR) ile boyanarak analizlendi ve ışık mikroskobunda incelendi (Şekil 5.27 ve Şekil 5.28). Boyanan örnekler ışık mikroskobunda (Leica, Almanya) 10X büyütmede görüntülenerek fotoğraflandı ve örnekler karşılaştırmalı olarak incelendi.

Histolojik bulgular genel olarak hücre proliferasyonunun sOB kültürlerinde, artan kültür günleri ile uyumlu şekilde ilerlediğini gösterdi. Ayrıca, hücrelerin zamanla dağılmış görüntüden uzaklaşarak doku benzeri yapı oluşturmak üzere hücre kümeleri şeklinde bir araya geldikleri görüldü. sOB kültürlerinde hücre kümelerinin miktarının çok daha fazla olduğu Saf-O ve içerisinde kalsiyum mineralizasyonun gerçekleşerek kemik doku-benzeri yapıların oluştuğu AR tespit edildi (Şekil 5.27 ve Şekil 5.28).

sOB hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen histokimyasal analizlerde, hücre kültürlerinden haftalık zaman noktalarında alınan örnekler Saf-O ile boyandı ve organoidin HDM gelişimi mikroskop ile incelenerek görüntüleri kayıt altına alındı (Şekil 5.27). Hücredışı matriksin ana bileşimini oluşturan kollajen ve proteoglikan moleküllerinin safranin-o ile boyanması sonucu oluşan boyama yoğunluğu, hücreler arası bölge ve hücre çevresinde yoğun olarak görülmektedir. Resimler incelendiğinde genel olarak kültürün ileriki aşamalarında Saf-O ile boyama sonucu sOB tarafından sentezlenen protein yapılı moleküllerinin kırmızıdan turuncuya doğru değişen tonlarda boyandığı tespit edildi. In vitro kültürün ileriki aşamalarında hücre dışı matriks yapısının artmasına bağlı olarak boyamalardaki renk şiddetinde de artış gözlendi. sOB hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen testlerde, 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskeleler üzerinde yürütülen hücre kültürlerinden haftalık zaman noktalarında alınan örnekler AR ile boyanarak kalsiyum miktarı mikroskop ile incelenerek görüntüleri kayıt altına alındı (Şekil 5.28). Fotoğraflar incelendiğinde genel olarak in vitro kültürün ilerleyen günlerinde kalsiyum varlığını gösteren kırmızı renk şiddetinin arttığı gözlemlendi. 7. gün elde edilen boyama sonuçlarında göre kırmızı renk şiddeti düşükken, 21. ve 28. günlerde kırmızı renk şiddetinde artış tespit edildi.



Şekil 5.27 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin Saf-O ile boyanması ve gelişen HDM ile hücrelerin günlere göre değişimi.



Şekil 5.28 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı iskelelerin sOB hücreleri ile kültüründen haftalık zaman noktalarında alınan örneklerin AR ile boyanması ve gelişen HDM'deki kalsiyum birikiminin günlere göre değişimi.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kemik doku mühendisliğine yönelik biyomimetik KOL/HYA/KS-HA kompozit iskeleleri geliştirilerek, bu malzemelerin sıçan kalvaria ve tibia kemiğinden izole edilen osteoblast hücreleri kullanılarak yeni kemik dokusu oluşturulması amaçlanmıştır.

Biyolojik açıdan bakıldığında uygun kemik dokusunu oluşturabilmek için hücrelere, hücre dışı matrikslere, hücreler arası iletişimlere ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kemik 3B yapıya sahipir ve in vitro ortamda 3B olarak büyümemektedir. Bu nedenle uygun kemik dokusunu oluşturabilmek için doğal kemik dokusunu taklit eden 3B bir iskele kullanılmalıdır. Doku mühendisliği çalışmlarında hücre-iskele yapılarının istenilen sonucu verebilmesi için iskele seçimi en önemli parametrelerden birini oluşturmaktadır. Kemik doku mühendisliği için iskeleler biyouyumlu, doku yenilenmesine uyumlu olarak biyobozunur, kemik büyümesi ve hücre proliferasyonunu destekleyen uygun gözeneklilik ve geniş yüzey alanına sahip olmalıdır (Kneser vd., 2006; Black vd.,2015; Baldwin vd., 2017)

Kemik doku mühendisliğinde yeterli özelliklere sahip iskeleler üretmek için dondurarak kurutma, lif bağlama, çözücüde çözme patikül uzaklaştırma gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır (Mikos vd., 1994; Leong vd., 2003; Salgado vd., 2004). Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında biyomimetik kompozit iskeleler dondurarak kurutma yötemiyle hazırlanmış olup, 3B-iskeleler hazırlanırken kimyasal çapraz bağlayıcılar yerine mekanik stres altında zincirler arası etkileşimler arttırılarak molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalar ile biyouyumluluğu arttırılmıştır.

Kollajen, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat gibi doğal polimerler doku mühendisliği için hücre bağlanmasını ve kemotaktik tepkileri destekleyen biyolojik bilgi rehberliği sağlamaktadır (Hench ve Polak, 2002). Doku mühendisliği için çeşitli biyobozunur polimerik malzemeler mevcut olsa da kemik doku mühendisliği iskelelerinin tüm gereksinimlerini karşılamamaktadır. Kemik yapısında inorganik hidroksiapatit kristalleri ve organik kollajen lifleri içeren kompozit bir yapıdır ve bu nedenle kemiğin

yapısını taklit etmeyi amaçlayan kompozit malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Hidroksiapatit ile kollajen, PLGA, ve kitosan dahil olmak üzere çeşitli polimerlerin kompozit iskeleleri kemik doku mühendisliği için başarılı bir şekilde üretilmiş ve yapılan tüm in vivo, in vitro çalışmalar kemik oluşumunu desteklediğini göstermiştir (Wei ve Ma, 2004; Kim vd., 2006; Chesnutt vd., 2009). İskele yüzeyindeki kemik benzeri apatit oluşumunun hücrelerin iskele yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinmekle birlikte (Boyan vd., 1996) yapılan çalışmalar sonucu doku mühendisliği için hazırlanan iskelelerin SBF içerisinde inkübasyonu sonucu iskele yüzeyinde hidroksiapatit çekirdeklenmesi gerçekleştiği bilinmektedir.

Hazırlanan (K)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS kompozit iskeleler yüzeyinin biyomimetik olarak hidroksiapatit ile kaplanması için 28 gün boyunca SBF içerisinde bekletildi. (K)KOL/HYA/KS ve (Ç)KOL/HYA/KS iskelelerin SBF içerisindeki stabilitesi karşılaştırıldığında çözelti halindeki karışımlardan hazırlanan deney serisine ait iskelelerin SBF içerisinde daha stabil olarak kaldığı tespit edildi. Elde edilen XRD grafikleri incelendiğinde farklı iki yöntemle hazırlanan polimerik kompozit iskelelerin kristal yapılarında farklılıklar olduğu gözlemlendi. (K)KOL/HYA/KS iskelelerin XRD desenlerinde (Ç)KOL/HYA/KS iskelelere göre amorf bölgeye ait pik şiddetinin genel olarak daha düşük, pik genişliğinin de daha dar ve 2 kısımdan oluştuğu gözlendi. Amorf bölgede gözlemlenen bu durumun hiyalüronik asitin SBF içerisinde kısmen çözünmesi ile polimer hacmini büyük ölçüde kaybettiği gerçeğini doğrulamaktadır. Bununla ilişkili olarak kollajen çözelti içinde katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesiyle hazırlanan polimer karışımların SBF öncesi FTIR grafikleri incelendiğinde iskele yapısındaki hiyalüronik asite ait 1720 ve 1648 cm-1'deki iki pik, sırasıyla karboksilik asit ve amidin karbonil gerilme bantlarına atfedilmektedir (Carneiro, 2016). SBF sonrası FTIR grafiği incelendiğinde ise, hiyalüronik asite ait bu piklerde ve pik şiddetinde değişim olduğu açık şekilde görülmektedir. Bu nedenle kollajen çözelti içerisine katı hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ilavesi ile hazırlanan iskelelerinin hiyalüronik asit oranının artmasına bağlı olarak SBF içerisinde yapısının daha çabuk bozunduğu tespit edilmiştir.

SBF ile inkübasyonu sonrasında iskelelerdeki hidroksiapatit oluşumu SEM, XRD ve FTIR analizi ile incelendi. SEM analiziyle SBF ile muamele sonrası yapıda bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesi net olarak görüldü. Elde edilen XRD grafikleri üzerinde tepe noktalarına karşılık gelen 2θ açı değerleri literatürle karşılaştırılmış olmakla birlikte HA fazına karşılık gelen ana kırınım zirveleri 2θ'da sırasıyla (002), (211), (202), (310) ve (215) düzlemlerine indekslenmiş olarak bilinmektedir(Sagedevan vd., 2013; He vd., 2018) Hidroksiapatit için 32.0535–34.1952 ve 46.788–53.5459 açı aralıklarında iki geniş pikin varlığı kaplamanın yarı kristal kalsiyum fosfat olduğu ve geniş piklerin birleştirilmiş sinyalleri temsil ettiği bilinmektedir (Chuang ve Advincula, 2010). Amorf desenlenmenin görüldüğü bölgede, 2 farklı pik görülmesi ve amorf bölgenin içinde ve hemen devamında kristal piklerin görülmesi polimerin semi-kristalin yapıda olduğunu işaret etmektedir. Kırınım desenleri, hidroksiapatite karşılık gelen yansımaları temsil etmekle birlikte iskeleler üzerinde semi-kristalin bir kalsiyum fosfat formunun oluştuğunu göstererek HA'nın varlığını doğrulamaktadır. SBF sonrası FTIR grafikleri incelendiğinde (Ç)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS iskelelerin 500-600 cm-1 arasındaki pik şiddetinde artış meydana gelmiştir. SBF öncesinde iskelelerde düşük alan şiddetine sahip olarak gözlenen bu piklerde SBF sonrasında alan şiddetinde önemli ölçüde artış meydana gelmiştir. 500-600 cm^{-1} arasında bulunan bu pik iskelelerin yüzeyinde meydana gelen hidroksiapatit oluşumunu göstermektedir (Xia vd., 2013). SBF sonrası (Ç)KOL/HYA/KS ve (K)KOL/HYA/KS iskelelerin yapısında bulunması beklenen hidroksiapatit çekirdeklenmesinin başarılı şekilde gerçekleştiği FTIR sonuçları ile desteklenmektedir. Tüm bunlara ek olarak FTIR sonuçlarına göre farklı karıştırma sürelerinin her bir iskeleye farklı kimlik kazandırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu durumu desteklemektedir.

Biyobozunurluk sürelerini gösteren grafikler incelendiğinde %0,5 ve %1 kollajen içeren iskelelerin düşük bozunma oranı sergilediği gözlemlenirken, %2 kollajen içeren iskelelerin yüksek bozunma oranı sergilediği gözlemlendi. Ayrıca 30 dakika karıştırma süresine sahip iskelelerin bozunma oranının daha düşük olduğu tespit edilirken, tüm iskeleler için aynı serilere ait iskelelerin bozunma süresi karşılaştırıldığında karıştırma süresine bağlı olarak yapıdaki zincirler arası etkileşimler

artırılarak molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmaların artması sonucu bozunma oranının etkilendiği söylenebilir. Genel olarak numunelerin bozunma oranları farklılık göstermekle birlikte kollajen konsantrasyonu ve karıştırma süresine bağlı olarak bozunma süresinin etkilendiği belirlendi.

İskelelerin su tutma kapasitesini gösteren grafik incelendiğinde ise genel olarak tüm örnekler için su tutma kapasitesinin yüksek olduğu ve çözelti halindeki polimer karışımlardan hazırlanan deney serisine ait iskelelerin su tutma kapasitelerinin birbirine yakın sonuçlar verdiği gözlemlendi. Ayrıca karıştırma süresine bağlı olarak mekanik stres altında zincirler arası etkileşimler artırılarak molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalar ile yapıdaki çapraz bağlanmaların artması sonucu ıslanabilirliğin azaldığı tespit edildi.

İskelelerin termogravimetrik değişimleri incelendiğinde genel olarak birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. TGA grafikleri incelendiğinde iskelelerin termal olarak kararsız olduğu ve suyun uzaklaştırılmasına atfedilebilecek olan 100°C'nin altına bile ısıtıldığında ağırlık kaybetmeye başladığı gözlemlendi(Türk vd., 2018). Kompozit iskelelerde su salınımı ile ilgili olan yaklaşık 100°C'de TGA'dan elde edilen 40-80°C ve 80-270°C sıcaklık aralıklarındaki su kaybı, sırasıyla fiziksel olarak emilen serbest su ve yapısal su kaybından kaynaklanmaktadır. Bu durum asıl olarak hazırlanan kompozit iskelede bulunan kollajenin protein yapısında olmasından dolayı sahip olduğu yapısından kaynaklanmaktadır. Kollajen makromoleküllerinin üçlü sarmal konformasyonunun kararlılığından moleküller arası hidrojen bağlarının ve hidrojene bağlı suyun sorumlu olduğu bilinmektedir. Böylelikle elde edilen sonuçlar, çapraz bağlantılar arasındaki alanlarda yer alan üçlü sarmaldan rastgele bir yapıya geçişle kollajen makromolekülün ikincil yapısındaki kısmi değişikliklerin, ısıtma ve gevşek bağlı suyun salınması üzerine moleküller arası ve moleküller arası hidrojen bağlarının kırılmasından önce geldiği daha öncede Pietrucha ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Pietrucha, 2005; Mandal vd., 2012; Perumal vd., 2018). Termal denatürasyon sıcaklığının üçlü sarmaldan rastgele sarmal bir yapıya geçişle ilgili olduğu bilinmektedir ve bu kollajen makromoleküllerinin çapraz bağları arasındaki alanlarda meydana gelmektedir. Bu konformasyonun kararlılığı, moleküller arası hidrojen bağlarının yanı sıra hidrojene bağlı suyun varlığına bağlı olmalıdır.

Hazırlanan iskelelerdeki çapraz bağlanma matriksteki su içeriğinden ve onun derecesinden güçlü bir şekilde etkilenmektedir(Watson vd., 2010). Ayrıca bilindiği üzere hidroksiapatit yapısında adsorbe edilmiş su ve kafes suyu olmak üzere iki tür su bulunmaktadır. Hidroksiapatitin kafes suyunun 200-400°C sıcaklıkta geri döndürülemez bir şekilde kaybedildiği bu durumun ise ısıtma sırasında α-kafes boyutunda bir daralmaya neden olduğu bilinmektedir. Hidroksiapatit kafes suyunu kaybetmesi sonucu hidroksiapatit formundan oksiapatit formuna geçmektedir (Liao vd., 1999). 270-400°C civarında gözlemlenen büyük ağırlık kaybı, hazırlanan iskelelerin yapısında bulunan polimerler zincirlerinin termal dehidrasyonu, polimer yapısının depolimerizasyonu ve ayrışmasına ek olarak iskelelerin yapısında bulunan hidroksiapatitin kafes suyunun kaybedilmesi sonucu hidroksiapatit formundan oksiapatit formuna geçmesi ile açıklanabilir. Son olarak 400-700°C aralığında meydana gelen ağırlık kaybı organik bileşenlerin yanması ile ilişkilendirilmektedir. (Türk vd., 2018). Hazırlanan iskelelere ait termogramlar incelendiğinde bu sıcaklık aralığında gözlemlenen küçük ağırlık kayıplarının iskelelerin yapısında bulunan organik bileşenlerin yanması ile ilişkili olduğu söylenebilir. Elde edilen TGA sonuçlarına göre hazırlanan tüm iskeleler için bozunma oranı karşılaştırıldığında üretim yönteminden bağımsız olarak numunelerin sıcaklıkla bozunma hızlarının genel olarak aynı olduğu tespit edildi. Bununla birlikte aynı serilere ait iskelelerin karıştırma süresine bağlı olarak yapıdaki zincirler arası etkileşimler artırılarak molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmaların artması sonucu termal bozunma oranının daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği belirlendi.

Biyomimetik kompozit KOL/HYA/KS/HA yapı iskelelerine tohumlanan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri MTT testi ile değerlendirildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılması için seçilen iskeleler üzerine sOB hücreleri tohumlanarak osteojenik indüksiyondan itibaren farklı zaman aralıklarında MTT testi uygulandı ve hücre canlılığı ve çoğalması takip edildi. (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip olmasına karşın, (K)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin nispeten daha düşük ve birbirine yakın metabolik aktivite gösterdiği tespit edildi. Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması ile (Ç)KOL/HYA/KS-HA iskelelerin sOB hücre proliferasyonunun daha yüksek olduğu belirlendi.

Işık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ise formazan kristallerinin iskele yüzeyinde homojen olarak dağıldığı görülmektedir (Şekil 5.25). Ayrıca doğal kemik dokusunun büyük bir kısmının kollajenden oluşması ve doğala benzer şekilde hazırlanan iskelelerdeki artan kollajen konsantrasyonu ile osteojenik hücre proliferasyonunun orantılı olarak arttığı tespit edildi.

ALP enzimi kemikteki mineralizasyonun önemli bir göstergesidir. Biyomineralizasyonda, dolayısıyla osteojenik farklılaşmada rol oynamaktadır. Bu nedenle kemikteki kalsiyum artışı ALP analizi ile tayin edilmektedir. ALP aktivitesi, renksiz bir p-nitrofenol fosfattan fosfat grubunu alkalin pH 10.4'te renkli bir p-nitrofenol ürününe çıkarmak için ALP'nin reaksiyonuna dayalı olarak ölçülür. Hidrolizlenme reaksiyonu sonucunda oluşan sarı rengin 405 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmesi esasına dayanmaktadır. 405 nm'de absorbanstaki artış, ALP aktivitesi ile orantılıdır (Ambler vd., 1970; Song, 2017; Tamburacı vd., 2019). Malzeme hücre etkileşiminin ilk aşamasında yüzeyin hidrofilikliği ve malzemenin yapısındaki kimyasal gruplar hücre yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını desteklemede kilit rol oynamaktadır. İkinci aşamada ise hücre malzeme arayüzeyindeki azalan pH değerine bağlı olarak malzeme bozulmaya başlar ve osteoblastların osteojenik farklılaşmasını destekler (Ruan vd, 2017). 14. günde en düşük ALP aktivitesi elde edilmesinden sonra 21 ve 28. günlerde ALP aktivitesinde meydana gelen artışın, polimer bozunması ve hücre büyümesi arasındaki ilişkiden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. ALP'deki meydana gelen artışın nedeni ise bu iskelelerin önemli ölçüde daha yüksek Ca2+ birikimi ile açıklanabilir. ALP aktivitesindeki bu artışların 14 ve 28 günlük farklılaşmadan sonra da devam etmesi ise iskele malzeme bileşiminin hücre osteojenik farklılaşması üzerinde bir etkisinin olduğunu göstermektedir (Hench, 2006; Jensen vd., 2015; Hermenean vd., 2017; Akgüner; 2021).

Yapılan çalışmada KOL/HYA/KS-HA biyomimetik kompozit iskelelerin Alizarin kırmızısı boyaması yöntemiyle iskelelerde meydana gelen kalsifikasyon takip edilmiştir. In vitro kültürün ileriki aşamalarında, oluşan kırmızı rengin şiddetinin arttığı tespit edilirken, kompozit iskeledeki kırmızı renk şiddetinin (Ç)KOL/HYA/KS-HA yöntemiyle hazırlanan iskelelerin (K)KOL/KS/HYA/KS-HA yöntemiyle

hazırlanan iskelelere göre daha fazla olması hücrelerin burada daha fazla çoğaldığını ve osteojenik yönde farklılaştığını göstermektedir. Ayrıca iskelelerin Saf-O ile boyalı fotoğrafları incelendiğinde, in vitro kültürün ileriki aşamalarında hücre dışı matriks yapısının artmasına bağlı olarak boyamalardaki renk şiddetinde artış gözlenmiştir. Yapılan her iki boyama sonucu iskelelerin kemik doku mühendisliği için kullanılabilecek uygun osteoindüktif iskeleler olduğu sonucuna varılabilir.

7. SONUÇ

Tez kapsamında yürütülen çalışmalar TÜBİTAK ARDEB 119S123 numaralı projenin bir kısmını oluşturmaktadır. Çalışmalar kapsamında üretilen iskelelerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu yapıldıktan sonra, uygunluğu tespit edilen 9, 11, 37, 51, 53, 55, 56, 60 numaralı örneklerin sitotoksik özellikleri ve kemik doku oluşturma kapasiteleri sOB hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Hücresel çalışmalar sonucunda kemik doku oluşumu için 37, 51, 53, 55, 56 ve 60 numaralı örneklerin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Proje kapsamında devam edecek çalışmalarda, üretimi yapılan ve in vitro osteogenez için uygunluğu tespit edilen bu iskelelerin mezenkimal kök hücreler ile test edilerek, rejeneratif kemik doku tedavileri için kullanılabilirliği belirlenecektir.

KAYNAKLAR

Agrawal, C. M., Parr, J. E., & Lin, S. T. (2000). *Synthetic Bioabsorbable Polymers for Implants*. www.copyright.com/.

Akhshabi, S., Biazar, E., Singh, V., Keshel, S. H., & Nagaraja, G. (2017). The effect of glutaraldehyde cross-linker on structural and biocompatibility properties of collagen-chondroitin sulfate electrospun mat. *33*(4), 253–261. https://doi.org/10.1080/10667857.2017.1410998

Albeshri, S., Alblaihess, A., Niazy, A. A., Ramalingam, S., Sundar, C., & Alghamdi, H. S. (2018). Biomarkers as Independent Predictors of Bone Regeneration around Biomaterials: A Systematic Review of Literature. *The journal of contemporary dental practice*, *19*(5), 605-618.

Allison, D. D., & Grande-Allen, K. J. (2006). Review. Hyaluronan: A Powerful Tissue Engineering Tool. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ten*, *12*(8), 2131–2140. https://doi.org/10.1089/TEN.2006.12.2131

Allen, M. R., & Burr, D. B. (2019). Techniques in Histomorphometry. *Basic and Applied Bone Biology*, 141–158. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00008-7

Aytekin, M., & Çaylak, E. (2009). Hiyalüronan, tanı ve tedavideki önemi. 57(3), 356-364.

Baldwin, J., Henkel, J., & Hutmacher, D. W. (2017). 6.3 Engineering the organ bone. *Comprehensive Biomaterials II*, 54–74. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09342-5

Bashutski, J. D., D'Silva, N. J., & Wang, H.-L. (2009). Implant Compression Necrosis: Current Understanding and Case Report. *Journal of Periodontology*, *80*(4), 700–704. https://doi.org/10.1902/JOP.2009.080581

Black, C. R., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S., & Oreffo, R. O. (2015). Bone tissue engineering. Curr Mol Biol Rep 1: 132–140.

Boyan, B. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17(2), 137–146. doi:10.1016/0142-9612(96)85758-9

Boyan, B. D., Baker, M. I., Lee, C. S. D., Raines, A. L., Greenwald, A. S., Olivares-Navarrete, R., & Schwartz, Z. (2011). Bone tissue grafting and tissue engineering concepts. In *Comprehensive Biomaterials* (pp. 237-255). Elsevier.

Burg, K. J. L., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *21*(23), 2347–2359. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00102-2

Burr, D. B., & Allen, M. R. (Eds.). (2019). *Basic and applied bone biology*. Academic Press.

Cai, Y., López-Ruiz, E., Wengel, J., Creemers, L. B., & Howard, K. A. (2017). A hyaluronic acid-based hydrogel enabling CD44-mediated chondrocyte binding and gapmer oligonucleotide release for modulation of gene expression in osteoarthritis. *Journal of Controlled Release*, *253*, 153–159. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.004

Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G., & Williams, D. F. (1998). Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, *19*(23), 2101–2127. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00042-8

Carneiro, J., Döll-Boscardin, P. M., Fiorin, B. C., Nadal, J. M., Farago, P. V., & Paula, J. P. de. (2016). Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *52*(4), 645–651. https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000400008

Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, *101*(8), 821-833.

Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, *101*(8), 821–833. https://doi.org/10.1002/BIP.22486

Chesnutt, B. M., Yuan, Y., Buddington, K., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2009). Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo. *Tissue Engineering Part A*, *15*(9), 2571-2579.

Chuang, P., Advincula, M. A., & Lu, H. H. (2010). Calcium phosphate coating on tendons via concentrated simulated body fluid soaking. *Proceedings of the 2010 IEEE 36th Annual Northeast Bioengineering Conference, NEBEC 2010*. https://doi.org/10.1109/NEBC.2010.5458146

Cho, S.-B., Nakanishi, K., Kokubo, T., Soga, N., Ohtsuki, C., & Nakamura, T. (n.d.). *Apatite Formation on Silica Gel in Simulated Body Fluid: Its Dependence on Structures of Silica Gels Prepared in Different Media*. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199623)33:3

Choi, S. T., Kim, J. H., Kang, E.-J., Lee, S.-W., Park, M.-C., Park, Y.-B., & Lee, S.-K. (2008). Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *47*(12), 1775–1779. https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEN385

Choudhury, P., & Agrawal, D. C. (2012). Hydroxyapatite (HA) coatings for biomaterials. *Nanomedicine: Technologies and Applications*, 84–127. https://doi.org/10.1533/9780857096449.1.84

Correlo, V. M., Oliveira, J. M., Mano, J. F., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2011). Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering – *Properties, Processing, and Performance. Principles of Regenerative Medicine*, 557–586. DOI: 10.1016/b978-0-12-381422-7.10032-x.

Cremers, S., Garnero, P., & Seibel, M. J. (2008). Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*, *2*, 1857–1881. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00020-3

da Silva, G. T., Voss, G. T., Kaplum, V., Nakamura, C. V., Wilhelm, E. A., Luchese, C., & Fajardo, A. R. (2017). Development, characterization and biocompatibility of chondroitin sulfate/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder porous biocomposite. *Materials Science and Engineering: C*, *72*, 526–535. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.069

Dicker, K. T., Gurski, L. A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*, *10*(4), 1558–1570. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.12.019

Dinoro, J., Maher, M., Talebian, S., Jafarkhani, M., Mehrali, M., Orive, G., Foroughi, J., Lord, M. S., & Dolatshahi-Pirouz, A. (2019). Sulfated polysaccharide-based scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, *214*, 119214. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.05.025

Doppalapudi, S., Jain, A., Khan, W., & Domb, A. J. (2014). Biodegradable polymers—an overview. *Polymers for Advanced Technologies*, *25*(5), 427–435. https://doi.org/10.1002/PAT.3305

Ereschenko, A. L. (2008). Deri (Örtü Sistemi). R. Demir (Çeviren), *Histoloji Atlası* (185-201). Onuncu Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık. ISBN: 978-9944-341-91-2.

Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers 2018, Vol. 10, Page 701*, *10*(7), 701. https://doi.org/10.3390/POLYM10070701

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/421746

Franceschi, R. T., & Xiao, G. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, *88*(3), 446–454. https://doi.org/10.1002/JCB.10369

Fuchs, R. K., Thompson, W. R., & Warden, S. J. (2019). Bone biology. *Bone Repair Biomaterials*, 15–52. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00002-0

Gallo, N., Nasser, H., Salvatore, L., Natali, M. L., Campa, L., Mahmoud, M., Capobianco, L., Sannino, A., & Madaghiele, M. (2019). Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. *European Polymer Journal*, *117*, 134–147. https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.05.007

Robey, P. G. (2008). Noncollagenous bone matrix proteins. In *Principles of bone biology* (pp. 335-349). Academic press.

Gelinsky, M., Welzel, P. B., Simon, P., Bernhardt, A., & König, U. (2008). Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chemical Engineering Journal*, *137*(1), 84–96. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2007.09.029

Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(12), 1531–1546. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2003.08.002

Godley, R., Starosvetsky, D., & Gotman, I. (2004). Bonelike apatite formation on niobium metal treated in aqueous NaOH. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2004 15:10*, *15*(10), 1073–1077. https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000046388.07961.81

Granito, R. N., Renno, A. C. M., Yamamura, H., Almeida, M. C. de, Ruiz, P. L. M., & Ribeiro, D. A. (2018). Hydroxyapatite from Fish for Bone Tissue Engineering: A Promising Approach. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, *7*(2), 80. https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.2.80

He, X., Fan, X., Feng, W., Chen, Y., Guo, T., Wang, F., Liu, J., & Tang, K. (2018). Incorporation of microfibrillated cellulose into collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 385–392. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.085

Heath, C. A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, *18*(1), 17–19. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01396-7

Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-Generation Biomedical Materials. *Science*, *295*(5557), 1014–1017. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067404

Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2016). Type I Collagen. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers*, 1–11. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5

Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Angel Alobera Gracia, M., del Canto Pingarrón, M., Blanco Jerez, L., Carlos, J., & Titular, P. (2005). *E47 Cirugía Bucal Histología y fisiología del tejido óseo Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo*.

Huang, G., & Chen, J. (2019). Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, *125*, 478–484. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.074

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, *21*(24), 2529–2543. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6

Ivanov, D. (2015). Hyaluronic Acid-Based Biomaterials. *In Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 11 Volume Set (pp. 3743-3759). CRC Press.

Jang, J.-H., & Kim, J.-H. (2005). Improved Cellular Response of Osteoblast Cells Using Recombinant Human Osteopontin Protein Produced by Escherichia coli. *Biotechnology Letters 2005 27:22*, *27*(22), 1767–1770. https://doi.org/10.1007/S10529-005-3551-6

Jell, G., & Stevens, M. M. (2006). Gene activation by bioactive glasses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2006 17:11*, *17*(11), 997–1002. https://doi.org/10.1007/S10856-006-0435-9

Johannesdottir, F., & Bouxsein, M. L. (2018). Bone structure and biomechanics. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.03760-0.

Demirtaş, T. T., Kaynak, G., & Gumuşderelioǂlu, M. (2015). Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation. *Materials Science and Engineering: C*, *49*, 713–719. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.01.057

Khwaldia, K. (2019). Chondroitin and Glucosamine. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 27–35. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00004-7

Kim, S.-S., Park, M. S., Gwak, S.-J., Choi, C. Y., & Kim, B.-S. (2006). Accelerated Bonelike Apatite Growth on Porous Polymer/Ceramic Composite Scaffolds in Vitro. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ten*, *12*(10), 2997–3006. https://doi.org/10.1089/TEN.2006.12.2997

Kim, H. D., & Valentini, R. F. (1996). Hyaluronan-based biodegradable scaffolds for sceletal tissue reconstruction. In *Proceedings of Fifth World Biomaterials Congress, Toronto, Canada* (Vol. 236).

Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., & Horch, R. E. (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *10*(1), 7–19. https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2006.TB00287.X

Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, *27*(15), 2907–2915. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.017

Kwon, H. J., & Han, Y. (2016). Chondroitin sulfate-based biomaterials for tissue engineering. *Turkısh Journal Of Bıology*, *40*(2), 290–299. http://journals.tubitak.gov.tr/biology/

Langer, R. (1993). VacantiJP. *Tissue engineering. Science*, *260*(5110), 920-926.

Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, *221*(1–2), 1–22. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3

Lee, S., Lee, D.-S., Choi, I., Pham, L. B. H., & Jang, J.-H. (2015). Design of an Osteoinductive Extracellular Fibronectin Matrix Protein for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences 2015, Vol. 16, Pages 7672-7681*, *16*(4), 7672–7681. https://doi.org/10.3390/IJMS16047672

LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research®, 395*, 81-98.

Leong, K. F., Cheah, C. M., & Chua, C. K. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, *24*(13), 2363–2378. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00030-9

Liao, C. J., Lin, F. H., Chen, K. S., & Sun, J. S. (1999). Thermal decomposition and reconstruction of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomedical sciences instrumentation*, *35*, 99-104.

Lyles, M. B., Hu, J. C., Varanasi, V. G., Hollinger, J. O., & Athanasiou, K. A. (2015). Bone tissue engineering. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*, 97–134. https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-301-0.00005-7

Mandal, A., Meda, V., Zhang, W. J., Farhan, K. M., & Gnanamani, A. (2012). Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity of PEG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *90*(1), 191–196. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2011.10.021

Maquet, V., & Jerome, R. (1997). Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation. *Materials Science Forum*, *250*, 15–42. https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/MSF.250.15

Martel-Pelletier, J., Farran, A., Montell, E., Vergés, J., & Pelletier, J.-P. (2015). Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. *Molecules 2015, Vol. 20, Pages 4277-4289*, *20*(3), 4277–4289. https://doi.org/10.3390/MOLECULES20034277

Mathews, S., Mathew, S. A., Gupta, P. K., Bhonde, R., & Totey, S. (2014). Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *8*(2), 143–152. https://doi.org/10.1002/TERM.1507

Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., & Çolak, Ü. (2009). Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, *5*(8), 3098–3111. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2009.04.037

Mikos, A. G., Thorsen, A. J., Czerwonka, L. A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D. N., & Vacanti, J. P. (1994). Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. *Polymer*, *35*(5), 1068–1077. https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90953-9

Mohd Pu'ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Lee, T. C. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, *5*(5), e01588.

Murphy, W. L., Dennis, R. G., Kileny, J. L., & Mooney, D. J. (2004). Salt Fusion: An Approach to Improve Pore Interconnectivity within Tissue Engineering Scaffolds. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ten*, *8*(1), 43–52.

https://doi.org/10.1089/107632702753503045

Necas, J. B. L. B. P., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. J. V. M. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, *53*(8), 397-411.

Olszta, M. J., Cheng, X., & Jee, S. S. (2007). R. kumar, YY Kim, MJ Kaufman, EP Douglas and LB Gower. *Mater. Sci. Eng., R*, *58*, 77.

Orlovskii, V. P., Komlev, V. S., & Barinov, S. M. (2002). Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials 2002 38:10*, *38*(10), 973–984. https://doi.org/10.1023/A:1020585800572

Öber,, İzzetoğlu, G. T. (2006). *Duyular, Histoloji* (279-285). Ankara: Nobel Basımevi. ISBN: 9944-77-011-6.

Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials 2010, Vol. 3, Pages 1863-1887*, *3*(3), 1863–1887. https://doi.org/10.3390/MA3031863

Pasinli, A., & Aksoy, R. S. (2010). Yapay kemik uygulamaları için hidroksiapatit. *BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi*, *1*(1), 41-51.

Patterson, J., Siew, R., Herring, S. W., Lin, A. S. P., Guldberg, R., & Stayton, P. S. (2010). Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*, *31*(26), 6772–6781. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.05.047

Perumal, R. K., Perumal, S., Thangam, R., Gopinath, A., Ramadass, S. K., Madhan, B., & Sivasubramanian, S. (2018). Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 1032–1040. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.111

Pietrucha, K. (2005). Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *International Journal of Biological Macromolecules*, *36*(5), 299–304. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2005.07.004

Pokhrel, S. (2018). Hydroxyapatite: Preparation, Properties and Its Biomedical Applications. *Advances in Chemical Engineering and Science*, *08*(04), 225–240. https://doi.org/10.4236/ACES.2018.84016

Qiu, Z. Y., Cui, Y., & Wang, X. M. (2019). Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*, 1–22. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1

Ramírez Rodríguez, G., Patrício, T., & Delgado López, J. (2019). Natural polymers for bone repair. *Bone Repair Biomaterials*, 199–232. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00008-1

Rees, S. G., Hughes Wassell, D. T., & Embery, G. (2002). Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials*, *23*(2), 481–489. https://doi.org/10.1016/S0142-

9612(01)00130-2

Rigano, L., & Lionetti, N. (2016). Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials*, 121–148. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42868-2.00006-1

Robey, P. G. (2008). Noncollagenous Bone Matrix Proteins. *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*, *1*, 335–349. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00036-7

Rodrigues, C. V. M., Serricella, P., Linhares, A. B. R., Guerdes, R. M., Borojevic, R., Rossi, M. A., Duarte, M. E. L., & Farina, M. (2003). Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *24*(27), 4987–4997. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00410-1

Roy, M., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2017). Ceramics in Bone Grafts and Coated Implants. *Materials and Devices for Bone Disorders*, 265–314. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802792-9.00006-9

Rumpel, E., Wolf, E., Kauschke, E., Bienengräber, V., Bayerlein, T., Gedrange, T., & Proff, P. (2006). The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphologica*, *65*(1), 43–48. https://journals.viamedica.pl/folia_morphologica/article/view/16119

Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., & Popoff, S. N. (2009). Bone Structure, Development and Bone Biology. *Bone Pathology*, 1–50. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9_1

Ch, A., rasekar, Sagadevan, S., & Dakshnamoorthy, A. (2013). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique. *International Journal of Physical Sciences*, *8*(32), 1639–1645. https://doi.org/10.5897/IJPS2013.3990

Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience*, *4*(8), 743–765. https://doi.org/10.1002/MABI.200400026

Sheehy, E. J., Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2018). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, 127–150. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00005-X

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Biochem.77.032207.120833*, *78*, 929–958. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.77.032207.120833

Sikavitsas, V. I., Bancroft, G. N., & Mikos, A. G. (2002). Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research*, *62*(1), 136–148. https://doi.org/10.1002/JBM.10150

Silver, F. H., Jaffe, M., & Shah, R. G. (2018). Structure and behavior of collagen fibers. *Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres*, 345–365. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101272-7.00011-0

Sorushanova, A., Coentro, J. Q., Pandit, A., IZeugolis, D., & Raghunath, M. (2017). 2.15 Collagen: Materials analysis and implant uses. *Comprehensive Biomaterials II*, *2*, 332–350. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10155-9

Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, *11*(5), 18–25. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5

Sudha, P. N., & Rose, M. H. (2014). Beneficial Effects of Hyaluronic Acid. *Advances in Food and Nutrition Research*, *72*, 137–176. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9

Tanrıkulu, S., & Gönen, E. (2017). Kırık iyileşmesi. *TOTBİD Dergisi Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*. (n.d.). https://doi.org/10.14292/totbid.dergisi.2017.62

Topaloğlu, U., Ketani, M. A., & Saruhan, B. G. (2017). Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *10*(1), 62–71. https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd/363445

Tsui, Y. C., Doyle, C., & Clyne, T. W. (1998). Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. *Biomaterials*, *19*(22), 2015–2029. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00103-3

Türk, S., Altınsoy, I., Çelebi Efe, G., Ipek, M., Özacar, M., & Bindal, C. (2018). 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *92*, 757–768. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.07.020

URL-1 İnsan kemik yapısı, https://tr.depositphotos.com Erişim Tarihi; 20/05/2019

URL-2 Bone and Skeletal Tissues, https://slideplayer.com Erişim Tarihi; 22/05/2019

URL-3 Kemik Doku Yapısı, http://www.biyolojidersim.com Erişim Tarihi; 08/05/2019

URL-4 Kemik Doku Histolojisine Giriş, http://adliantropoloji101.blogspot.com Erişim Tarihi; 08/05/2019

URL-5 Osteogenesis, https://www.researchgate.net Erişim Tarihi; 08/05/2019

URL-6 Osteopontin, https://en.wikipedia.org Erişim Tarihi; 24/09/2019

URL-7 Bone Sialoprotein , https://en.wikipedia.org Erişim Tarihi; 24.09.2019

URL-8 Kollajen, http://www.wikizero.biz Erişim Tarihi; 26/09/2019

URL-9 Hiyalüronik asit, https://en.wikipedia.org Erişim Tarihi; 25/05/2019

URL-10 Tissue Engineering, https://www.researchgate.net Erişim Tarihi; 13/06/2019

URL-11 Corning 4500-250 Reusable Spinner Flask, https://www.coleparmer.ca Erişim Tarihi; 20/07/2019

URL-12 Kollajenin Yapısı, https://slideplayer.biz.tr Erişim Tarihi; 01/07/2019

Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I., Bursac, P. M., Langer, R., & Freed, L. E. (1998). Dynamic Cell Seeding of Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Biotechnology Progress*, *14*(2), 193–202. https://doi.org/10.1021/BP970120J

Wagermaier, W., Fratzl, P., & Planck, M. (2016). Collagen - Introduction The Collagen Fibril – A Building Block of Extracellular Tissues. In Reference Module in Materials Science and Materials Engineering (Issue April 2015). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.01493-4Watson, G. S., Cribb, B. W., & Watson, J. A. (2010). Experimental determination of the efficiency of nanostructuring on non-wetting legs of the water strider. *Acta Biomaterialia*, *6*(10), 4060–4064. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.04.016

Watson, G. S., Cribb, B. W., & Watson, J. A. (2010). Experimental determination of the efficiency of nanostructuring on non-wetting legs of the water strider. *Acta Biomaterialia*, *6*(10), 4060-4064.

Wei, G., & Ma, P. X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *25*(19), 4749–4757. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.12.005

Xia, Z., Yu, X., Jiang, X., Brody, H. D., Rowe, D. W., & Wei, M. (2013). Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *9*(7), 7308–7319. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.03.038

Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. (2004). The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ten*, *7*(6), 679–689. https://doi.org/10.1089/107632701753337645

Yilmaz, B., Alshemary, A. Z., & Evis, Z. (2019). Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications. *Microchemical Journal*, *144*, 443–453. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2018.10.007

Oyane, A., Kim, H.-M., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., & Nakamura, T. (2003). Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *65A*(2), 188–195. https://doi.org/10.1002/JBM.A.10482

Zhang, Y., Ni, M., Zhang, M., & Ratner, B. (2004). Calcium Phosphate—Chitosan Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ten*, *9*(2), 337–345. https://doi.org/10.1089/107632703764664800