

**POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) BAZLI
DOKU İSKELELERİ: SENTEZ, KARAKTERİZASYON VE
OSTEOBLASTİK AKTİVİTE**

**POLY(BUTYLENEADIPATE-CO-TEREPHTHALATE) (PBAT)
BASED SCAFFOLDS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION
AND OSTEOBLASTIC ACTIVITY**

AYSU ARSLAN

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

AYSU ARSLAN'ın hazırladığı “**Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Bazlı Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Osteoblastik Aktivite**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen BOZDEMİR

Başkan

.....

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

.....

Doç. Dr. Dilek KESKİN

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin, herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17/09/2015

AYSU ARSLAN

ÖZET

POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) BAZLI DOKU İSKELELERİ: SENTEZ, KARAKTERİZASYON VE OSTEOLASTİK AKTİVİTE

Aysu ARSLAN

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eylül 2015, 109 sayfa

Bu çalışma, FHD-2015-6667 kodlu “Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Doku İskeleleri: Fabrikasyon ve *in vitro* Testler” adlı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi ve 2210-C TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı, mevcut biyobozunur sentetik polimerlere alternatif olarak, alifatik-aromatik bir kopolimer olan PBAT’ın kemik doku mühendisliği alanındaki kullanım potansiyellerinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, çözücü buharlaştırma ve elektroçirme yöntemleri ile 2 boyutlu (2D), çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile ise 3 boyutlu (3D) PBAT doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelelerinin en uygun morfolojide üretilebilmeleri için optimum koşullar belirlenmiştir. Parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile malzeme üretiminde 200-355 µm boyut aralığında NaCl parçacıkları kullanılmıştır. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinde %90 oranında gözeneklilik ve 283 ± 61 µm gözenek boyutu; eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinde ise %62 gözeneklilik ve 236 ± 61 µm gözenek boyutu elde edilmiştir. Elektroçirme yönteminde seçilen optimum parametreler ile (21 kV gerilim, 1 mL/sa akış hızı ve 20 cm şırınga-toplayıcı arası mesafe) yaklaşık %85 gözenekliliğe, 12 µm gözenek boyutuna ve 569 ± 187 nm çapında fiberlere sahip 2D fibröz matrisler elde edilmiştir. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile ise 400 µm kalınlığında, gözeneksiz ince filmler elde edilmiştir.

Üretilen malzemeler ile yapılan su alım kapasitesi testleri sonucunda, en yüksek su alım kapasitesine sahip olan grup %578 ± 62 ile çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskeleleri, en düşük değere sahip olan grup ise %4 ± 3 ile çözücü buharlaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri olmuştur. Mekanik dayanım testleri

sonucu, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinin sıkıştırma direncinin (8.80 ± 6.10 MPa), kanselöz kemiğin sıkıştırma direncine benzer olduğu görülmüştür. PBAT ince filmlerin su temas açısı 71° , diğer doku iskelelerinin temas açıları ise gözenekli yapılarından dolayı 0° olarak elde edilmiştir. Lipaz enzimi ile yürütülen *in vitro* bozunurluk testlerinde, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ile üretilen doku iskelelerinde 5. hafta sonunda yapısal bozunma gözlenmiştir.

In vitro hücre kültür çalışmaları, MC3T3-E1 preosteoblastlar ile gerçekleştirilmiştir. SEM analizi ile yapılan morfolojik incelemeler sonucunda, kültürün 11. gününde hücrelerin tüm iskelelerin yüzeyini tamamen kapladığı görülmüş ve en hızlı hücre yayılımının fibröz matrislerin yüzeyinde olduğu gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, daha büyük gözenek boyutuna ve daha yüksek gözenekliliğe sahip 3D fibröz matrislerin üretimi ıslak elektroçirme ile gerçekleştirilmiş, biyoaktivitenin incelenmesi için insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (hBMSC) kullanılmıştır. Osteoindüktif etkinin artırılması amacıyla, mikrodalga destekli biyomimetik çöktürme yöntemi ile üretilen hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) parçacıkları, %5 (w/w) oranında PBAT fiberlerin yapısına eklenmiştir. Üretilen 3D fibröz matrislerin gözenek boyutu 30 ± 22 μm , gözenekliliği ise yaklaşık ~%91 olarak belirlenmiştir.

hBMSC'ler ile yapılan hücre kültür çalışmaları sonucu, hücrelerin 3D fibröz matrislerin iç kısımlarına yayılamayıp tüm yüzeyi kapladığı, mineralize yapıların ise doku iskelesinin iç kısımlara geçebildiği gözlenmiştir. Hücre farklılaşmasının belirlenmesinde, alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi, kollajen ve kalsiyum miktarları kolorimetrik yöntemlerle tayin edilmiş ve elde edilen sonuçlar ALP, kollajen tip I (*COL-I*), osteokalsin (*OCN*) ve osteopontin (*OPN*) gibi gen ifadelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) incelenmesi ile desteklenmiştir. Farklılaşma analizleri sonucu, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde osteojenik farklılaşmanın daha belirgin olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, PBAT doku iskelelerinin yüzey yapısı, biyobozunurluk ve mekanik özellikler açısından yeterli özellikler gösterdiği, hücre tutunmasını ve çoğalmasını büyük ölçüde desteklediği anlaşılmıştır. Özellikle osteojenik farklılaşmayı iyileştiren B-HAp gibi malzemeler ile desteklendiğinde, PBAT'ın kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek alternatif bir biyomalzeme olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat), kemik doku mühendisliği, doku iskelesi, 3 boyutlu elektroçirme, bor, hidroksiapatit.

ABSTRACT

POLY(BUTYLENEADIPATE-CO-TEREPHTHALATE) (PBAT) BASED SCAFFOLDS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND OSTEOBLASTIC ACTIVITY

Aysu ARSLAN

Master of Science, Chemical Engineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

September 2015, 109 pages

This thesis was prepared with support of FHD-2015-6667 Hacettepe University funding project and TÜBİTAK 2210-C Primary Subject National Scholarship Program for MSc Students. The aim of the present study is to investigate the potential of an aliphatic-aromatic copolyester PBAT as an alternative biomaterial for bone tissue engineering applications.

At the first part of the study, 2 dimensional (2D) PBAT scaffolds were fabricated with solvent evaporation and electrospinning whereas 3 dimensional (3D) PBAT scaffolds were fabricated with solvent casting-particulate leaching and melt molding-particulate leaching techniques. In order to obtain better results in terms of morphology, optimum parameters were determined for scaffold fabrication. The size range of NaCl particles used in the particulate leaching methods were determined as 200-355 μm . Porosity of 90% and pore size $283 \pm 61 \mu\text{m}$ were obtained with solvent casting-particulate leaching technique whereas porosity of 62% and pore size of $236 \pm 61 \mu\text{m}$ were obtained with melt molding-particulate leaching technique. Electrospun fibrous mats have 85% of porosity, 12 μm of pore size and $569 \pm 187 \text{ nm}$ of fiber diameter under optimized process parameters (21 kV of voltage, 1 mL/h of flow rate and 20 cm of distance between syringe tip-collector). Non-porous thin films with 400 μm thickness were fabricated with solvent evaporation method.

According to water absorption capacity analyses, solvent casting-particulate leaching scaffolds have the highest water uptake of $578 \pm 62 \%$ whereas thin films have the least water uptake capacity that is close to zero. According to mechanical tests, melt molding-

particulate leaching scaffolds showed a mechanical strength (8.80 ± 6.10 MPa) similar to cancellous bone. Water contact angle of PBAT thin films were observed as 71° , whereas other scaffolds have contact angle value of zero due to their porous structure. According to *in vitro* degradation assays, solvent casting-particulate leaching scaffolds were partially degraded within lipase enzyme after 5 weeks.

In vitro cell culture studies were carried out with MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. According to morphological investigation with SEM analysis, it was observed that cells fully covered the surface of the scaffolds at the end of the 11th day of the culture. The most rapid cell spreading was observed on fibrous mats.

At the second part of the study, 3D fibrous mats that have higher pore size and porosity were fabricated via wet electrospinning method. In order to investigate bioactivity of the scaffolds, human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) were used in cell culture studies. In order to enhance osteoinductive effect, hydroxyapatite (HAp) and boron containing hydroxyapatite (B-HAp) particles were fabricated via microwave-assisted biomimetic precipitation method and added into PBAT fibrous mats with ratio of 5% (w/w). Fabricated 3D fibrous mats have pore size of 30 ± 22 μm and porosity of $\sim 91\%$.

According to hBMSC culture studies, it was observed that cells could not infiltrate into 3D fibrous mats and covered the surface of scaffolds. However, secreted minerals could penetrate into the scaffolds. In order to determine cell differentiation, alkaline phosphatase (ALP) activity, collagen and calcium amounts were determined via colorimetric assays and also *ALP*, collagen (*COL-1*), osteocalcin (*OCN*) and osteopontin (*OPN*) gene expressions were investigated via real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses. As a result, differentiation of hBMSCs on B-HAp-PBAT fibrous mats were more significant than the other groups.

As a conclusion, it was observed that PBAT scaffolds have adequate properties in terms of surface structure, biodegradability and mechanical properties and they promote cell attachment and proliferation. PBAT can be used as an alternative biomaterial for bone tissue engineering applications particularly with the incorporation of materials like B-HAp, to enhance the osteoinductivity.

Keywords: Poly(butyleneadipate-co-terephthalate), bone tissue engineering, scaffold, 3 dimensional electrospinning, boron, hydroxyapatite.

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum günden bu yana bana mesleğimi sevdiren, sahip olduğu bilgi ve deneyimi ile çalışmalarımın yürütülmesinde yol gösteren, öğrencisi olma şansını elde ettiğim için büyük mutluluk duyduğum, hayatım boyunca çalışma disiplini örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na desteği, sağladığı imkanlar ve kazandırdığı deneyimler için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında büyük emeği olan, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, umutsuzluğa düştüğümde olumlu bakış açısıyla destek olan, birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim **Dr. Soner Çakmak**'a sabrı, desteği ve öğrettikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama FHD-2015-6667 no.'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte vakit geçirmekten çok büyük keyif aldığım, içtiğimiz kahvelere doyamadığım, paylaştığımız zamanları her zaman büyük özlemle hatırlayacağım kahve çetesinden sevgili arkadaşlarım **Bedriye Topal**'a, **Derya Kalelioğlu**'na, **Meryem Sümeyye Akdemir**'e, **Tuğçe Gültan**'a, **İnci Şıxaliyeva**'ya, **Ebru Tamahkar**'a, **Şeyma Bektaş**'a ve **Gülseren Irmak**'a,

Aynı ortamda çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili laboratuvar arkadaşlarım **Dr. Anıl Sera Çakmak**'a, **Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e, **Arş. Gör. Damla Çetin Altındal**'a, **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever**'e, **Ekin Özge Tunçay**'a, **Gökçe Kaynak**'a, **Dr. Murat Şimşek**'e, **Ülkü Bozoğlu**'na ve **Farzin Sana**'ya,

Tez çalışmama yeni başladığımda dünyaya gözlerini açan, bana şimdiye kadar yaşadığım en güzel duyguları hissettiren, ayrı kalmaya dayanamadığım boncuk gözlü, mis kokulu, minicik yeğenim **Ozan Dinçbilek**'e, mesafeler ayırdığı için hep özlem duyduğum, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim biricik ablam **Burcu Dinçbilek**'e, beni bugüne getiren ve hayatım boyunca aldığım kararlarda bana destek olan sevgili aileme; canım annem **Sevim Arslan**'a ve canım babam **Yusuf Arslan**'a,

Sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik doku mühendisliği	4
2.1.1. Kemik dokunun yapısı.....	4
2.1.2. Doku mühendisliği yaklaşımı.....	5
2.1.3. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler.....	6
2.1.4. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri	7
2.1.4.1. Kemik doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler	8
2.1.4.2. Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri.....	10
2.2. Elektroegirme yöntemi	13
2.2.1. Yöntemin temeli ve parametreler	13
2.2.2. Üç boyutlu nanofibröz doku iskeleleri üretiminde kullanılan elektroegirme yöntemleri.....	15
2.3. Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT)	21
2.3.1. PBAT'ın yapısı ve kullanım alanları	21
2.3.2. PBAT'ın biyobozunurluğu	22
2.3.3. PBAT'ın fiziksel özellikleri.....	24
2.3.4. PBAT ve doku mühendisliği	25
2.4. Hidroksiapatit	27
2.4.1. Biyomimetik yöntem ile HAp üretimi.....	27
2.4.1.1. İyon katkılı HAp üretimi	28
2.4.1.2. Bor katkılı HAp	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1. Kullanılan malzemeler.....	30
3.2. PBAT reçinelerinin karakterizasyonu	31
3.2.1. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi	31

3.2.2. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TG-DTA)	31
3.2.3. Sıvı ¹³ C-nükleer manyetik rezonans (¹³ C-NMR) analizi.....	31
3.3. Doku iskelelerinin üretimi	32
3.3.1. PBAT doku iskelelerinin üretimi.....	32
3.3.1.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi	32
3.3.1.2 Elektroğirme yöntemi	32
3.3.1.3. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	33
3.3.1.4. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma	33
3.3.2. Üç boyutlu (3D) fibröz doku iskelelerinin üretimi.....	34
3.3.2.1. Biyomimetik yöntemle HAp ve Bor katkılı HAp parçacıklarının üretimi	34
3.3.2.2. Üç boyutlu elektroğirme	35
3.4. Doku iskelelerinin karakterizasyonu	36
3.4.1. SEM analizi	36
3.4.2. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) analizi	36
3.4.3. Su temas açısı analizi.....	36
3.4.4. Su alım kapasitesi ölçümü	36
3.4.5. Gözeneklilik ölçümü	37
3.4.6. Mekanik dayanım testleri	37
3.4.7. Enzimatik bozunma testleri	38
3.5. Hücre kültür çalışmaları	38
3.5.1. MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları	38
3.5.1.1. SEM analizi	39
3.5.2. hBMSC hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları	39
3.5.2.1. DNA analizi.....	39
3.5.2.2. Alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi tayini.....	40
3.5.2.3. Kollajen analizi.....	40
3.5.2.4. Kalsiyum analizi	41
3.5.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifadesi analizi.....	41
3.5.2.6. SEM analizi	42
3.5.2.7. İstatistiksel analiz	43
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	44
4.1. PBAT reçinelerinin karakterizasyonları	44
4.1.1. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi	44

4.1.2. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TG-DTA)	45
4.1.3. ¹³ C-NMR analizi.....	45
4.2. PBAT doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu.....	47
4.2.1. Elektroğirme işlemi ile 2D fibröz matrislerin üretimi	48
4.2.2. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi.....	51
4.2.3. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi	55
4.2.4. Çözücü buharlaştırma işlemi ile ince film üretimi	57
4.2.5. Gözeneklilik ölçümü	58
4.2.6. Su alım kapasitesi ölçümü	59
4.2.7. Su temas açısı analizi.....	60
4.2.8. Enzimatik bozunma testleri	61
4.2.9. Mekanik dayanım testleri	64
4.3. MC3T3-E1 preosteoblast hücreleriyle yapılan kültür çalışmaları.....	65
4.3.1. SEM analizi	65
4.4. Islak elektroğirme ile 3D fibröz matrislerin üretimi.....	70
4.5. hBMSC ile yapılan kültür çalışmaları	74
4.5.1. Hücre çoğalmasının belirlenmesi	74
4.5.2. SEM analizi	76
4.5.3. Hücre farklılaşmasının belirlenmesi	80
5. GENEL SONUÇLAR	90
6. KAYNAKLAR.....	94
EK-1	105
EK-2	106
EK-3	107
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Elektroğirme parametrelerinin fiber morfolojilerine etkileri.....	14
Çizelge 2.2. Ecoflex®'in fiziksel özellikleri	22
Çizelge 3.1. Parçacık uzaklaştırma yöntemlerinde kullanılan parametreler. (* Çözücü döküm parçacık uzaklaştırma işlemi için v:w; eriyik kalıplama parçacık uzaklaştırma işlemi için w:w)	34
Çizelge 3.2. 1 L'lik 10xSBF çözeltisi bileşenleri ve miktarları	35
Çizelge 3.3. Mekanik dayanıklılık testlerinde uygulanan parametreler	37
Çizelge 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri	42
Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları	58
Çizelge 4.2. PBAT biyomalzemelerin su alım kapasiteleri.....	59
Çizelge 4.3. PBAT doku iskelelerinin su temas açısı değerleri.....	61
Çizelge 4.4. PBAT doku iskelelerinin mekanik özellikleri	64
Çizelge 4.5. Geleneksel elektroğirme ve ıslak elektroğirme sonucu elde edilen malzemelerin fiber çapları, gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları	72

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kemiğin Yapısı: (a) kortikal kemik ve (b) kanselöz kemik	5
Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği	6
Şekil 2.3. Parçacık uzaklaştırma yöntemlerinin şematik gösterimi: (a) çözücü döküm- parçacık uzaklaştırma, (b) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma	11
Şekil 2.4. Elektroğirme işleminin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5. (a) Fiberlerin katmanlar halinde biriktirilmesinin şematik gösterimi ve (b) bu yöntemle üretilen malzemenin SEM görüntüsü	16
Şekil 2.6. (a) Tabakaların elektroğirme sonrası biraraya getirilmesinin şematik gösterimi, (b) ve (c) bu yöntemlerle üretilen malzemelerin görüntüleri	17
Şekil 2.7. 3D fibröz matrislerin üretimi için kullanılan çeşitli toplayıcılara örnekler: (a-b) ırgara toplayıcılar, (c) yarı-küresel toplayıcı, (d) sabit şekle sahip 3D toplayıcılar.....	18
Şekil 2.8. (a) Parçacık uzaklaştırma işlemi ile 3D fibröz malzeme üretiminin şematik gösterimi ve (b) bu yöntemle üretilen doku iskelesinin SEM görüntüsü	19
Şekil 2.9. (a) Islak elektroğirmenin şematik gösterimi (b) ve (c) bu yöntem ile üretilmiş fibröz matrisler	20
Şekil 2.10. PBAT'ın molekül yapısı.....	21
Şekil 2.11. Sistemin Gibbs serbest enerjisini düşürmek için izlenen kristalizasyon yolları	28
Şekil 3.1. PBAT molekülündeki merkezi tetrametilen glikol karbonların gösterimi (B: bütilen, A: adipat, T: tereftalat)	32
Şekil 4.1. PBAT reçinelerinin ATR-FTIR spektrumu.....	44
Şekil 4.2. PBAT reçinelerine ait TG-DTA eğrisi	45
Şekil 4.3. PBAT reçinelerine ait ¹³ C-NMR spektrumu (B: bütilen, A: adipat, T: tereftalat)	46
Şekil 4.4. Çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile üretilen doku iskelelerinin görüntüleri: (a) çözücü buharlaştırma, (b) elektroğirme, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, (d) eriyik kalıplama- parçacık uzaklaştırma.....	47
Şekil 4.5. Yüzde 12 (w/v) PBAT çözeltisinin kullanımıyla farklı gerilim ve akış hızlarında elde edilen fibröz matrislerin SEM görüntüleri (Toplayıcı-şırınga ucu arası mesafe: 20cm), (Büyütme: 5,000x).....	49

Şekil 4.6. Yüzde 14 (w/v) PBAT çözeltisinin kullanımıyla farklı gerilim ve akış hızlarında elde edilen fibröz matrislerin SEM görüntüleri (Toplayıcı-şırınga ucu arası mesafe: 20cm) (Büyütme: 5,000x).....	50
Şekil 4.7. Farklı akış hızı ve polimer derişimlerinde elde edilen PBAT fiber çaplarının değişimi: (a) 12 kV ve (b) 21 kV.....	51
Şekil 4.8. %10 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (Beyaz oklar, tuz kümelerinin oluşturduğu büyük boşlukları işaret etmektedir) (büyütme: 100x)	52
Şekil 4.9. %15 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri (Beyaz oklar, tuz kümelerinin oluşturduğu büyük boşlukları işaret etmektedir) (büyütme: 100x)	53
Şekil 4.10. %20 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri (büyütme: 100x) (c'de bulunan küçük görüntü kapalı gözenekleri göstermektedir.)	54
Şekil 4.11. %15 PBAT çözeltisi, 200-355 µm boyut aralığında NaCl parçacıkları ve 1:1.5 polimer çözeltisi:tuz oranında elde edilen doku iskeleleri: (a) yatay ve (b) dikey kesit. Beyaz oklar, iskele yapısındaki küçük gözenekleri işaret etmektedir. (büyütmeler a: 200x, b: 100x).....	55
Şekil 4.12. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskeleleri: (a-c) yüzeyden ısıtılarak, (d-f) fırında eritilerek hazırlanan doku iskeleleri, (Büyütmeler: a,b,d,e: 100x; c,f: 50x).....	56
Şekil 4.13. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen PBAT ince filmlerin SEM görüntüleri (Büyütmeler: a: 5,000x, b: 10,000x).....	58
Şekil 4.14. Doku iskelelerinin absorpladığı su miktarının zamanla değişimi. (Ç.D.-P.U: çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, E.K.-P.U.: eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri).	60
Şekil 4.15. PBAT ince filmlerin bozunma sonucu SEM görüntüleri: (a-c) enzimsiz ortamdaki filmler, (d-f) enzimli ortamdaki filmler. (a,d) 1. hafta, (b,e) 3. hafta ve (c,f) 5. hafta (büyütme: 5000x)	62
Şekil 4.16. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen PBAT doku iskelelerinin bozunma sonucu SEM görüntüleri (büyütmeler: 500x)	63
Şekil 4.17. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 4. saat SEM görüntüleri: (a) İnce film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-	

parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a-b) 1,000x, (c) 1,370x ve (d) 1,150x)	66
Şekil 4.18. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 24. saat SEM görüntüleri: (a) İnce film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a-b) 1000x, (c) 1380x ve (d) 1260x)	67
Şekil 4.19. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 11. gün SEM görüntüleri: (a) ince film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a,c) 1,000x, (b,d) 5,000x, (e) 788x, (f,h) 2,300x ve (g) 917x)	69
Şekil 4.20. Islak elektroçirme ile üretilen PBAT doku iskelelerinin (a) yatay ve (b) dikey görüntüleri	70
Şekil 4.21. Islak elektroçirme ile üretilen 3 boyutlu fibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT fiberler. (Büyütme: a,c,e: 1000x ve b,d,f: 5000x).....	71
Şekil 4.22. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fiberlerin TEM görüntüleri: (a) PBAT, (b) HAp-PBAT ve (c) B-HAp-PBAT.....	72
Şekil 4.23. 2 ve 3 boyutlu PBAT fibröz matrislerin SEM görüntüleri: (a) 2 boyutlu, (b) 3 boyutlu matrisler. (Büyütmeler: 1,000x)	73
Şekil 4.24. 3D fibröz matrislerin absorpladığı su miktarının zamanla değişimi.	74
Şekil 4.25. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde çoğalan hBMSC'lerin DNA miktarı analizi. İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken: * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$; kontrol grubu HAp-PBAT iken ## $p < 0.01$)	75
Şekil 4.26. hBMSC kültürünün 7. gün SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT doku iskeleleri; (a,c,d) yatay kesit ve (b,d,f) dikey kesit. (Büyütmeler: (a,c,e) 1,000x, (b) 2,000x, (d) 250x, (f) 1,000x, (a1) 3,000x, (b1) 10,000x ve (c1) 5,000x	77
Şekil 4.27. hBMSC kültürünün 28. gün SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT doku iskeleleri; (a,c,d) yatay kesit ve (b,d,f) dikey kesit. Beyaz oklar, mineralize yapıları işaret etmektedir. (Büyütmeler: (a,c,e) 1000x, (b) 2000x, (d,f) 5000x, (a1,b1,c1) 5,000x	78
Şekil 4.28. hBMSC kültürünün 28. gününe ait EDX grafikleri: (a) PBAT, (b) HAp-PBAT ve (c) B-HAp-PBAT.....	80

Şekil 4.29. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin ALP aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken **p<0.01, ***p<0.001; kontrol grubu HAp-PBAT iken #p<0.05, ###p<0.001, n=3).	81
Şekil 4.30. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kollajen miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken *p<0.05, **p<0.01; kontrol grubu HAp-PBAT iken #p<0.05, ##p<0.01, n=3).	82
Şekil 4.31. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken **p<0.01; kontrol grubu HAp-PBAT iken ###p<0.001, n=3).	83
Şekil 4.32. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl ALP gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken, *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001; kontrol grubu HAp-PBAT iken #p<0.05, ##p<0.01 ve ###p<0.001, n=3).	84
Şekil 4.33. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl COL-I gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken **p<0.01; kontrol grubu HAp-PBAT iken ##p<0.01, n=3)	86
Şekil 4.34. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl OCN gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken ***p<0.001; kontrol grubu HAp-PBAT iken ###p<0.001, n=3).	87
Şekil 4.35. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl OPN gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken ***p<0.001; kontrol grubu HAp-PBAT iken ###p<0.001, n=3).	88

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μ	mikro
n	nano
β	beta
ρ	yoğunluk
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum klorür dihidrat
H_3BO_3	Borik asit
KCl	Potasyum klorür
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum klorür heksadhidrat
NaCl	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat

Kısaltmalar

2D	2 boyutlu
3D	3 boyutlu
ALP	Alkalın fosfataz
ATR- FTIR	Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi
BA	Bütülen adipat
BT	Bütülen tereftalat
B-HAp	Bor katkılı hidroksiapatit
cDNA	Komplementer deoksi ribonükleik asit
^{13}C -NMR	Karbon nükleer manyetik rezonansı
COL-I	Kollajen tip 1

DCM	Diklorometan
ECM	Hücre dışı matris
FBS	Fetal sığır serumu
HAp	Hidroksiapatit
hBMSC	İnsan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler
HFIP	1,1,1,3,3,3,-Hekzafloro-2-propanol
HMDS	Hekzametildisilazan
MC3T3-E1	Fare osteoblast hücre hattı
MSC	Mezenkimal kök hücreler
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
PBAT	Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat)
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SBF	Yapay vücut sıvısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
SL	Sekans uzunluğu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TG-DTA	Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz
α -MEM	Minimum essential medium alpha modification

1. GİRİŞ

Doku ve organ hasarlarının onarımı için uygulanan otogreft ve allogreft gibi geleneksel tedavilerin getirdiği sınırlamalar, doku mühendisliği yaklaşımını ön plana çıkarmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımı, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerin kullanımları ile doku ve organların laboratuvar koşullarında oluşturulmasıdır. Bu bileşenlerin tek başına kullanıldığı yaklaşımlar olsa da, en çok araştırılan yaklaşım biyomalzemeler ile hücrelerin birlikte kullanıldığı yaklaşımlardır [1].

Biyomalzeme tabanlı doku mühendisliği yaklaşımının en önemli bileşeni olan doku iskeleleri, doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit etmesi için tasarlanan, hücrelerin tutunması için uygun bir yüzey oluşturan gözenekli yapılardır. Doku iskelelerinin toksik etkilere neden olmaması ve vücut içerisinde parçalanabilmesi amacıyla, üretiminde kullanılan biyomalzeme biyoyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Ayrıca, seçilen biyomalzemenin mekanik özelliklerinin hedeflenen doku için yeterli olması da önem taşımaktadır [2].

Kemik doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla üretilen doku iskelelerinde sıklıkla kullanılan malzemeler sentetik ve doğal polimerler, biyoseramikler ve kompozitlerdir. Sentetik polimerler kolay işlenebilirlikleri, kontrol edilebilir mekanik özellikleri ve immünolojik reaksiyona neden olmamaları gibi avantajları açısından kemik doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [3]. Fakat, biyobozunur doku iskelesi üretimi için kullanılacak sentetik polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) kopolimerleri, polikaprolakton (PCL) ve polihidroksi alkanoatlar (PHA' lar) gibi biyobozunur olan alifatik poliestерler ile sınırlı kalmaktadır [4].

Alifatik poliestерler, biyobozunur olmaları nedeni ile kemik doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılsa da, genellikle gerekli mekanik ve termal özellikleri sağlayamamaktadırlar [5]. Aromatik poliestерler ise çok iyi mekanik ve termal özelliklere sahip olmasına rağmen, biyobozunur olmadıkları için doku iskelesi üretiminde kullanılmamaktadır. Yakın zamanda geliştirilen alifatik-aromatik kopoliestерler ise, içerisinde hem alifatik hem de aromatik ester grupları bulundurmaları sayesinde biyobozunurluğu ve iyi mekanik özellikleri birarada sağlamaktadır [6,7]. Bu özellikleri sayesinde aromatik-aromatik kopoliestерler, doku mühendisliği uygulamaları için güçlü bir adaydır.

Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT), monomerleri 1,4-bütandiol, adipik asit ve tereftalik asit olan bir alifatik-aromatik kopoliesterdir. Esnek, hidrofobik ve tamamen biyobozunur bir malzeme olması, film ve ambalaj üretiminde kullanılmasını sağlamaktadır [8]. PBAT'ın mekanik özellikleri, alçak yoğunluklu polietilene (LDPE) benzerlik göstermektedir [9]. BASF firmasının ticari ürünü olan Ecoflex®'in, kompost ortamında %99.9'unun 22 gün içerisinde bozunduğu belirtilmiştir [10].

Son yıllarda, PBAT'ın doku mühendisliği alanındaki potansiyelini vurgulayan çalışmalar da mevcuttur. PBAT bazlı malzemeler ile yapılan çeşitli sitotoksosite ve hücre kültür çalışmaları, PBAT'ın biyouyumlu bir malzeme olduğunu ve çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasını desteklediğini göstermektedir [11-16]. Yapılan çalışmalarda, genellikle PBAT'ın çeşitli doğal ve sentetik polimerlerle karışımları şeklinde hazırlanan doku iskelelerinin özelliklerinin PBAT'ın varlığıyla iyileştiği belirtilmiştir [14].

Bir kalsiyum fosfat bileşiği olan hidroksiapatit (HAp), osteoindüktif ve osteokondüktif olması sayesinde kemik onarımını hızlandırmakta ve doku etkileşimini artırmaktadır. Bu nedenlerle, kemik doku iskelesi üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Hidroksiapatitin sentetik polimerler ile birlikte kompozit formunda üretilmesi sonucu kemiğin doğal kompozit yapısına benzer, biyoaktif, biyobozunur ve istenen mekanik özelliklere sahip doku iskeleleri elde edilmektedir [3,17]. Son zamanlarda, nano boyutta hidroksiapatitin kullanımı ile oluşturulan nanokompozit formunda doku iskeleleri tercih edilmektedir [18].

Literatürde rapor edilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bor katkısının kemik onarımına olumlu etki gösterdiğini belirtmektedir. Kemik doku iskelesi üretiminde belirli bir miktara kadar bor kullanımının, hücre çoğalmasını, ECM oluşumunu ve mineralizasyonu artırarak osteojenik farklılaşmayı desteklediği bilinmektedir [19,20].

Sunulan tez çalışması kapsamında, PBAT bazlı doku iskelelerinin çeşitli yöntemlerle üretimi gerçekleştirilerek PBAT'ın doku mühendisliği alanındaki kullanım potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma 2 bölümden oluşmaktadır. İlk olarak; çözücü buharlaştırma, 2 boyutlu (2D) elektroçizme, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma teknikleri kullanılarak üretilen PBAT doku iskeleleri üzerinde, MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin tutunması ve çoğalması incelenmiştir. Gerçekleştirilen çeşitli karakterizasyon çalışmaları sonucunda, PBAT tek başına doku iskelesi malzemesi olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde, elektroçizme yöntemi ile 3-boyutlu (3D) nanofibröz HAp-PBAT ve bor katkılı HAp-PBAT kompozit doku iskeleleri üretilmiş ve hücre kültür

alışmalarında insan kemik iliği kökenli kök hücreleri (hBMSC) kullanılmıştır. HAp ve bor katlılı HAp retimi için mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılmış, elde edilen HAp ve bor katlılı HAp nanopartikülleri elektroğirme işlemi öncesi polimer zeltisine eklenmiştir. Elde edilen 3D nanofibröz doku iskeleleri ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışması sonrasında, hBMSC hücrelerinin ğalması ve osteojenik farklılaşması değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, tez çalışmasının temelini oluşturan konular 4 ana başlık altında incelenmiştir. Birinci kısımda, kemik dokusu ve kemik doku mühendisliği yaklaşımı hakkında teorik bilgiler verilmiştir. İkinci kısımda, kemik doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler ve çalışmada kullanılan doku iskelesi üretim tekniklerine yer verilmiştir. Üçüncü kısımda, PBAT'ın yapısı hakkında ayrıntılı bilgiler verilmiş ve literatürde yer alan çalışmalar anlatılarak PBAT'ın doku mühendisliğindeki yerinden söz edilmiştir. Son kısımda ise hidroksiapatitin kemik doku mühendisliğindeki öneminden bahsedilerek üretim yöntemi açıklanmıştır.

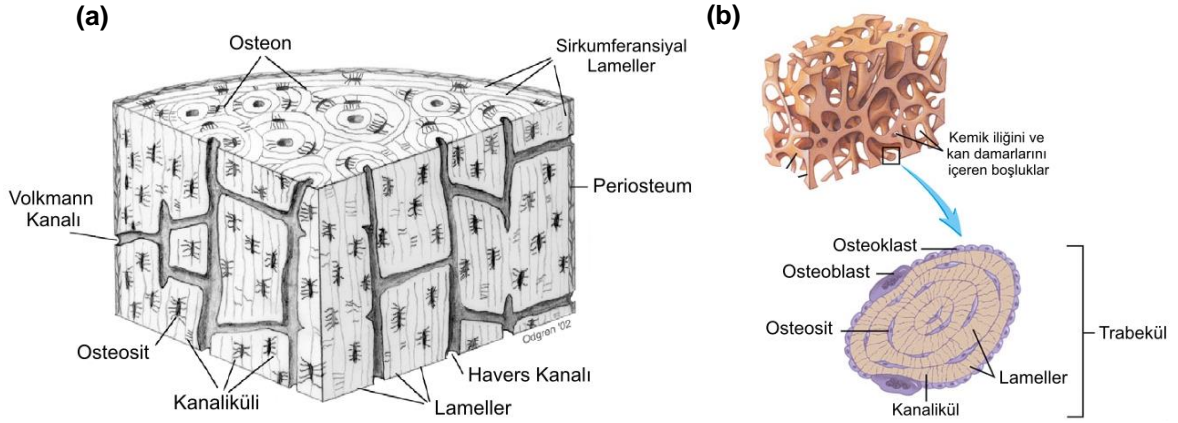
2.1. Kemik doku mühendisliği

2.1.1. Kemik dokunun yapısı

Kemik dokusu hücrelerden, organik ve inorganik yapılardan oluşan doğal bir kompozittir. Kemiğin organik yapısının %90-95'ini kollajen fibriller oluştururken, inorganik kısmını kalsiyum fosfat bileşiklerinin kristal formu olan hidroksiapatit (HAp) oluşturmaktadır. Kemiğin organik fazının geri kalan kısmını ise glikoproteinler, proteoglikanlar ve büyüme faktörleri gibi moleküller oluşturmaktadır [21].

Makroskopik olarak incelendiğinde kemik, dış kısmındaki **kortikal** (sıkı) kemik ve iç kısmındaki **kanselöz** (süngerimsi) kemikten oluşmaktadır. Kanselöz kemik, %50-90 arasında yüksek gözenekliliğe sahipken, kortikal kemik yalnızca %10 gözenekliliğe sahiptir [22]. Ayrıca, kanselöz kemiğin ortalama mineral içeriği kortikal kemikten daha azdır [23]. Bu nedenlerle kanselöz kemiğin mekanik özellikleri kortikal kemiğe göre 20 kat daha düşüktür [22].

Kortikal ve kanselöz kemiğin yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Kortikal kemiğin en küçük işlevsel birimi olan **osteonlar**, kollajen liflerin bir araya gelerek meydana getirdiği lamellerden ve Havers kanallarından oluşur [24]. Kemiğin iç kısmında bulunan Havers ve Volkmann kanallarındaki damar ağı, kanaliküller aracılığıyla osteositleri beslemektedir. Kemiğin çevresi **periostum** adı verilen zarla çevrilidir. Kanselöz kemiği oluşturan trabekül birimleri ise, osteoblast, osteoklast, osteositler ve osteositleri besleyen kanaliküllerden oluşmaktadır.



Şekil 2.1. Kemiğin Yapısı: (a) kortikal kemik [21] ve (b) kancellöz kemik

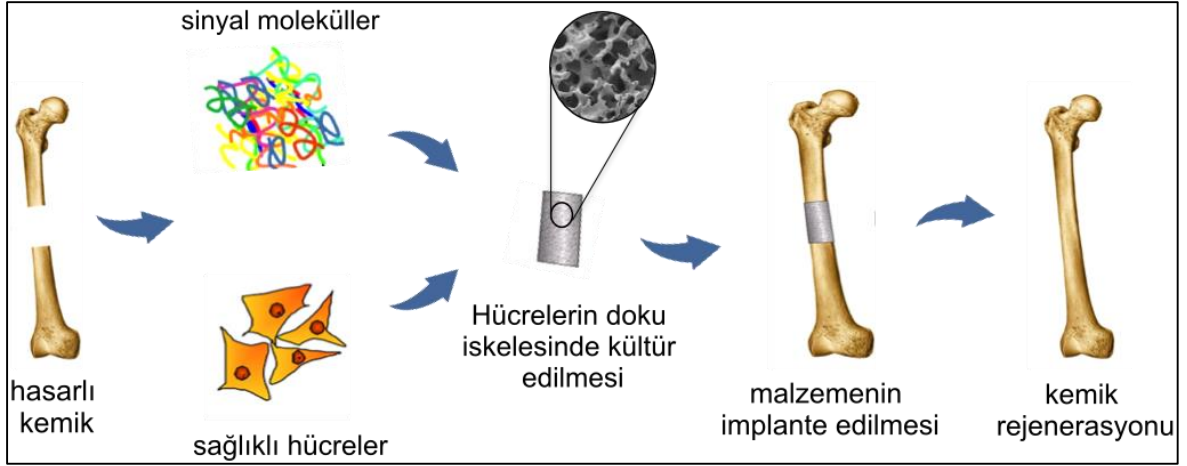
2.1.2. Doku mühendisliği yaklaşımı

Kemik hasarlarının onarımı için yapılan geleneksel yaklaşımlar otogreft, allogreft ve zenogreft uygulamalarıdır. **Otogreft** uygulaması, hastanın sağlıklı bir bölgesinden alınan kemiğin hasarlı bölgeye yerleştirilmesidir. Otogreft yöntemi; osteoindüksiyon ve osteokondüksiyonu sağlamasına rağmen, sağlıklı dokunun alındığı bölgede hasara neden olması, birden fazla ameliyat gerektirmesi ve yüksek maliyet gibi sınırlamaları mevcuttur [22]. Başka bir bireyden alınan sağlıklı dokunun hasarlı bölgeye yerleştirildiği **allogreft** uygulaması ise, viral hastalıkların taşınımına, enfeksiyona ve bağışıklık sistemi reddine neden olmaktadır [25]. Allogreftlere uygulanan bazı işlemler ile viral hastalıkların taşınımını engellenebilse de, uygulanan işlemler kemiğin dayanıklılığını ve osteoindüktivitesini düşürmektedir [26]. Farklı bir türden alınan sağlıklı dokunun transplantasyonu ise **zenogreft** olarak adlandırılmaktadır. Zenogreftler de, patojenlerin aktarımı ve bağışıklık sistemi reddine neden olmaktadır [27].

Kemik dokusuna uygulanan geleneksel tedavilere alternatif olarak geliştirilen **kemik doku mühendisliği** yaklaşımı; kemik hücrelerine farklılaşabilecek hücrelerin, hücrelerin farklılaşmasını uyuracak sinyallerin ve hücrelerin tutunabileceği geçici bir matris olan doku iskelelerinin kullanımı ile kemik dokusu oluşumunu hedefler. Bu üç bileşen bir arada kullanılabileceği gibi, yalnızca hücreler ve doku iskelesinin kullanıldığı çalışmaların sayısı da oldukça fazladır. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı, Şekil 2.2' de şematik olarak gösterilmiştir.

Kemik doku mühendisliği yaklaşımında hastanın kendisinden veya başka bir bireyden izole edilen, kemik hücrelerine farklılaşabilecek sağlıklı hücreler; biyosinyal moleküller ile

birlikte 3 boyutlu gözenekli doku iskelesine ekilerek kültür edilir. Bu aşamada hücreler, doku iskelesi yüzeyine tutunarak çoğalır ve farklılaşarak kendi doğal matrislerini sentezlemeye başlarlar. Gerçek dokunun oluşumu ve çevre dokuyla etkileşimi devam ettikçe, doku iskelesi bozunmaya devam eder [28,29].



Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği

Kemik, dünya çapında gerçekleştirilen doku nakillerinde ikinci sırada yer almaktadır [30]. Günümüzde küçük kemik hasarlarının onarımında kullanılmak üzere geliştirilen çeşitli doku mühendisliği ürünleri mevcut olsa da, büyük kemik hasarları için geliştirilmiş ürün bulunmamaktadır. Ayrıca, kemik hasarları genellikle anında müdahale gerektirdiğinden, ürünlerin pek çoğu biyomalzeme ve biyosinyal moleküllerden oluşan fakat hücre içermeyen malzemelerden oluşmaktadır [28].

2.1.3. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler

Doku mühendisliğinde kullanılacak en iyi hücre kaynağı, immünolojik reaksiyon oluşturmaması nedeniyle olog hücreler, yani hastanın kendisinden alınacak hücrelerdir. Fakat, bazı durumlarda hastanın kendisinden alınacak hücrelerin hasar oluşturması veya yaşlı hastalardan alınacak hücrelerin uygun olmaması nedeni ile, alternatif olarak farklı bireyden veya farklı türden hücre sağlamak daha uygun olabilmektedir [31]. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler, uygun bir kaynaktan alınan osteoblastlar ve kök hücrelerdir.

Kök hücreler, henüz farklılaşmamış, yüksek çoğalma kapasitesine sahip ve çeşitli hücrelere farklılaşarak doku oluşumu sağlayabilecek hücrelerdir. Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler olmak üzere 3 gruba ayrılır. Kök hücrelerin farklılaşabilme yeteneği, kaynağına göre değişkenlik göstermektedir. Erişkin kök hücreler

olan **multipotent kök hücreler**, tamamen farklılaşmış dokularda bulunur ve gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında farklı hücre tiplerine dönüşebilirler [22,32].

Multipotent kök hücre sınıfına giren **mezenkimal kök hücreler (MSC)**, kemik iliğinde, kas, yağ, beyin ve deri gibi dokularda bulunabilir. Farklı dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücreler fenotipik olarak benzer özellikler gösterse de, yenilenme, çoğalma ve farklılaşma açısından değişiklik gösterebilmektedir [33]. Yapılan bir çalışmada kemik iliği, sinovyum ve periost kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenez potansiyelinin daha yüksek olduğu görülmüştür [34].

Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (BMSC), kemik, yağ ve kıkırdak gibi dokulara farklılaşabilmektedir. BMSC'lerin uygun kültür koşullarında kollajen tip-I, kemik sialoproteinleri, osteokalsin ve osteopontin gibi proteinleri sentezleyerek osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir [35]. MSC'lerin osteojenik farklılaşması, deksametazon, B-gliserofosfat, askorbik asit ve 1,25-dihidroksivitamin D₃ varlığında indüklenmektedir. Ayrıca, IGF-1, EGF ve VEGF gibi büyüme faktörleri de MSC'lerin osteoindüksiyonuna katkı sağlamaktadır [33].

Uygun bir verici varlığında BMSC eldesi kolay olmasına rağmen, verici dokuda hasar oluşturması, acıya neden olması ve alınan kaynağa göre farklılıklar göstermesi gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca, yapılan bir çalışmada BMSC'erin proliferasyon kapasitesinin adipoz kökenli ve göbek kordon bağı kanı kökenli MSC'lere göre daha düşük olduğu saptanmıştır [36]. BMSClerin yanı sıra, adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler de kemik doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan diğer hücreler olan **osteoblastlar**, özelleşmiş mezenkimal kök hücrelerdir. Osteoblastlar, biyopsi ile veya kök hücrelerin *in vitro* farklılaştırılması ile elde edilebilirler. Bunların dışında MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ve MG63, HOBIT ve SAOS-2 gibi osteoblast benzeri hücre hatları da kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır [37].

2.1.4. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri

Doku iskeleleri, hücre yapışması, büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasını uyararak gerçek hücre dışı matrisin yeniden oluşumuna katkıda bulunan yapay hücre dışı matrislerdir. Kemik doku mühendisliğinde, çeşitli biyomalzemelerin ve fabrikasyon yöntemlerinin kullanımı ile farklı yapılarda doku iskeleleri üretmek mümkündür.

Doku iskelelerinin, vücutta immünolojik ve toksik etkiye neden olmaması için biyoyumlu olması gerekmektedir. Ayrıca, hücreler zamanla kendi matrislerini oluşturacağı için, doku iskeleleri kontrollü bir hızda vücut içerisinde bozunmalıdır [4,38]. Bu nedenlerle, kemik doku iskelesi üretimi için seçilecek biyomalzemenin biyoyumlu ve biyobozunur olması gerekmektedir.

Kemik gibi sert dokuların rejenerasyonuna yönelik olarak üretilen doku iskelelerinin, stres altında yapılarının bozulmadan kalabilmeleri ve yeterli desteği geçici olarak sağlayabilmeleri için, mekanik dayanımları yüksek olmalıdır [30]. Kortikal kemik ile kanselöz kemiğin mekanik özellikleri birbirinden oldukça farklıdır. Kortikal kemiğin sıkıştırma direnci 15-20 GPa arasında iken, kanselöz kemiğin sıkıştırma direnci 2-20 MPa arasında değişmektedir [39]. Seçilen biyomalzeme, doku iskelesinin mekanik özelliklerini etkileyeceği gibi, fabrikasyon yöntemi de doku iskelesinin mekanik dayanımında belirleyici bir etkidir.

Kemik doku iskelelerinin sahip olması gereken diğer özellik yüksek miktardaki gözenekliliktir. Ayrıca, gözeneklerin içsel bağlantılı olması ve gözenek çapı da büyük önem taşımaktadır. Böylece, hücrelerin doku iskelesi içerisine doğru çoğalması sağlanabildiği gibi, besinlerin ve metabolizma atıklarının taşınımı da gerçekleşmektedir [40].

Kemik doku iskelelerinin, hücrelerin tutunmasını ve üremesini destekleyecek şekilde **osteokondüktif** olmaları ve osteoprojenitör hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasını uyuracak şekilde **osteoindüktif** olmaları, sahip olmaları gereken diğer önemli özelliklerdir [41].

2.1.4.1. Kemik doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Günümüzde, çeşitli biyomalzemelerin kullanımı ile kemik doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmektedir. Biyoaktif seramikler, sentetik ve doğal polimerler ve kompozitler kemik doku iskelesi üretiminde en çok kullanılan biyomalzemelerdir.

Biyoaktif seramikler

Kemiğin kimyasal yapısına oldukça benzeyen **biyoaktif seramikler**, osteoindüktif ve osteokondüktif olmaları, çevre dokuyla etkileşim sağlamaları ve yüksek modülüse (7-234 GPa) sahip olmaları sayesinde sıklıkla kemik doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadırlar [30,42]. Fakat, çok kırılğan olmaları, kolay işlenememeleri ve çok yavaş bozunmaları nedeniyle tek başlarına doku iskelesi üretiminde kullanımları kısıtlıdır. Bu nedenle,

çoğunlukla doğal veya sentetik polimerler ile birleştirilerek kompozit halinde kullanılırlar [43]. Biyoaktif seramiklere örnek olarak HAp ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat bileşikleri örnek verilebilir [30].

Doğal polimerler

Protein ve polisakkarit kökenli doğal polimerler, doğal ECM' ye benzer yapıdadır ve hücre reseptörleri ile etkileşebilecek bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu nedenle, hücrelerin tutunma ve çoğalma gibi fonksiyonlarını desteklemektedirler. Fakat, özellikleri alındıkları kaynağa göre değişmekte ve immünolojik reaksiyon oluşturma riski taşımaktadırlar. Ayrıca, çabuk bozunmaları ve yeterli mekanik destek sağlayamamaları gibi dezavantajları mevcuttur. Bu nedenle, doğal polimerlerin de biyoseramikler gibi tek başlarına kemik doku mühendisliğinde kullanımları sınırlıdır. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan doğal polimerlere kollajen, kitosan, aljinat, jelatin ve hyaluronik asit örnek verilebilir [44].

Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, kemik doku iskelesi bileşeni olarak kullanılmaya en elverişli biyomalzemelerdir. Seramikler ve doğal polimerlerden daha kararlı mekanik özellikleri sayesinde kolayca işlenerek çeşitli yapılar oluşturulabilmektedir [45]. Toksik ve immünolojik reaksiyon oluşturmamaları, iyi mekanik dayanımları, kontrol edilebilir hızda bozunmaları ve büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması diğer avantajlarındandır. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyobozunur sentetik polimerler polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), kopolimerleri polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL) ve polihidroksialkanoatlar gibi poli- α -esterler, yani alifatik poliesterlerdir.

Sentetik polimerler, sağladığı pek çok avantaja rağmen, hücrelerin biyolojik işlevlerini uyaracak özellikte değildir. Bu nedenle sentetik doku iskeleleri, çeşitli katkıların ve modifikasyonların yapılması ile biyoaktif hale getirilebilmektedir. Jelatin, kollajen, laminin ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin doku iskelesi yüzeyine immobilize edilmesi ile hücre fonksiyonları iyileştirilebilmektedir [46]. Birçok ECM proteininin yapısında bulunan peptid sekanslarının eklenmesi ile de doku iskelesinin biyoaktif özelliği artırılabilir. Peptid sekansları, hücrelerin integrin reseptörlerine bağlanma özelliği gösterdiğinden hücre-malzeme etkileşimlerini iyileştirmektedir. En çok kullanılan peptid sekansı Arginine-Glycine-Aspartic asit (RGD)' dir [47].

Kompozitler

Kompozit doku iskeleleri, iki veya daha fazla farklı biyomalzemenin birleştirilmesi ile oluşturulur. Polimerler ile biyoaktif seramiklerin birleştirilerek kompozit oluşturulması ile, osteoindüktif ve osteokondüktif özellik gösteren, kırılabilirlik ve esnekliğin dengelendiği mekanik özelliklere sahip, biyobozunur ve kemiğin doğal yapısına benzer doku iskeleleri üretmek mümkündür [48].

2.1.4.2. Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri

Kemik doku iskelesi fabrikasyonu yapılırken, belirli parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Kemik rejenerasyonunun sağlanabilmesi için, kemik doku iskelelerinin gözenek çapının 50-1000 µm arasında ve gözenekliliğinin en az %40-60 arasında olması beklenmektedir [49]. Uygun fabrikasyon yönteminin seçimi ile, istenen yapıda doku iskeleleri üretilebilmektedir. Üç boyutlu kemik doku iskelesi üretiminde en çok kullanılan yöntemler parçacık uzaklaştırma yöntemleri, dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme yöntemleri, elektroçirgeme ve hızlı prototipleme yöntemleridir.

Dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma yöntemi, genellikle doğal polimerlerden doku iskelesi üretiminde tercih edilen bir yöntemdir [50]. Bu yöntemde, hazırlanan polimer çözeltisi uygun sıcaklıkta dondurulmaktadır. Çözelti içerisinde oluşan buz kristalleri, dondurarak kurutma cihazında düşük sıcaklıkta ve vakum altında süblimleşerek mikro gözenekleri oluşturmaktadır. Gözeneklilik ve gözenek boyutu dağılımı, polimer çözeltisinin derişimine ve dondurma sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir [51].

Gaz köpükleştirme yöntemi

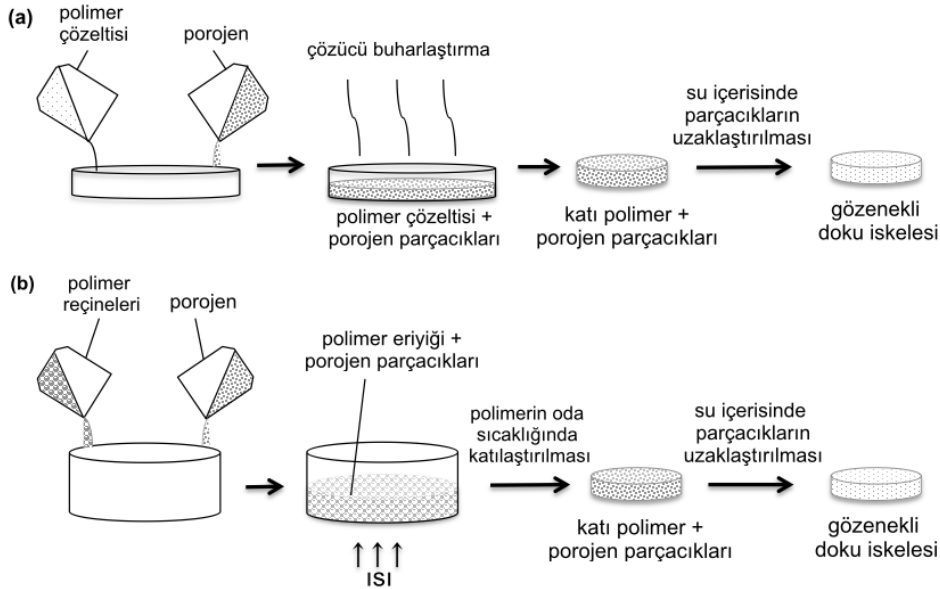
Gaz köpükleştirme yönteminde, katı polimer diskleri basınçlı karbondioksit gazına maruz bırakılır. Karbondioksit gazına doygun hale gelen polimer içerisinde karbondioksit hızlıca salındığında, malzeme içerisinde çekirdeklenme ile oluşan gaz kabarcıkları, gözenekleri meydana getirir. Bu yöntem ile 100 µm boyutlarında gözeneklere ve %93 oranında gözenekliliğe ulaşmak mümkündür. Fakat, oluşan gözenekler içsel bağlantılı olamamakta ve doku iskelesinin üst kısmında gözeneksiz bir tabaka oluşmaktadır. Bu kısıtlamaları gidermek için gaz köpükleştirme ile parçacık uzaklaştırma yöntemlerinin birleştirildiği çalışmalar mevcuttur [3].

Parçacık uzaklaştırma yöntemleri

Parçacık uzaklaştırma teknikleri temel olarak, gözenek oluşturuucu katı parçacıkların doku iskelesi malzemesi içerisinde dağıtılması ve son basamak olarak uygun bir çözücü ile yapıdan uzaklaştırılması ile gözenekli doku iskelelerinin üretimine dayanır. Bu yöntem, istenen boyutta ve miktarda gözenek oluşturmaya izin vermesi ve kompleks ekipmanların kullanılmaması nedeni ile sıklıkla kullanılan basit, geleneksel bir yöntemdir. Porojen olarak genellikle suda çözünen tuz veya şeker parçacıkları tercih edilmektedir. Doku iskeleleri, polimerin uygun bir çözücüde çözülmesiyle (çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma) veya eritilmesiyle (eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma) elde edilebilir. Bu yöntemler, Şekil 2.3.'te şematik olarak gösterilmiştir.

Fakat, parçacık uzaklaştırma yöntemlerinin getirdiği bazı sınırlamalar mevcuttur. Bu sınırlamalar, şu şekilde sıralanabilir [52]:

- İskelenin üst kısmında gözeneksiz film tabakası oluşumu,
- Gözeneklerin iskele içinde homojen bir şekilde dağılmaması,
- Birbirine bağlı gözenek elde etmedeki zorluklar,
- Parçacıkların tamamının yapıdan uzaklaştırılamaması.



Şekil 2.3. Parçacık uzaklaştırma yöntemlerinin şematik gösterimi: (a) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, (b) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma

Üretim yönteminde yapılacak bazı modifikasyonlar ile bu sınırlamaların önüne geçilebilmektedir.

Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma tekniği, toksik organik çözücülerin kullanılmaması ve elde edilen ürünün mekanik dayanımının daha iyi olması nedeni ile çözücü buharlaştırma-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile karşılaştırıldığında daha avantajlı olmaktadır. Fakat, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma tekniğinde, eriyik polimerin çok viskoz olması, parçacıkların yapı içerisinde homojen dağılamamasına neden olmaktadır. Literatürde, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma tekniğinde gözenekliliğin ve gözeneklerin içsel bağlantılarının artırılması amacı ile yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Reignier ve arkadaşları, polikaprolakton doku iskelesi üretiminde gözenek oluşturmak için tuz kullanmanın yanı sıra, suda çözünen bir polimer olan polietilen oksit (PEO) de kullanmışlardır [53]. Ekstrüzyon ile kalıplama işlemi sonrası katılaştırdıkları kompoziti suda bekleterek içerisinden tuz ve PEO'ü uzaklaştırmışlar ve içsel bağlantılı ve yüksek gözenekliliğe sahip doku iskeleleri elde etmişlerdir. Bir diğer yöntemde Cho ve arkadaşları, eriyik kalıplama işlemi öncesinde polimeri öğüterek toz haline getirmişlerdir [54]. Fabrikasyon işlemi sonucunda, elde ettikleri doku iskelelerinin gözenekliliğinin geleneksel yöntemle göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Eriyik kalıplama işlemi sırasında polimer eriyiğine basınç uygulanarak da, porojen parçacıklarının eriyik içerisinde homojen olarak dağılabilmesi mümkündür [55].

Hızlı prototipleme yöntemleri

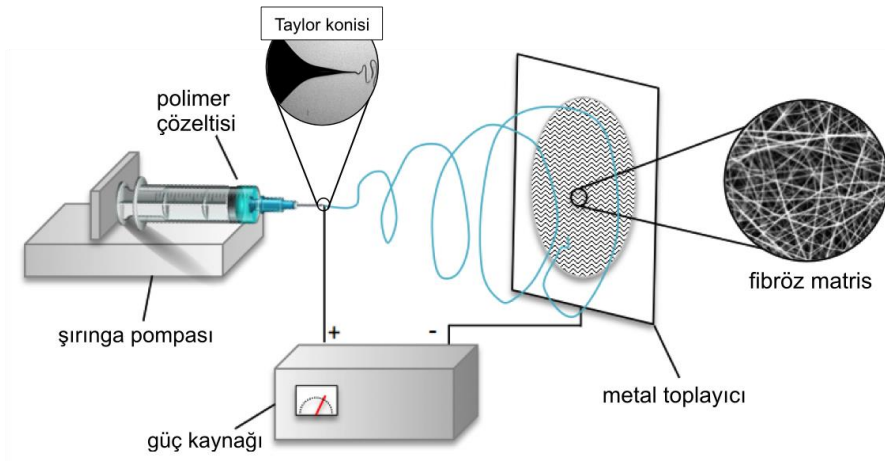
Son yıllarda kullanımı hızla artan **hızlı prototipleme teknikleri**, geleneksel yöntemlerden farklı olarak, doku iskelelerinin üretimi sırasında hücrelerin enkapsülasyonuna da olanak sağlar. Serbest katı hal olarak da adlandırılan bu yöntemlerde, fabrikasyon sırasında eş zamanlı olarak hücre enkapsülasyonunun homojen olarak sağlanması, hücre ekiminin verimini artırdığı için avantajlı olmaktadır. Ayrıca bilgisayar destekli programların kullanımı ile doku iskelelerinin yapısı ve gözeneklerinin boyutu kontrol edilebilmektedir. Üretilecek doku iskelelerinin gözenek yapısı, kullanılacak hızlı prototipleme tekniğine göre değişmektedir. Hızlı prototipleme teknikleri genel olarak, lazer temelli, nozzle temelli ve yazıcı temelli teknikler olmak üzere 3'e ayrılmaktadır [56].

Sunulan tez kapsamında hem 2 boyutlu, hem de 3 boyutlu nanofibröz doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan yöntem olması nedeniyle Bölüm 2.2'de elektroçirime yöntemi ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.2. Elektroğirme yöntemi

Doku iskelesi oluşturmak amacı ile en çok kullanılan bir diğer yapı **nanofiberlerdir**. Nanofibröz matrisler, yüzey alanı/hacim oranı oldukça yüksek, yüksek gözenekliliğe sahip ve iyi mekanik özelliklere sahip yapılardır. Bu nedenle, birçok alanda olduğu gibi, biyomedikal alanda da ilaç salımında, yara örtü malzemelerinde ve doku iskelelerinde sıklıkla kullanılmaktadır [57]. Çapları 100 nm ve altında olan fiberler nanofiber olarak bilinse de, 100-1000 nm arasındaki yarı-mikron fiberler de bu uygulamalarda nanofiber olarak kabul edilmektedir.

Nanofibröz doku iskeleleri, kendiliğinden oluşma, faz ayrımı ve elektroğirme yöntemleri ile üretilebilir. Ancak, elektroğirme yöntemi; kolaylığı, çok sayıda polimerin kullanılabilirliği, proses parametrelerinin kontrol edilebilirliği ve büyük ölçekte üretimin mümkün olması nedenleri ile nanofiber üretimi için en uygun ve en sık kullanılan tekniktir.



Şekil 2.4. Elektroğirme işleminin şematik gösterimi

2.2.1. Yöntemin temeli ve parametreler

Elektroğirme yöntemi, polimerik fiberlerin elektrostatik kuvvetler ile oluşturulması ilkesine dayanır. Sistemin başlıca bileşenleri, güç kaynağı, şırınga pompası ve toplayıcıdır (Şekil 2.4). Şırınga iğnesi ucunda asılı bulunan polimer çözeltisi veya eriyiğinin damlacığı, yüksek gerilim uygulandığında elektriksel olarak yüklenir. Uygulanan gerilim, belirli bir değere ulaştığında polimer çözeltisinin sahip olduğu elektriksel kuvvetler, yüzey gerilimine eşitlenir ve şırınga iğnesi ucunda incelerek **Taylor konisi** şeklini alır. Bu noktada uygulanan gerilim artmaya devam ettiğinde, elektriksel yük taşıyan polimer jetleri uzayarak ve incelerek toplayıcıya doğru ilerler ve metal toplayıcı üzerinde fiberler halinde

biriktirilir [58]. Toplanan fiberler rastgele veya uygun aparatların kullanımı ile hizalı olarak düzenlenebilir. Elektroğirme yöntemi, Şekil 2.4.'te şematik olarak gösterilmiştir.

Elektroğirme işleminde, çevresel ve sistemsel parametrelerin değiştirilmesi ile istenen çapta ve morfolojide fiberler elde edilebilir. Elektroğirme işlemini etkileyen parametreler Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Elektroğirme parametrelerinin fiber morfolojilerine etkileri

	Parametreler	Parametredeki artışın fiber morfolojisine etkisi
Sistem Parametreleri	Şırınga ucu çapı	Jet çıkışı miktarını artırdığı için fiber çapı artar [59].
	Şırınga pompası akış hızı	Daha çok miktarda jet çıkışına neden olduğu için fiber çapı artar [60].
	Gerilim	Bazı kaynaklarda, voltajın jet çıkışı miktarını artırdığı için fiber çapını artıracakları belirtilmiştir [60]. Fiber çapını azalttığını belirten çalışmalar da mevcuttur [61,62].
	Şırınga ucu-toplayıcı arası mesafe	Jet daha fazla uzayacağı için fiber çapı azalır. Fakat, bazı durumlarda elektrostatik etkinin azalmasına bağlı olarak fiber çapı artabilir [63].
Çözültü Parametreleri	Viskozite	Polimer molekül zincirlerinin dolaşıklığı artacağından dolayı fiber çapı artar ve boncuk oluşumu azalır [63].
	Yüzey gerilimi	Fiber çapı üzerine olan etkisi ihmal edilebilir [60]. Fakat boncuk oluşumuna neden olabilir [63].
	Uçuculuk	Çözücü uçuculuğu yüksek olduğunda, jetin katılaşma süreci hızlanacağı için jet yeterince incelemez. Bu nedenle fiber çapı artar [59].
	İletkenlik	Jetin taşıdığı yük miktarı artırması daha çok incelmelerini sağlar ve fiber çapı azalır [63].
	Dielektrik sabiti	Fiber çapı ve boncuk oluşumu azalır.
Çevresel Parametreler	Sıcaklık	Sıcaklık ve nem gibi faktörler, çözücünün buharlaşma hızını, viskozitesini ve yüzey gerilimini etkileyeceği için fiber morfolojisini değiştirebilir [64,65].
	Nem	
	Atmosfer türü	Farklı gazların bulunduğu ortamda yapılan elektroğirme işlemi, fiber oluşumunu ve çapını etkileyebilir [63].

Çizelge 2.1.'de görüldüğü gibi, çözelti parametreleri uygun olmadığında fiberlerin yapısında boncuk oluşumu görülebilmektedir. Özellikle çözelti viskozitesi yeterli olmadığında ve yüzey gerilimi yüksek olduğunda boncuk oluşumu artmaktadır. Boncuk oluşumu, polimer çözeltilisine bazı ajanların eklenmesi ile giderilebilmektedir. Yapılan çalışmalar, polimer çözeltilisine belirli oranda tuz eklendiğinde polimer jetinin taşıdığı yük miktarının arttığını, dolayısıyla boncuk oluşumunun engellendiğini ve fiber çapının azaldığını göstermiştir [66]. Fiberler üzerindeki boncuk oluşumu, çözeltiliye yüzey aktif ajan eklenerek yüzey geriliminin düşürülmesi ile de giderilebilmektedir [64]. Grubumuzda daha önceden yapılmış bir çalışmada, elektroğirme çözeltilisine bal katıldığında da boncuk oluşumunun engellendiği görülmüştür [67].

Elektroğirme yöntemi ile farklı morfolojide fiberlerin üretimi de mümkündür. Çeşitli uygulamalar için üretilebilen bu fiberler içi oyuk, gözenekli veya düz şerit benzeri morfolojilere sahip olabilmektedir [68].

2.2.2. Üç boyutlu nanofibröz doku iskeleleri üretiminde kullanılan elektroğirme yöntemleri

Elektroğirme sisteminde şırınga ucundaki polimer çözeltisi negatif, metal toplayıcı ise pozitif yüklenmektedir. Negatif olarak yüklenmiş polimer jetleri, pozitif yüklü toplayıcıya ulaştığı anda elektron transferi gerçekleşmekte ve yapılarında kalan elektronlar nedeni ile fiberler güçlü bir şekilde (+) yüklü toplayıcıya tutunmaktadır. Sonuç olarak, toplama süresi ne kadar uzun tutulsa da, geleneksel elektroğirme işleminde 3 boyutlu fibröz matrisler elde edilememektedir [69].

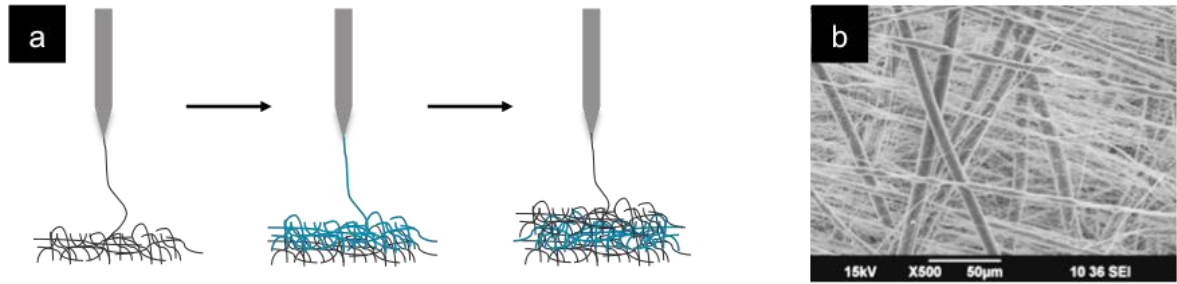
Belirli bir kalınlığa sahip olan **3 boyutlu (3D) nanofibröz doku iskeleleri**, 2 boyutlu (2D) matrislerle göre daha işlevseldir. ECM yapısını daha iyi taklit edebilen 3D nanofibröz doku iskeleleri, sağladığı daha büyük gözenek boyutları ile hücrelerin doku iskelesi içerisine doğru çoğalabilmesini sağlamaktadır. Elektroğirme yöntemi ile 3D fibröz yapılar elde etmek için geliştirilen yöntemler, aşağıda açıklanmıştır .

Fiberlerin katmanlar halinde biriktirilmesi

Geleneksel elektroğirme yönteminin kullanımı ile, fiberlerin daha önceden üretilmiş başka bir fibröz matris üzerine toplanması ile 3D fibröz matrisler üretmek mümkündür (Şekil 2.5). Bu işlem, paralel şırıngalara aktarılan farklı polimer çözeltilerinin aynı anda eğirilmesi ile de gerçekleştirilebilir. Genellikle, elde edilen fibröz malzemenin kalınlığı

toplama süresine bağlı olmaktadır [60]. Bu nedenle, yüksek kalınlığa sahip malzemeler üretilmesinde, gözenekliliğin kontrolü için uygun bir yöntemdir.

Bu yöntem ile, nano boyuttaki fiberler, mikro boyuttaki fiberler ile birleştirilerek farklı gözenekliliklere sahip katmanlar ile hibrid malzemeler oluşturulabilmektedir (Şekil 2.5. (b)). Bu nedenle yöntem, fiberlerin ve katmanların gözenekliliğinin kontrol edilebilirliği açısından avantajlıdır ve çeşitli uygulamalar için fonksiyonel malzemelerin üretimine olanak sağlar.

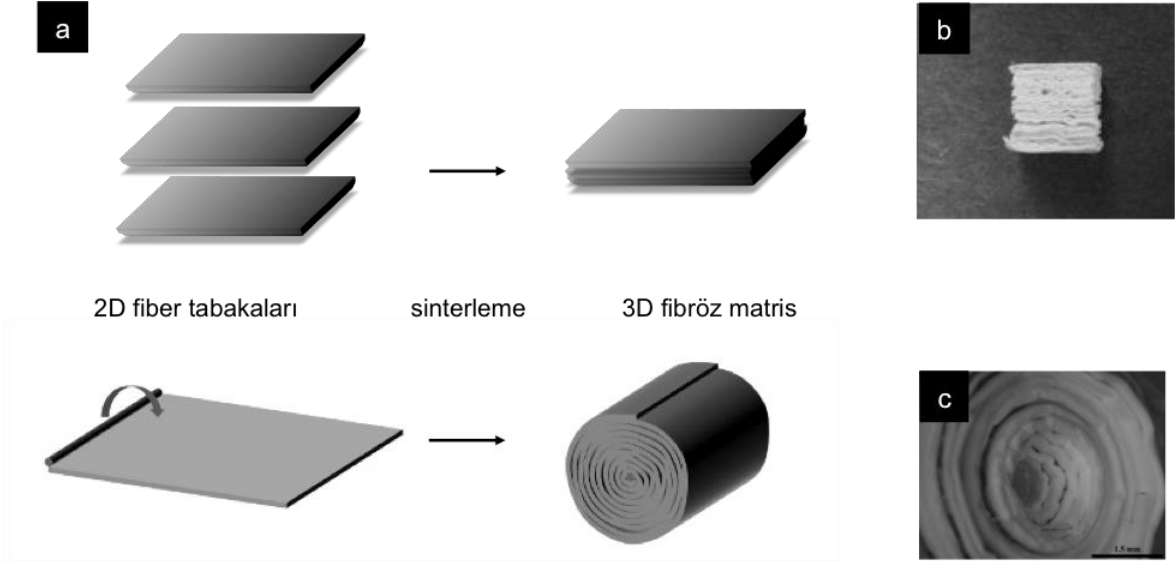


Şekil 2.5. (a) Fiberlerin katmanlar halinde biriktirilmesinin şematik gösterimi ve (b) bu yöntemle üretilen malzemenin SEM görüntüsü [70]

Geleneksel elektroğirme işlemi sonrası uygulanan yöntemler

Geleneksel elektroğirme ile üretilen 2D matrislerin, ısı ile işleme veya çözücü ile sinterlenmesiyle de 3D yapılar elde edilmektedir. Fakat bu işlem görece daha yavaş olmakta ve sinterleme yöntemine bağlı olarak fiberler deforme olabilmektedir [60]. Fakat, sinterleme işlemi sayesinde, üretilen malzemelerin mekanik dayanımı daha yüksek olmaktadır. Bu işlem, şematik olarak Şekil 2.6’da gösterilmiştir.

Bu yöntemle, fiber tabakaları düzlemsel olarak bir araya getirilebileceği gibi, rulo şeklinde birleştirilerek silindirik malzemeler de üretilmektedir. Oluşturulan malzeme, bir araya gelen tabakaların 2D olmasından kaynaklı küçük gözenek çaplarına sahip olmakta ve derinlik boyunca hücre infiltrasyonu sağlanamamaktadır. Bu kısıtlamanın giderilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Joshi ve ark., 2D elektroğirme ile ürettikleri fiber tabakalarında lazer kesici yardımıyla 80, 160 ve 300 µm boyutlarında makro-gözenekler oluşturmuşlar ve makro-gözenekli tabakayı rulo şeklinde birleştirerek 3D matris oluşturmuşlardır [71]. Malzemelerin *in vivo* hücre infiltrasyonunu inceleyen araştırmacılar, lazer ile 300 µm boyutunda gözenek açılan malzemede en iç tabakaya kadar vasküler hücre geçişinin sağlandığını belirtmişlerdir.

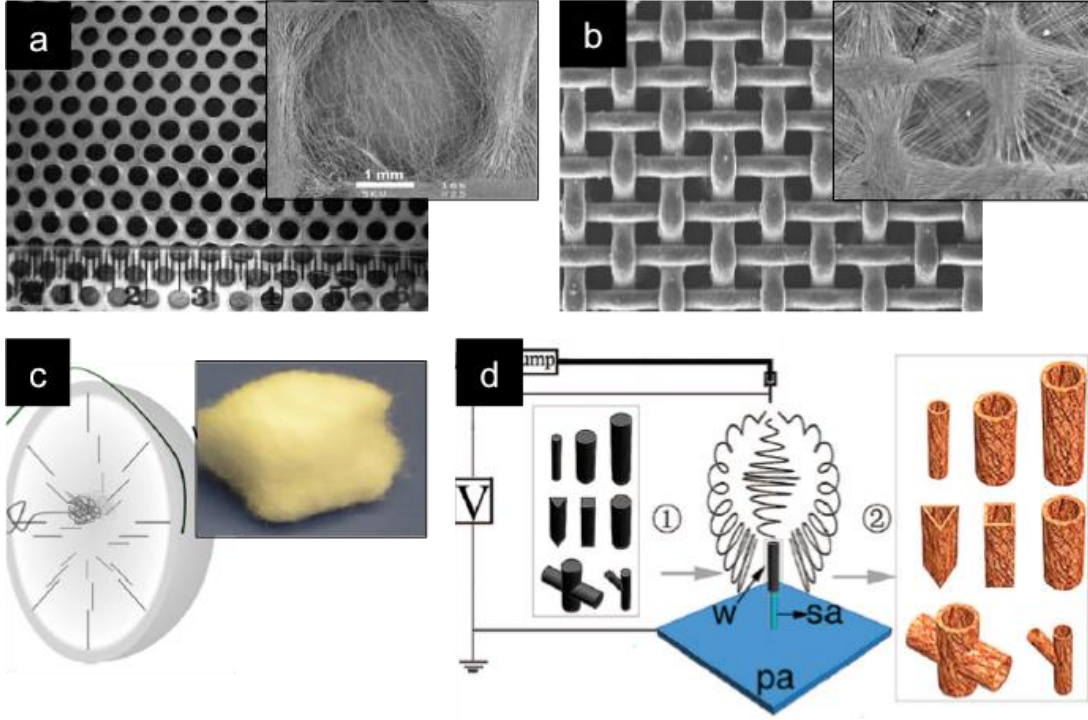


Şekil 2.6. (a) Tabakaların elektroğirme sonrası biraraya getirilmesinin şematik gösterimi [72], (b) ve (c) bu yöntemlerle üretilen malzemelerin görüntüleri [73] ve [74]

Toplayıcı modifikasyonu

Elektroğirme işleminde, toplayıcının yapısı değiştirilerek fiberlerin kendiliğinden 3D yapıda toplanması sağlanabilmektedir. Üzerinde izole bölgeler veya boşluklar bulunduran düz yüzeyler, silindirik yapılar, ya da iç bükey yarı-küresel yapılar bu toplayıcılara örnek olarak verilebilir (Şekil 2.7). Bu toplayıcıların tümü ile 3D yapılar oluşturulmasa da, büyük gözeneklere sahip yapılar elde edilebilmektedir (Şekil 2.7. a, b ve e). Bu yöntem, işlem sırasında hücrelere zararlı olabilecek bir ajan kullanılmadığı ve elektroğirme sonrası ilave işlemler gerektirmediği için avantajlıdır.

Blakeney ve ark. yalıtkan yarı-küresel bir yapının içerisine belirli aralıklar ile yerleştirdikleri iletken probaları toplayıcı olarak kullanmışlardır (Şekil 2.7. c) [75]. Toplayıcının küresel yapısı, PCL fiberlerin orta kısımda odaklanarak 3D yapıda toplanmasını sağlamıştır. Araştırmacılar, elde ettikleri malzemenin gözenek boyutunun, hücre çoğalmasının ve penetrasyonunun 2D matrisler ile karşılaştırıldığında arttığını belirtmişlerdir.



Şekil 2.7. 3D fibröz matrislerin üretimi için kullanılan çeşitli toplayıcılara örnekler: (a-b) ızgara toplayıcılar [76,77], (c) yarı-küresel toplayıcı [75], (d) sabit şekle sahip 3D toplayıcılar [77]

Yüzey aktif ajan ekleme yöntemi

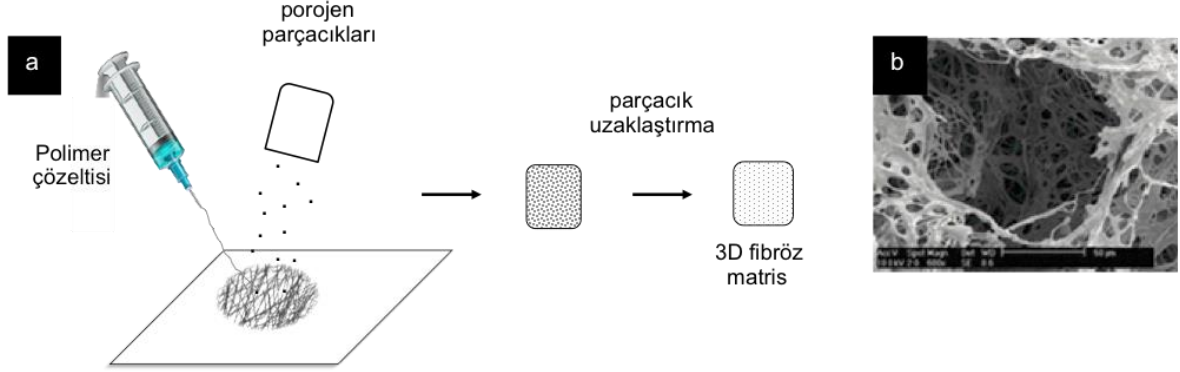
Bu yöntemde, elektroğirme çözeltilisine belirli miktarda sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yüzey aktif ajanlar eklenmektedir. Böylece, oluşturulan fiberlerin yüzey direnci düşürülerek toplayıcıya yük geçişi artmakta ve hızlanmaktadır. Sonuç olarak, fiber-fiber ve fiber-toplayıcı arasındaki çekim kuvveti azaltılarak 3 boyutlu fibröz yapılar elde edilebilmektedir.

Cai ve arkadaşları, bu yöntemle ürettikleri polietilen glikol (PEG) fiberler üzerinde 3T3 fibroblast hücreleri ile kültür çalışmaları yürütmüşlerdir [69]. Araştırmacılar, 3D matrislerde kültür edilen hücrelerin tutunma ve çoğalmasının 2D matrislere göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, hücrelerin 3D iskelelerde yüzeyin 120 µm derinine kadar yayılabildiğini, 2D iskelelerde ise bu derinliğin 20-30 µm ile sınırlı kaldığını belirtmişlerdir.

Bu yöntem, kolaylığı açısından avantajlı olsa da, SDS gibi yüzey aktif ajanlar kültür sırasında hücrelere toksik etki gösterebilir [78]. Bu nedenle, bu yöntemle üretilen fiberlerin yapısından yüzey aktif ajanların uzaklaştırılması için ek işlemlere ihtiyaç duyulabilir.

Porojen uzaklaştırma yöntemleri

Porojen ekleme yöntemi ile de 3 boyutlu fibröz yapılar elde edilebilmektedir. Bu yöntemde, elektroğirme sırasında toplanan fiberler üzerine porojen eklenir ve daha sonra uygun işlemler ile yapıdan uzaklaştırılır (Şekil 2.8) [79]. Fakat, bu yöntemin dezavantajı büyük gözeneklerin meydana gelmesi ve gözenekler arasında bulunan fiberlerin sık bir şekilde birikerek yoğun bir tabaka oluşturmasıdır [80].



Şekil 2.8. (a) Parçacık uzaklaştırma işlemi ile 3D fibröz malzeme üretiminin şematik gösterimi ve (b) bu yöntemle üretilen doku iskelesinin SEM görüntüsü [79]

3D fibröz tabaka oluşturmak için tuz ve şeker gibi parçacıkların kullanımının yanı sıra, başka malzemeler de kullanılmaktadır. Örneğin, fibröz matrisi oluşturacak polimer ile suda çözünebilir farklı bir polimerden oluşturulan fiberler aynı anda farklı şırıngalardan toplanır. İşlem sonrası, suda çözünen polimer yapıdan uzaklaştırılır ve büyük gözeneklere sahip fibröz matrisler elde edilir. Uzaklaştırılacak olan polimerin miktarı ayarlanarak gözenek yapısı kolayca kontrol edilebilmektedir [68].

Fibröz matrislerde gözenek oluşturmak için kullanılan bir başka madde de buz kristalleridir. Bu yöntemde fiberler, çok düşük sıcaklıkta tutulan ve üzerinde buz kristalleri oluşan toplayıcı üzerinde biriktirilir. İşlem sonrası buz kristalleri yapıdan dondurarak kurutma yöntemi ile uzaklaştırılmaktadır [81]. Simonet ve ark., çeşitli nemlilik değerlerinde çalışarak su buharının yoğunlaşması ile toplayıcı yüzeyinde buz kristallerinin oluşumunu sağlamış, %30 ve daha yüksek nemlilik değerlerinde yüksek gözenekliliğe ve düşük fiber yoğunluğuna ulaşmışlardır [82].

Islak elektroğirme yöntemi

Sıvı toplayıcı kullanımı ile de 3 boyutlu fibröz malzemeler üretilmektedir. **Islak elektroğirme** olarak da adlandırılan bu yöntemde, sıvı toplayıcıya ulaşan fiberler, sıvının

parçacıklarının elektroğirme sırasında sıvı banyosuna eklenmesinin, NaCl eklenmeyen örneklerle göre gözenekliliği anlamlı ölçüde artırdığını belirtmişlerdir. NaCl miktarı artırıldığında ise gözenekliliğin anlamlı olarak değişmediğini gözlemlemişlerdir. Hong ve arkadaşları doku iskelesi kalınlığının ayarlanması için, elektroğirme işlemi sırasında sıvı banyosuna olan etanol akışını bir akış-ölçer kullanarak kontrol etmişlerdir [87]. Sıvı haznesine olan etanol akışının farklı hızlarda sağlanması ile farklı yüksekliklerde ve gözenekliliklerde doku iskeleleri elde etmişlerdir.

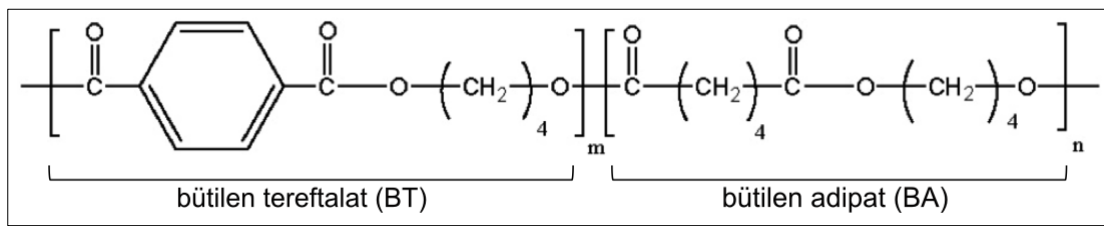
Elektroğirme-hücre spreyleme

Literatürde bu 3 boyutlu toplama yöntemlerinin dışında, elektroğirme işlemi ile eş zamanlı olarak hücre süspansiyonunun elektrospreylendiği çalışmalar da bulunmaktadır [89,90]. Böylece, üretim aşamasında hücrelerin fibröz tabakanın iç kısımlarına ulaşabilmesi sağlanmaktadır. Fakat bu yöntemde de, sterilizasyonun sağlanması, daha kalın yapılar elde etmek için işlemin zaman alması ve elektroğirme çözeltisinin hücrelere toksik etki göstermesi gibi kısıtlamalar mevcuttur [91].

2.3. Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT)

2.3.1. PBAT'ın yapısı ve kullanım alanları

Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT), monomerleri 1,4-bütandiol, adipik asit ve tereftalik asit olan, alifatik-aromatik bir kopolimerdir. İçerdiği iki farklı tekrarlayan birimden bütülen adipat (BA) alifatik ester gruplarını, bütülen tereftalat (BT) ise aromatik ester gruplarını oluşturmaktadır. PBAT'ın molekül yapısı Şekil 2.10' da gösterilmektedir.



Şekil 2.10. PBAT'ın molekül yapısı

Alifatik-aromatik kopolimerler, alifatik ve aromatik homo-poliesterlerin neden olduğu sınırlamalara çözüm getirmek amacı ile ilk kez 1995 yılında BASF firması tarafından polikondenzasyon yöntemi ile üretilmiştir [6]. Alifatik poliesterler, biyobozunur olmalarına rağmen gerekli termal ve mekanik özellikleri sağlayamamaktadır. Bu nedenle, işlenebilirlikleri ve kullanım alanları sınırlı kalmaktadır. Aromatik poliesterler ise, çok iyi mekanik ve termal özelliklere sahip olmalarına rağmen biyobozunur değildir [92].

Alternatif olarak geliştirilen alifatik-aromatik kopoliesterler ise, içerdiği alifatik ester grupları sayesinde biyobozunur ve aromatik ester grupları sayesinde ise iyi termal ve mekanik dayanıma sahiptir. Bu nedenle, alifatik-aromatik kopoliesterlerin çeşitli uygulamalarda kullanılması, homo-poliesterlere göre daha avantajlı olmaktadır. Yapılan çalışmalar, geliştirilen çeşitli alifatik-aromatik kopoliesterler arasında en elverişli biyobozunurluk davranışına sahip olan kopoliesterin PBAT olduğunu göstermiştir [93]. PBAT, 1998 yılında BASF tarafından Ecoflex® adı ile ticarileştirilmiştir. Ecoflex®'in fiziksel özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

PBAT; esnek yapısı, tamamen bozunması ve toksik etkiye neden olmaması sayesinde ambalaj, poşet, fiber gibi endüstriyel ürünlerde ve tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır [94].

Çizelge 2.2. Ecoflex®'in fiziksel özellikleri [95,96]

Molekül ağırlığı (g/mol)	40,000
Erime sıcaklığı (°C)	110-120
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	-29
Yoğunluk (g/cm³)	1.25-1.27
Kristalinite	~ %20

2.3.2. PBAT'ın biyobozunurluğu

Alifatik esterler, enzim varlığında bozunma özelliğine sahiptir. Alifatik esterlerin bozunması genel olarak, ester bağlarının enzim katalizli hidrolizi ile başlamaktadır. Depolimerizasyonun ilk basamağı olan bu süreç, enzimler polimer yığınının içerisine nüfuz edemediği için **yüzey aşınması** olarak gerçekleşir. Son olarak, bozunma sonucu ortaya çıkan suda çözünebilen ara ürünler, mikroorganizmalar tarafından metabolize edilir [92]. Polihidroksi bütirat (PHB) gibi doğal alifatik poliesterlerin yanı sıra, PCL ve PLA gibi sentetik alifatik poliesterler de mikroorganizmaların salgıladığı **lipaz** ve **kütinaz** gibi hücre dışı enzimlerin varlığında bozunabilmektedir [7].

Polietilen tereftalat (PET), polibütülen tereftalat (PBT) ve polietilen naftalat (PEN) gibi aromatik poliesterler, mikrobiyal veya enzimatik atağa karşı hassas olmadıkları için bozunurluk hızları oldukça düşüktür. PET fiberlerin insan ve hayvan vücudu içerisindeki bozunurluğunun 30 yıl sürdüğü tahmin edilmektedir [92].

Alifatik-aromatik kopoliesterlerin yapısı ise homopoliesterlere göre daha komplekstir. Bu sınıfa ait bir polimer olan PBAT'ın biyobozunurluğu hakkında yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur.

Yapılan çalışmalarda, polimerin erime sıcaklığı ile bozunma sıcaklığı arasındaki farkın biyobozunurluğu etkilediği belirtilmiştir. Polimerin bozunma sıcaklığı ile erime sıcaklığının arasındaki fark azaldıkça, biyobozunurluk hızı artmaktadır. PBAT'ın erime sıcaklığını ise, yapısında bulunan aromatik birimlerin molce oranı ve ortalama uzunluğu belirlemektedir. Çünkü, aromatik birimlerin miktarı ve uzunluğu arttıkça, polimerin kristal bölgelerinde bulunan hareketsiz zincirler artmaktadır. Bu da polimerin erime noktasını artırmakta ve bozunurluk hızını düşürmektedir [7]. Bu nedenle, biyobozunur alifatik birimler ne kadar uzun olsa da, zincirde bulunan aromatik birimler polimerin biyobozunurluğunda belirleyici etkindir. PBAT'ın yapısındaki alifatik ve aromatik sekansların molce oranı ve ortalama uzunluğu, ¹³C-NMR analizi ile hesaplanabilmektedir [97].

Çalışmalar, PBAT'ın sahip olduğu aromatik birimlerin ortalama uzunluğu $n \geq 3$ olduğunda ve/veya miktarı molce %60'tan fazla olduğunda, PBAT'ın bozunurluk hızının anlamlı olarak azaldığını göstermektedir [97]. Yine de, sıcaklık 60°C'ye artırıldığında, uzun aromatik birimlerin de bozunduğu görülebilmektedir [98].

Literatürde PBAT'ın biyobozunurluğunu analiz etmek için yapılan çalışmalar, genellikle toprak, kompost ve su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Kleeberg ve arkadaşları, izole ettikleri aktinomiset popülasyonlarının varlığında çeşitli poliesterlerin biyobozunurluğunu incelemişlerdir [99]. Aynı koşullarda gerçekleşen deneylerde, PBAT'ın, mikrobiyal kökenli PHB'tan dahi daha hızlı bozunduğunu belirtmişlerdir. Wang ve arkadaşları, elektroegirme yöntemi ile üretilen PHBV matrislerin hidrolitik bozunmasının, PBAT'ın yapıya belirli miktarlarda eklenmesiyle %45 oranında arttığını belirtmişlerdir [14].

Witt ve arkadaşları, %44 oranında BT (aromatik) ve %56 oranında BA (alifatik) içeren Ecoflex® ile simüle kompost ortamında, bir termofilik aktinomiset türü olan *Thermomonaspora fusca* varlığında gerçekleştirilen biyobozunurluk deneylerinde,

polimerin %99.9'unun 22 günde bozunduğunu belirtmişlerdir. Yapılan büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC), gaz kromatografisi (GC) analizleri ve respirometrik testler sonucunda, aromatik bozunma ürünlerinin oluştuğuna dair bir bulgu olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, *T. fusca*'nın oluşan oligomer ve monomer ara ürünlerini metabolize edemediği, ara ürünlerin ancak ortama karışık mikrobiyal popülasyon eklendiğinde hidrolize olduğu görülmüştür. Monomerlerin karışık mikrobiyal popülasyon varlığında mineralize olduğu, respirometrik testlerle desteklenmiştir [10].

PBAT'ın bozunma ürünlerinin çevreye olan toksik etkisinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur. *Daphnia* su pireleri, *Photobacterium phosphoreum* bakterisi [10] ve bazı bitkilerin [100] üzerinde yapılan incelemeler, PBAT'ın bozunma ürünlerinin çevreye toksik etki oluşturmadığını göstermektedir.

Toprakta ve kompost ortamında yapılan çalışmalar PBAT'ın tamamen biyobozunur olduğunu gösterse de, PBAT'ın vücut içerisindeki biyobozunurluğuna dair yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2.3.3. PBAT'ın fiziksel özellikleri

Camsı geçiş sıcaklığı -30°C olan PBAT, mekanik ve termal özellikler açısından alçak yoğunluklu polietilene (LDPE) benzetilmektedir. Ayrıca, yapısında bulunan -CO- grupları nedeni ile hidrofobik bir polimerdir [101]. Oldukça dayanıklı ve esnek olması, PBAT'ın çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır.

Witt ve arkadaşları [9], çeşitli polimerler ile yaptıkları mekanik dayanıklılık testlerinde, PBAT'ın çekme direncinin LDPE'ninkine benzer olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, yapılan deneyler sonucunda PBAT'ın çekme direncinin PCL ve PHBV'nin çekme dirençlerinden daha düşük olduğunu, kopma anındaki uzama değerinin ise PCL ve PHBV'den oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, PBAT'ın alifatik poliesterler gibi sıkı bir yapıya sahip olmaktansa esnek ve bükülebilir bir malzeme olduğunu göstermektedir.

PBAT, PLA gibi alifatik poliesterlerin dayanıklılığını artırmak amacı ile sıklıkla karışım malzemesi olarak kullanılmaktadır [102,103]. PBAT, PLA'nın dayanıklılığını ve kopma anındaki uzamasını önemli ölçüde artırırken, bükülebilir bir malzeme olduğu için çekme ve basma direncini bir miktar düşürmektedir [104]. PBAT'ın çekme ve sıkıştırma dirençleri, nanokil veya seramik gibi katkı malzemeleri eklenerek artırılabilir. Fukushima ve arkadaşları [12], PBAT malzemelere nano boyuttaki montmorillonit parçacıklarının eklenmesinin, PBAT'ın sıkıştırma direncini yaklaşık 10 kat artırdığını

gözlemlemişlerdir. Ayrıca, yaptıkları sitotoksinite testleri ile, PBAT yapısına eklenen montmorillonit parçacıklarının biyouyumluluğa olumsuz etkisi olmadığını göstermişlerdir. Correlo ve arkadaşları [105], PBAT'ın yapısına eklenen kitosanın, PBAT'ın sıkıştırma direncini artırdığını belirtmişlerdir. Ribiero Neto ve arkadaşları, PBAT malzemelerin içerisine ekledikleri nano hidroksiapatit parçacıklarının, malzemelerin elastik modülüsünü %12.7 oranında, kopma anındaki uzamasını ise %52 oranında artırdığını belirtmişlerdir [106].

PBAT'ın mekanik dayanımı, içerdiği aromatik birimlerin miktarıyla doğru orantılı, biyobozunurluğu ise içerdiği aromatik birimlerin miktarı ile ters orantılı olduğu için; PBAT'ın biyobozunurluğu ve mekanik özellikleri birbiri ile ters orantılı olarak değişmektedir. Bu nedenle PBAT'ın, hem istenen hızda biyobozunurluğa, hem de iyi mekanik dayanıma sahip olması için, zincirde yer alan aromatik birimlerin optimum değer olan %30-%55 aralığında bulunması gerektiği belirtilmiştir [98].

2.3.4. PBAT ve doku mühendisliği

Doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan alifatik poliestерler, yeterli mekanik ve termal özelliklere sahip değildir. Aromatik poliestерler ise, istenen fiziksel özellikleri sağlamasına rağmen biyobozunur olmadıkları için doku mühendisliğinde kullanılamamaktadır. Bu noktada, alifatik-aromatik poliestерler önem kazanmaktadır. Çünkü, içerdikleri alifatik birimler sayesinde biyobozunur olmakla birlikte, aromatik birimler sayesinde istenen mekanik ve termal özelliklere sahiptir. Böylece, alifatik-aromatik kopoliestерler ideal bir doku iskelesinin sahip olması gereken biyobozunurluk, biyouyumluluk ve iyi mekanik dayanım gibi özellikleri sağlayabilmektedirler. Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalar, PBAT'ın doku mühendisliği alanında da umut verici bir malzeme olduğunu vurgulamaktadır.

Jao ve arkadaşları [11], ürettikleri PBAT ve modifiye edilmiş PBAT membranlar ile 6 günlük hücre kültür çalışması gerçekleştirmişlerdir. Tüm membranların L929 hücrelerinin çoğalmasını desteklediğini; kitosan-heparin ve kitosan-hyaluronik asit ile modifiye edilen PBAT membranlarda üremenin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, modifiye edilen PBAT membranlarda yüzeye tutunan albümin/fibrinojen oranının düştüğü ve kanın pıhtılaşmasının azaldığı görülmüştür.

Costa-Pinto ve arkadaşları [15], çeşitli poliestерlerin kitosan ile karışımlarından hazırladıkları doku iskeleleri üzerinde, fare mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmasını ve

osteojenik farklılaşmasını incelemişlerdir. Sonuç olarak, PBAT da dahil tüm poliesterlerin kitosan ile karışımlarının doku iskelesi olarak uygun özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nar ve arkadaşları [13], PHBV'nin işlenebilirliğini kolaylaştırmak amacı ile, PHBV-PBAT karışımlarından ekstrüzyon yöntemi ile fiber üreterek örgü doku iskeleleri elde etmişlerdir. MC3T3-E1 hücre hattı ile yaptıkları çalışmalar sonrası, PBAT ve PBAT-PHBV doku iskelelerinin osteokondüktif özellik gösterdiğini ve kemik rejenerasyonunda kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. PHBV-PBAT doku iskelelerinin özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada [14], doku iskelesi üretim yöntemi olarak elektroçirme kullanılmış ve üretilen malzemelerde insan kemik-iliği mezenkimal stroma hücreleri ile hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Farklı oranlarda PBAT içeren PBAT-PHBV doku iskeleleri yüzeyindeki hücre çoğalmasının, doku iskelelerinin içerdiği PBAT miktarıyla orantılı olarak arttığı belirtilmiştir. PBAT katkısının PHBV'nin biyobozunurluğunu hızlandırdığını da ekleyen araştırmacılar, gerekçe olarak PBAT katkısının PHBV'nin hidrofilik özelliğini artırdığını belirtmişlerdir.

PBAT doku iskelelerinin biyoyumluluğu, *in vitro* deneylerin yanı sıra *in vivo* olarak da değerlendirilmiştir. Ribeiro Neto ve arkadaşları, nano hidroksiapatit (nHAp) parçacıkları içeren ve içermeyen PBAT malzemelerinin *in vivo* biyoyumluluğunu incelemiştir. Malzeme üretimi için, spin coating yöntemi ile ürettikleri PBAT filminin üzerini elektroçirme yöntemini kullanarak PBAT fiberler ile kaplamışlardır. nHAp katkılı malzemeler için ise filme ve fiberlere nano boyutta hidroksiapatit parçacıkları eklemişlerdir. Araştırmacılar, malzemeleri osteojenik ortamda adipoz kökenli kök hücreler ile kültür ettikten sonra farenin derisinin altına implante etmiştir. Sonuç olarak, HAp içeren ve içermeyen PBAT malzemelerde hücrelerin osteojenik ortamda farklılaştığını ve yaptıkları histoloji çalışmaları ile implantasyondan 30 gün sonra malzemenin etrafının fibröz membranla kaplandığını, dolayısıyla malzemelerin biyoyumlu olduğunu belirtmişlerdir. HAp içeren malzemelerin ise enflamasyonu azalttığını belirtmişlerdir [106].

PBAT ile doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalara bakıldığında, genellikle diğer polimerler ile karışımları halinde kullanıldığı ve çalışmaların sayıca yetersiz kaldığı görülmektedir. Literatürde PBAT içeren malzemeler ile yapılan hücre kültür çalışmaları, mekanik dayanım testleri, biyobozunurluk çalışmaları ve *in vivo* çalışmalar PBAT'ın doku mühendisliğinde kullanılmaya oldukça elverişli bir polimer olduğunu göstermektedir.

2.4. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit, kemiğin başlıca mineral bileşenidir. Osteoindüktif ve osteokondüktif yapısı sayesinde kemik oluşumunu hızlandırmakta ve kemik dokusuna doğrudan bağlanabilmektedir [48]. Bu nedenle, ortopedik ve dental implantlar gibi klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır [107].

Molekül formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan HAp, kemiğin doğal yapısından elde edilebileceği gibi, laboratuvar ortamında sentetik olarak da üretilebilmektedir [108]. Hidroksiapatitin bileşimi, morfolojisi ve boyutu modifiye edilerek kemiğin yapısındaki doğal apatitin yapısına benzer duruma getirilebilmektedir. Yapılan çalışmalar, bu modifikasyonların HAp'in osteokondüktivitesini artırdığını göstermektedir [46,109].

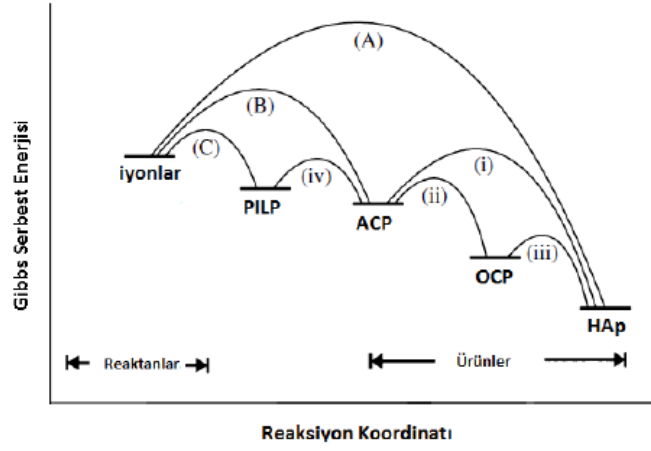
HAp, laboratuvar koşullarında çöktürme yöntemi, sol-jel yöntemi, hidrotermal yöntemler ve katı faz yöntemleri ile üretilebilmektedir [110]. Bu yöntemler, bileşenlerin konsantrasyonunun, ortam pH'nın ve sıcaklığının kontrolü gibi kısıtlamalara sahiptir [111].

2.4.1. Biyomimetik yöntem ile HAp üretimi

Hidroksiapatit çöktürme yöntemlerinde kullanılan çeşitli kalsiyum ve fosfat kaynakları arasından insan kan plazmasının iyon bileşimine eşdeğer sentetik vücut sıvısının (SBF) kullanımı daha etkili olmaktadır. **Biyomimetik yöntem** olarak adlandırılan yöntemde, SBF çözeltisi kendiliğinden çekirdeklenme ile hidroksiapatiti oluşturur. Bu yöntemle stokiometrik HAp'ten farklı olarak yapısında çeşitli iyonları bulunduran biyoaktif, kemik-benzeri hidroksiapatit üretimi mümkündür [112-114]. Biyomimetik çöktürme yöntemi ile apatit tabakası doğrudan doku iskelesi üzerine kaplanabileceği gibi, HAp parçacıkları toz halinde üretilerek daha sonra doku iskelesinin yapısına katılması mümkündür. Doygunluk seviyesi düşük olan SBF'nin çöktürme sırasında çekirdeklenme hızı yavaş olmakta ve dolayısıyla kalsiyum fosfat bileşiklerinin çökme hızı düşük kalmaktadır. Bu nedenle çekirdeklenme hızını artırmak için SBF'nin iyonik konsantrasyonu 1.5, 2, 5 ve 10 katına çıkarılarak HAp üretimi gerçekleştirilebilmektedir [115].

Doygun kalsiyum fosfat çözeltisinden çöktürme yolu ile HAp üretimi sırasında, Gibbs enerjisini düşürmek için çeşitli yollar izlenebilir (Şekil 2.11). İzlenecek yol ve kararsız fazların oluşması sisteme verilen enerjiye bağlı olmaktadır. Enerji yeterli olduğunda, doymuş kalsiyum fosfat çözeltisinden direkt kristalizasyon ile HAp oluşabilmektedir (A).

Enerjinin yeterli olmadığı durumlarda ise, en kararlı faz olan hidroksiapatitin çekirdeklenmesinden önce kararsız ara fazlar oluşmaktadır [19,108,116].



Şekil 2.11. Sistemin Gibbs serbest enerjisini düşürmek için izlenen kristalizasyon yolları [116]

Enerji kaynağı olarak **mikrodalga teknolojisinin** kullanımı ile kararsız fazların oluşma ihtimali düşürülerek, kısa sürede hidroksiapatit çekirdeklenmesi meydana gelmektedir [110,117]. Mikrodalga teknolojisi ve biyomimetik yaklaşım birleştirilerek, daha hızlı ve saflığı daha yüksek kemik-benzeri HAp üretilmektedir [118].

Grubumuzda daha önceden yapılan bir çalışmada, 10xSBF çözeltisine çeşitli güçlerde mikrodalga enerjisi uygulanarak kemik benzeri HAp üretimi gerçekleştirilmiştir [118]. Çalışma sonucunda, en uygun yapıdaki HAp'in 600 W gücünde mikrodalga enerjisi kullanılarak 30'ar saniye süreyle 9 kez çöktürme ile üretilen HAp olduğu ve bu koşullarda üretilen HAp'in biyolojik HAp'e benzer şekilde amorf yapıda olduğu gözlenmiştir. Morgan ve ark. [119] yaptıkları çalışmada, Ca^{2+} iyonlarının ortamdaki çözünürlüğünün HAp kaplamasının yüzey kristalinitesine bağlı olduğu, daha amorf yapıdaki HAp kaplamanın Ca^{2+} iyonlarının çözünürlüğünü ve mineralizasyonu artırdığını belirtmiştir.

2.4.1.1. İyon katkılı HAp üretimi

Kemiğin yapısında bulunan doğal HAp, stokiyometrik HAp'ten farklı olarak Mg^{2+} , F^- , CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ gibi iyonlar içerir. Biyoyumluluğun ve biyoaktivitenin artırılması için, sentetik HAp'in yapısına çeşitli iyonlar eklenebilmektedir. Ayrıca, HAp'e yapılan iyon katkısı, hidroksiapatitin bozunma hızını artırabilmekte, mekanik özellikleri iyileştirebilmekte ve tanecik boyutunu küçülebilmektedir [120,121].

Webster ve arkadaşları, HAp'e molce %2 oranında yaptıkları Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Y^{3+} katkılarının, osteoblast tutunmasını iyileştirdiğini belirtmişlerdir [121]. Araştırmacılar, yaptıkları diğer çalışmada, katyon katkılı (Mg^{2+} , Zn^{2+} , La^{3+} , Y^{3+} , In^{3+} ve Bi^{3+}) HAp'lerin, osteoblast tutunmasını iyileştirmenin yanı sıra, hücrelerin farklılaşmasını da indüklediğini belirtmiştir. Yapılan çalışmada biyoaktivitesi en yüksek olan malzeme grubunun Bi^{3+} katkılı HAp olduğu belirtilmiştir [122].

Hidroksiapatite yapılacak uygun iyon katkısı ile antibakteriyel özellik kazandırmak da mümkündür. Shi ve arkadaşları, optimize ettikleri koşullarda Ag^+ iyonu ekledikleri HAp'in sağlıklı hücrelere toksik etki göstermeden antibakteriyel özellik gösterdiğini ve kemik onarımında kullanılabilecek bir malzeme olduğunu belirtmişlerdir [123].

2.4.1.2. Bor katkılı HAp

Ametal bir element olan **bor**, bitkiler, hayvanlar ve insanlar için gerekli bir besin maddesidir. Yapılan çalışmalar, canlılarda bor eksikliğinin kemik gelişimini olumsuz etkilediğini göstermektedir [124-126].

Son yıllarda, bor katkılı biyomalzemelerin kemik doku mühendisliğinde kullanımı araştırılmaktadır. Hakkı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, borun osteoblast hücrelerin fonksiyonları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada, borun kollajen-I, kemik sialoproteinleri, osteopontin, ve osteokalsin hücre dışı matris proteinlerine ait mRNA gen ifadelerini düzenlediği, BMP protein seviyelerini artırdığı belirtilmiş ve kemik gelişiminde kullanılabileceği vurgulanmıştır [127]. Başka bir çalışmada, PLGA doku iskelelerine bor katkısı yapılarak kemik oluşuma olan etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar, bor katkılı PLGA doku iskelelerinin sıçan adipoz kökenli kök hücrelerinin hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasını artırdığını belirtmiştir [20]. Gümüşderelioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, borik asitin enkapsüle edildiği kitosan nanopartiküller, kitosan doku iskelelerine yüklenmiştir ve MC3T3-E1 preosteoblastlarının osteojenik aktivitesine olan etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak bor içeren nanopartiküllerin, kollajen-I, osteokalsin ve osteopontin gen ifadelerini yükselterek hücrelerin farklılaşmasını desteklediğini belirtmişlerdir [128].

Borun, hidroksiapatitin yapısına katılmasıyla **bor katkılı HAp** üretimi mümkündür. Grubumuzda yapılan bir çalışma ile, biyomimetik yöntem kullanılarak üretilen bor katkılı HAp'in MC3T3-E1 preosteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği ve bor katkısının HAp'in osteoindüktif etkisini güçlendirdiği gösterilmiştir [19].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile PBAT doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen doku iskeleleri, yapısal ve morfolojik açıdan karakterize edilerek, MC3T3-E1 hücre hattı ile 11 gün boyunca kültür edilmiş, hücrelerin morfolojisi, yüzeye tutunması ve çoğalması incelenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, elektroğirme yöntemi ile 3 boyutlu nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Osteoindüktivite ve osteokondüktiviteyi artırmak amacı ile, fibröz doku iskelelerinin yapısına HAp ve B-HAp parçacıkları eklenmiştir. Elde edilen doku iskeleleri, yapılan karakterizasyonlar sonrası, insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri (hBMSC) ile osteojenik ortamda kültür edilerek, hücrelerin çoğalması ve osteojenik farklılaşmaları incelenmiştir.

3.1. Kullanılan malzemeler

PBAT reçineleri, SASA firmasından (Adana, Türkiye) temin edilmiştir. Doku iskelesi üretiminde kullanılan organik çözücülerden diklorometan (DCM) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Enzimatik bozunma testlerinde kullanılan Lipaz (30-90 unit/mg), Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Yıkama ve 3 boyutlu elektroğirme işlemlerinde kullanılan etanol (%96, v/v), Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir.

Yapay vücut sıvısı üretiminde kullanılan bileşenlerden sodyum klorür (NaCl), Sigma-Aldrich firmasından, potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) ve sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. B-HAp parçacıklarının üretiminde kullanılan borik asit (H_3BO_3) BDH Chemicals Ltd. (İngiltere) firmasından satın alınmıştır. Doku iskelelerinin şişme ve bozunma çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) hazırlamak için kullanılan tabletler, Sigma (Almanya) tarafından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukaba, Japonya) satın alınmıştır. Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu (α -MEM), Biochrom (ABD) firmasından temin edilmiştir. Kültür ortamına eklenen L-glutamin, penisilin-streptomisin çözeltileri ve fetal sığır serumu (FBS) Biowest (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit ve

hekzametildisilazan (HMDS), Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi ve osteojenik ortamın hazırlanmasında kullanılan askorbik asit, dekzametazon ve β -gliserol fosfat, Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. RNA izolasyonunda kullanılan Trizol ve hücre çoğalmasının belirlenmesinde kullanılan Picogreen analiz kiti Invitrogen (ABD)'den temin edilmiştir. ALP aktivitesi analizi, kalsiyum analizi ve kollajen analizinde kullanılan analiz kitleri Biovision (ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.2. PBAT reçinelerinin karakterizasyonu

PBAT reçinelerinin fiziksel ve kimyasal yapılarının belirlenmesi amacı ile çeşitli karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon öncesinde, PBAT reçinelerine saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla, reçineler DCM'de çözülmüş ve elde edilen çözelti metanole damlatılarak PBAT'ın çökmesi sağlanmıştır. Son olarak, PBAT çökeltileri sıvıdan ayrılarak vakumda kurutulmuştur.

3.2.1. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

PBAT'ın kimyasal yapısını belirlemek amacı ile yapılan ATR-FTIR analizinde Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi (ABD) kullanılmıştır. Analizde, PBAT'ın içerdiği alifatik ve aromatik ester grupları, 400-4000 cm^{-1} aralığındaki dalga sayılarında incelenmiştir.

3.2.2. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TG-DTA)

PBAT'ın termal özelliklerinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen TG-DTA analizinde (TG/DTA, 6300 SII EXSTAR 6000, Seiko Instruments Inc., USA), 0-600°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dakika ısıtma hızında atmosferik ortamda çalışılmıştır.

3.2.3. Sıvı ^{13}C -nükleer manyetik rezonans (^{13}C -NMR) analizi

PBAT'ın içerdiği bütülen adipat (BA, alifatik) ve bütülen tereftalat (BT, aromatik) tekrarlayan birimlerinin molce yüzdeleri ve birim uzunluklarının belirlenmesi için sıvı ^{13}C -NMR analizi (Bruker Avance, 300 MHz) gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi, PBAT reçineleri döteryumlu kloroform içerisinde çözülmüştür.

Elde edilen spektrumda, BA ve BT birimlerinin molce yüzdeleri, pik şiddetleri kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 1 ve 2) [97].

$$(\text{BT}) \% = (I_1 + I_2) / (I_1 + I_2 + I_3 + I_4) \times 100 \quad (1)$$

$$(BA) \% = (I_3+I_4) / (I_1+I_2+I_3+I_4) \times 100 \quad (2)$$

BA ve BT birimlerinin PBAT zincirindeki ortalama uzunluklarının belirlenmesi için Eşitlik 3 ve 4'ten yararlanılmıştır [97].

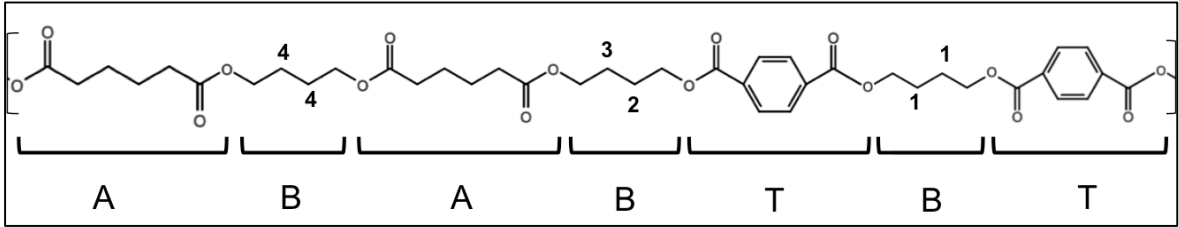
$$SL(BT) = I_1/I_2 + 1 \quad (3)$$

$$SL(BA) = I_3/I_4 + 1 \quad (4)$$

Degree of randomness (R) değerinin hesaplanması, Eşitlik 5'te gösterilmiştir.

$$R = 1/SL(BA) + 1/SL(BT) \quad (5)$$

I_1, I_2, I_3 ve I_4 , merkezi tetrametilen glikol karbon sinyallerine (Şekil 3.1) ait piklerin integral değerlerini ifade etmektedir. $SL(BT)$ ve $SL(BA)$, sırasıyla bütülen tereftalat ve bütülen adipat birimlerinin sekans uzunluklarını ifade etmektedir.



Şekil 3.1. PBAT molekülündeki merkezi tetrametilen glikol karbonlarının gösterimi (B: bütülen, A: adipat, T: tereftalat)

3.3. Doku iskelelerinin üretimi

3.3.1. PBAT doku iskelelerinin üretimi

2 boyutlu PBAT malzemelerin üretiminde çözücü buharlaştırma ve elektroğirme; 3 boyutlu PBAT doku iskelelerinin üretiminde ise çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma teknikleri kullanılmıştır.

3.3.1.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi

PBAT reçineleri, DCM içerisinde çözülmüş (%15, w/v), elde edilen çözeltiden cam Petri kaplarına 3'er mL aktarılmıştır. Çözücünün 12 saat boyunca oda sıcaklığında buharlaşması sağlandıktan sonra, Petri yüzeyinde oluşan ince filmler yüzeyden kaldırılmış ve distile su ile yıkanmıştır.

3.3.1.2 Elektroğirme yöntemi

Elektroğirme işleminin optimizasyonu için, farklı konsantrasyonlarda PBAT çözeltileri hazırlanmıştır. Elektroğirme çözeltisi hazırlanırken organik çözücü olarak HFIP

kullanılmış ve işlem sırasında güç kaynağı (Gamma High Voltage Research, FL, USA), şırınga pompası (NE, New Era Pump Systems) ve alüminyum plaka toplayıcıdan oluşan elektroegirme düzeneğinde çalışılmıştır. En iyi morfolojideki fiberlerin elde edilmesi amacı ile, çeşitli polimer konsantrasyonlarında (%12 ve %14) ve sistem parametrelerinde çalışılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Karakterizasyon ve hücre kültür çalışmalarında kullanılacak örneklerin üretimi için, fiberler alüminyum plaka üzerinde 2.5 sa süreyle toplanmıştır.

3.3.1.3. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma

Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işleminin optimizasyonu için PBAT, DCM içinde çözülerek çeşitli konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve gözenek oluşması için çözeltilerin içerisine çeşitli boyut aralıklarında ve miktarlarda porojen (NaCl) eklenmiştir.

Çözücü tamamen buharlaştıktan sonra, geriye kalan katı PBAT-NaCl karışımı, distile su içinde bekletilerek tuzun uzaklaşması sağlanmış ve kurutma sonrası 3-boyutlu doku iskeleleri elde edilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesi için çalışılan parametreler, Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

3.3.1.4. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma

Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yönteminde, polimer ve porojenin (NaCl, Sigma) katı halde homojen olarak karıştırılabilmesi için, PBAT reçineleri mekanik olarak kesilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Parametrelerin optimize edilmesi amacı ile çeşitli porojen boyut aralıklarında çalışılmıştır. Ayrıca, polimerin eritilmesi için fırın içerisinde eritme ve alt yüzeyden ısıtarak eritme şeklinde 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Katı polimer reçineleri ve tuz karışımı, bir kalıba aktarılarak yaklaşık 250°C sıcaklık uygulanmış ve polimerin erimesi sağlanmıştır. Polimer tamamen eridikten sonra eriyik polimer-tuz karışımı oda sıcaklığında katılaştırılmış ve elde edilen katı PBAT-NaCl karışımı, distile su içerisinde 3 gün boyunca bekletilerek tuzun uzaklaşması sağlanmıştır. Vakumlu etüv içerisinde yapılan kurutma işlemi sonrasında gözenekli 3-boyutlu doku iskeleleri elde edilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesi için çalışılan parametreler, Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Parçacık uzaklaştırma yöntemlerinde kullanılan parametreler. (* Çözücü döküm parçacık uzaklaştırma işlemi için v:w; eriyik kalıplama parçacık uzaklaştırma işlemi için w:w)

Fabrikasyon yöntemi	Polimer derişimi (% <i>, w/v</i>)	Polimer:tuz oranı*	NaCl parçacık boyut aralığı (μm)
Çözücü buharlaştırma - parçacık uzaklaştırma	10	1:1.25	200-355
			355-455
		1:1.5	200-355
			355-455
		1:2	200-355
			355-455
	15	1:1.25	200-355
			355-455
		1:1.5	200-355
			355-455
		1:2	200-355
			355-455
20	1:1.25	200-355	
		355-455	
	1:1.5	200-355	
		355-455	
	1:2	200-355	
		355-455	
Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma	-	1:2.3	100-200
			200-355
			355-455

3.3.2. Üç boyutlu (3D) fibröz doku iskelelerinin üretimi

3.3.2.1. Biyomimetik yöntemle HAp ve Bor katkılı HAp parçacıklarının üretimi

Biyomimetik yöntemle HAp ve bor katkılı HAp parçacıkların üretiminde Maviş ve arkadaşlarının [115] hazırladığı 10xSBF çözeltisi kullanılmıştır. 10xSBF çözeltisinin bileşenleri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Beş çeşit tuz, Çizelge 3.2.'de belirtilen miktarlarda tartılarak 800 mL distile su içerisinde çözülmüş ve çözelti hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltisi, çöktürme işlemi öncesine kadar 4°C'de saklanabilmektedir.

Çöktürme işlemi yapılmadan önce, çözelti pH'ını dengelemek için 100 mL stok çözeltisine 0.084 g NaHCO_3 eklenmiştir. Daha sonra, mikrodalga fırında (Milestone, İtalya) 600W'lık mikrodalga enerjisi kullanılarak HAp kristallerinin oluşturulması sağlanmıştır. Mikrodalga enerjisi, 10xSBF çözeltisine 30 s süreyle 9 kez uygulanmıştır [118].

Çizelge 3.2. 1 L'lik 10xSBF çözeltisi bileşenleri ve miktarları

Sıra	Bileşen	Miktar (g)	Molarite(mM)
1	NaCl	58.443	1000
2	KCl	0.373	5
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.675	25
4	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.016	5
5	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.250	3.62
6	NaHCO_3^*	0.084	10

* 100 mL SBF için

B-HAp parçacıkların üretimi için ise, ilk olarak 1000 mL ultra saf su içerisine 10 g borik asit eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra pH değerinin uygun aralıkta olması için (6.5-7.4) NaOH eklenmiştir. Daha sonra uygulanan işlemler, HAp parçacıkların üretiminde yapıldığı şekilde tekrarlanmıştır [19].

HAp ve B-HAp parçacıkları, mikrodalga ile çöktürme işlemi sonrasında istenmeyen fazların uzaklaştırılması için 3 kez etanol, 2 kez de distile su ile yıkanarak her seferinde 6,000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve 37°C'de kurumaya bırakılmıştır.

3.3.2.2. Üç boyutlu elektroegirme

PBAT ve HAp, B-HAp katkılı PBAT fibröz matrislerin üretimi için, 3 boyutlu elektroegirme yöntemlerinden biri olan ıslak elektroegirme kullanılmıştır. Bu yöntemde, geleneksel 2 boyutlu elektroegirmeden farklı olarak, fiberler sıvı banyosunda toplanmıştır. PBAT, HFIP içerisinde çözülerek (%24, w/v), şırıngaya aktarılmıştır. İşlem sırasında voltaj 21 kV, akış hızı 0.6 mL/sa ve şırınga-toplayıcı arasındaki uzaklık 25 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Sıvı toplayıcı olarak %96'lık etanol kullanılmıştır. HAp ve B-HAp katkılı fibröz PBAT matrislerin fabrikasyonu için, biyomimetik yöntemle üretilen HAp veya B-HAp parçacıkları, elektroegirme işlemi öncesinde PBAT çözeltisine %5 oranında (w/w) olacak şekilde eklenerek 1 gün boyunca karıştırılmış ve parçacıkların çözelti içerisinde dağılması sağlanmıştır. Etanol içerisinde toplanan fibröz matrisin üzerinden etanol uzaklaştırılarak distile su ile yıkanmış ve dondurarak kurutma yöntemi ile

kurutulması sağlanmıştır. Karakterizasyon ve hücre kültür çalışmalarında kullanılacak örneklerin üretimi için, fiberler sıvı toplayıcı içerisinde 2.5 sa süreyle toplanmıştır.

3.4. Doku iskelelerinin karakterizasyonu

Elde edilen doku iskelelerinin yapılarının ve morfolojilerinin incelenmesi amacı ile, çeşitli karakterizasyonlar yapılmıştır. Doku iskelelerinin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş, yapılan diğer analizler ile mekanik dayanımları, bozunurlukları, su alım kapasiteleri, su temas açıları ve gözeneklilikleri incelenmiştir. HAp ve B-HAp içeren PBAT fibröz matrisler, ayrıca transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizi ile incelenmiştir.

3.4.1. SEM analizi

Doku iskelelerinin morfolojileri, SEM analizi (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir. Bu amaçla, doku iskeleleri SEM ile görüntülenmeden önce altınla kaplanmıştır. Doku iskelelerinin gözenek çapları ve elektroegirme işlemi sonucu elde edilen fiberlerin çapları, ImageJ programı (NIH, Bethesda, MD) ile hesaplanmıştır.

3.4.2. Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) analizi

Geçirimli elektron mikroskopisi analizi (TEM), ıslak elektroegirme yöntemi ile üretilen PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp PBAT doku iskelelerinde PBAT fiberler içerisinde hapsolmuş olan HAp ve B-HAp parçacıkların morfolojilerinin görüntülenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Elektroegirme işlemi sırasında fiberler, Bölüm 3.3.2.2’de belirtilen parametrelerde, Holey karbon ızgaralar üzerine 15 s süreyle toplanmış ve TEM cihazında (FEI Tecnai G² Spirit BioTwin CTEM) görüntülenmiştir.

3.4.3. Su temas açısı analizi

Su temas açısı ölçümünde yapışık damla metodu kullanılmıştır. Krüss DSA 100 (Almanya) cihazı ile gerçekleştirilen deneyde, 5 µL hacmindeki deiyonize su damlacığı doku iskelesi üzerine bırakılarak, yüzey ile yaptığı açı mikro kamera yardımı ile ölçülmüştür.

3.4.4. Su alım kapasitesi ölçümü

Doku iskelelerinin su alım kapasitesi ölçümü, PBS (pH:7.4, 37°C) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, PBS içerisine daldırılmış ve belirli zaman aralıklarında çıkarılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Ağırlık ölçümü yapılmadan önce, iskelelerin yüzeyindeki fazla su bir kağıt yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarındaki su alım kapasiteleri (WC), Eşitlik 6’da gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$WC (\%) = [(W_t - W_i) / W_i] \times 100 \quad (6)$$

Eşitlikte, W_i , doku iskelesinin ilk (kuru) ağırlığını, W_t ise su içeren ağırlığını göstermektedir.

3.4.5. Gözeneklilik ölçümü

Doku iskelelerinin gözenekliliği gravimetrik yöntem ile hesaplanmıştır. Hesaplamalarda, PBAT'ın gerçek yoğunluğu (ρ_g , 1.26 g/cm³) ve doku iskelesinin görünen yoğunluğu (ρ_a) kullanılmıştır (Eşitlik 7).

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = [1 - (\rho_a / \rho_g)] \times 100 \quad (7)$$

Görünen yoğunluk (ρ_a), doku iskelesinin ağırlığının hacmine bölünmesi ile elde edilmiştir.

3.4.6. Mekanik dayanım testleri

Üretilen doku iskelelerinin mekanik dayanımları, universal testing machine (Zwick Roell/Z250) ile ölçülmüştür. Örnekler, ölçüm öncesinde 1 saat boyunca PBS (pH:7.4, 37°C) içerisinde bekletilmiştir. Üç boyutlu örnekler sıkıştırma testleri, 2 boyutlu örnekler ise çekme testleri uygulanmıştır. Üç boyutlu örnekler, çapı 10 mm, yüksekliği 8 mm olmak üzere silindir şeklinde kesilmiştir. 2 boyutlu örnekler ise 7 mm genişlik ve 40 mm uzunluk olacak şekilde dikdörtgen parçalara kesilmiştir. Sıkıştırma ve çekme testlerinde uygulanan kuvvetler ve uygulama hızları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Mekanik dayanıklılık testlerinde uygulanan parametreler

Fabrikasyon Yöntemi	Sıkıştırma/çekme hızı (mm/dk)	Uygulanan basma kuvveti (N)	Uygulanan çekme kuvveti (N)
Çözücü buharlaştırma	10	-	100
Elektroçirme		-	100
Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	2	100	-
Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma		10,000	-

Sıkıştırma dirençleri, çekme dirençleri ve modülüs değerleri, test sonucu elde edilen gerilim-gerinim (stress-strain) eğrisinden hesaplanmıştır.

3.4.7. Enzimatik bozunma testleri

Enzimatik bozunma testleri, ince filmlere ve çözücü döküm parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen sünger yapıdaki doku iskelelerine uygulanmıştır. Enzim olarak lipaz kullanılmıştır. Elli mg lipaz enzimi, 100 mL PBS içerisinde çözülmüş, ve çözeltiye mikroorganizma oluşumunu engellemek amacı ile %0.1 (w/v) oranında sodyum azid eklenmiştir. Doku iskeleleri, enzim bozunmanın yanı sıra, enzim içermeyen PBS ortamında da bekletilerek hidrolitik bozunmaları incelenmiştir. Doku iskelelerinin üzerindeki bozunma ortamları haftada bir yenilenmiştir. Bozunurluğun incelenmesi için malzemelerin morfolojilerindeki değişimler SEM ile görüntülenmiştir. Ölçümler ve analizler bozunma testlerinin 1., 3. ve 5. haftasında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hücre kültür çalışmaları

3.5.1. MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları

MC3T3-E1 hücre hattı ile hücre kültür çalışmaları, ince film, 2 boyutlu fibröz matrisler ve çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri ile yapılmıştır. Bu doku iskeleleri ile yürütülen hücre kültür çalışmalarında, hücrelerin yüzey üzerine tutunmaları ve çoğalması incelenmiştir.

Hücreler, önce hacimce %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamında çoğaltılmıştır. Sterilizasyon için, %70'lik etanol içerisine konulan doku iskeleleri vakum etüvünde çöktürülmüş ve 30 dk etanol içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra, kültür kaplarına yerleştirilen doku iskelelerinin her iki yüzeyi 45 dk UV'ye maruz bırakılmıştır. Hücre ekimi yapılmadan önce, hücrelerin beslendiği %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı yarı yarıya seyreltilerek doku iskelelerinin üzerine eklenmiştir. Doku iskeleleri, bu ortamda bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, tripsinizasyon ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılarak süspanse edilmiş, 10 μ L besi ortamı içerisinde doku iskelelerine ekilmiştir. İki boyutlu doku iskeleleri için 30,000 hücre/iskele; 3 boyutlu doku iskeleleri için ise 100,000 hücre/iskele olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Doku iskeleleri üzerine, hücre ekimi yapıldıktan sonra 30 dk'da bir 10'ar μ L besi ortamı eklenmiştir. Üç saat sonunda, doku iskelelerinin üzerine 1'er mL besi ortamı eklenmiştir. Hücreler, doku iskelesi üzerinde büyüme ortamı (hacimce %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamı) içerisinde, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Heraeus Instruments, Almanya) kültür edilmiştir. Hücre kültür çalışmaları, steril hava içeren laminer akışlı kabinde (Bioair, Type II, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.1. SEM analizi

Hücrelerin doku iskelelerinin yüzeyine tutunmaları, yayılmaları ve çoğalmaları, SEM analizi ile morfolojik olarak incelenmiştir. SEM analizi için örnekler, üzerinden kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon işlemi için 30 dk boyunca %2.5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve analize kadar 1'er mL PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. Analize gitmeden önce, örnekler %30, %50, %70, %90 ve %100'lük etanol serisi içerisinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve HMDS içerisinde 5'er dk bekletilmiştir. Bir gece boyunca kuruması sağlanan örnekler, SEM analizi öncesinde altın ile kaplanmıştır. SEM analizi, hücre kültür çalışmasının 4., 24. saatinde, 3. gününde ve 11. gününde yapılmıştır.

3.5.2. hBMSC hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları

Çalışmada, kemik iliğinden izole edilen 7. pasajdaki insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri (hBMSC)ler kullanılmıştır [129]. Bu hücrelerin kültürleri, 3 boyutlu PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fibröz doku iskeleleri ile yürütülmüştür. Sterilizasyon için, doku iskeleleri %70 etanol içerisinde 45 dk bekletildikten sonra, her iki yüzeyi 45 dk UV'ye maruz bırakılmıştır. Hücre ekimi yapılmadan önce, hücrelerin beslendiği %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı yarı yarıya seyreltilerek doku iskelelerinin üzerine eklenmiştir. Doku iskeleleri, bu ortamda bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hBMSCler, 10 μ L besi ortamı içerisinde 70,000 hücre/iskele olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra, hücrelerin osteojenik farklılaşmasının uyarılması için büyüme ortamına kültür süresince 100 nM dekzametazon, 10 mM β -gliserol fosfat ve 0.05 mM askorbik asit eklenmiştir. hBMSC hücre kültüründe hücrelerin çoğalmasının ve farklılaşmasının değerlendirilmesi için DNA analizi, SEM analizi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), alkalın fosfataz aktivitesi (ALP) tayini, kollajen analizi ve kalsiyum analizi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. DNA analizi

Kültürün 1., 7., 14. ve 28. günlerinde gerçekleştirilen DNA analizi ile hücrelerin çoğalması belirlenmiştir. Belirlenen günlerde kültür ortamından uzaklaştırılan doku iskeleleri, analiz yapıncaya kadar -80°C de muhafaza edilmiştir. Analizden önce ekstrakt elde etmek için, Eppendorf tüpleri içerisinde bulunan doku iskelelerinin üzerine 600 μ L Triton X-100 çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Örnekler 10,000 rpm'de 30'ar s homojenize edildikten sonra, 12,000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.

Ekstraktlardan 10'ar μL alınarak 96 gözlü Petri kabına aktarılmış ve her bir ekstraktın üzerine 90'ar μL TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:7.5) ve 100'er μL Quant-iT™ PicoGreen® reagent (TE tamponu kullanılarak 200 kat seyreltilmiş) eklenmiştir. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, floresan mikropilaka okuyucu ile (uyarılma: 480 nm, emisyon: 520 nm) floresan şiddetleri belirlenmiştir. DNA derişimleri bilinen standartların kullanımı ile elde edilen kalibrasyon eğrisi yardımı ile (EK 1), örneklerin floresan şiddetlerinden DNA miktarları hesaplanmıştır.

3.5.2.2. Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi tayini

Erken dönem farklılaşma belirteci olan alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümü, analiz kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde, ALP enziminin pNPP (p-nitrofenil fosfat)'ı, pNP (p-nitrofenol) bileşiğine dönüştürmesinden yararlanılmıştır [130].

ALP aktivitesinin tayininde, DNA analizi için Triton X-100 ile hazırlanan ekstraktlar kullanılmıştır. Triton ekstraktlarından 80 μL alınarak 96 gözlü Petri kabına aktarılmış ve üzerine 50'şer μL pNPP çözeltisi (5mM) eklenerek 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak, tepkimenin durdurulması için, örneklerin üzerine 20 μL stop çözeltisi eklenmiştir. Tepkime sonucu oluşan pNP'nin absorbansı, UV mikropilaka okuyucuda (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi yardımı ile, bilinmeyen örneklerin absorbans değerlerinden ALP miktarları hesaplanmıştır. ALP aktivitesi analizi, kültürün 7., 14. ve 28. gününde gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.3. Kollajen analizi

Bu analiz, kollajenin yapısında bulunan hidroksiprolin amino asidinin miktarsal ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Hidroksiprolin, doku hidrolizatlarında bulunan kollajen veya jelatin miktarının doğrudan ölçütüdür. Kollajen analizi, hücre kültür çalışmasının 1., 7., 14. ve 28. günlerinde yapılmıştır.

Kollajen ekstraksiyonu için, örneklerin üzerine 100 μL su eklenerek homojenize edilmiş ve sonrasında 100'er μL 12 N HCl eklenerek 3 saat 120°C'de inkübe edilmiştir. 3 saat sonunda örnekler vortekslenmiş ve 10,000 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek çökeltilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ekstraktlardan 50'şer μL alınarak 96 gözlü Petri kaplarına aktarılmış ve 1 gece boyunca 60°C'de kurumaya bırakılmıştır. Analiz için, kuruyan örneklerin üzerine 100 μL kloramin T ajanı eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 100 μL DMAB reagent eklenerek 60°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Tepkime sonucu oluşan hidroksiprolinin absorbansı, UV mikropilaka okuyucu kullanılarak 560 nm'de

ölçülmüştür. Hidroksiprolin standartlarının kullanımıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi yardımı ile (EK 2), bilinmeyen örneklerin absorbens değerlerinden hidroksiprolin miktarları hesaplanmıştır.

3.5.2.4. Kalsiyum analizi

ECM mineralizasyonunun değerlendirilmesi amacıyla, hücre kültürünün 14. ve 28. günlerinde kalsiyum analizi yapılmıştır. Analiz öncesinde, kalsiyumun ekstrakte edilmesi için, makas yardımı ile parçalanmış örneklerin üzerine %5'lik (w/v) trikloroasetik asit eklenmiş ve 30 dk sonikatörde bekletilmiştir.

Bilinmeyen örneklerin analizi için, hazırlanan ekstraktlardan 25'er µL alınarak 96 gözlü Petri kaplarına aktarılmış ve steril su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Son olarak 90'ar µL kromojenik ajan ve 60'ar µL analiz tamponu eklenmiştir. 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, UV mikroplaka okuyucu kullanılarak 575 nm dalga boyunda absorbens ölçümü yapılmıştır. Kalsiyum standartlarının kullanımı ile çıkarılan kalibrasyon eğrisi yardımı ile (EK 3), bilinmeyen örneklerin absorbens değerlerinden kalsiyum miktarları hesaplanmıştır.

3.5.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifadesi analizi

Hücrelerin osteojenik farklılaşmasının değerlendirilmesi için, RT-PCR ile *COL-I*, *ALP*, osteokalsin (*OCN*) ve osteopontin (*OPN*) gen ifadelerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, hücre kültürünün 7., 14. ve 28. günlerinde besi ortamından uzaklaştırıldıktan sonra Eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 200 µL Trizol eklenerek analiz edilinceye kadar -80°C'de bekletilmiştir.

Analizden önce RNA izolasyonu için, donmuş olan Trizol eritilerek vortekslendikten sonra üzerine 50 µL kloroform eklenmiş ve 12,000 rpm'de 4 °C 'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Üstte oluşan sıvı faz, yeni Eppendorf tüplerine aktarılarak üzerlerine 250 µL %70'lik etanol eklenmiştir. Elde edilen çözeltiler, RNA için seçici filtreler içeren kolonlara aktarılmış ve 12,000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Daha sonra, kolonların alt kısmında toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve 700 µL RW1 tamponu eklenerek 30 s 12,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Kolonun altında toplanan sıvı tekrar uzaklaştırılarak 500 µL RPE tamponu eklenmiş ve 30 s boyunca 12,000 rpm'de santrifüjlendikten sonra son basamak tekrarlanmıştır. Kolonun altında bulunan toplama tüpleri temiz Eppendorf tüpleriyle değiştirilmiş ve 12,000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Son olarak, toplama tüpleri, steril tüpler ile değiştirilmiş ve 50 µL RNase içermeyen su eklenerek 1 dk boyunca 12,000

rpm'de santrifüjlenmiştir. İzole edilen RNA miktarları Nanodrop (Thermo Scientific nanodrop 2000c) ile belirlenmiş ve uygun oranlarda su eklenerek örneklerin RNA başlangıç derişimleri eşitlenmiştir.

RT-PCR analizleri için, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne 5 Hot FirePol® EvaGreen®qPCRMix Plus (Estonya) kitleri kullanılmış ve analizler LightCycler®NanoInstrument (Roche, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lardan cDNA eldesi için, 40°C'de 120 dk'da reverse transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yapılan PCR analizi, ilk aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk'da, uzatma basamağı 95°C'de 15 s, 60°C'de 20 s, 72°C'de 20s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde β -Aktin geni referans gen (housekeeping gen) olarak kullanılmıştır. Genler için kullanılan primerler Metabion (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Genlerin primer dizileri Çizelge 3.4' te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri

Gen Bölgeleri	Primer Dizileri	
β -Aktin	Forward	5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'
	Reverse	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
Kollajen-I	Forward	5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3'
	Reverse	5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
ALP	Forward	5'-GAGCGACACGGACAAGAAG-3'
	Reverse	5'-TGGTAGTTGTTGTGACATAATC-3'
Osteokalsin (OCN)	Forward	5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3'
	Reverse	5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Osteopontin (OPN)	Forward	5'-CACTTTCCTCCAATCGTCCCTAC-3'
	Reverse	5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'

3.5.2.6. SEM analizi

SEM analizi, kültürün 7. ve 28 günlerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin fiksasyonu için, Bölüm 3.5.1.1'de belirtilen işlemler uygulanmıştır.

3.5.2.7. İstatistiksel analiz

Çalışmalarda elde edilen sonuçlar, GraphPAD Software InStat programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar \pm standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi, Tukey-Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

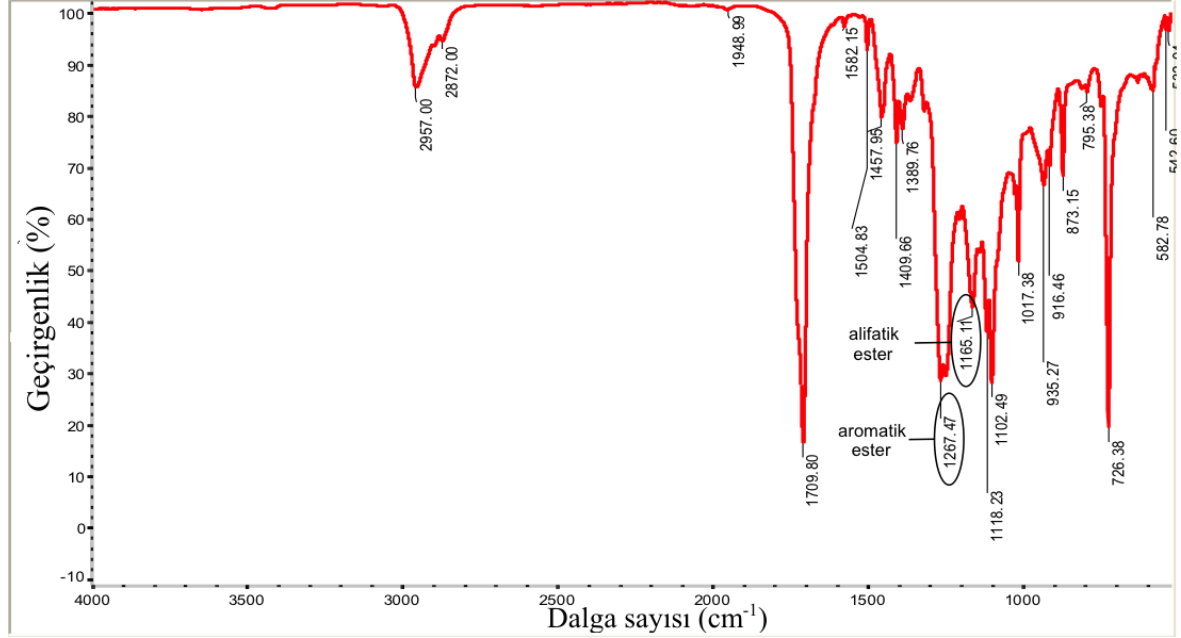
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, kemik rejenerasyonu için üretilen PBAT bazlı doku iskelelerinin karakterizasyonlarının ve *in vitro* hücre kültür çalışmalarının sonuçları verilmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak tartışılmıştır. İlk olarak, PBAT reçinelerinin karakterizasyonları ile ilgili sonuçlar değerlendirilmiştir. Daha sonra, çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile üretilen doku iskelelerinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan kültür çalışmalarının sonuçları incelenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında, ıslak elektroçirme ile üretilen PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT 3D fibröz doku iskelelerinin karakterizasyon sonuçları değerlendirilmiş, hBMSC hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmalarının sonuçları incelenmiş ve tartışılmıştır.

4.1. PBAT reçinelerinin karakterizasyonları

4.1.1. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

ATR-FTIR analizi, PBAT'ın kimyasal yapısının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR analizinden elde edilen spektrum, Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



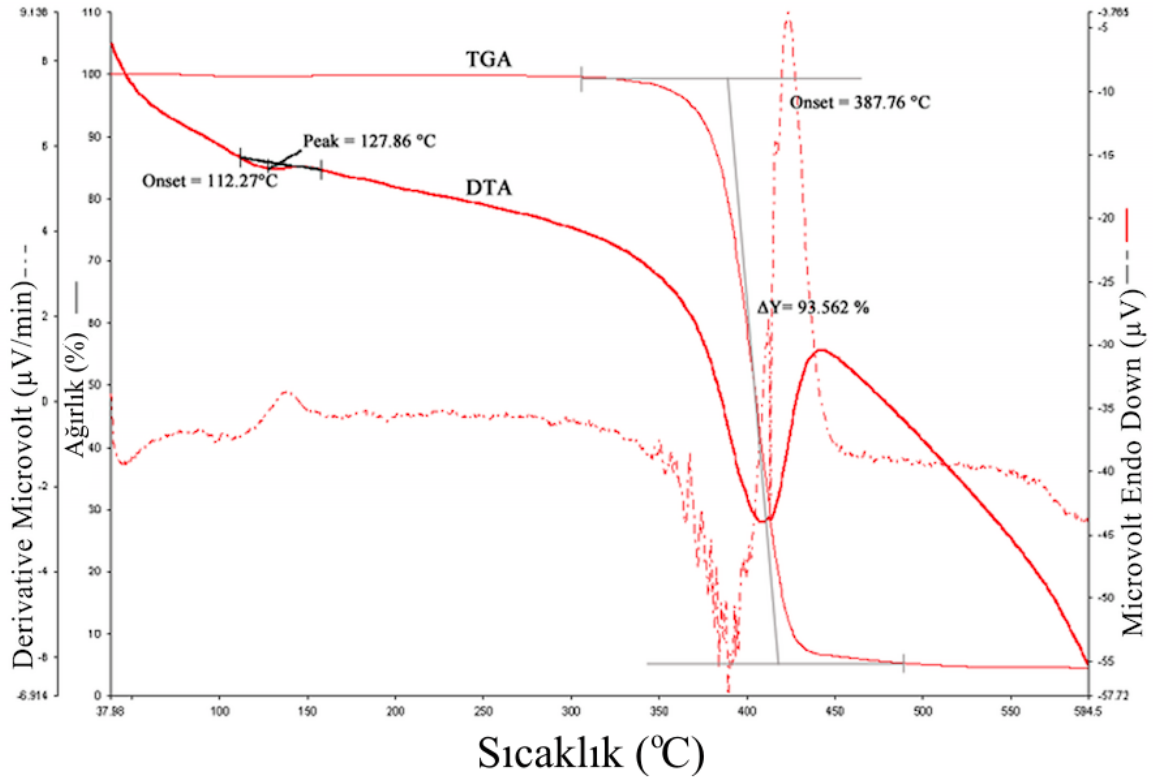
Şekil 4.1. PBAT reçinelerinin ATR-FTIR spektrumu

Spektrumda, 1709 cm⁻¹ dalga sayısında bulunan pik, ester grubunun karakteristik pikidir. 1267 cm⁻¹ ve 1165 cm⁻¹ dalga sayılarında bulunan pikler ise, sırasıyla PBAT'ın yapısında

bulunan aromatik ve alifatik ester gruplarının O=C-O-C gerilimlerine aittir. Bu piklerin varlığı, PBAT'ın yapısında alifatik ve aromatik grupların bulunduğunu doğrulamaktadır.

4.1.2. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TG-DTA)

PBAT'ın termal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılan TG-DTA analizinden elde edilen termogram Şekil 4.2.'de gösterilmektedir.



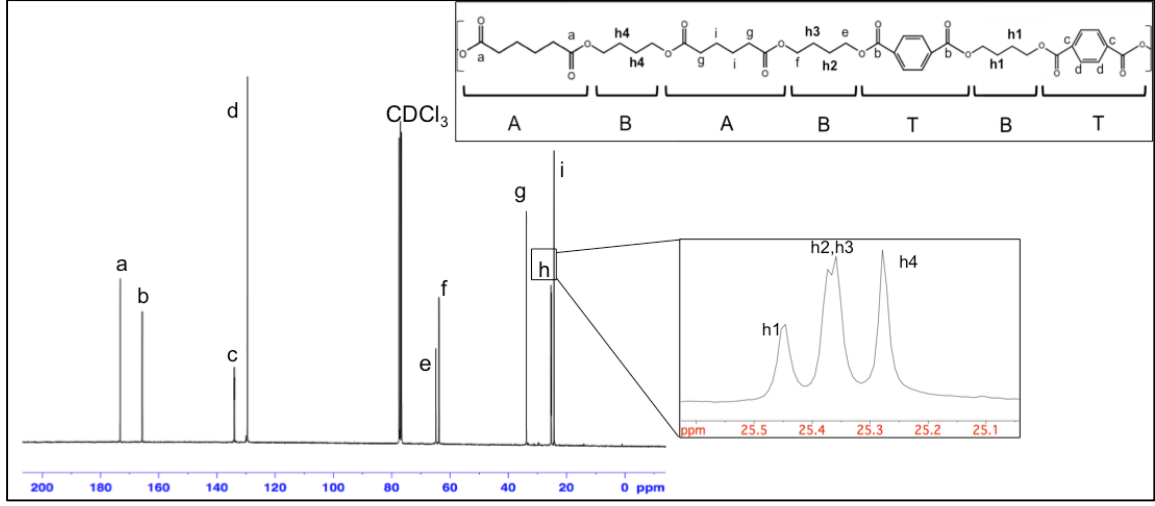
Şekil 4.2. PBAT reçinelerine ait TG-DTA eğrisi

Şekil 4.2.'de gösterildiği gibi, PBAT'ın termal bozunması 388°C de başlamakta ve %93 kütle kaybı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, DTA eğrisinde 112°C' de gözlenen endotermik pik, PBAT'ın erime noktasını belirtmektedir. Bir polimerin termal bozunma sıcaklığı, çeşitli mühendislik uygulamalarında kullanılması için önem taşımaktadır. Termal bozunma sıcaklığının erime sıcaklığının oldukça üzerinde olması, PBAT'ın termal uygulamalarda kullanım için elverişli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, PBAT'ın erime noktası ve termal bozunma sıcaklığının, LDPE'ninkine benzer olduğu anlaşılmıştır [131].

4.1.3. ¹³C-NMR analizi

PBAT'ın biyobozunurluk hızı ve mekanik özellikleri, yapısında bulunan alifatik ve aromatik grupların miktarlarına bağlıdır. PBAT'ın yapısında bulunan tekrarlayan birimlerden alifatik bütülen adipat (BA) ve aromatik bütülen tereftalat (BT)'in molce

yüzdelerinin ve ortalama sekans uzunluğunun belirlenmesi için yapılan ^{13}C -NMR analizinden elde edilen spektrum Şekil 4.3.' te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. PBAT reçinelerine ait ^{13}C -NMR spektrumu (B: bütilen, A: adipat, T: tereftalat)

Şekil 4.3.'te gösterilen spektrumda, PBAT'ın yapısında bulunan her bir karbon harflendirilmiş ve spektrumda bulunan pikler üzerinde belirtilmiştir.

Daha önceden belirtildiği gibi, zincirde bulunan aromatik blokların miktarı arttığında polimer zincirlerinin hareketliliği azalmakta ve dolayısıyla bozunma hızı düşmektedir [7]. ^{13}C -NMR spektrumunda, BT ve BA birimlerinin molce yüzdeleri, Eşitlik (1) ve (2)'nin kullanımıyla sırasıyla %42 ve %58 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler, BASF firmasının Ecoflex[®] adlı ticari ürününün bileşimine (BT: %44, BA: %56) yakındır. Ayrıca BA ve BT'nin ortalama sekans uzunlukları, Eşitlik 3'ün kullanımı ile sırasıyla 2.56 ve 1.78 olarak hesaplanmıştır. Son olarak, “degree of randomness” değeri, 0.95 olarak bulunmuştur.

“Degree of randomness” değeri 1'e yaklaştıkça, kopolimerin rasgele seçilen ve $n \geq 10$ tekrarlayan birim içeren bölümündeki X ve Y tekrarlayan birimlerinin birbirine olan oranı, tüm zincirde bulunan X ve Y birimlerinin birbirine olan oranına yaklaşır [132]. Bu değer 0.95'e eşit olmasından yola çıkılarak, PBAT molekül zincirinin herhangi bölümünde bulunan BT ve BA'nın oranının genel orana (BT:%42 ve BA:%58) benzer olduğu söylenebilir.

Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda, %42 BT ve %58 BA içeren PBAT'ın 12 haftada kompost ortamında tamamen bozunduğu belirtilmiştir [6]. Witt ve ark., aromatik grupların

sekans uzunlukları $n=1$ ve $n=2$ olduğunda bozunmanın hızlı olduğunu, $n \geq 3$ olduğunda ise bozunurluk hızının oldukça azaldığını belirtmiştir [97]. Yine de, karışık mikrobiyal popülasyon varlığında uzun aromatik sekansların da bozunmaya uğradığının belirtildiği çalışmalar mevcuttur [10].

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan lipaz enzimi varlığında bozunan PBAT'ın, *in vivo* koşullarda da lipaz enzimi varlığında bozunabileceği öngörülse de, bu koşullarda yapılan bozunurluk deneyi bulunmamaktadır.

PBAT'ın tekrarlayan birimlerinin molce yüzdesi, bozunurluk hızını etkilediği gibi, mekanik özelliklerini de etkilemektedir. PBAT'ın hem biyobozunurluk, hem de mekanik özellikler açısından yeterli özellik gösterebilmesi için, içerdiği aromatik birimlerin molce yüzdesinin optimum olarak %35-55 arasında bulunması gerektiği belirtilmiştir [98].

Bu nedenlerle, tez çalışmasında kullanılan PBAT'ın bozunurluk ve mekanik özellikler açısından yeterli özellik gösterdiği söylenebilir.

4.2. PBAT doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu

Çalışmanın ilk kısmında PBAT biyomalzemeler, elektroegirme, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma ve çözücü buharlaştırma yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Elde edilen ürünlerin görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile üretilen doku iskelelerinin görüntüleri: (a) çözücü buharlaştırma, (b) elektroegirme, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, (d) eriyik kalıplama- parçacık uzaklaştırma

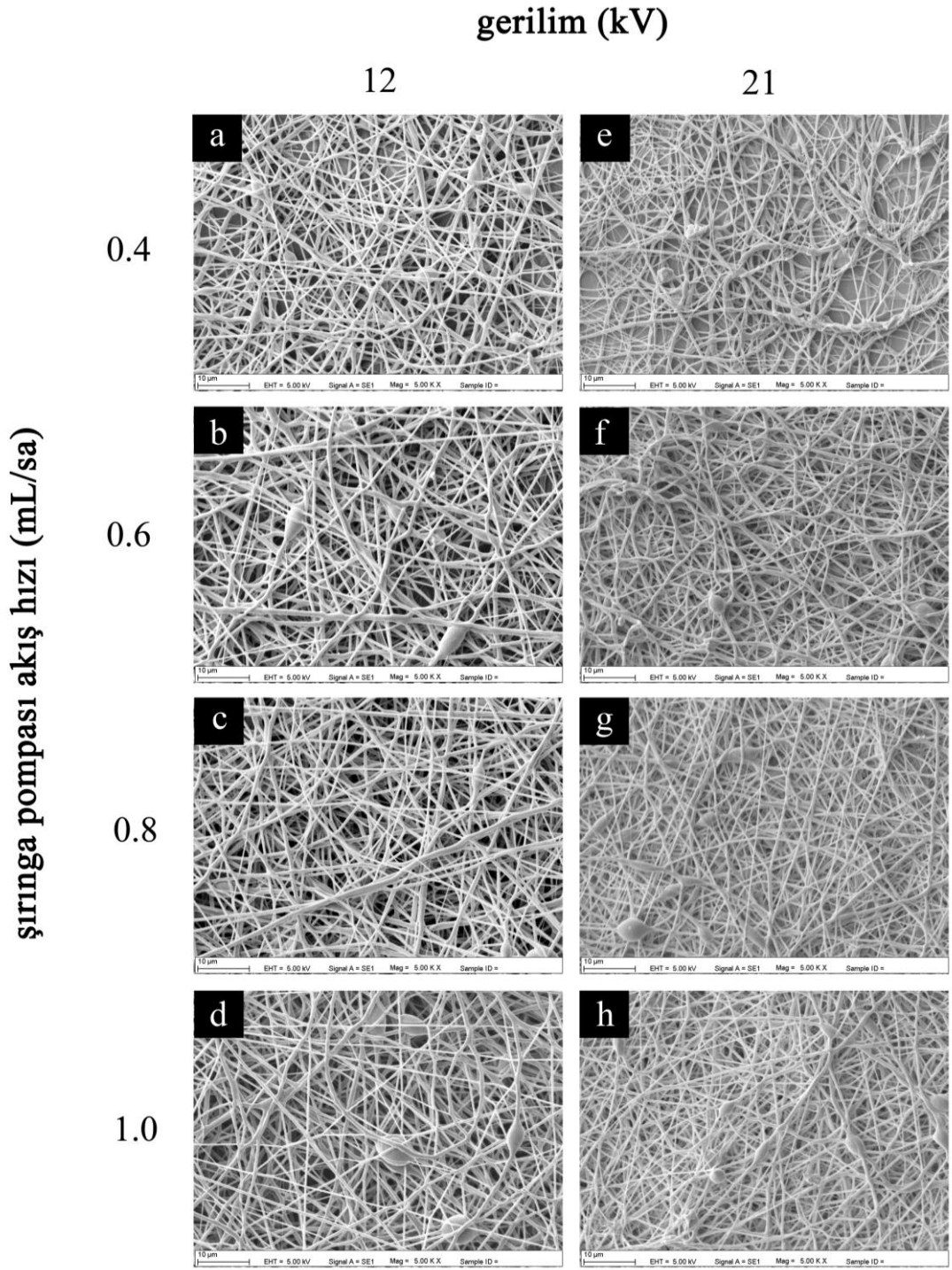
4.2.1. Elektroğirme işlemi ile 2D fibröz matrislerin üretimi

Elektroğirme yöntemi ile 2D PBAT fiberlerinin üretim aşamasında, optimum koşulların belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda organik çözücü olarak HFIP kullanılmış, %12 ve % 14 (w/v) polimer derişimlerinde çalışılmıştır. Yüzde 12 ve %14'lük derişimlerde çeşitli gerilim ve şırınga pompası akış hızlarında elde edilen fiberlerin görüntüleri sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Şekil 4.5.'te verilen SEM görüntülerinde, %12 PBAT derişiminde tüm akış hızları ve gerilim değerlerinde fiberlerde boncuk oluştuğu görölmektedir.

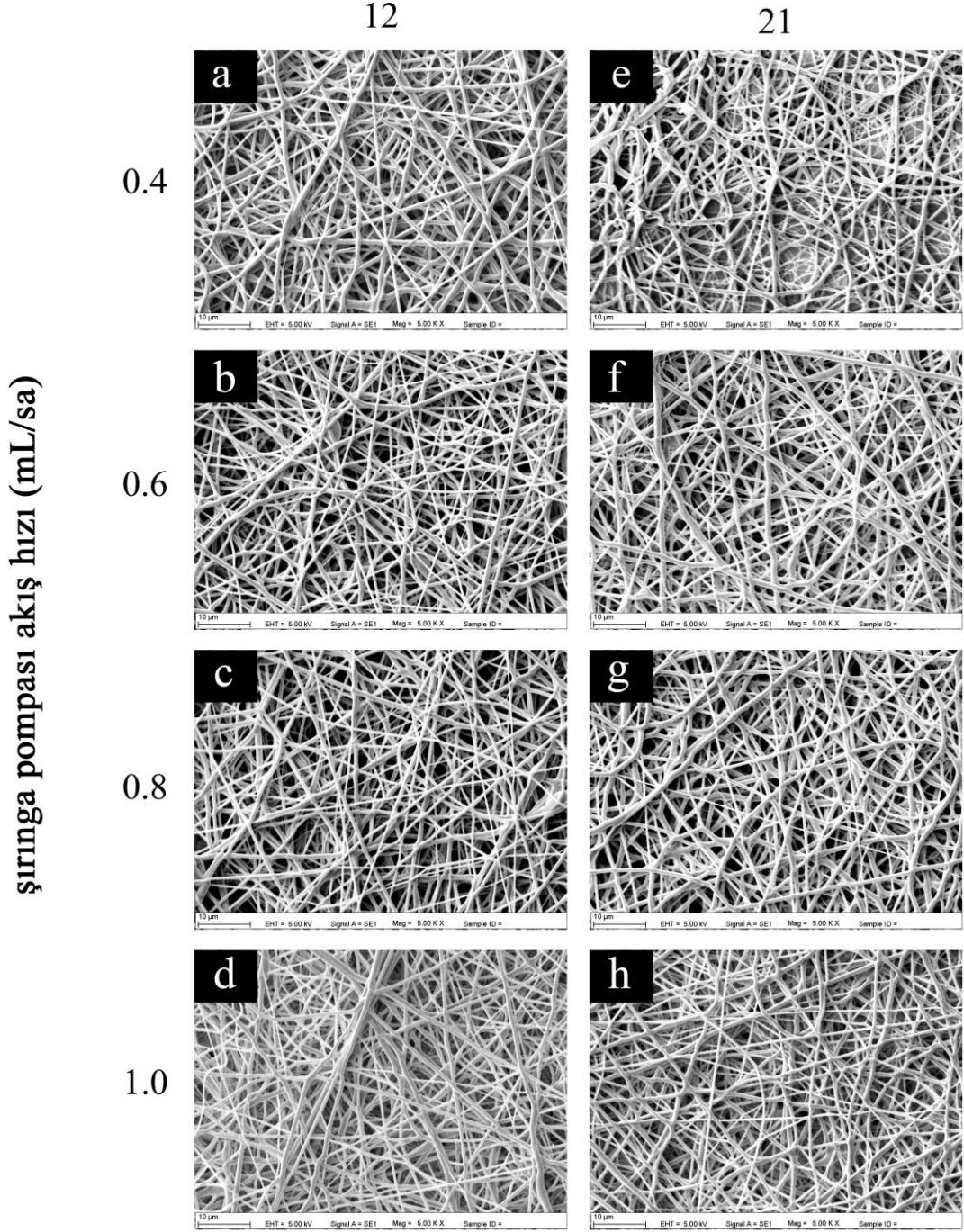
Polimer çözeltisinin viskozitesi, fiber morfolojisini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Çözelti viskozitesi arttığında, polimer molekül zincirlerinin dolaşıklığı artar ve düzgün morfolojiye sahip, kesintisiz ve boncuksuz fiberler oluşur. Düzgün ve kesintisiz fiber oluşumu için çözeltilinin belirli bir viskoziteye sahip olması gerektiği gibi, viskozitenin yüksek olması jet çıkışını zorlaştıracak için fiber oluşumunu engelleyebilir. Ayrıca viskozitenin artırılması, fiber çapını da artırmaktadır. Bu nedenle, viskozitenin optimum bir aralıkta olması gerekir. Çözeltilinin viskozitesi, polimer çözeltisinin derişimi ile doğru orantılıdır [63].

PBAT çözeltisinin derişimi %12 (w/v) olduğunda, viskozite yetersiz geldiği için fiberlerde boncuk oluştuğu düşünölmektedir. Derişim sabit tutularak gerilim ve şırınga pompası akış hızları artırıldığında da boncuk oluşumunun engellenememesi, boncuk oluşumunu etkileyen ana faktörün çözelti derişimi, dolayısıyla viskozite olduğunu göstermektedir. Diğer parametreler sabit tutulup polimer derişimi %12'den %14'e çıkarıldığında boncuk oluşmaması, bu bulguyu desteklemektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Yüzde 12 (w/v) PBAT çözeltisinin kullanımıyla farklı gerilim ve akış hızlarında elde edilen fibröz matrislerin SEM görüntüleri (Toplayıcı-şırınga ucu arası mesafe: 20cm), (Büyütme: 5,000x)

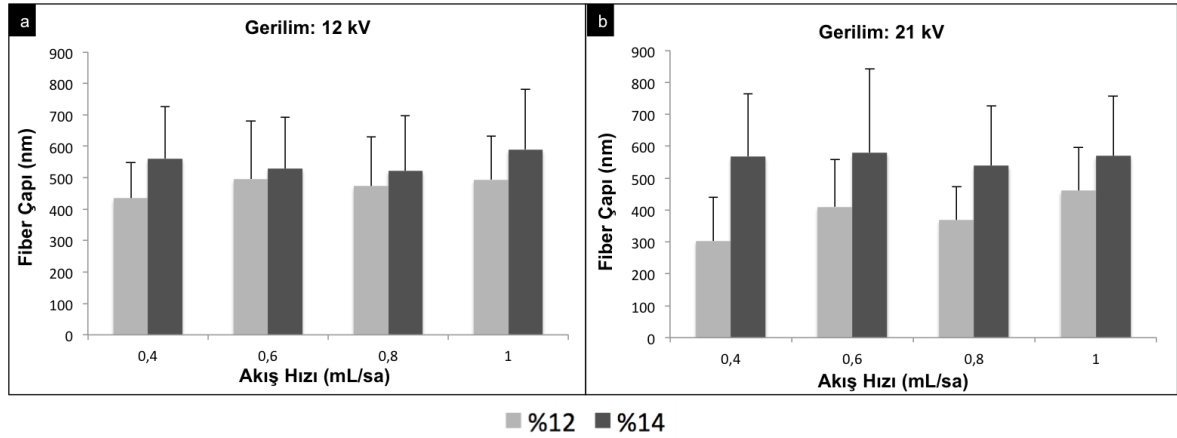
gerilim (kV)



Şekil 4.6. Yüzde 14 (w/v) PBAT çözeltisinin kullanımıyla farklı gerilim ve akış hızlarında elde edilen fibröz matrislerin SEM görüntüleri (Toplayıcı-şırınga ucu arası mesafe: 20cm) (Büyütme: 5,000x)

Yüzde 14 (w/v) PBAT çözeltisi ile yapılan elektroğirme işlemi sonucunda düzgün ve boncuksuz fiberler elde edilmiştir. Fakat, akış hızı düşükçe jet kararlılığının azalmasından dolayı şırınga ucunda birden fazla polimer jeti oluşumu görülmüştür. Bu da, düşük akış hızlarında fiber çapı dağılımının artmasına neden olmuştur. Bu nedenle, en kararlı jet oluşumunun görüldüğü 1 mL/sa akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir. Yüzde 14'lük polimer derişiminde, farklı gerilim değerlerinde yapılan elektroğirme işleminin ise fiber morfolojisinde ve çapında belirgin bir etki yaratmadığı görülmüştür.

Şekil 4.7 (a) ve (b)'de, farklı akış hızı ve polimer derişimi değerlerinde elde edilen fiberlerin çap değişimlerini gösteren grafikler verilmiştir. Polimer derişimi artırıldığında, fiber çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemekle birlikte, %14 polimer derişimi ile elde edilen fiber çaplarının %12 polimer derişimi ile elde edilen fiberlere göre oransal olarak daha yüksek olduğu görülmektedir.



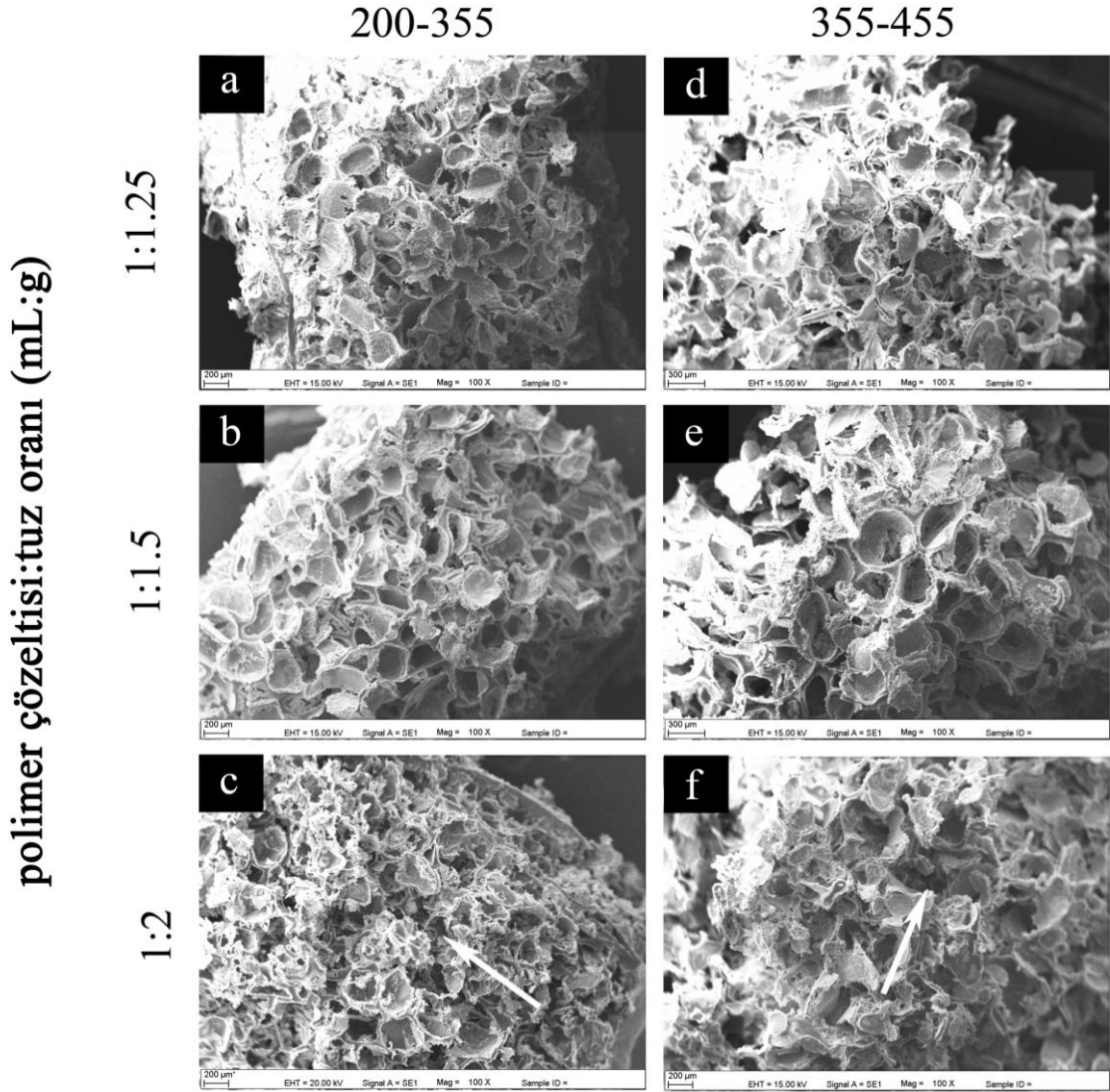
Şekil 4.7. Farklı akış hızı ve polimer derişimlerinde elde edilen PBAT fiber çaplarının değişimi: (a) 12 kV ve (b) 21 kV

Hücre kültürü ve diğer karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, 2D fibröz matrislerin 21 kV gerilim, 1 mL/sa akış hızı ve 20 cm mesafe koşullarında üretilmesine karar verilmiştir. Bu koşullarda üretilen fiberlerin ortalama çapı 569 ± 187 nm'dir.

4.2.2. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi

Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile, %10, %15 ve %20 (w/v) polimer derişimlerinde elde edilen iskelelerin SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

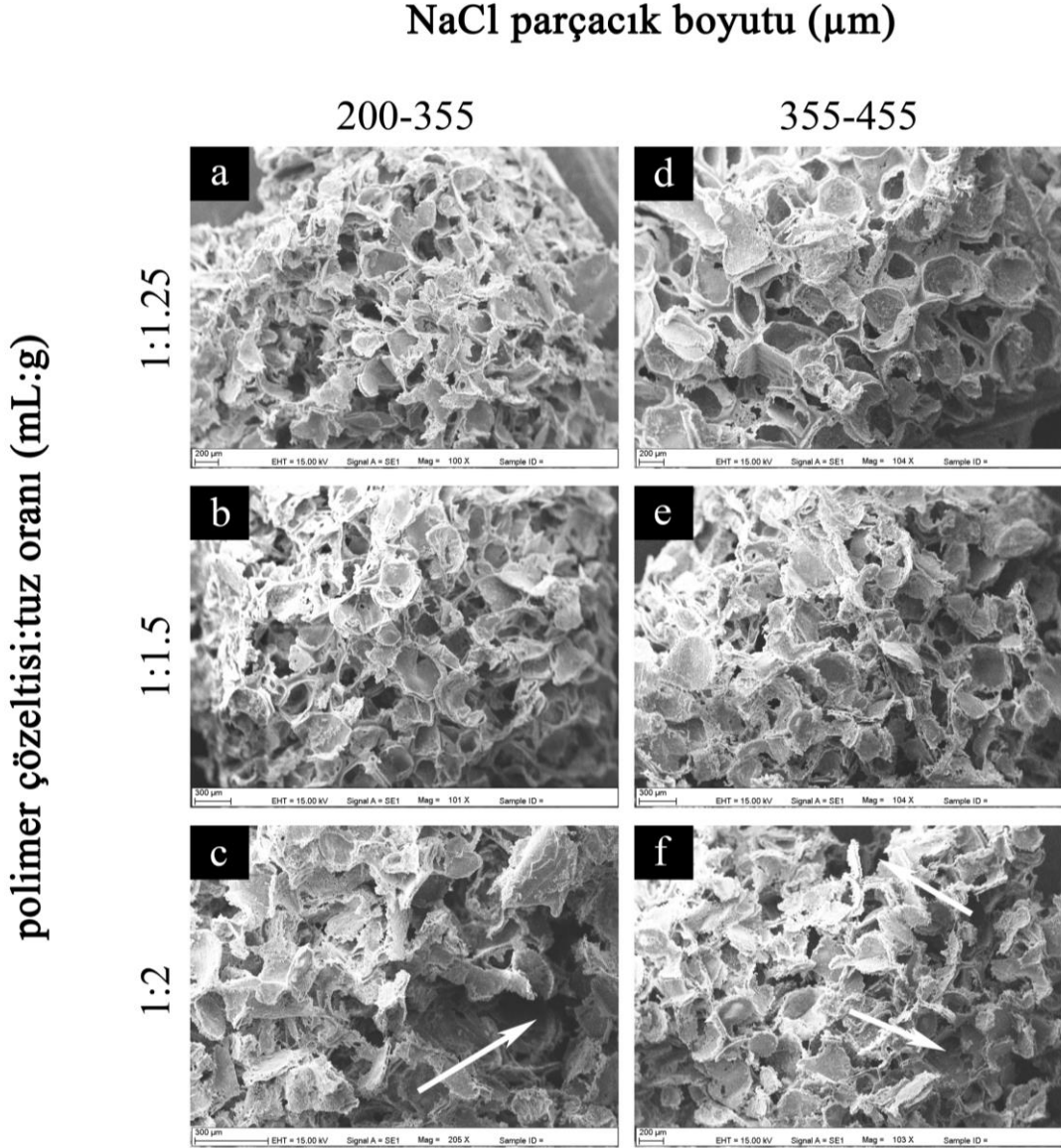
NaCl parçacık boyutu (μm)



Şekil 4.8. %10 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (Beyaz oklar, tuz kümelerinin oluşturduğu büyük boşlukları işaret etmektedir) (büyütme: 100x)

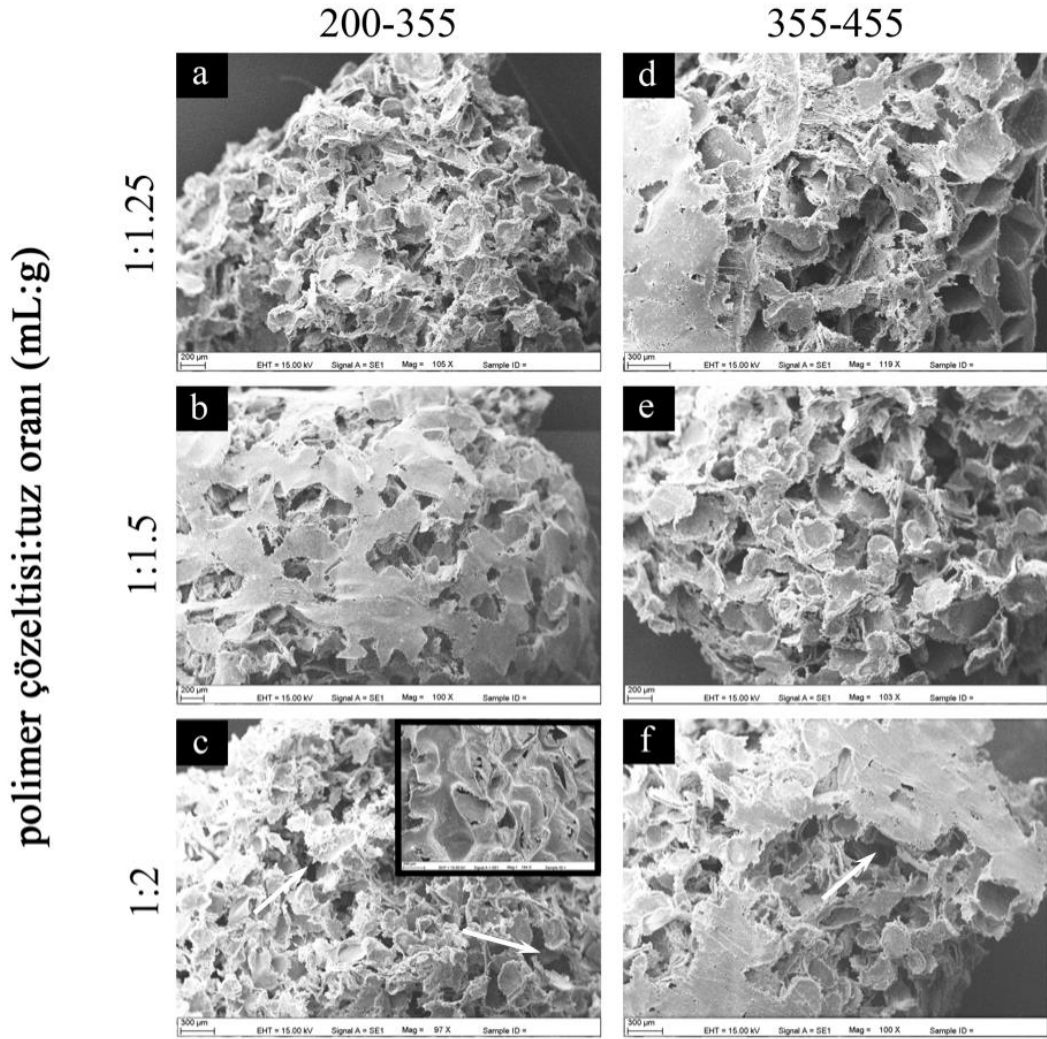
Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10’da sunulan SEM görüntülerinden, genel olarak çözeltiliye eklenen NaCl miktarının gözenek morfolojisini etkilediği görülmektedir. Tuz miktarı, polimer çözeltisinin hacminin 1.25 katında tutulduğunda, içsel bağlantılı gözenek oluşumu için yeterli olmadığı ve kapalı gözeneklerin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8. a, d; Şekil 4.9. a, d ve Şekil 4.10. a, d). Tuz miktarı polimer derişiminin 2 katına çıkarıldığında ise, tuz parçacıkları kümelenecek iskelelerin bazı bölgelerinde büyük boşluklar oluşturmuştur. Bu boşluklar, Şekil 4.8. c, f; Şekil 4.9. c, f ve Şekil 4.10. c, f’ de beyaz oklarla gösterilmiştir.

Tuz miktarının, polimer çözeltisi hacminin 1.5 katında tutulması ise, içsel bağlantıların oluşumu için yeterli olmuş ve daha ideal gözenek yapısının oluşmasını sağlamıştır (Şekil 4.8. b, e; Şekil 4.9. b, e ve Şekil 4.10. b, e).



Şekil 4.9. %15 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri (Beyaz oklar, tuz kümelerinin oluşturduğu büyük boşlukları işaret etmektedir) (büyütme: 100x)

NaCl parçacık boyutu (μm)

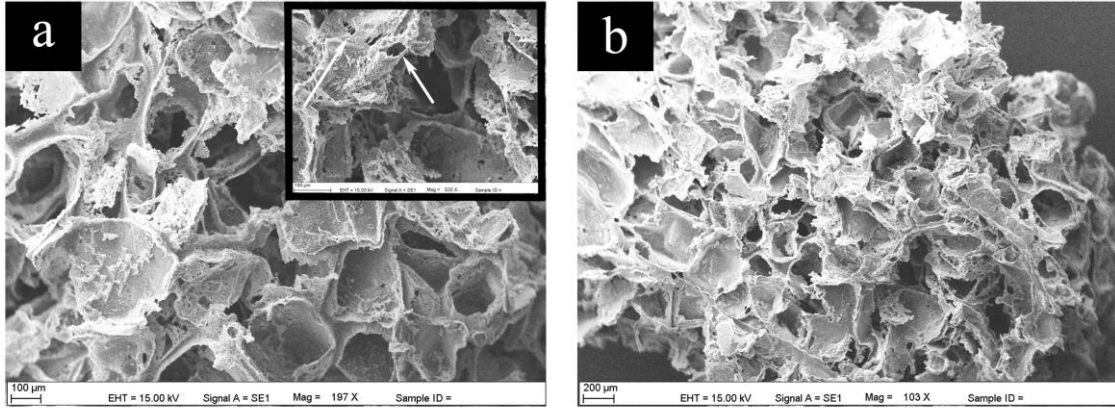


Şekil 4.10. %20 (w/v) PBAT çözeltisinden farklı NaCl parçacık boyutu ve miktarlarında elde edilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri (büyütme: 100x) (c’de bulunan küçük görüntü kapalı gözenekleri göstermektedir.)

Kullanılan tuz miktarının yanı sıra, polimer çözeltisinin derişiminin de doku iskelesi morfolojisini etkilediği görülmüştür. Polimer çözeltisinin oranı %20 (w/v) iken, fazla polimer miktarı doku iskelelerinin üzerinde gözeneksiz bir tabakanın ve kapalı gözeneklerin oluşumuna neden olmuştur (Şekil 4.10 a-f). Polimer derişiminin %10 ve %15 değerlerinde tutulması ise, gözenek morfolojisi açısından daha tercih edilir özellikler göstermiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).

Sonuç olarak, ilerideki karakterizasyonlarda ve hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere, doku iskelelerinin üretiminde optimum koşullar olarak %15 PBAT derişimi, 1:1.5

polimer çözeltisi:tuz oranı ve 200-355 µm parçacık boyutu seçilmiştir (Şekil 4.9 b). Seçilen koşullarda üretilen doku iskelelerinin yatay, dikey kesitleri ve gözenek yapıları, Şekil 4.11’ de daha detaylı olarak sunulmuştur. Bu doku iskelesinin ortalama gözenek boyutları 283 ± 61 µm olarak hesaplanmıştır. Bu değer, kullanılan tuz parçacıklarının boyut aralığındadır.



Şekil 4.11. %15 PBAT çözeltisi, 200-355 µm boyut aralığında NaCl parçacıkları ve 1:1.5 polimer çözeltisi:tuz oranında elde edilen doku iskeleleri: (a) yatay ve (b) dikey kesit. Beyaz oklar, iskele yapısındaki küçük gözenekleri işaret etmektedir. (büyütmeler a: 200x, b: 100x)

Şekil 4.11. b’de, gözeneklerin dikey kesit boyunca da homojen olarak dağıldığı ve içsel bağlantılı oldukları görülmektedir. Şekil 4.11. a’da, tuz parçacıklarının oluşturduğu büyük gözeneklerin yanı sıra, beyaz oklar ile işaretlenen 0-100 µm boyutlarında küçük gözeneklerin de olduğu görülmektedir. Ayrıca, doku iskelelerinin yüzeylerinin pürüzlü bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmektedir. Pürüzlü yüzeyler, yüzeye bağımlı hücreler için tutunma noktaları sağlamakta ve ayrıca yüzey alanını genişleterek daha fazla serum proteinin yüzeye yapışmasını sağlamaktadır. Bu yüzden pürüzlü yüzeyler, hücre tutunmasını düz yüzeylere göre daha iyi desteklemektedir. Zan ve ark., mikro boyutta pürüzlülüğe sahip kitosan mikropartiküllerin, MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını düz yüzeyli kitosan mikropartiküllere göre daha iyi desteklediğini belirtmiştir [133].

4.2.3. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi

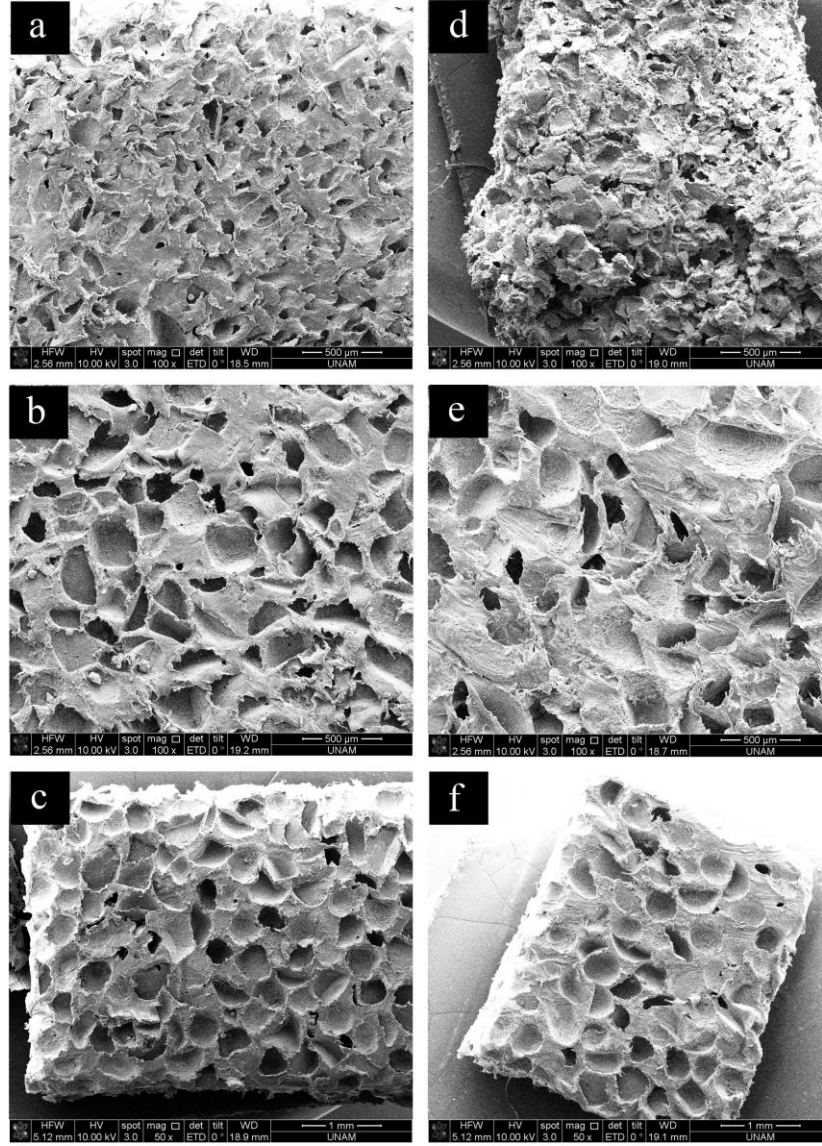
Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işleminde farklı koşullarda elde edilen iskelelerin SEM görüntüleri Şekil 4.12’ de verilmiştir.

NaCl parçacık boyutu (μm)

100-200

200-355

355-455



Şekil 4.12. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskeleleri: (a-c) yüzeyden ısıtılarak, (d-f) fırında eritilerek hazırlanan doku iskeleleri, (Büyütmeler: a,b,d,e: 100x; c,f: 50x)

Şekil 4.12’ de görüldüğü gibi, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işleminde olduğu gibi içsel bağlantılı gözeneklere sahip değildir. Bunun nedeni, polimer eriyiğinin çok viskoz olması ve tuz parçacıklarının eriyik içerisinde homojen bir şekilde dağıtılamamasıdır. Farklı boyutlarda tuz parçacıklarının kullanımı gözenek çapını etkilese de, kapalı gözenek oluşumunu engelleyememiştir. Correlo ve ark., eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile elde ettikleri PBAT-kitosan doku iskelelerinin gözenekliliğinin, kullandıkları tuz parçacıklarının miktarına göre %55-75 arasında değiştiğini belirtmişlerdir [105]. Kullandıkları tuz miktarını %20 oranında artırdıklarında, gözeneklilik oranının %55.7’den

%73.4'e yükseldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, daha büyük tuz parçacıklarının oluşturdukları gözeneklerin içsel bağlantılarının daha az olduğunu, daha küçük tuz parçacıklarının ise kümeleşerek çok büyük gözenek tabakaları oluşturduklarını belirtmişlerdir. Tez çalışması kapsamında yapılan eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işleminde ise, tuz miktarının artması polimer eriyiğinin yanması ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle optimum koşulların belirlenmesinde sabit polimer:tuz oranında (1:2.3) çalışılmıştır.

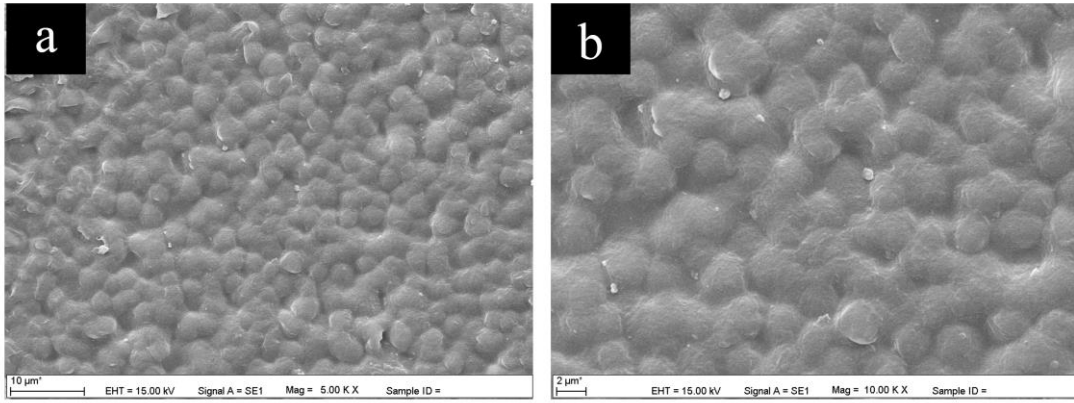
Isı kaynağının değiştirilmesi, gözenek morfolojisini etkilememiştir. Fırın içerisinde eritilen doku iskelelerinde, ısı aktarımının kontrolü daha zor olmuş ve oluşan ürünlerde yanma meydana gelmiştir. Bu nedenle, polimerin yüzeyden ısıtılarak eritildiği yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile, ilerideki karakterizasyonlarda ve hücre kültür çalışmalarında kullanılacak doku iskelelerinin, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yönteminde olduğu gibi 200-355 µm parçacık boyut aralığındaki tuzların kullanımı ile üretilmesine karar verilmiştir (Şekil 4.12. (b)). Bu parametreler ile üretilen doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutu 236 ± 61 µm olarak hesaplanmıştır.

Literatürde, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemine yapılan çeşitli modifikasyonlar ile gözeneklilik ve içsel bağlantılı gözenek oluşumunun arttırılabileceği belirtilmiştir [53-55]. Bu yöntemler Bölüm 2.1.4.2'de açıklanmıştır.

4.2.4. Çözücü buharlaştırma işlemi ile ince film üretimi

Karakterizasyon ve hücre kültür çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılmak üzere, doku iskelelerine ek olarak çözücü buharlaştırma yöntemi ile gözeneksiz ince filmler üretilmiştir. Üretilen filmlerin SEM görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir.

Şekilde görüldüğü gibi, PBAT ince filmler mikro skalada pürüzlü bir morfolojiye sahiptir. Elde edilen filmlerin kalınlığı yaklaşık 400 µm'dir.



Şekil 4.13. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen PBAT ince filmlerin SEM görüntüleri (Büyütmeler: a: 5,000x, b: 10,000x)

4.2.5. Gözeneklilik ölçümü

Doku iskelelerinin gözeneklerinin içsel bağlantılı olması, boyutları ve gözeneklilik oranı, hücrelerin doku iskelelerinin iç kısmına geç edebilmesi, besinlerin ve hücre atıklarının taşınımı açısından önem taşımaktadır [40]. *In vivo* kemik rejenerasyonu için, kemik doku iskelelerinin gözenek boyutunun 50-1000 µm aralığında olması ve %40-60'tan yüksek gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir.

Çalışma kapsamında, farklı yöntemlerle üretilen doku iskelelerinin gözenek boyutları ve gözeneklilikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, gravimetrik yöntem ile yapılan gözeneklilik ölçümü sonucunda, çözücü buharlaştırma ile üretilen ince filmler gözeneksiz yapıdayken, diğer 3 yöntem ile üretilen doku iskelelerinin gözeneklilik oranlarının, gerekli minimum değerden yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları

Fabrikasyon Yöntemi	Gözenek Boyutu (µm)	Gözeneklilik (%)
Çözücü buharlaştırma	-	-
Elektroçirme (2 boyutlu)	12 ± 4	85.6 ± 3.7
Çözücü buharlaştırma - parçacık uzaklaştırma	283 ± 62	90.0 ± 1.7
Eriyik kalıplama - parçacık uzaklaştırma	236 ± 61	62.0 ± 5.8

Her iki parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskeleleri, kemik rejenerasyonu için gerekli olan gözenek boyutunu sağlamaktadır. 2D fibröz matrislerde, oldukça yüksek gözeneklilik sağlanmış olsa da, yüksek gözenek boyutları elde edilememiştir (ortalama 12 µm). Düşük gözenek boyutları, hücrelerin iç kısımlara göç etmesini engellemektedir. Fibröz matrislerin gözenek boyutu ve gözenekliliği, 3D elektroegirme yöntemleri ile artırılmaktadır [75].

4.2.6. Su alım kapasitesi ölçümü

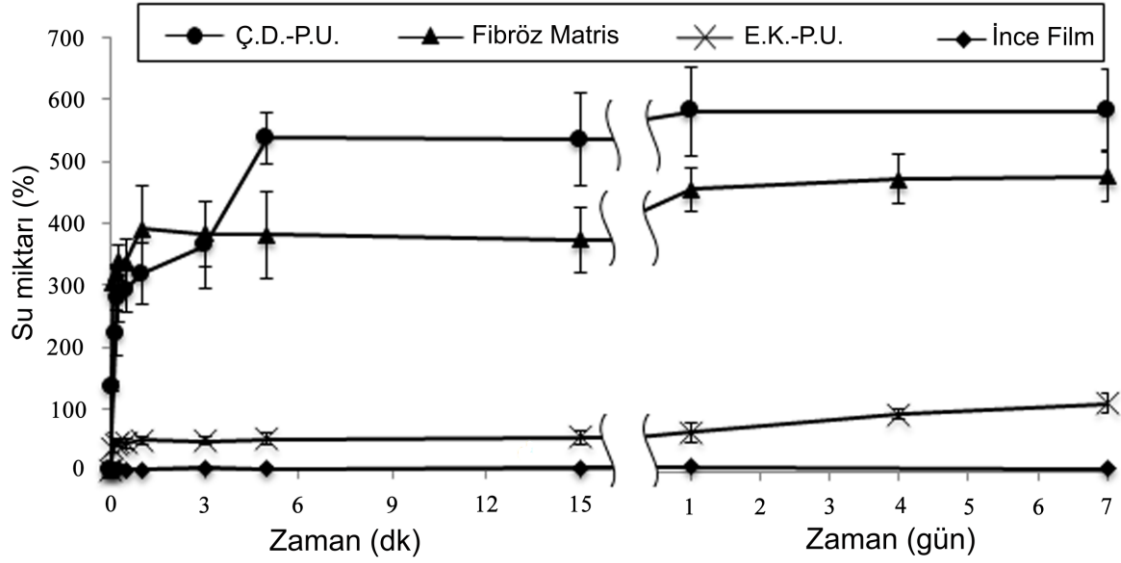
Doku iskelelerinin denge durumundaki su alım kapasiteleri, Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. PBAT biyomalzemelerin su alım kapasiteleri

Doku iskeleleri	Denge durumundaki su miktarı (%)
İnce film	4 ± 3
Fibröz matris	475 ± 42
Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	578 ± 62
Eriyik kalıplama-paracık uzaklaştırma	110 ± 17

Doku iskelelerinin denge durumunda içerdikleri su miktarları, gözeneklilikleri ile doğru orantılı olarak bulunmuştur. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin, tüm gruplar arasında en yüksek su alım kapasitesine sahip olduğu görülmektedir (%578 ± 62). Bunun nedeni, bu yöntem ile üretilen doku iskelelerinin esnekliğinin, gözeneklilik oranının ve gözeneklerin içsel bağlantılarının daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanında, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinin, sıkı bir yapıya, düşük gözenekliliğe sahip olması ve gözeneklerinin içsel bağlantılarının az olması, diğer gruplarla karşılaştırıldığında yapılarına daha az su almasına neden olmuştur (%110 ± 17).

Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin yanı sıra, fibröz matrislerin su alım kapasitelerinin de yüksek oranlarda olduğu görülmektedir (%475 ± 42). Benzer şekilde, fibröz matrislerin yüksek gözenekliliği ve esnekliği, yapılarına kısa sürede fazla miktarda su alabilmelerini sağlamıştır.



Şekil 4.14. Doku iskelelerinin absorpladığı su miktarının zamanla değişimi. (Ç.D.-P.U: çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, E.K.-P.U.: eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri).

Şekil 4.14’te, doku iskelelerinin su alım kapasitelerinin zamana göre değişim grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile elde edilen doku iskeleleri, daha yüksek gözenekliliği sayesinde diğer doku iskelelerinden daha hızlı dengeye ulaşmıştır. Benzer şekilde, elektroegirme ile üretilen 2D fibröz matrisler, yüksek gözenekliliği ve esnekliği sayesinde dakikalar mertebesinde dengeye ulaşmıştır. Ancak, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri, sıkı yapıları nedeniyle 1 hafta gibi uzun bir sürede dengeye ulaşmıştır. Son olarak, çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen PBAT ince filmlerin su alım kapasiteleri, gözeneksiz olmaları ve PBAT’ın hidrofobik yapısından dolayı, sıfıra yakın bulunmuştur.

4.2.7. Su temas açısı analizi

Doku iskelelerinin ıslatılabilirlik özellikleri, ekilen hücrelerin tutunması ve dağılımı açısından önem taşımaktadır. Doku iskelelerinin ıslatılabilirliği, su temas açısı ölçümü ile değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 4.3.’te sunulmuştur.

Çizelgede görüldüğü gibi, 71°’lik su temas açısına sahip PBAT ince filmler, ortalama derecede ıslatılabilirliğe sahiptir. Yapılan çalışmalar, hücre etkileşimlerinin ortalama ıslatılabilirliğe sahip yüzeylerde, yüksek derecede hidrofilik veya hidrofobik yüzeylere göre daha iyi olduğunu göstermektedir. Tamada ve Ikada, 70°’lik temas açısına sahip polimerik malzemelerin, protein adsorpsiyonu ve hücre tutunması için optimum ortamı sağladığını belirtmiştir [134].

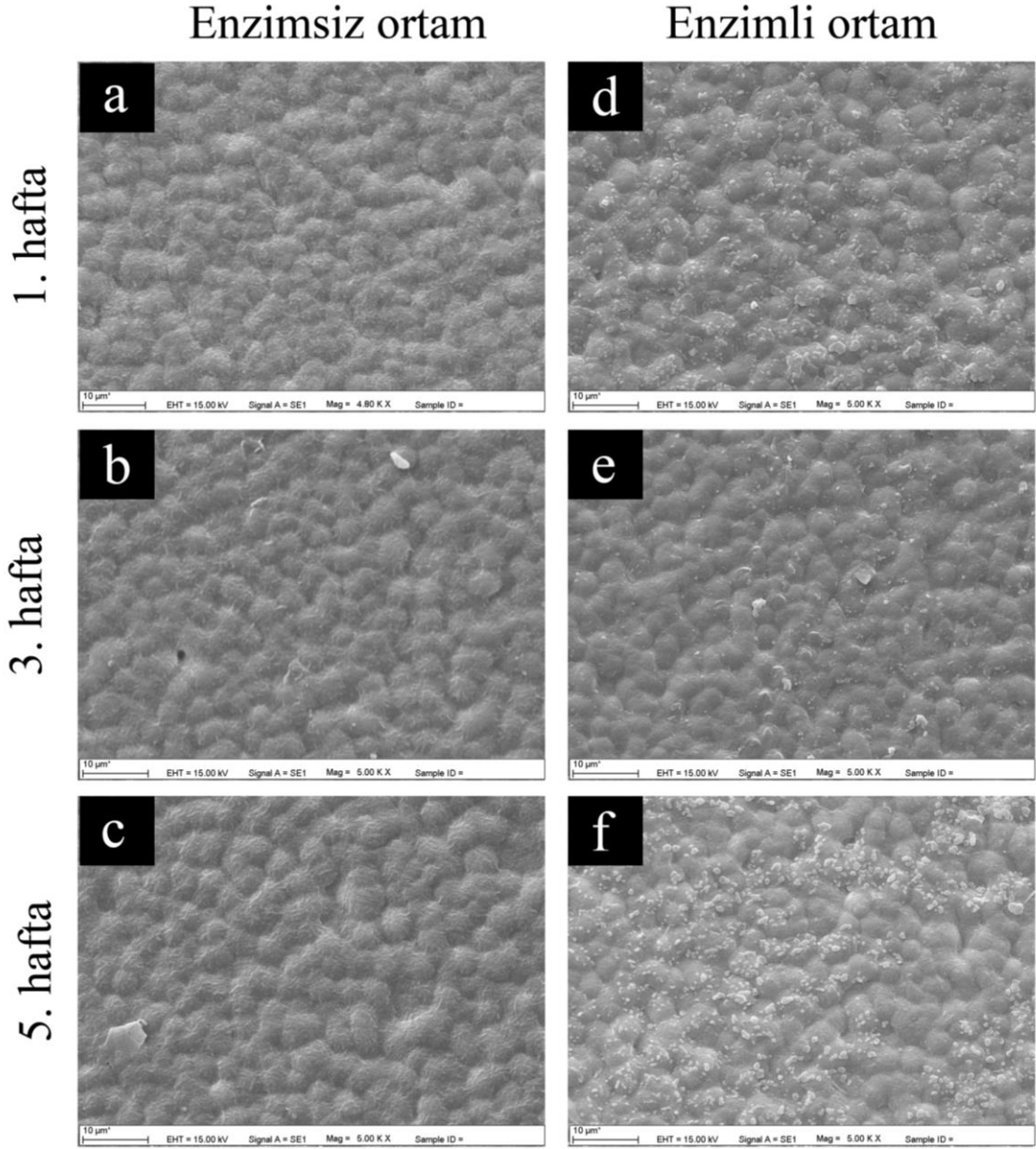
Gözenekli yapıya sahip olan nanofibröz matrisler ve parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskelelerinde, su temas açısı sıfır olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, doku iskelelerinin gözeneklerinin, yapıların iç kısmına olan su geçişine izin verdiğini göstermektedir.

Çizelge 4.3. PBAT doku iskelelerinin su temas açısı değerleri

Fabrikasyon yöntemi	Su temas açısı (°)
Çözücü buharlaştırma	71.0 ± 1.6
Elektroegirme	0
Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	0
Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma	0

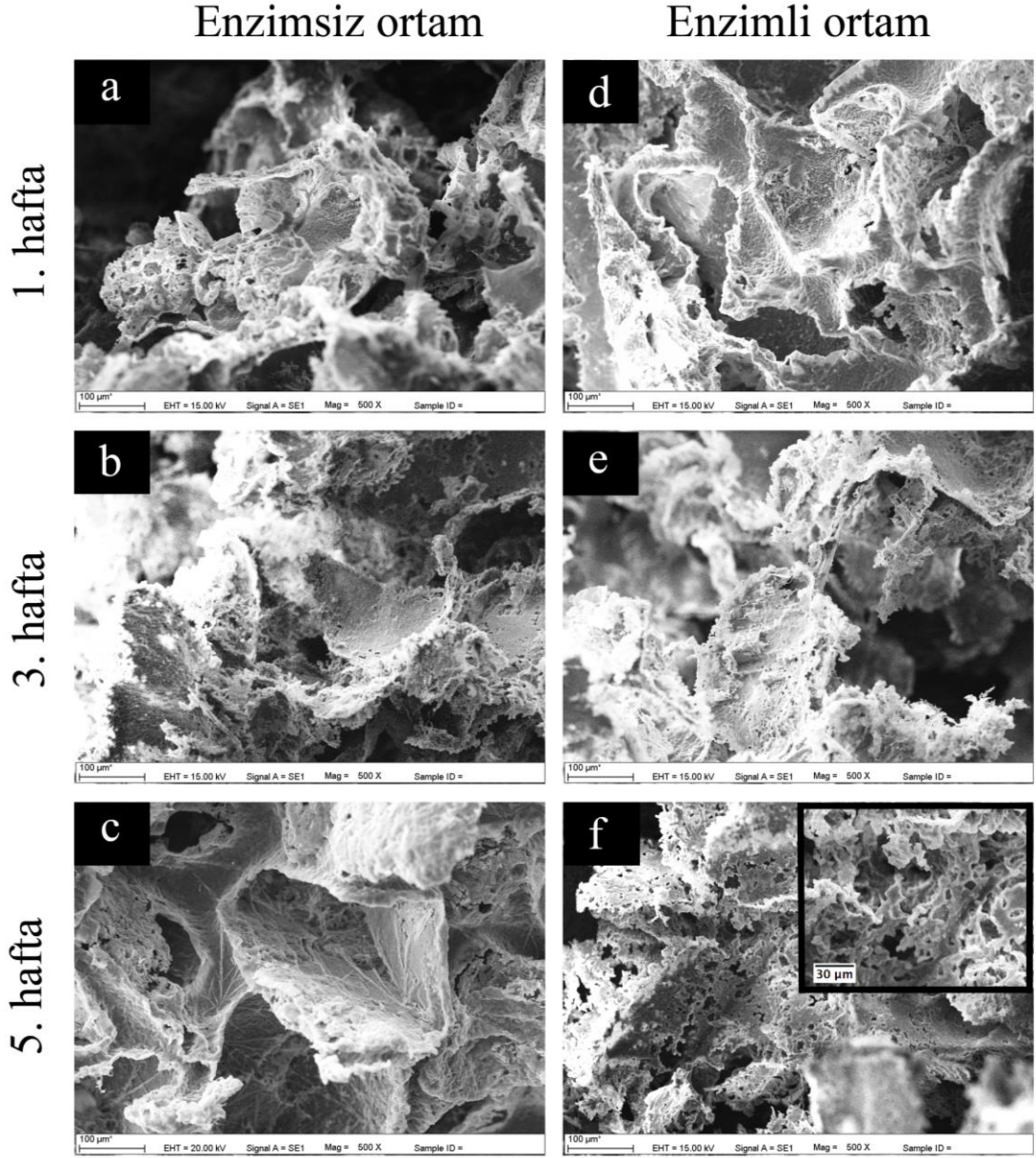
4.2.8. Enzimatik bozunma testleri

İnce filmlerin ve çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin bozunurlukları, SEM analizi ile morfolojik olarak incelenmiştir. Şekil 4.15'te, bozunurluğunun 1., 3. ve 5. haftasında ince filmlerin SEM görüntüleri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, ince filmlerin yüzeyinde, bozunmaya bağlı herhangi bir deformasyon görülmemektedir. Yüzeyde beliren parçacıklar, bozunma ortamındaki enzim (lipaz) kristallerine aittir (Şekil 4.15 d-f).



Şekil 4.15. PBAT ince filmlerin bozunma sonucu SEM görüntüleri: (a-c) enzimsiz ortamdaki filmler, (d-f) enzimli ortamdaki filmler. (a,d) 1. hafta, (b,e) 3. hafta ve (c,f) 5. hafta (büyütme: 5000x)

Bunun yanında, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin yapısında oluşan delinmeler, özellikle 5. hafta sonunda iskelelerin bozunmaya uğradığını işaret etmektedir (Şekil 4.16). Teorik olarak enzimler, polimer matrise difüze olamamakta, bu nedenle bozunmayı yüzeyde gerçekleştirmektedir. Bu sürece “yüzey erozyonu” da denmektedir [135]. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin yüksek gözenekliliğe ve dolayısıyla yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması, ince filmlerle karşılaştırıldığında daha hızlı bozunmasını sağlamıştır.



Şekil 4.16. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen PBAT doku iskelelerinin bozunma sonucu SEM görüntüleri (büyütmeler: 500x)

Lin ve ark., PBAT ve TiO₂ parçacıkları içeren PBAT membranların enzimatik ortamda biyobozunurluklarını incelemişlerdir . Sonuç olarak, %18 oranında TiO₂ katkısının PBAT membranların bozunurluğunu yaklaşık olarak %1.5'tan %5'e çıkardığını gözlemlemişlerdir [136].

Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinin yüzeyinin, lipaz içermeyen PBS ortamında da pürüzlü bir şekil alması, hidrolitik bozunmaya uğradığını göstermektedir (Şekil 4.16. c). Fakat, ortamda bozunmayı katalizleyen enzimin

bulunmaması nedeniyle, bozunma hızı daha düşük kalmakta ve bozunma enzimatik ortamda olduğu gibi belirgin olmamaktadır.

In vitro testlerin verdiği sonuçlardan yola çıkılarak, PBAT'ın *in vivo* ortamda da bozunmaya uğrayacağı öngörülebilir. Fakat, literatürde henüz bu konuda yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

4.2.9. Mekanik dayanım testleri

Doku iskeleleri, implantasyondan sonra maruz kalacağı kuvvetlere dayanıklı olmalıdır. Bu nedenle, doku iskelesi üretiminde kullanılan malzemelerin mekanik dayanımı önem taşımaktadır [137]. Yapılan mekanik dayanım testleri sonucu elde edilen PBAT doku iskelelerinin mekanik özellikleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. PBAT doku iskelelerinin mekanik özellikleri

Fabrikasyon yöntemi	Çekme direnci (MPa)	Sıkıştırma direnci (MPa)	Modülüs (MPa)
Çözücü buharlaştırma	5.70 ± 0.62	-	45.00 ± 4.70
Elektroçirme	1.35 ± 0.20	-	9.60 ± 0.97
Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	-	0.75 ± 0.00	0.08 ± 0.01
Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma	-	8.80 ± 6.10	2.46 ± 1.90

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri diğer malzemeler ile karşılaştırıldığında daha yüksek mekanik dayanıma sahiptir (8.80 ± 6.10 MPa). Ayrıca, bu doku iskelelerinin sıkıştırma direnci, kanselöz kemiğin sıkıştırma direnci ile (2-12 MPa) benzerdir [138]. Bir doku iskelesinin gözenekliliği arttıkça, mekanik dayanımı azalır. Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik dayanım özelliklerinin daha yüksek bulunması, bu iskelelerin fabrikasyon sırasında çözücü ile işlem görmemeleri ve düşük gözeneklilikleri ile ilişkilendirilebilir.

Sert dokuların rejenerasyonu için kullanılan doku iskelesinin modülüs değeri 10 ile 1500 MPa arasında olmalıdır [139]. Tüm doku iskelelerinin modülüs değerleri, olması gereken değerden düşük olsa da, yapılan modifikasyonlar ile mekanik dayanımları artırılabilir. Bu amaçla, PBAT malzemeler hidroksiapatit gibi seramikler veya montmorillonit gibi nanokil malzemeler ile modifiye edilerek mekanik özellikleri artırılmaktadır [12,106]. Fukushima ve ark., eriyik kalıplama ile ürettikleri gözeneksiz PBAT malzemelerin yapısına çeşitli nanokilleri ekleyerek PBAT'ın basma direncini 1.34 MPa'dan 10-17 MPa'a, modülüs değerini ise 0.1 MPa'dan 0.21-0.25 MPa'a yükseltmişlerdir [12].

2D PBAT malzemeler incelendiğinde, ince filmlerin çekme direnci 5.7 MPa, elastik modülü 45 MPa, fibröz matrislerin ise çekme direnci 1.35 MPa, modülü 9.6 MPa olarak bulunmuştur. Grubumuzda daha önceden yapılan bir çalışmada, PCL nanofibröz membranların mekanik özellikleri incelenmiş ve elastik modülü 21.4 MPa olarak ölçülmüştür [140]. Genel olarak PCL ve PLA gibi alifatik poliesterler, alifatik-aromatik kopoliesterler ile karşılaştırıldığında daha kırılğan ve sıkı bir yapı gösterir. Bundan dolayı, alifatik poliesterlerin çekme direnci ve modülüs vb. mekanik karakteristikleri, PBAT gibi alifatik-aromatik kopoliesterlere göre daha yüksek iken, kopma anındaki uzama gibi elastik özellikleri ise daha düşüktür. PBAT, alifatik poliesterlerin kırılğan yapılarını azaltmak ve bükülebilirliklerini artırmak için sıklıkla karışım malzemesi olarak kullanılmaktadır.

Kemiğin organik kısmı son derece esnek ve bükülebilir özelliğe sahiptir. Bu nedenle, PBAT gibi yüksek derecede esnekliğe sahip polimerler, biyoaktif seramikler gibi kırılğan yapılarla desteklendiğinde kemiğin doğal yapısına benzer, yeterli mekanik özelliklere sahip doku iskeleleri üretilebilir.

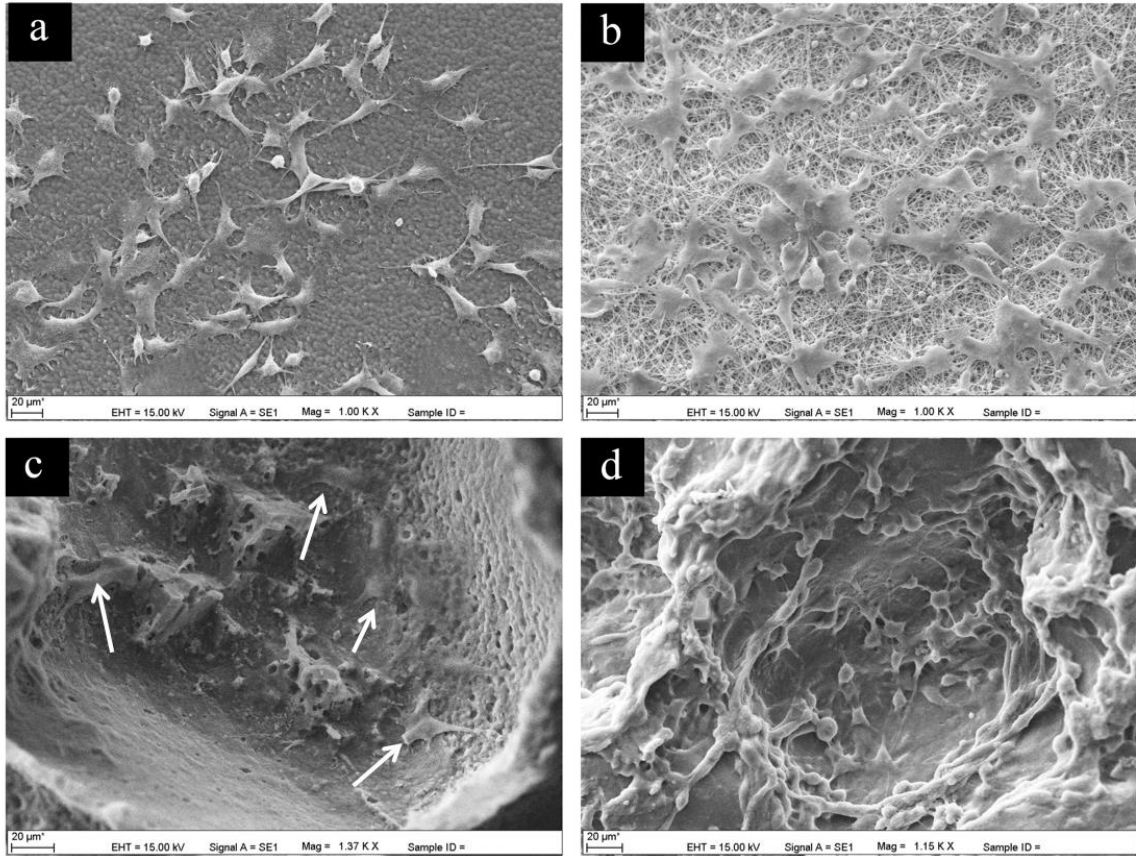
4.3. MC3T3-E1 preosteoblast hücreleriyle yapılan kültür çalışmaları

İnce film, fibröz matris ve parçacık uzaklaştırma teknikleriyle üretilen doku iskeleleri ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmasında, ikilenme süresi 36 saat olan, 6. pasajdaki MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin tutunmaları ve çoğalmaları SEM analiziyle morfolojik olarak incelenmiştir.

4.3.1. SEM analizi

SEM analizi, hücre yapışmasını ve çoğalmasını/canlılığını belirlemek üzere hücre kültür çalışmasının 4., 24. saatinde ve 11. gününde gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmasının 4. saatinde, PBAT doku iskelelerinin yüzeyindeki hücrelerin morfolojileri Şekil 4.17'de görülmektedir.

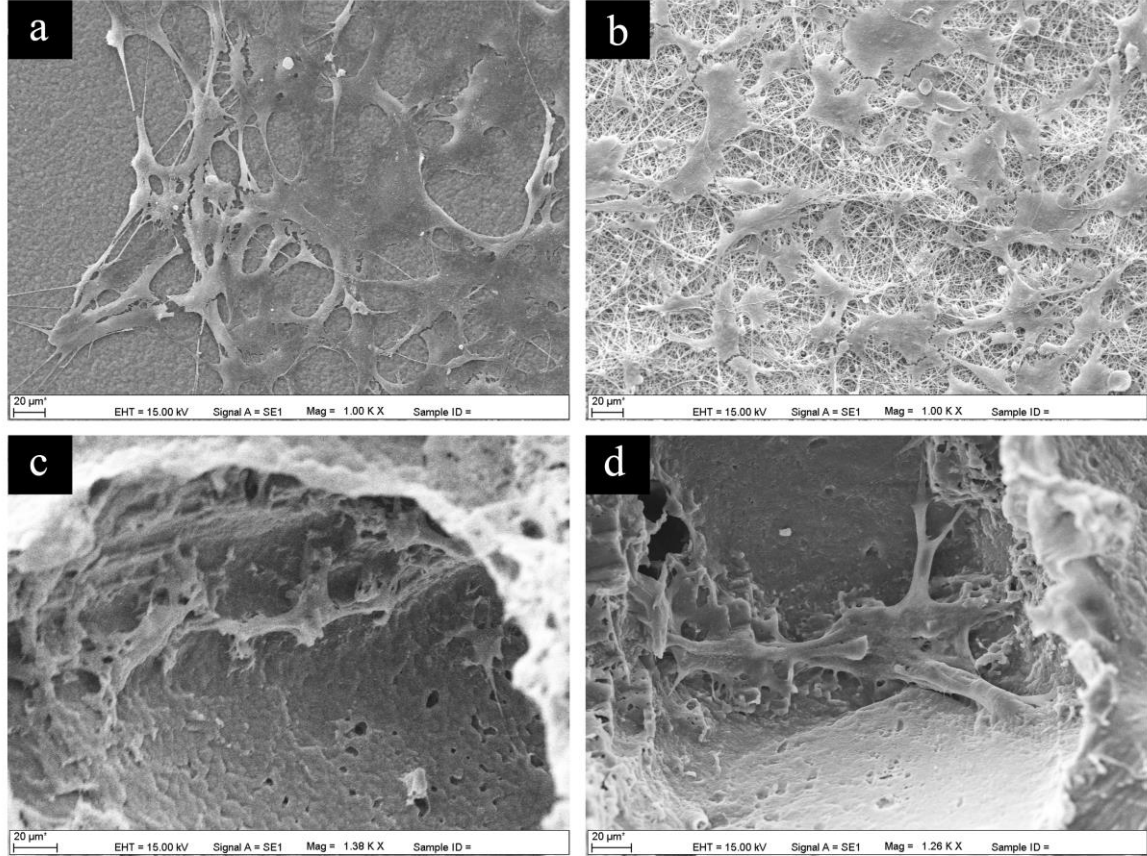
Hücre kültürünün 4. saatinde, tüm doku iskelelerinin yüzeyinde hücre tutunmasının gerçekleştiği gözlenmektedir. Hücrelerin tutunmasının ve yayılmasının en iyi fibröz matrislerin (Şekil 4.17 b) yüzeyinde gerçekleştiği, oluşturdukları uzantılarla hücre-hücre iletişiminin sağlandığı görülmektedir. Diğer doku iskelelerinde de hücre yapışması sağlanmış, bununla birlikte fibröz matrislerle karşılaştırıldığında hücre yayılımlarının görece daha yavaş olduğu ve halen küresel yapıda hücrelerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17 a, c ve d).



Şekil 4.17. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 4. saat SEM görüntüleri: (a) İnce film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a-b) 1,000x, (c) 1,370x ve (d) 1,150x)

Yüzey yapısı, hücre tutunmasını ve yayılımını doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Kültür sırasında ilk meydana gelen olay, serum proteinlerinin yüzeye yapışmasıdır. Hücrelerin yüzeye tutunması ise yüzeye tutunmuş proteinler ile sağlanır. Çalışmada, hücre yayılımlarının, fibröz matrislerde daha hızlı olması, yüzey yapısı ile açıklanabilir. Fibröz matrisler, diğer doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek yüzey alanına sahiptir ve bu nedenle daha çok miktarda serum proteininin adsorpsiyonunu

sağlamıştır. Bu da, hücrelerin tutunma sürecini hızlandırmıştır [141]. Woo ve ark., yaptıkları çalışmada PLLA'dan ürettikleri nanofiberlere ve düz yüzeylere yapışan protein miktarlarını karşılaştırmıştır [142]. Nanofiber yüzeylere yapışan serum proteinleri miktarının düz yüzeylere göre 2.6-3.9 kat daha fazla olduğunu, yüzeye tutunan hücre sayısının ise nanofiberlerde 1.7 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.18. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 24. saat SEM görüntüleri: (a) İnce film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a-b) 1000x, (c) 1380x ve (d) 1260x)

Hücrelerin, kültür çalışmasının 24. saatindeki morfolojileri Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kültürün 24. saatinde, hücrelerin bütün doku iskelelerinin yüzeylerinde yayıldığı, birbirinden ayrık hücre morfolojilerinin kaybolduğu ve oluşturulan sitoplazmik uzantılarla hücreler arası etkileşimin sağlandığı görülmektedir.

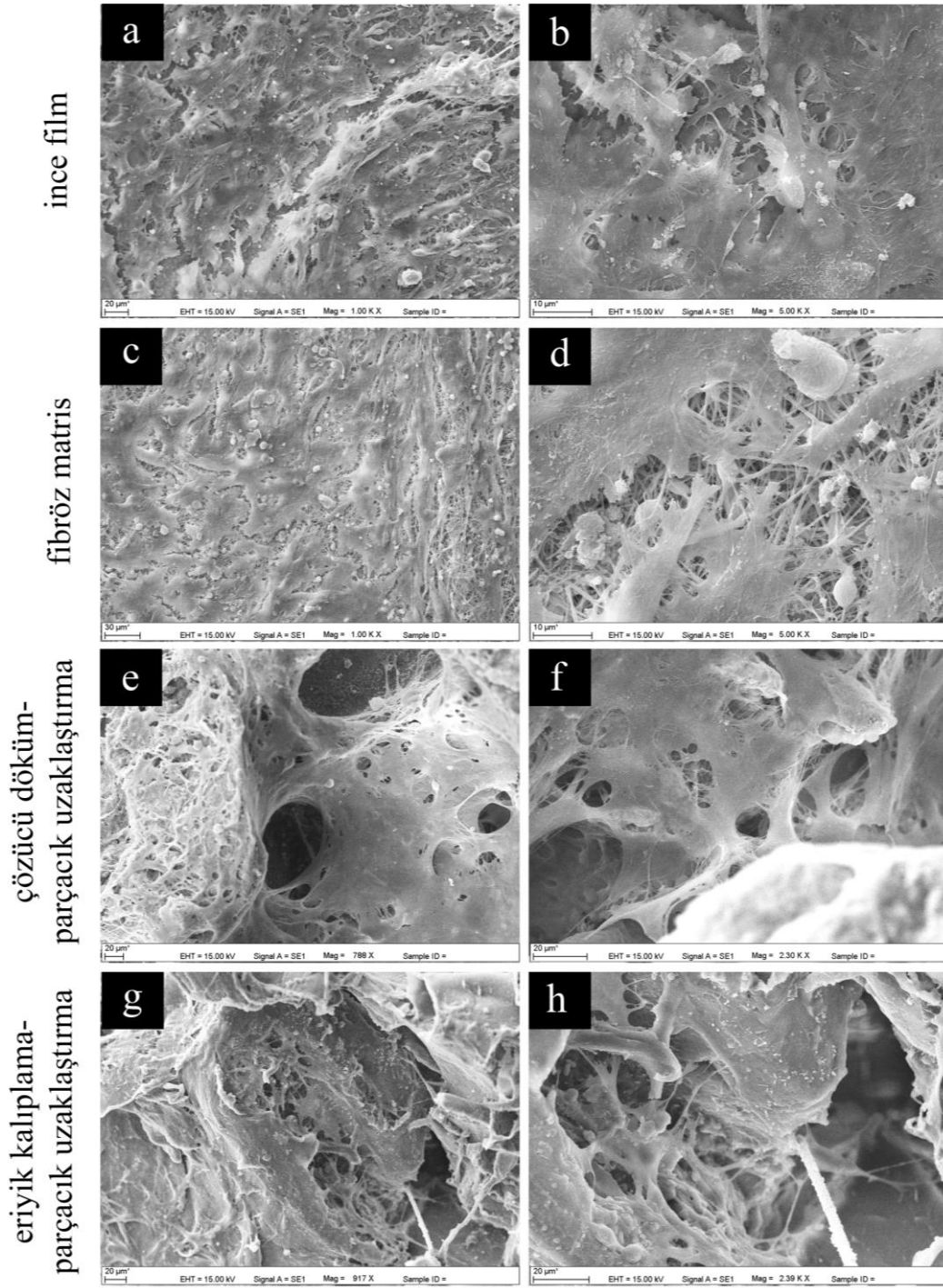
Hücrelerin, kültür çalışmasının 11. günündeki morfolojileri Şekil 4.19'da görülmektedir. Kültürün 4. saatinde fibröz matrislerdeki hücre yayılımının daha hızlı olduğu gözlenirse de, 11. günün sonunda tüm iskelelerde hücre yoğunluğunun büyük oranda arttığı ve doku iskelelerinin neredeyse tüm yüzeyinin hücreler ve hücrelerin oluşturduğu ECM ile

kaplandığı görülmektedir. Hücrelerin sentezlediği kollajen fibriller, Şekil 4.19 (b, d, f ve g)' de belirgin olarak görülmektedir.

Parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerinin yüzeyindeki hücrelerin, gözenekleri kapatmadan iç bölgelere doğru yayılabildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.19 e ve g). Böylece, parçacık uzaklaştırma teknikleri ile üretilen 3D doku iskelelerinin sahip olduğu gözeneklerin boyut aralığının (200-355 µm) osteoblastik hücre infiltrasyonu için yeterli olduğu anlaşılmaktadır. İki boyutlu fibröz matrislerde ise, hücresel tabakanın gözeneklerin üzerini kapatarak tüm yüzeyi kapladığı gözlenmiştir (Şekil 4.19 (c)). Bunun nedeni, 2D fibröz matrislerin gözenek boyutunun (12 µm) MC3T3-E1 preosteoblastik hücrelerin infiltrasyonu için yetersiz kalmasıdır. İki boyutlu elektroçizme yönteminde, fiberler toplayıcıda yoğun tabakalar halinde biriktirildiği için, matrislerin gözenek boyutu yetersiz kalmaktadır. İki boyutlu fibröz matrislerin gözenek boyutu, 3 boyutlu üretim teknikleri ile artırılabilir.

Üç boyutlu doku iskeleleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskelelerindeki hücre yoğunluğunun eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen iskelelere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma işleminde iskeleler toksik organik çözücü ile işlem görmelerine rağmen, eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskelelerine göre hücreler için daha iyi tutunma ve çoğalma ortamı sağlamıştır. Bu sonuç, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin daha pürüzlü yüzey yapısı ve daha yüksek gözenekliliğe sahip olması ile açıklanabilir.

MC3T3-E1 preosteoblast hücreleriyle yapılan hücre kültür çalışması sonucunda, tüm PBAT doku iskelelerinin herhangi bir biyoaktif ajanla modifiye edilmediğinde dahi hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği gözlenmiştir. PBAT'ın ıslatılabilirlik derecesi ve doku iskelelerinin pürüzlü yüzey yapıları hücrelerin tutunması için uygun bir ortam sağlamıştır. Bir malzemenin yüzey yapısı, hücrelerin tutunma ve çoğalmasında etkili olacağı gibi, farklılaşmasını da etkileyen bir faktördür [143].



Şekil 4.19. MC3T3-E1 preosteoblast hücre kültürünün 11. gün SEM görüntüleri: (a) ince film, (b) fibröz matris, (c) çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve (d) eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri (Büyütmeler: (a,c) 1,000x, (b,d) 5,000x, (e) 788x, (f,h) 2,300x ve (g) 917x)

MC3T3-E1 preosteoblastlar ile yürütülen kültür çalışması sonucunda, fibröz matrislerin hücre tutunması ve yayılmasını görece daha iyi desteklediği görülmüştür. Fakat, 2D fibröz matrislerin gözeneklerinin hücre infiltrasyonu için yeterince büyük olmadığı, bu nedenle hücrelerin yüzeyi kapladığı ve iç kısımlarda çoğalamadığı görülmüştür. Hücrelerin iskelenin yüzeyinde ve derinliğinde daha homojen olarak dağılabilmesi için, daha büyük gözenekli 3D fibröz matrislere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, çalışmanın ikinci kısmında ıslak elektroğirme yöntemi ile 3D fibröz matrisler üretilmiş, hücrelerin çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri bu matrislerde incelenmiştir.

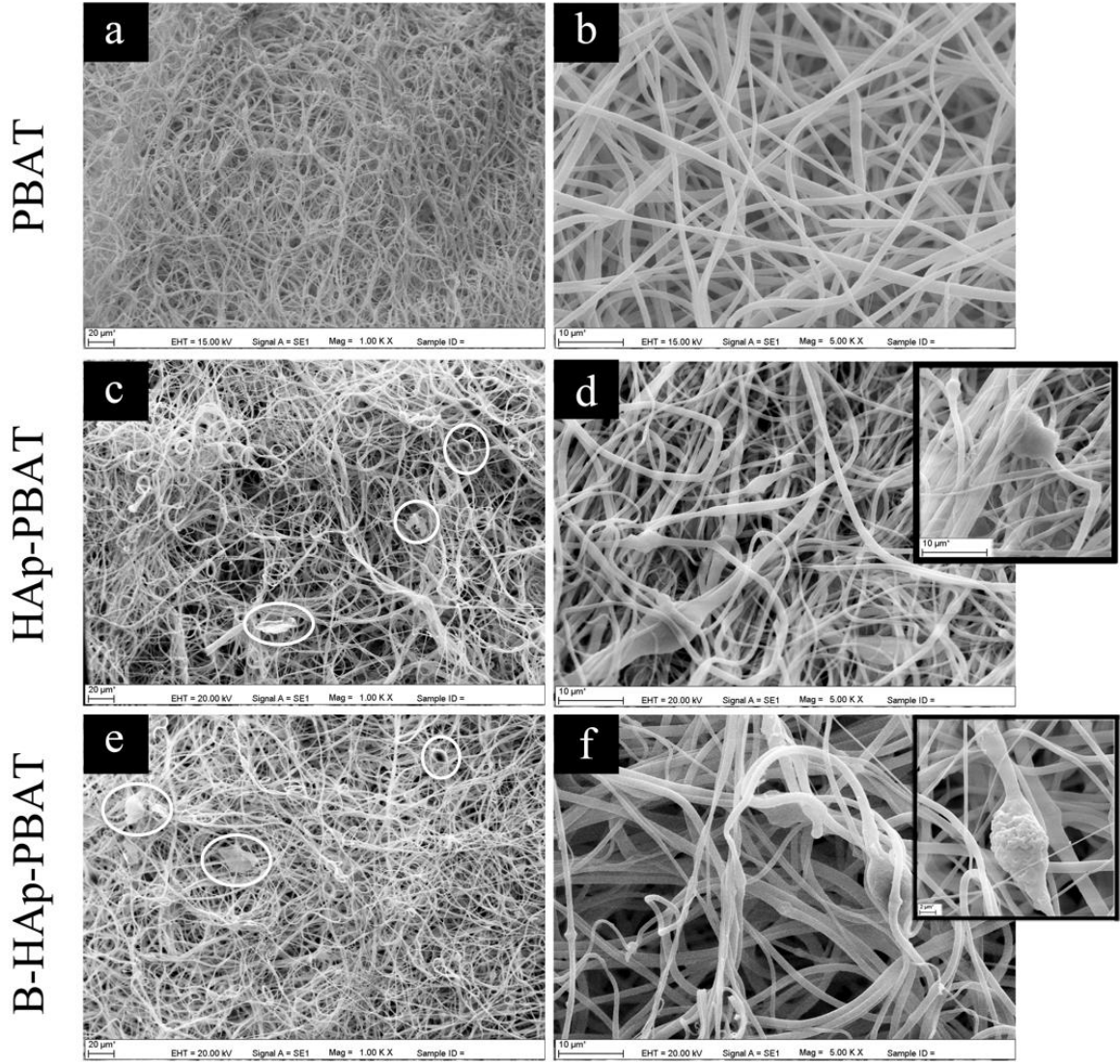
4.4. Islak elektroğirme ile 3D fibröz matrislerin üretimi

Islak elektroğirme yöntemi ile üretilen PBAT fiberlerin yapısına, osteoindüktivitenin artırılması amacı ile hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) parçacıkları eklenmiştir. Islak elektroğirme yöntemi ile üretilen doku iskeleleri, Şekil 4.20’de görüldüğü gibi yaklaşık 2.5 mm kalınlığa sahiptir.



Şekil 4.20. Islak elektroğirme ile üretilen PBAT doku iskelelerinin (a) yatay ve (b) dikey görüntüleri

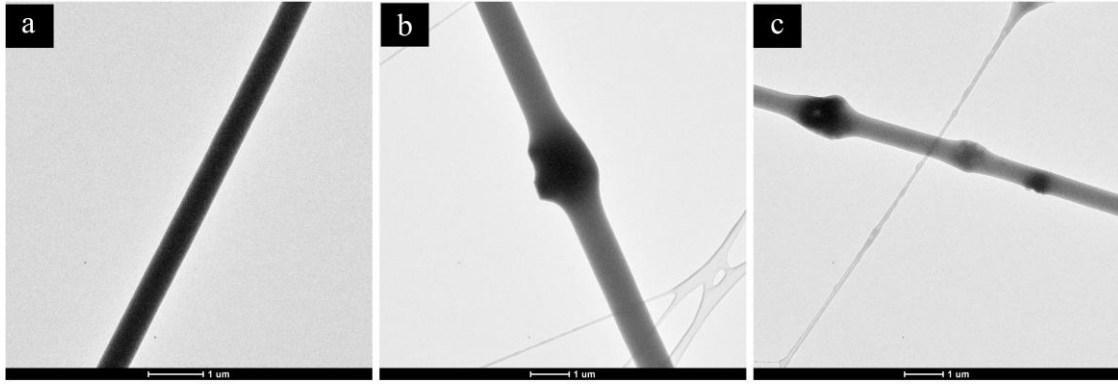
PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fiberlerin SEM görüntüleri ise Şekil 4.21’de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, ıslak elektroğirme yöntemi ile üretilen PBAT fiberler, düzgün morfolojiye sahip olup boncuk içermemektedir. PBAT fiberlerin yapısına HAp ve B-HAp parçacıklarının katılması ise fiber morfolojisini etkilemiş, çap dağılımının artmasına neden olmuş ve fiberlere bazı bölgelerde pürüzlü bir morfoloji kazandırmıştır. HAp ve B-HAp parçacıkları, hem matris içerisinde serbest olarak dağılmış hem de fiberler içerisinde hapsolmuş olup, Şekil 4.21 (c) ve (e)’de beyaz çemberler ile işaretlenmiştir. Fiberler içerisinde hapsolan HAp ve B-HAp parçacıkları, TEM analizi sonucu elde edilen görüntülerde daha belirgin olarak görülmektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. Islak elektroğirme ile üretilen 3 boyutlu fibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT fiberler. (Büyütme: a,c,e: 1000x ve b,d,f: 5000x)

TEM görüntülerinde, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fiberlerin içerisinde yaklaşık 1 µm boyutlarında gömülü parçacıklar görülmektedir.

Geleneksel elektroğirme ile üretilen 2 boyutlu fibröz matrisler ve ıslak elektroğirme yöntemiyle elde edilen 3 boyutlu fibröz matrislerin fiber çapları ve gözenek boyutları Çizelge 4.5'te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.22. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fiberlerin TEM görüntüleri: (a) PBAT, (b) HAp-PBAT ve (c) B-HAp-PBAT.

Çizelge 4.5. Geleneksel elektroğirme ve ıslak elektroğirme sonucu elde edilen malzemelerin fiber çapları, gözenek boyutları ve gözeneklilik oranları

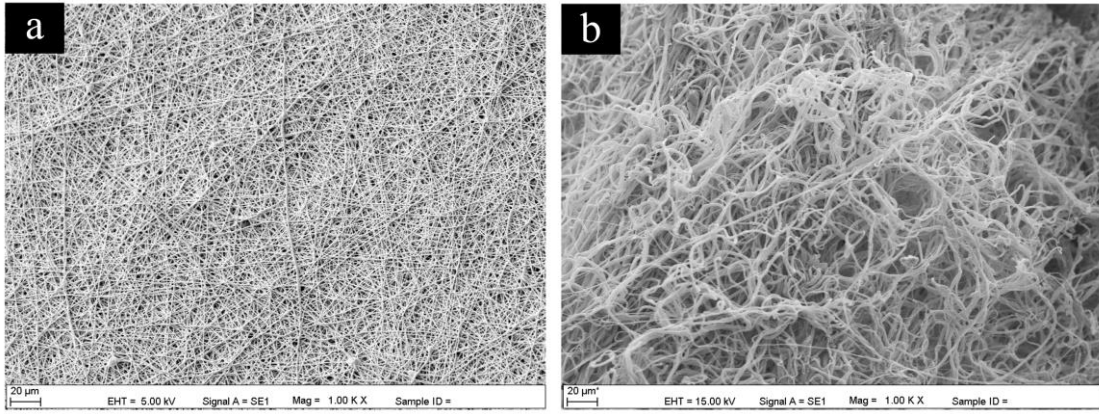
	Fiber içeriği	Fiber çapı (nm)	Gözenek boyutu (μm)	Gözeneklilik (%)	Su alım kapasiteleri (%)
2D	PBAT	569 ± 187	12 ± 4	85.6 ± 3.7	475 ± 42
3D	PBAT	898 ± 328	30 ± 22	91.2 ± 0.6	515 ± 59
	HAp-PBAT	614 ± 289	32 ± 12		587 ± 57
	B-HAp-PBAT	899 ± 351	25 ± 7		563 ± 40

3 boyutlu elektroğirme ile üretilen fiberlerin ortalama çapı, 2 boyutlu elektroğirme ile üretilen fiberlere kıyasla daha yüksektir. Bunun nedeni, 3 boyutlu elektroğirmede kullanılan PBAT çözeltisinin derişiminin (%24) 2 boyutlu elektroğirmede kullanılan PBAT çözeltisinin derişimine (%14) göre daha yüksek olmasıdır. Bunun yanı sıra, ıslak elektroğirmede elde edilen fiber çaplarının, geleneksel elektroğirme ile üretilen fiberlere göre daha yüksek olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur [85]. Fakat bu etki, hidrofilik polimerler ile üretilen fiberlerin sıvı toplayıcıda şişmesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla PBAT gibi hidrofobik polimerlerde böyle bir etki görülmeyebilir.

Islak elektroğirme ile üretilen fiberler kendi aralarında karşılaştırıldığında, HAp katkılı PBAT fiberlerin daha düşük çapa sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, HAp'ten çözeltiliye salınan iyonların çözeltili iletkenliğini etkilemesinden kaynaklanabilir. Literatürde,

fiberlerin içine gömülü mikro HAp parçacıklarının fiber çapını düşürdüğünü belirten çalışmalar mevcuttur [144].

2D ve 3D fibröz matrisler gözeneklilik açısından karşılaştırıldığında, beklendiği gibi 3D fibröz matrislerin gözenek boyutlarının yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, 3D fibröz matrislerde gözeneklilik oranı 2D matrislere göre %5 oranında daha yüksektir. Gang ve ark., geleneksel elektroğirme ile ürettikleri 2D fibröz matrislerde gözenek boyutunun $40 \pm 9 \mu\text{m}$ iken, ıslak elektroğirme ile ürettikleri 3D fibröz matrislerin gözenek boyutunun $121 \pm 12 \mu\text{m}$ 'e çıktığını belirtmişlerdir [88]. Ki ve ark., geleneksel elektroğirme ile ürettikleri matrislerin gözenekliliği %84 iken, ıslak elektroğirme ile ürettikleri 3D matrislerin gözenekliliğinin %94 oranına yükseldiğini belirtmişlerdir [85].

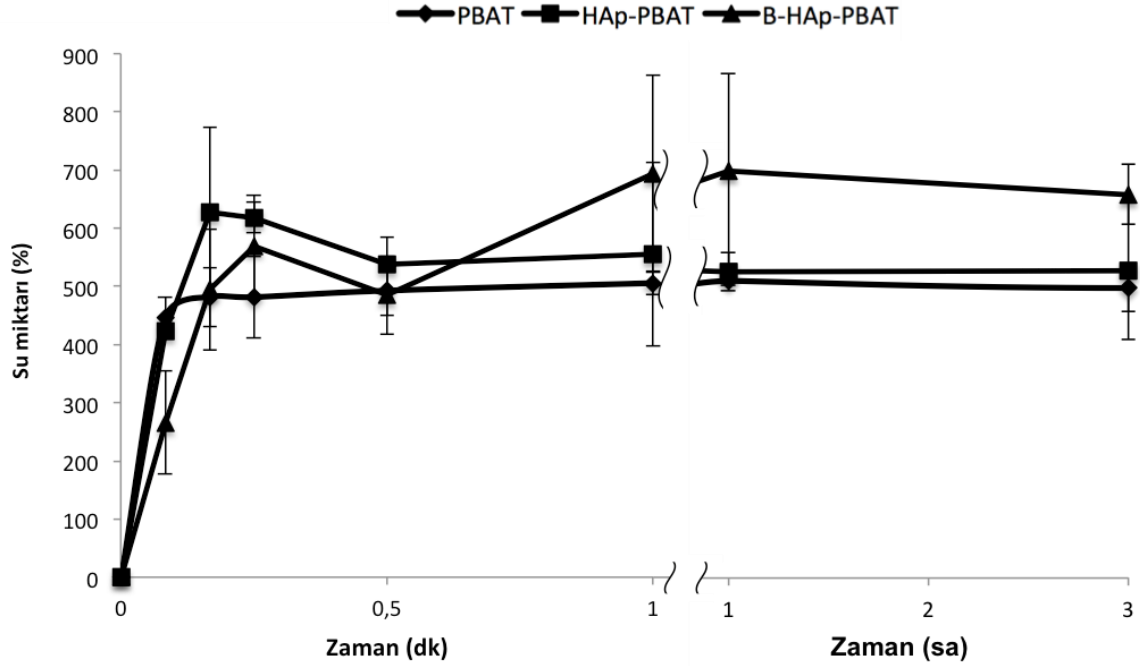


Şekil 4.23. 2 ve 3 boyutlu PBAT fibröz matrislerin SEM görüntüleri: (a) 2 boyutlu, (b) 3 boyutlu matrisler. (Büyütmeler: 1,000x)

2D ve 3D fibröz matrislerin görüntüleri eşit büyüme değerinde Şekil 4.23'te karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Şekilde, 3D matrislerin 2D matrislere göre daha büyük gözeneklere sahip olduğu belirgin olarak görülmektedir. 2D elektroğirmede yük geçişinden dolayı metal toplayıcıya yapışan fiber katmanları, yoğun bir şekilde birikerek küçük gözeneklerin oluşumuna neden olmaktadır. Sıvı toplayıcıda toplanan fiberler ise, derinlik boyunca batarak daha az yoğunlukta birikir ve daha büyük gözeneklerin oluşumuna imkan sağlar. Ayrıca, geleneksel elektroğirmede fiberler düz yüzeyde toplandığı için, fiberler sadece yatay düzlemde hizalanmaktadır. Islak elektroğirmede ise sıvı toplayıcıda biriken fiberler, derinlik boyunca da hizalanarak daha dolambaçlı bir morfolojiye sahip olmaktadır.

3D fibröz matrislerin su alım kapasiteleri incelendiğinde, daha yüksek hacimleri ve gözenekliliklerine bağlı olarak yapılarına 2D matrislere göre daha fazla miktarda su

aldıkları görülmektedir (Çizelge 4.5). 3D fibröz matrislerin su alım kapasitelerini içeren grafik, Şekil 4.24'te incelenmiştir. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp PBAT doku iskelelerinin denge durumunda içerdikleri su miktarlarının arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Bunun yanında, iskelelerin 2D fibröz matrislere benzer şekilde dakikalar içinde dengeye geldiği görülmüştür.



Şekil 4.24. 3D fibröz matrislerin absorpladığı su miktarının zamanla değişimi.

4.5. hBMSC ile yapılan kültür çalışmaları

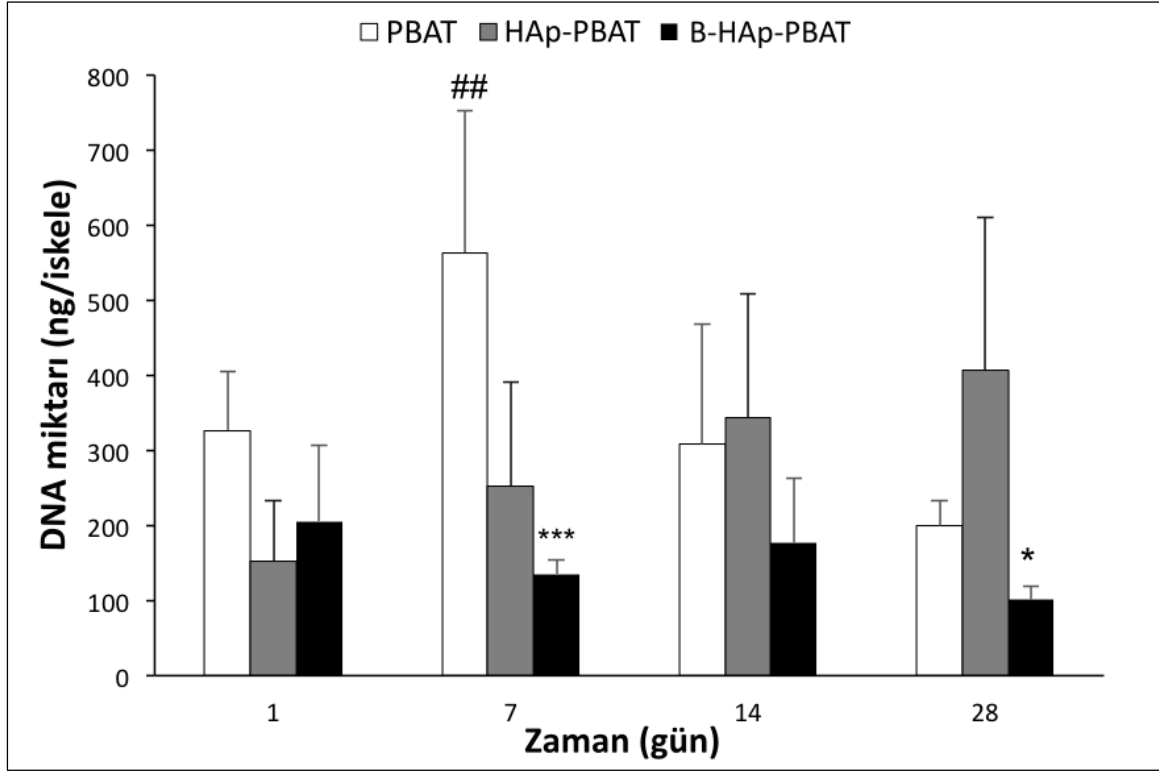
3D fibröz matrisler ile yapılan hücre kültür çalışmalarında, insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (hBMSCler) kullanılmıştır. Kullanılan hBMSCler, grubumuzda daha önce yapılan bir çalışmada insan kemik iliğinden izole edilmiş ve osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri çeşitli analizlerle incelenmiştir [129].

Bu tez çalışması kapsamında hBMSC ile yapılan 28 günlük hücre kültür çalışmalarında, hücrelerin çoğalma ve farklılaşması SEM analizi, DNA analizi, RT-PCR analizleri, kalsiyum analizi, kollajen analizi ve ALP aktivitesi tayini ile incelenmiştir.

4.5.1. Hücre çoğalmasının belirlenmesi

hBMSC'lerin PBAT bazlı doku iskelelerindeki çoğalması, kültürün 1., 7., 14. ve 28. günlerinde yapılan DNA analizi ile incelenmiştir. DNA miktarındaki değişim, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde

kültür edilen hBMSC'lerin DNA miktarlarının zamanla değişimi Şekil 4.25'te grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 4.25. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde çoğalan hBMSC'lerin DNA miktarı analizi. İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken: * $p<0.05$ ve *** $p<0.001$; kontrol grubu HAp-PBAT iken ## $p<0.01$)

Kültürün 1. gününde, PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSClerin DNA miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kültürün 7. gününde, PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerindeki hBMSC'lerin miktarında artış gözlenmiş, B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki hücrelerin DNA miktarı ise sabit kalmıştır. Kültürün 7. gününde DNA miktarında, 1. güne göre en fazla artış görülen grup PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerdir ($p<0.05$). Kültürün 7. gününde gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise PBAT doku iskelelerindeki hücrelerin DNA miktarı B-HAp-PBAT doku iskelelerine göre istatistiksel olarak fazladır ($p<0.01$). Kültürün 14. gününde, PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin DNA miktarı azalmakta ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'ler sabit kalmakta iken, HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hücrelerin DNA miktarında artış gözlenmiştir. 14. günde, gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Kültür süresi boyunca, genel olarak B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki hücre sayısı sabit kalmış, HAp-PBAT doku iskelelerindeki hücre sayısı ise artış göstererek 28. günde en yüksek değere ulaşmıştır. PBAT doku iskelelerindeki hücre sayısı 7. günden itibaren miktarsal olarak azalsa da, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Kültür çalışmasının 1. gününde, hücrelerin besi ortamı, osteojenik ortam ile değiştirilmiştir. Hücrelerin çoğalma ile farklılaşma kapasitelerinin birbirleri ile ters orantılı olduğu, farklılaşma süreci başladığında hücrelerin çoğalma potansiyelinin azaldığı bilinmektedir [145]. Hücrelerin DNA miktarının azalması veya sabit kalması, farklılaşma sürecinin başlamış olması ile açıklanabilir.

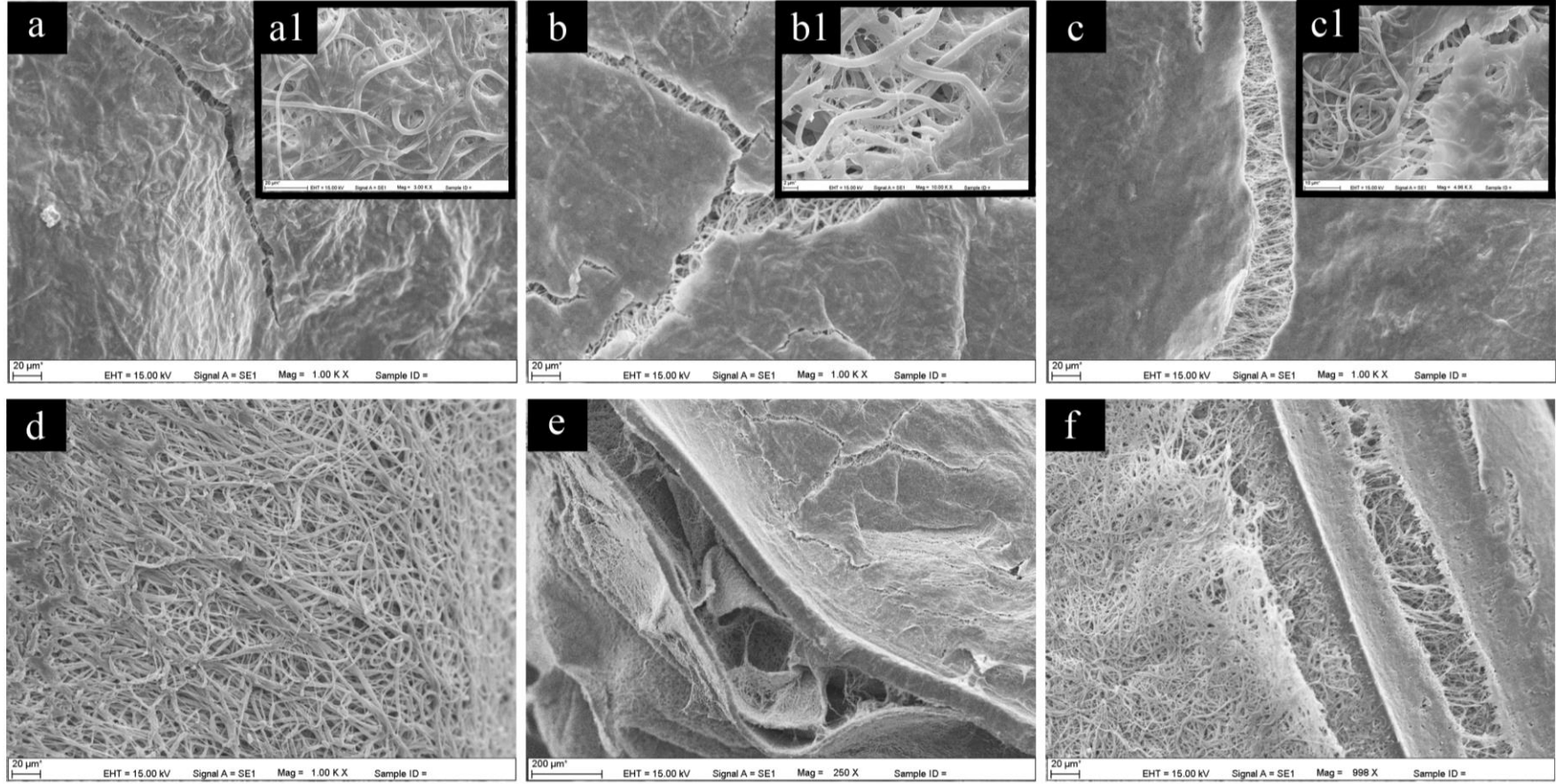
4.5.2. SEM analizi

PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskeleleri üzerinde kültür edilen hBMSClerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla kültürün 7. ve 28. günlerinde SEM analizi yapılmıştır. Kültürün 7. gününde alınan SEM görüntüleri Şekil 4.26'da verilmiştir.

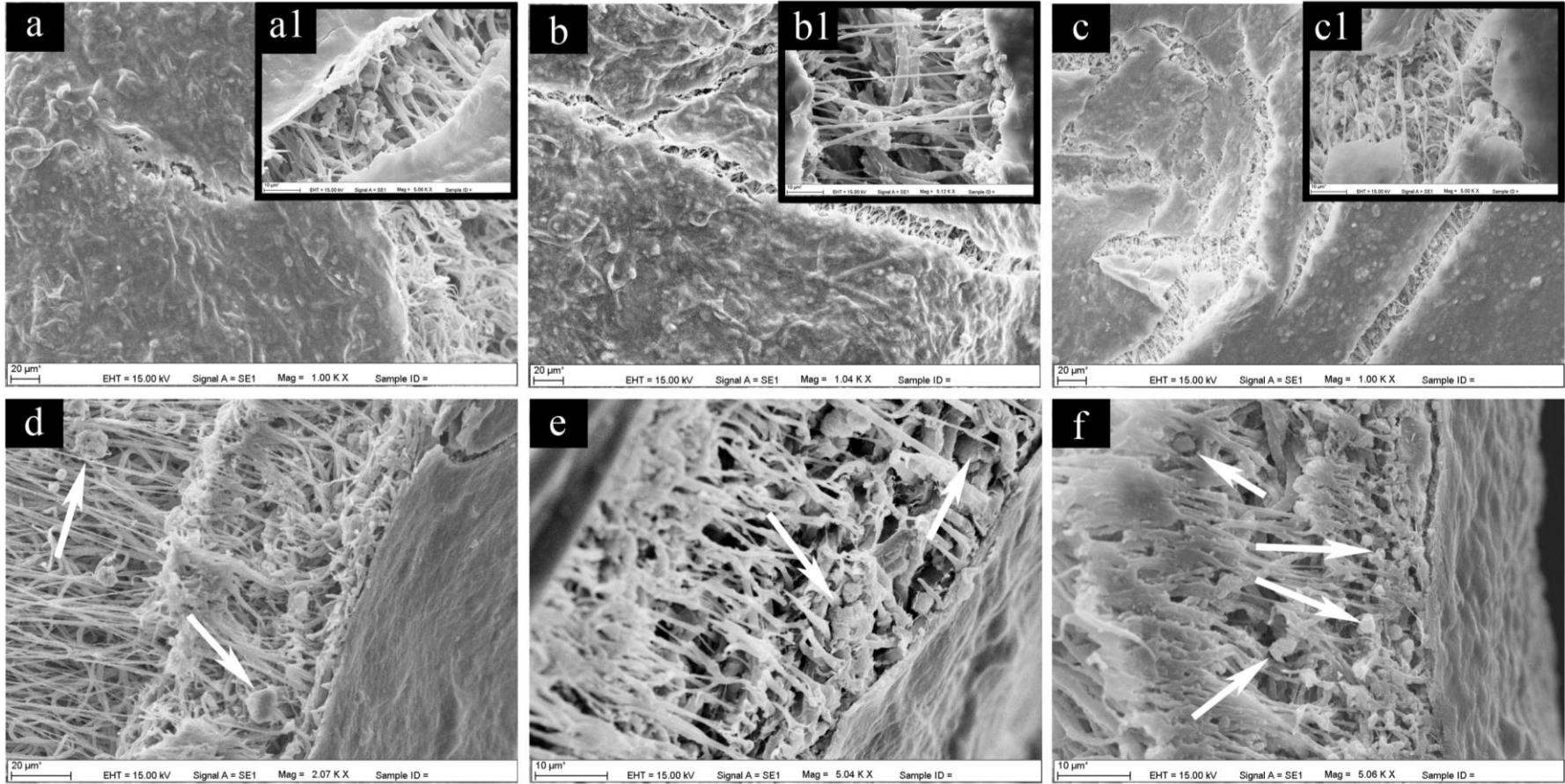
Şekil 4.26'da, hücre kültürünün 7. gününde hBMSClerin yoğun bir şekilde doku iskelelerinin tüm yüzeyini kapladığı görülmektedir. Doku iskelelerinin bazı bölgelerinde, fiberlerin iç kısmına doğru hücre yayılımı görülsede (Şekil 4.26. a1, b1 ve c1), doku iskelelerinin dikey kesitlerinden alınan görüntülerde, hücrelerin iskelelerin daha derin bölgelerinde çoğalamadığı gözlenmiştir (Şekil 4.26. b, d ve f). Bu nedenle, 3D elektroçirme yöntemi ile fibröz matrislerin gözenek boyutu yaklaşık 3 kat artırılrsa da, ortalama 30 μm 'lik gözenek boyutunun hBMSC'lerin infiltrasyonu için yeterli olmadığı görülmektedir.

Statik kültürlerde, hücreler besinini ortamdan yalnızca difüzyon yoluyla almaktadır. Bu kültürlerde, hücre ekimi sırasında doku iskelesinin üst kısmına tutunan hücreler kısa sürede yayılarak besi ortamındaki bileşenlerin iç kısımlara difüze olmasını engelleyebilir. Bu durumda, iç bölgelere tutunan hücrelerin canlılığını koruması kısıtlanır. Statik kültürlerde görülen bu kısıtlama, doku iskelesinin gözenek boyutu küçüldükçe etkisini daha çok gösterir [146].

Hücre kültürünün dinamik koşullarda gerçekleştirilmesi, hücrenin iskele boyunca infiltrasyonunu sağlayarak 3 boyutlu kemik dokusu oluşumunu desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada, statik kültür koşullarında sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin iskele yüzeyini kaplayarak tabaka oluşturduğu; dinamik koşullarda ise, aynı iskelenin iç kısımlarında homojen bir şekilde dağılabildiği gözlemlenmiştir [147].



Şekil 4.26. hBMSC kültürünün 7. gün SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT doku iskeleleri; (a,c,d) yatay kesit ve (b,d,f) dikey kesit. (Büyütmeler: (a,c,e) 1,000x, (b) 2,000x, (d) 250x, (f) 1,000x, (a1) 3,000x, (b1) 10,000x ve (c1) 5,000x



Şekil 4.27. hBMSC kültürünün 28. gün SEM görüntüleri: (a-b) PBAT, (c-d) HAp-PBAT, (e-f) B-HAp-PBAT doku iskeleleri; (a,c,d) yatay kesit ve (b,d,f) dikey kesit. Beyaz oklar, mineralize yapıları işaret etmektedir. (Büyütmeler: (a,c,e) 1000x, (b) 2000x, (d,f) 5000x, (a1,b1,c1) 5,000x

Hücrelerin iç kısımlara göç edememesi ekilen hücre sayısından veya hücre tipinden de kaynaklanmış olabilir. Ki ve ark., ıslak elektroçirme ile ürettikleri ipek doku iskelelerinde 10-100 µm aralığında gözenek boyutuna ulaşmışlar ve gerçekleştirdikleri 3T3 fibroblastik hücre kültürü sonrası, hücrelerin iç bölgelerde de çoğalabildiğini belirtmişlerdir [85].

Islak elektroçirme yöntemi ile parçacık uzaklaştırma teknikleri birleştirilerek daha büyük gözeneklere sahip 3D fibröz matrisler elde edilebilir. Ayrıca, elde edilen fibröz matrisler ile yapılacak kültür çalışmalarının dinamik koşullarda gerçekleştirilmesi, hücrelerin doku iskelesi içerisine olan infiltrasyonunu kolaylaştıracaktır.

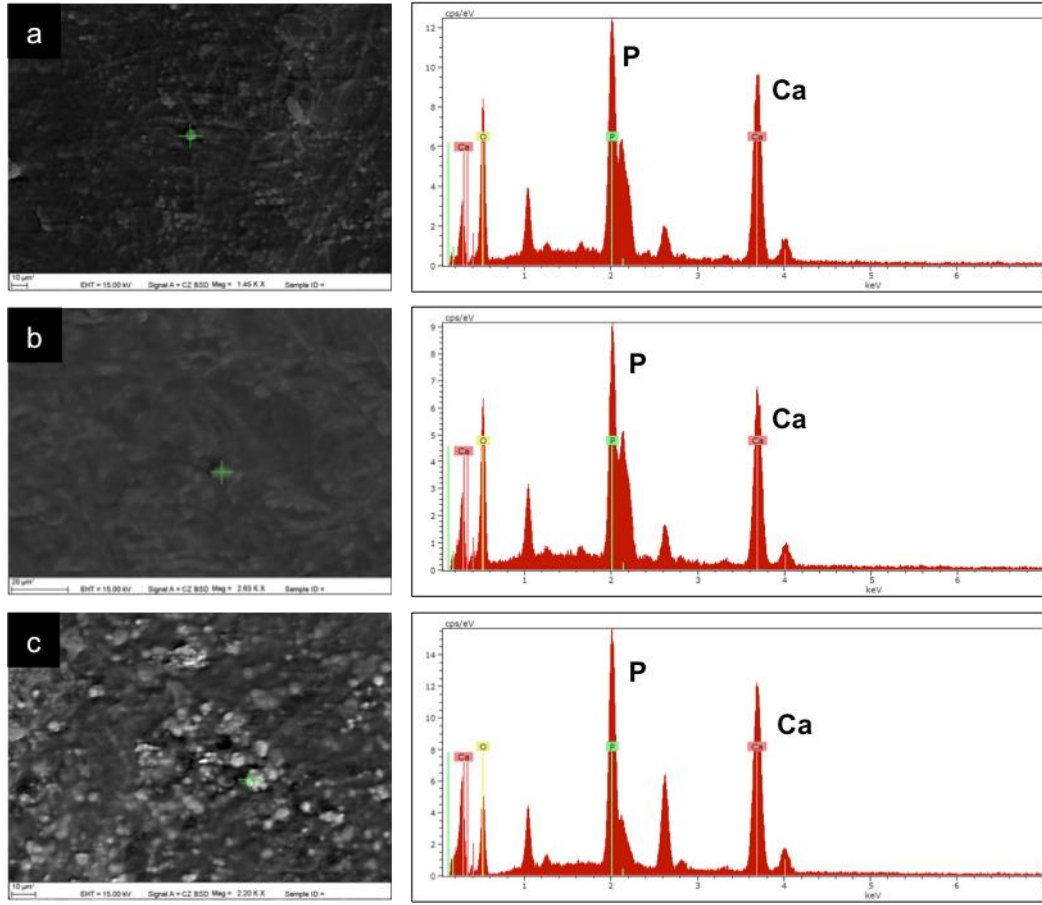
Islak elektroçirme ile üretilen doku iskelelerinin gözenek boyutu, bu yöntemin parçacık uzaklaştırma teknikleri ile birleştirilmesi ile artırılabilir. Gang ve ark., PLGA ile ürettikleri 2D ve ıslak-eğirilmiş 3D matrislerin gözenekliliklerini karşılaştırmışlardır [88]. Bir g/mL oranında ekledikleri NaCl parçacıklarının, fibröz matrisin gözenekliliğini yaklaşık %50 oranında artırdığını ifade etmişlerdir.

hBMSC kültürünün 28. gün SEM görüntüleri Şekil 4.27'de verilmiştir. Kültürün 28. günündeki hücre yoğunluğu, 7. gündeki hücre yoğunluğu ile benzerdir. Bu durum, proliferasyonun belirlenmesinde kullanılan DNA analizi sonuçlarını desteklemektedir.

Mineral oluşumu, farklılaşma sürecinin en önemli göstergelerinden biridir. hBMSC kültürünün 28. gününde, matris mineralizasyonu belirgin bir şekilde görülmektedir. Oluşan mineral yapılar, Şekil 4.27. (b), (d) ve (f)'de beyaz oklarla işaretlenmiştir. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında, B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki mineral oluşumunun daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 4.27. f).

Doku iskelelerinden alınan dikey kesitler incelendiğinde, hücre tabakasının alt kısmında, doku iskelesinin iç kesimlerine doğru mineral oluşumunun gerçekleştiği gözlenmektedir (Şekil 4.27. b, d ve f). 3D fibröz matrislerin gözenek boyutunun, hBMSC infiltrasyonu için yeterli olmasa da, mineralize yapıların geçişi için yeterli olduğu söylenebilir.

Doku iskelelerinde gerçekleşen mineralizasyon, enerji dağılımlı X-ışınları spektrometrisi (EDX) analizi ile de desteklenmiştir. Şekil 4.28'de görüldüğü gibi, PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde Ca ve P elementlerinin bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu elementler, HAp bileşiğinin yapısından kaynaklanabileceği gibi, mineralize ECM'nin oluştuğunun da göstergesidir. Fakat, HAp içermeyen PBAT fiberlerde de gözlenen Ca ve P elementlerinin varlığı, doku iskelelerinde mineralizasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.28. hBMSC kültürünün 28. gününe ait EDX grafikleri: (a) PBAT, (b) HAp-PBAT ve (c) B-HAp-PBAT.

4.5.3. Hücre farklılaşmasının belirlenmesi

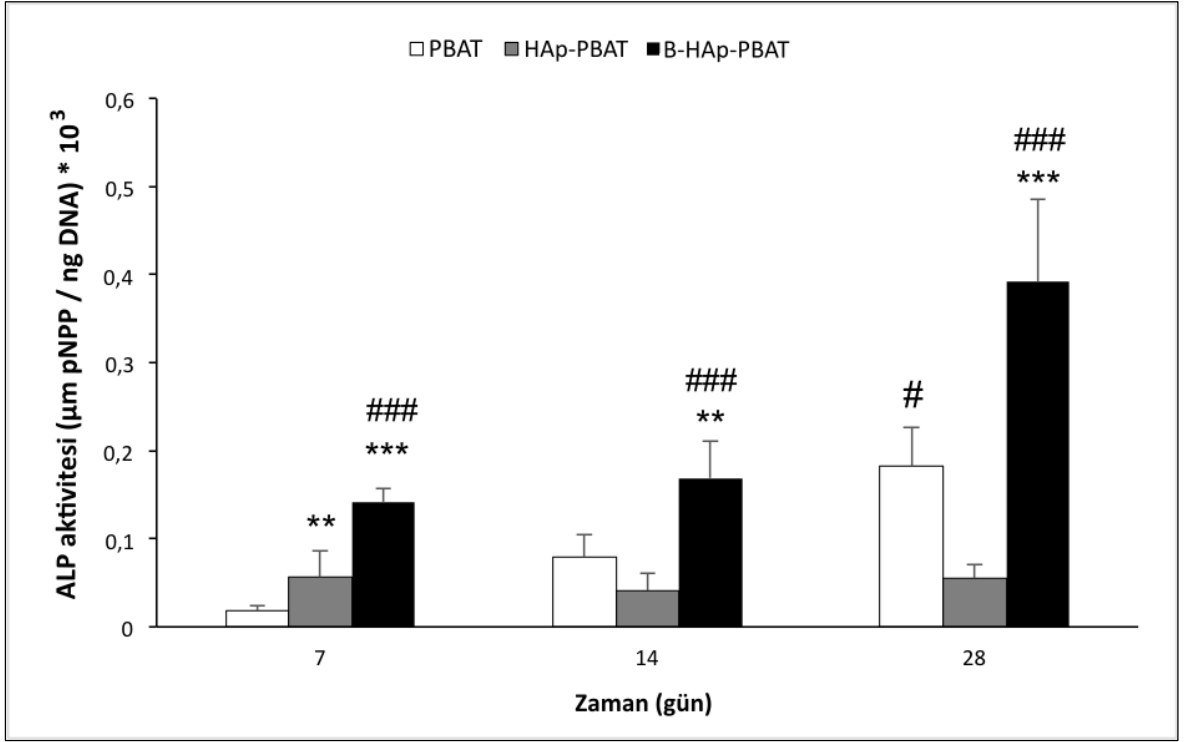
Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması sırasında, alkalın fosfataz (ALP) enzimi aktivitelerinde, kollajen, kalsiyum miktarlarında ve gen ifadelerinde artış olması beklenmektedir. *In vitro* kemik oluşumu temel olarak 3 evreden oluşmaktadır. İlk evre olan 4 günlük çoğalma sürecinde, hücre sayısında artış meydana gelir. İkinci evre olan 5. ve 14. günler arasını kapsayan erken farklılaşma sürecinde, ALP enziminde ve kollajen-I ekspresyonunda artış beklenmektedir. Son evre olan geç farklılaşma dönemi, 14 ve 28. günleri kapsamakta ve mineralizasyon sonucu oluşan kalsiyum miktarında ve osteopontin, osteokalsin gibi proteinlerin ekspresyonlarında artış olması beklenmektedir [148].

Tez çalışması kapsamındaki hücre kültür çalışmalarında, osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için kolorimetrik analizler yapılarak iskelelerde oluşan ALP enzimi, kollajen ve kalsiyum miktarları incelenmiştir. Daha sonra, kolorimetrik analizler sonucu elde edilen verilerin desteklenmesi amacıyla RT-PCR analizi ile gen ifadeleri incelenmiştir.

ALP aktivitesi analizi

Vücutta kemik, böbrek, karaciğer, akciğer gibi dokularında bulunan ALP enzimi, hidrolaz sınıfına girer ve fosfat gruplarının hidrolizinde katalizör işlevi görür. Kemikte bulunan ALP'nin işlevi, fosfataz aktivitesine bağlı olarak fosfat iyonları oluşturmak ve böylece kalsiyum fosfat bileşiklerini çöktürerek ossifikasyonu sağlamaktır. ALP'nin mineralizasyonu sağlamasında kabul edilen diğer bir mekanizma ise, ALP'nin mineralizasyonu inhibe eden pirofosfatları parçalayarak mineral oluşumunu kolaylaştırmasıdır [149,150]. Kemik oluşumunda, ALP aktivitesinin erken farklılaşma döneminde yükselmesi beklenmektedir.

hBMSClerin, ortamdaki pNPP oluşumuna bağlı ALP aktiviteleri Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin ALP aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken **p<0.01, ***p<0.001; kontrol grubu HAp-PBAT iken #p<0.05, ###p<0.001, n=3).

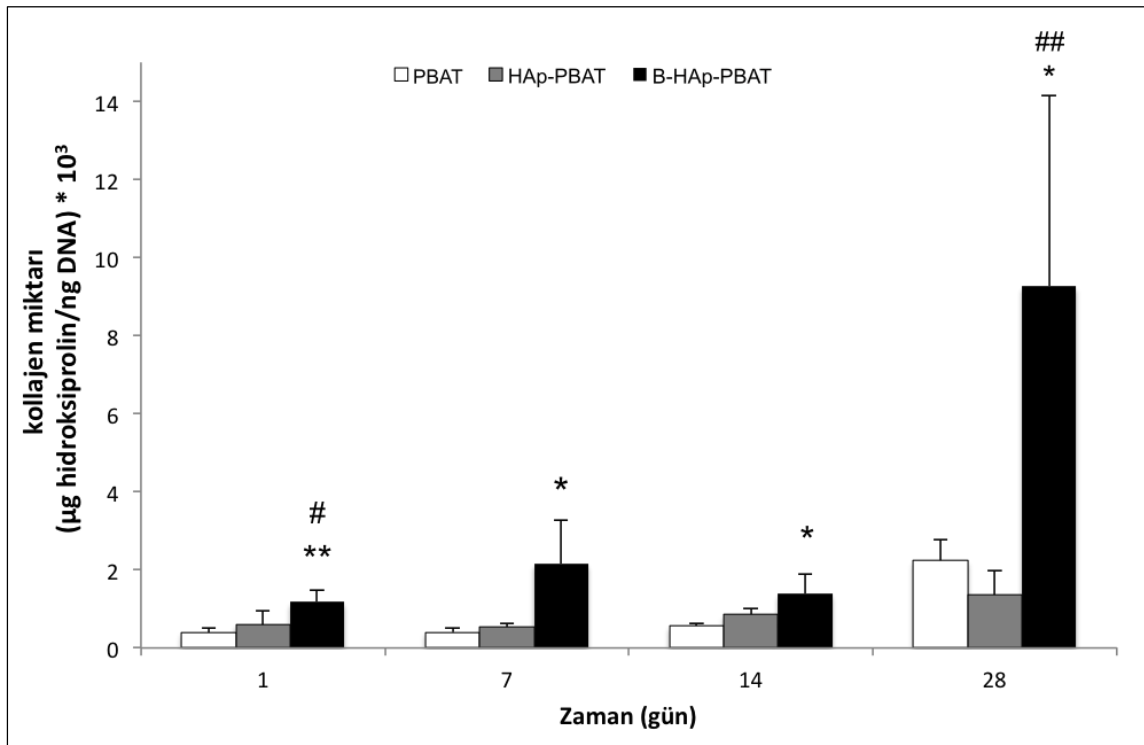
HAp-PBAT doku iskelelerindeki hBMSClerin ALP aktivitelerinin kültür boyunca sabit kaldığı, PBAT doku iskelelerindeki ALP miktarının kültürün 28. gününe kadar giderek arttığı, B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki ALP miktarının ise ilk 14 gün sabit kaldığı ve 28. gün arttığı görülmektedir. B-HAp-PBAT doku iskelelerinde bulunan hBMSClerin ALP miktarlarının, kültür boyunca diğer gruplardaki hücrelerden anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir (p<0.01 ve p<0.001). Kültürün 28. gününde, B-HAp-PBAT ile diğer doku

iskeleleri arasındaki fark artarak, PBAT doku iskelelerindeki hücrelerin ALP miktarının yaklaşık 2.2 katına, HAp-PBAT doku iskelesindekilerin ise yaklaşık 7.8 katına çıkmıştır ($p<0.001$). Ayrıca, kültürün 28. gününde PBAT doku iskelelerindeki ALP miktarının da HAp-PBAT doku iskelelerinden istatistiksel olarak fazla olduğu görülmektedir ($p<0.05$).

Kollajen analizi

Kemiğin organik kısmının ana maddesi olan kollajen-I, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasında rol oynar. Kollajen miktarının yükselmesi, erken farklılaşma evresinin belirteçidir [151].

hBMSC'lerin, hidroksiprolin miktarıyla doğru orantılı olan kollajen miktarları Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.30. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kollajen miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$; kontrol grubu HAp-PBAT iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, $n=3$).

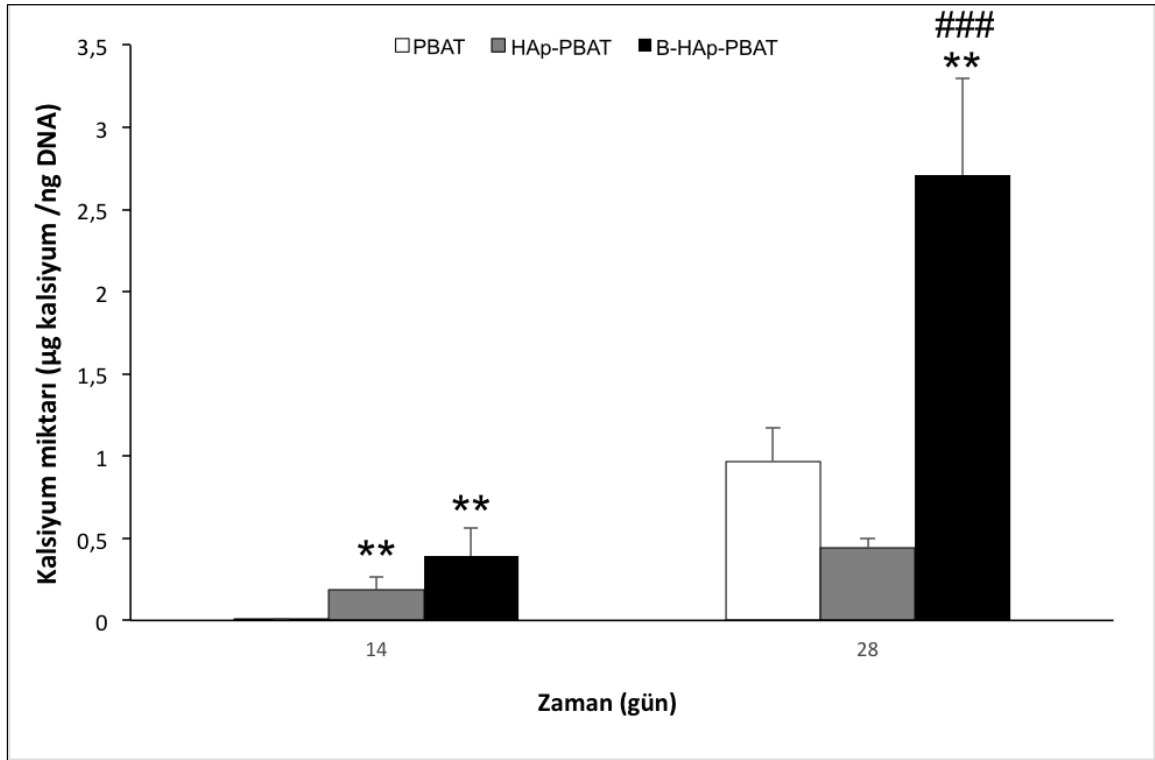
Hücre kültürü boyunca, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin oluşturduğu kollajen miktarı, diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0.05$, $p<0.01$). Kültürün 28. günü bu fark daha da belirginleşmiş, B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki hBMSC'lerin sentezlediği kollajen miktarının PBAT iskelelerdeki hücrelerin 4.2 katı, HAp-PBAT doku iskelelerindeki hücrelerin ise 6.8 katı olduğu

görülmüştür. Kültürün 28.gününde PBAT doku iskelelerindeki kollajen miktarı HAp-PBAT iskelelerin 1.6 katı olsa da bu gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kalsiyum analizi

ECM mineralizasyonu sonucu ECM’de oluşan kalsiyum miktarları, Şekil 4.31’de verilmiştir.

Kültürün 14. gününde, HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarı PBAT iskelelerin 26 katı ($p<0.01$), B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarı ise PBAT iskelelerin 56 katıdır ($p<0.01$).



Şekil 4.31. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken $**p<0.01$; kontrol grubu HAp-PBAT iken $###p<0.001$, $n=3$).

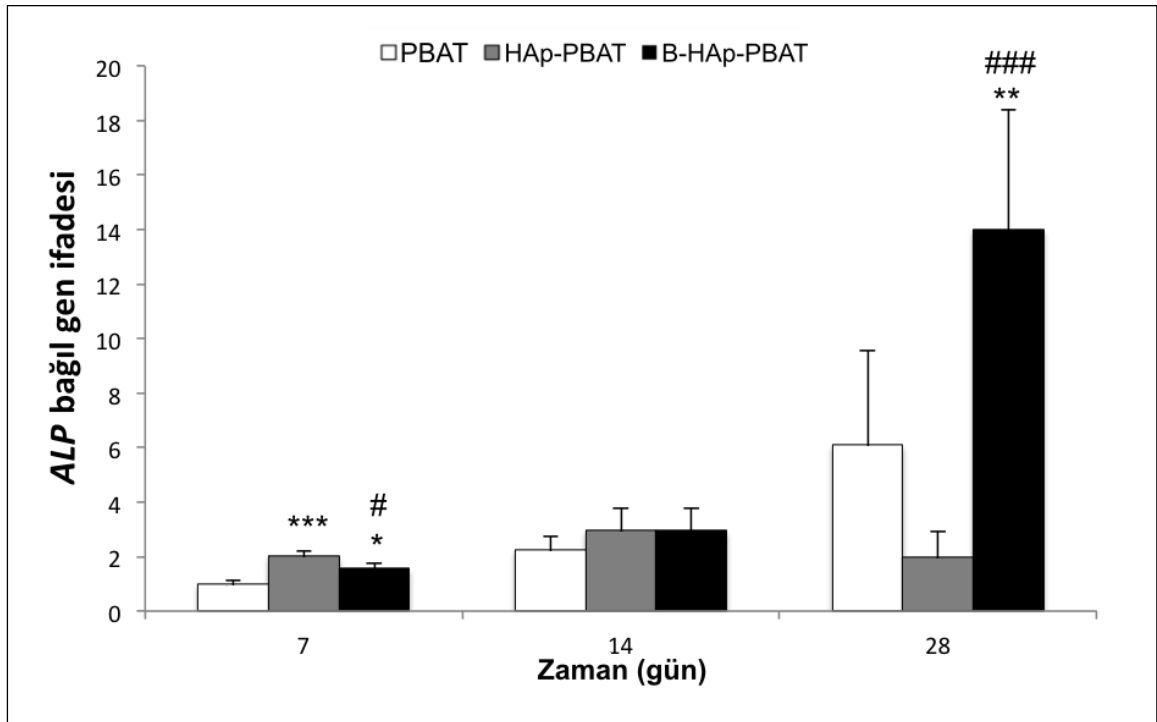
Kültürün 14. günü ile 28. günü arasında PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinin kalsiyum miktarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$ ve $p<0.001$). Kültürün 28. gününde, PBAT doku iskelelerinin kalsiyum miktarı HAp-PBAT doku iskelelerinin 2.19 katı olsa da, grupların arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarı ise, PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan kalsiyum miktarı ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksektir ($p<0.01$ ve $p<0.001$).

Kültürün 28. gününde B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki kalsiyum miktarının diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek çıkması, B-HAp-PBAT doku iskelelerinin osteoindüktif etkiyi artırarak mineralizasyonu indüklediğini göstermektedir. SEM görüntülerinde, kültürün 28. gününde B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oluşan mineral yapıların diğer gruplara göre daha yoğun olması, bu sonucu desteklemektedir.

RT-PCR analizleri

RT-PCR analizi yapılarak alkalın fofataz (*ALP*), kollajen tip 1 (*COL-1*), osteokalsin (*OCN*) ve osteopontin (*OPN*) gen ifadeleri incelenmiştir. Tüm gen ifade seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle hesaplanmış olup kontrol grubu olan hBMSC'lerin PBAT iskelelerindeki 7. gün ifade seviyeleri 1 olarak alınmıştır. Diğer örneklerdeki gen ifadesi seviyeleri hBMSC'lerin PBAT doku iskelelerindeki 7. gün değerlerinin katları olarak verilmiştir.

Çalışmada, hücrelerin *ALP* gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.32), HAp-PBAT doku iskelelerinin gen ifadelerinin kültür süreci boyunca sabit kaldığı, PBAT ve B-HAp-PBAT gruplarının *ALP* gen ifadesinin ise 28. günde yükseldiği görülmektedir.

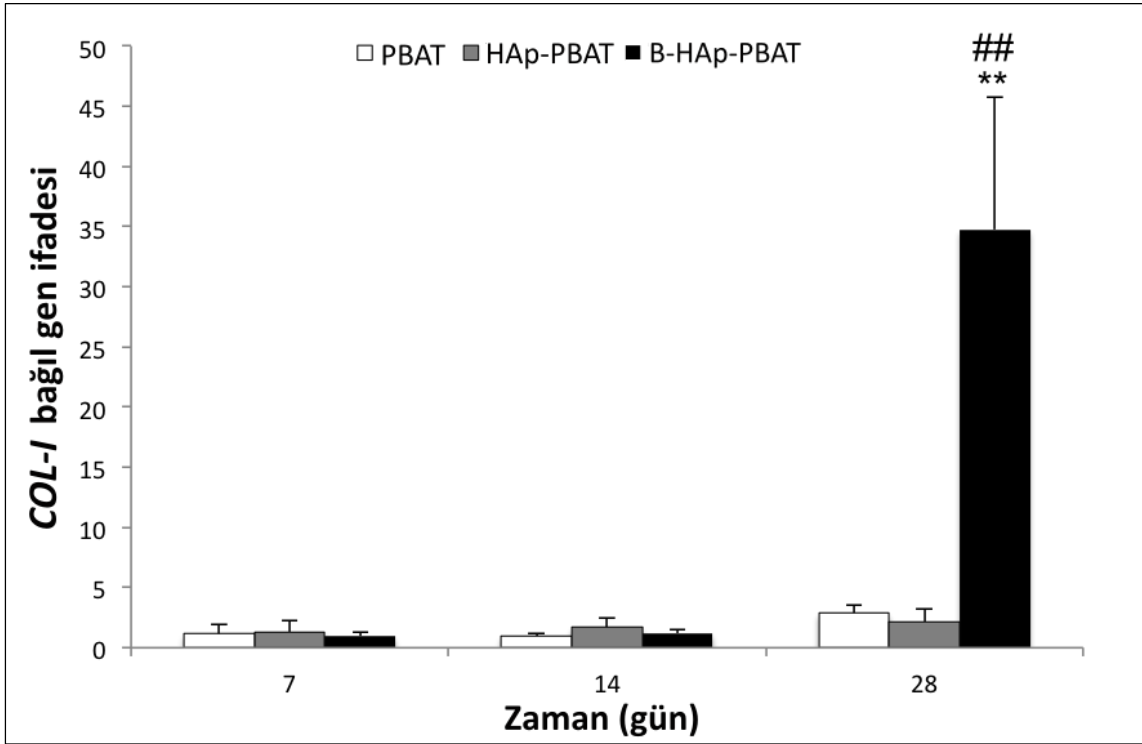


Şekil 4.32. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl *ALP* gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$; kontrol grubu HAp-PBAT iken # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$, $n=3$)

Kültürün 28. gününde, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSClerin *ALP* gen ifadesinin, diğer doku iskelelerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$ ve $p<0.001$). PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin *ALP* gen ekspresyon seviyeleri HAp-PBAT iskeledeki hücrelerin yaklaşık 3 katı olsa da bu gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *ALP* aktivitesinin geç farklılaşma döneminde artış göstermesi ve kültürün 28. gününde B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki hBMSC'lerin *ALP* aktivitelerinin diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek olması, kolorimetrik *ALP* aktivitesi analizinden elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Teorik olarak, *ALP* aktivitesinin erken farklılaşma belirteci olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *ALP* aktivitesinin kültürün 14. gününde belirgin derecede yükselmesi, kültürün 28. gününde ise azalması beklenmektedir. Ancak, tez çalışması kapsamında yapılan kolorimetrik analizler ve RT-PCR analizi sonucunda, hBMSC'lerin *ALP* gen ifadesinin en yüksek değere 28. günde ulaştığı görülmüştür. Literatürde, en yüksek *ALP* aktivitesinin geç dönemde elde edildiği çalışmalar mevcuttur [152-154]. Ruckh ve ark., HAp/PCL nanofiberlerde kültür ettikleri sıçan kemik iliği kök hücrelerinin osteojenik farklılaşma kapasitelerini incelemişler ve *ALP* aktivitesinin en yüksek seviyeye 3. haftada ulaştığını belirtmişlerdir [152].

PBAT bazlı doku iskeleleri üzerinde kültür edilen hBMSC'lerin kollajen-I (*COL-I*) gen ifadeleri grafiği Şekil 4.33'te görülmektedir. Şekilde, PBAT ve HAp-PBAT iskelelerde kültür edilen hBMSC'lerin *COL-I* seviyelerinin kültür boyunca sabit kaldığı, B-HAp-PBAT iskelelerdeki hBMSC'lerin *COL-I* seviyelerinin ise ilk 14 gün sabit kalarak 28. günde artış gösterdiği görülmektedir. Kültürün ilk 14 gününde, farklı doku iskelesi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Kültürün 28. gününde, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin *COL-I* seviyelerinin PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerindeki göre oldukça anlamlı seviyede yüksek olduğu ($p<0.01$), PBAT ve HAp-PBAT doku iskeleleri arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0.05$) görülmektedir. RT-PCR analizi ile elde edilen *COL-I* gen ifadesi seviyeleri, kolorimetrik analiz ile tayin edilen kollajen miktarları ile benzerdir.

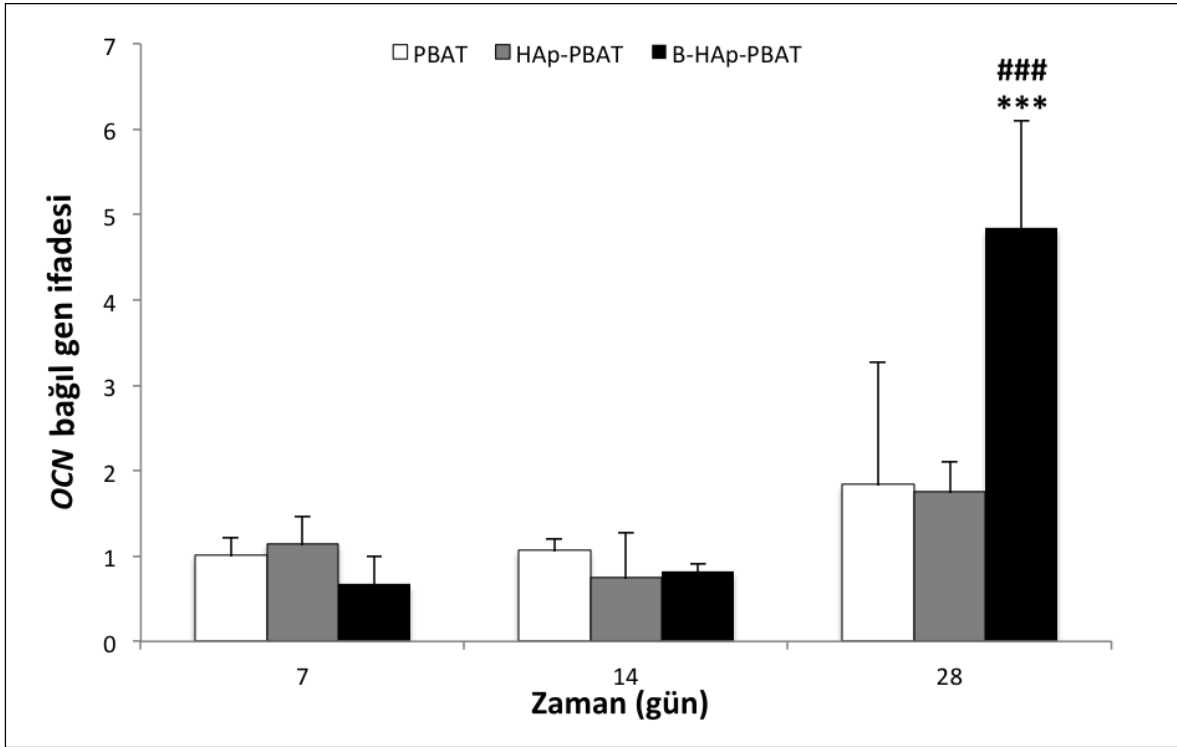


Şekil 4.33. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl *COL-1* gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken $**p<0.01$; kontrol grubu HAp-PBAT iken $^{##}p<0.01$, n=3)

Ying ve ark., 100 ng/mL borik asit içeren ortamda, hBMSC'lerin *COL-1* ifadesi seviyesinde artış elde etmişlerdir [155]. Gümüşderelioğlu ve ark., bor enkapsüle ettikleri nanopartikülleri içeren kitosan doku iskelelerinde kültür ettikleri MC3T3-E1 preosteoblastların *COL-1* gen ifadesi seviyesini artırdığını ifade etmişlerdir [128].

Osteokalsin (*OCN*) ve osteopontin (*OPN*), non-kollajenik ECM proteinlerinin büyük bir kısmını oluşturur. Kemik mineralizasyonunu düzenleyen *OCN* ve *OPN* seviyelerindeki artış, geç dönem farklılaşma belirteçidir. *OCN* ve *OPN* gen ifadeleri analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'te görülmektedir.

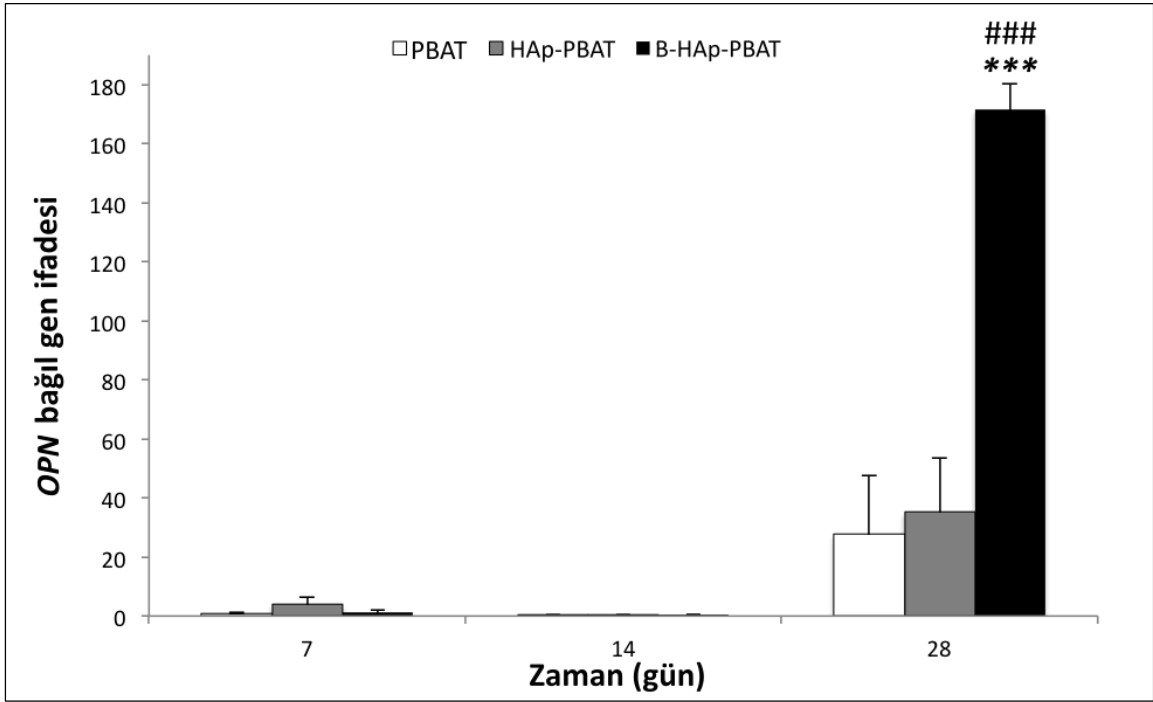
Kültürün ilk 14 gününde tüm doku iskelesi gruplarının *OCN* seviyelerinin sabit olduğu ve gruplar arasında anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) görülmektedir. Diğer gen ifadelerinde olduğu gibi, hücrelerin *OCN* seviyelerinde de kültürün 28. gününde artış görülmüştür. 28. gün, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin *OCN* gen ifadesinin, PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerindeki hücelere göre yaklaşık 3 kat fazla olduğu görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 4.34. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl OCN gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken *** $p<0.001$; kontrol grubu HAp-PBAT iken ^{###} $p<0.001$, $n=3$).

hBMSC'lerin *OPN* gen ifadeleri, *OCN* seviyelerine benzer şekilde, kültürün ilk 14 gününde sabit kalmış, 28. gününde ise artış göstermiştir (Şekil 4.35). Yirmisekizinci gün, PBAT ve HAp-PBAT doku iskeleleri üzerinde kültür edilen hBMSC'lerin *OPN* seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş ($p>0.05$), B-HAp-PBAT doku iskelesinde kültür edilen hücrelerin *OPN* seviyelerinin ise, PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hücrelere göre sırasıyla 6.3 ve 4.9 kat yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.001$).

Tüm iskelelerde 28. gün *OPN* ve *OCN* gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmesi, mineralize ECM'nin oluşmaya başladığını göstermektedir. Kültürün 28. gününde B-HAp-PBAT doku iskelelerindeki hBMSClerin *OPN* ve *OCN* seviyelerinin diğer doku iskelelerine göre oldukça anlamlı ölçüde yüksek olması ile ($p<0.001$), B-HAp katkısının PBAT'ın osteoindüktif etkisini önemli ölçüde artırdığı anlaşılmıştır. SEM analizinde kültürün 28. gününde görüntülenen mineralize yapıların B-HAp-PBAT doku iskelelerinde daha yoğun olması bu bulguları desteklemektedir. Ying ve ark., yaptıkları çalışmada, çeşitli konsantrasyonlarda bor uyguladıkları hBMSClerin gen ifadelerini incelemişler, 1-10 ng/mL konsantrasyon aralığındaki borun kalsiyum oluşumunu ve *OCN* gen ifade seviyesini artırdığını belirtmişlerdir [155].



Şekil 4.35. PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT doku iskelelerinde kültür edilen hBMSC'lerin bağıl OPN gen ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: kontrol grubu PBAT iken $***p<0.001$; kontrol grubu HAp-PBAT iken $###p<0.001$, $n=3$).

RT-PCR analizi ve kolorimetrik analizler ile elde edilen hücre farklılaşması sonuçlarına göre; *ALP*, kollajen, kalsiyum miktarları ve gen ifadeleri genel olarak tüm doku iskelesi gruplarında kültürün ilk 14 günü sabit kalmaya eğilimli olup 28. günde artış göstermiştir. Kültürün 28. günündeki artış, B-HAp-PBAT doku iskelelerinde oldukça belirgin olup, PBAT ve HAp-PBAT doku iskelelerinde daha düşük seviyede kalmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, HAp katkısının tek başına PBAT'ın farklılaşmasını artırmak için yeterli olmadığı; B-HAp PBAT doku iskelelerinin osteoindüktif etkisini önemli ölçüde artırdığı söylenebilir.

Grubumuzda daha önceden yapılan bir çalışmada, kitosan doku iskeleleri HAp ve B-HAp ile kaplanmış; HAp ve B-HAp katkısının kitosanın farklılaşmasına olan etkisi RT-PCR analizleri ile incelenmiştir [19]. Elde edilen sonuçlar, HAp ve B-HAp katkısında kitosanın farklılaşmasının önemli ölçüde arttığını, B-HAp katkısında ise bu etkinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan farklılaşma analizlerinde ise, HAp katkısının PBAT'ın farklılaşması üzerindeki etkisi net bir şekilde gözlenememiştir. Buna neden olan faktörlerden birisi, HAp katkısının doku iskelelerine kaplama şeklinde değil, parçacıklar halinde fiberlerin yapısına katılmasıdır. Fibröz matriste serbest halde bulunan HAp parçacıklarının yıkama işlemleri sırasında yapıdan uzaklaşması, diğer

parçacıkların ise fiberlerin içerisine gömülü kalması, HAp'ten kültür ortamına iyon salımını geciktirmiş olabilir. Bu durumda, HAp parçacıklarından ortama olan iyon salımı, PBAT fiberlerin bozunurluğunun kontrolündedir.

B-HAp-PBAT doku iskelelerinde ise, tüm gen ifadelerinin geç farklılaşma döneminde ortaya çıkması, aynı şekilde fiberlerin içinde hapsolan parçacıklardan iyon salımının gecikmesi ile yorumlanabilir. Ayrıca, elektroğirme çözeltisinin hazırlanması sırasında HAp ve B-HAp parçacıklarının kümelenerek mikro boyutta parçacıklar oluşturması, etkili yüzey alanlarını azaltmaktadır. Osteoindüktif etkinin daha belirgin görülebilmesi için, HAp parçacıklarının elektroğirme çözeltisindeki miktarları artırılabilir. Lee ve ark., yaptıkları çalışmada PLGA fiberlere kattıkları HAp parçacıklarının miktarını %10 (w/w)'dan %40 (w/w)'a çıkardıklarında, hücre sayısının ve mineralizasyonun arttığını belirtmişlerdir [156].

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile PBAT doku iskeleleri üretilmiş ve üretilen iskelelerden 3D fibröz matrislerin yapısına osteoindüktif özellik kazandırılması için hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) partikülleri eklenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları ve iki farklı hücre hattı ile yürütülen hücre kültür çalışmaları sonrasında, doku iskelelerinin *in vitro* kemik rejenerasyonundaki potansiyelleri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen önemli bulgular, bu bölümde özetlenmiştir.

- ❖ Çalışmanın ilk aşamasında, PBAT reçinelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan ¹³C-NMR analizi sonucu, PBAT'ın %58 oranında alifatik birime ve %42 oranında aromatik birime sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, PBAT'ın hem mekanik dayanımın hem de biyobozunurluğunun yeterli olduğunu göstermiştir.
- ❖ 2D PBAT doku iskeleleri çözücü buharlaştırma ve elektroğirme yöntemleriyle, 3D PBAT doku iskeleleri ise çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ve eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemleriyle üretilmiştir. En iyi morfolojideki doku iskelelerinin üretimi için, malzeme üretimi öncesinde optimum koşullar belirlenmiştir.
- ❖ Elektroğirme yönteminde boncuk oluşumunu etkileyen parametrenin polimer derişimi olduğu, gerilim ve şırınga pompası akış hızı gibi parametrelerin boncuk oluşumunu etkilemediği görülmüştür. En iyi morfolojideki fiberlerin elde edildiği parametreler %14 (w/v) polimer derişimi, 21 kV gerilim, 1 mL/sa akış hızı ve 20 cm şırınga toplayıcı arasındaki mesafe olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle üretilen 2D fibröz matrisler, 12 µm gözenek boyutuna, %85 gözenekliliğe ve 569 ± 187 nm çapında fiberlere sahiptir.
- ❖ Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemiyle doku iskelesi üretimi için, optimum koşullar %15 (w/v) polimer derişimi, 200-355 µm tuz parçacıkları boyutu ve 1:1.5 polimer:tuz oranı olarak belirlenmiştir. Bu parametrelerde üretilen doku iskeleleri içsel bağlantılı gözeneklere sahip olup %90 gözenekliliğe ve 283 ± 61 µm gözenek boyutuna sahiptir. Bu yöntem ile üretilen doku iskeleleri, tüm doku iskeleleri içerisinde en yüksek gözenekliliğe sahiptir.
- ❖ Eriyik kalıplama-parçacık uzaklaştırma yöntemiyle üretilen doku iskeleleri için optimum koşullar 1:2.3 polimer:tuz oranı ve 200-355 µm tuz parçacık boyutu

olarak belirlenmiştir. Bu parametrelerde üretilen doku iskeleleri %62 gözenekliliğe ve $236 \pm 61 \mu\text{m}$ gözenek boyutuna sahiptir. Bu yöntem ile üretilen doku iskeleleri, tüm doku iskeleleri içerisinde en düşük gözenekliliğe sahiptir.

- ❖ Doku iskelelerinin su alım kapasiteleri, gözeneklilikleri ile doğru orantılı olarak bulunmuştur. Yapısına en fazla su alan grup çözücü döküm parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleri (578 ± 62), en az su alan grup ise eriyik kalıplama parçacık uzaklaştırma işlemi ile üretilen doku iskeleleridir (110 ± 17). İnce filmlerin ise yapılarına aldıkları su miktarı gözeneksiz ve hidrofobik yapıları nedeniyle sifira yakındır.
- ❖ Yapılan mekanik testler sonucunda, eriyik kalıplama parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin sıkıştırma direnci ($8.80 \pm 6.10 \text{ MPa}$) ve modülüs değerinin ($2.46 \pm 1.90 \text{ MPa}$) diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve sıkıştırma direncinin kanselöz kemiğinkine benzer olduğu görülmüştür.
- ❖ *In vitro* bozunurluk testlerinin sonucunda, 5. haftada SEM analizinden elde edilen görüntülerde, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen iskelelerin yüzeyinde oluşan delinmeler, lipaz enzimi varlığında bozunduğunun göstergesidir. İnce filmlerin bozunması ise, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilen iskelelerde olduğu kadar belirgin değildir.
- ❖ İnce film, 2D fibröz matris ve parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen doku iskeleleri ile yapılan MC3T3-E1 hücre kültür çalışmaları sonucunda, tüm doku iskelelerinin hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Kültürün 11. gününde tüm yüzeylerin neredeyse tamamının hücreler ve salgıladıkları ECM tarafından kaplanması, PBAT'ın modifikasyona ihtiyaç duyulmadan hücre tutunmasını desteklediğini göstermektedir.
- ❖ MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan çalışmalarda, hücre tutunması ve yayılımını en iyi destekleyen malzemelerin PBAT fibröz matrisler olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmanın ikinci kısmında hücre farklılaşmasının belirlenmesi için daha işlevsel olan 3D fibröz matrislerin üretimine karar verilmiştir.
- ❖ Islak elektroçirme yöntemiyle üretilen 3D fibröz matrisler, %90 gözenekliliğe ve $898 \pm 328 \text{ nm}$ çapında düzgün morfolojide fiberlere sahiptir. Islak elektroçirme ile üretilen 3D fibröz matrislerin gözenekliliği 2D matrislere göre %5 oranında artmış, gözenek boyutu ise ortalama olarak $12 \mu\text{m}$ 'den $30 \mu\text{m}$ 'ye yükselmiştir.
- ❖ Osteoindüktif etkinin artırılması amacı ile PBAT fiberlerin yapısına katılan HAp ve B-HAp parçacıkları, mikrodalga destekli biyomimetik çöktürme yöntemi ile

üretimiştir. Elde edilen HAp ve B-HAp parçacıkları, ıslak elektroğirme işleminin öncesi %5 (w/w) oranında elektroğirme çözeltisine eklenmiştir. SEM ve TEM ile yapılan morfolojik analiz sonucunda, HAp ve B-HAp parçacıklarının homojen olarak fibröz matris içerisinde hem serbest halde dağıldığı hem de fiberlerin içinde gömülü olarak bulunduğı görülmüştür.

- ❖ 3D PBAT, HAp-PBAT ve B-HAp-PBAT fibröz matrislerin biyoaktivitesinin incelenmesi için yapılan hücre kültür çalışmalarında, insan kemik iliğı kökenli mezenkimal kök hücreler (hBMSC) kullanılmıştır. Alınan SEM görüntülerinde, hBMSClerin gözeneklerin içerisine geçemediğı ve yüzeyi tamamen kapladığı görülmüştür. 3D fibröz doku iskelelerinin sahip olduğı 30 µm boyutundaki gözeneklerin, hücre penetrasyonu için yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Fakat, oluşan mineral yapıların gözeneklerin içerisinden geçerek iskelenin iç kısımlarında birikebildiğı görülmüştür.
- ❖ Hücre farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla kolorimetrik analizler yapılmış ve sonuçlar gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri ile desteklenmiştir. Kolorimetrik testlerle ölçülen ALP aktivitesi, kollajen ve kalsiyum miktarlarında ve *ALP*, *COL-1*, *OCN* ve *OPN* gen ifadelerinde ölçülen en yüksek değerler B-HAp-PBAT doku iskelelerinde elde edilmiştir. PBAT doku iskelelerinde ise farklılaşma belirteci olan gen ifadeleri ve ALP aktivitesi, kollajen ve kalsiyum miktarları kültür boyunca artış gösterse de, B-HAp-PBAT'a göre daha düşük seviyelerde görülmüştür.
- ❖ HAp katkısının, PBAT'ın osteoindüktif etkisini artırmak için tek başına yeterli olmadığı, B-HAp katkısının ise PBAT'ın farklılaşmasını yüksek ölçüde indüklediğı görülmüştür.

Elde edilen bulgular ışığında, PBAT doku iskelelerinin gözeneklilik, mekanik dayanım, biyobozunurluk ve yüzey özellikleri açısından yeterli özelliklere sahip olduğı ve mevcut biyobozunur sentetik polimerlere alternatif olarak kullanılabilen bir biyomalzeme olduğu anlaşılmıştır. Çeşitli yöntemlerle üretilen PBAT doku iskelelerinin yüzey özelliklerinin, MC3T3-E1 ve hBMSClerin tutunması ve çoğalması için yeterli olduğu, hücre farklılaşmasının iyileştirilmesi için ise, PBAT'ın yapısına B-HAp gibi osteoindüktif malzemelerin katılmasının uygun olacağı anlaşılmıştır. Çalışmada doku iskelesi üretim yöntemi olarak kullanılan ıslak elektroğirmenin geliştirilmesi ile daha yüksek gözenek

boyutuna ulaşıldığında, 3D PBAT fibröz doku iskelelerinin kemik rejenerasyonunda kullanılabilircek uygun bir biyomalzeme olacağı öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Nair, L. S., Bhattacharya, S., Laurencin, C.T., Nanotechnology and tissue engineering: The scaffold based approach. Tissue, Cell and Organ Engineering. Nanotechnology for the Life Sciences Series. (eds: C. S. Kumar), Wiley-VCH, Germany, 1-56, **2006**.
- [2] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, Tübitak Yayınları, Bilim ve Teknik Özel Eki, **2007**.
- [3] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486, **2004**.
- [4] Hutmacher, D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, **2000**.
- [5] Bikiaris, D. N., Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters, *Polymer degradation and stability*, 98, 1908-1928, **2013**.
- [6] Witt, U., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 3, 215-223, **1995**.
- [7] Marten, E., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters, *Polymer Degradation and Stability*, 88, 371-381, **2005**.
- [8] Chiangga, S., Suwannasopon, S., Trivijitkasem, N, Thermal degradation of biodegradable poly(butyleneadipate-co-terephthalate)/starch blends, *Kasetsart Journal (Nature Science)*, 46, 653-661, **2012**.
- [9] Witt, U., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 5, 81-89, **1997**.
- [10] Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.-D., Müller, R.-J., Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere*, 44, 289-299, **2001**.
- [11] Jao, W. C., Lin, C. H., Hsieh, J. Y., Yeh, Y. H., Liu, C. Y., Yang, M. C. , Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly (butyleneadipate - co - terephthalate) films *Polymers for Advanced Technologies*, 21, 543-553, **2010**.
- [12] Fukushima, K., Rasyida, A., Yang, M.-C., Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites, *Applied Clay Science*, 80-81, 291-298, **2013**.
- [13] Nar, M., Staufenberg, G., Yang, B., Robertson, L., Patel, R. H., Varanasi, V. G., D'Souza, N. A., Osteoconductive bio-based meshes based on Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends, *Material Science and Engineering C*, 38, 315-324, **2014**.
- [14] Wang, A., Gan, Y., Yu, H., Liu, Y., Zhang, M., Cheng, B., Wang, F., Wang, H., Yan, J., Improvement of the cytocompatibility of electrospun poly [(R)-3 -

hydroxybutyrate - co - (R) - 3 - hydroxyvalerate] mats by Ecoflex, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100, 1505-1511, **2012**.

[15] Costa-Pinto, A. R., Salgado, A.J., Correlo, V.M., Sol, P., Bhattacharya, M., Charbord, P., Reis, R.L., Neves, N.M., Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds, *Tissue Engineering: Part A*, 14, 1049-1057, **2008**.

[16] Correlo, V. M., Costa - Pinto, A.R., Sol, P., Covas, J.A., Bhattacharya, M., Neves, N.M., Reis, R.L, Melt processing of chitosan-based fibers and fiber-mesh scaffolds for the engineering of connective tissues, *Macromolecular Bioscience*, 10, 1495-1504, **2010**.

[17] Johari, N., Fathi, M.H., Golozar, M.A., The effect of fluorine content on the mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone)/nano-fluoridated hydroxyapatite scaffold for bone-tissue engineering, *Ceramics International*, 37, 3247-3232-3251, **2011**.

[18] Torabinejad, B., Mohammadi-Rovshandeh, J., Davachi, S.M., Zamanian, A., Synthesis and characterization of nanocomposite scaffolds based on triblock copolymer of L-lactide, ϵ -caprolactone and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 42, 199-210, **2014**.

[19] Tunçay, Ö. E., *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.

[20] Doğan, A., Demirci, S., Bayır, Y., Halıcı, Z., Karakuş, E., Aydın, A., Çadırcı, E., Albayrak, A., Demirci, E., Karaman, A., Ayan, A.K., Gündoğdu, C., Şahin, F., Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 44, 246-253, **2014**.

[21] Odgren, P. R., Gartland, A., Mason-Savas, A., Marks, Jr., Sandy, C., Bone Structure. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. (eds: L. Martini), Elsevier, New York, 392-400, **2004**.

[22] Salgado, A. J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765, **2004**.

[23] Reznikov, N., Shahar, R., Weiner, S., Bone hierarchical structure in three dimensions, *Acta Biomaterialia*, 10, 3815-3826, **2014**.

[24] Korkusuz, F., Tomin, E., Yetkinler, D.N., Timuçin, M., Öztürk, A., Korkusuz, P., Yapay kemik dokusu, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 10, 134-142, **2011**.

[25] Lewandrowski, K.-U., Gresser, J.D., Wise, D.L., Trantolo, D.J., Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats, *Biomaterials*, 21, 757-764, **2000**.

[26] Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E., Bone substitutes: An update, *Injury*, 36, S20-S27, **2005**.

[27] Murugan, R., Ramakrishna, S., Nanophase biomaterials for tissue engineering. *Tissue, Cell and Organ Engineering*. (eds: C. S. S. R. Kumar), Wiley-VCH, **2006**.

[28] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliği ve ürünleri, *Bilim ve Teknik Dergisi, Tübitak Yayınları*, **2010**.

- [29] Sanjeev, K., Einhorn, T.A., Tissue engineering of bone, Taylor & Francis Boca Raton, Florida, **2006**.
- [30] Liu, Y., Lim, J., Teoh, S.-H., Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnology Advances*, 31, 688-705, **2013**.
- [31] Heath, C. A., Cells for tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 18, 17-19, **2000**.
- [32] İnan, S., Özbilgin, K., Kök hücre biyolojisi, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1, 11-23, **2009**.
- [33] Alexander, P. G., Hofer, H. R., Clark, K. L., Tuan, R. S., Mesenchymal Stem Cells in Musculoskeletal Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition). (eds: R. L. L. Vacanti), Academic Press, Boston, 1171-1199, **2014**.
- [34] Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T., Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source, *Arthritis & Rheumatism*, 52, 2521-2529, **2005**.
- [35] Hicok, K. C., Hedrick, M.H., Stem cells and the art of mesenchymal maintenance. Engineering of Functional Skeletal Tissues. (eds: F. Bronner, Farach-Carson M.C., Mikos, A.G.), Springer, Londra, 1-16, **2007**.
- [36] Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells*, 24, 1294-1301, **2006**.
- [37] Beşkardeş, I. G., *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: Sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2008**.
- [38] Rezwani, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3413-3431, **2006**.
- [39] Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A., Recent advances in bone tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 30, 546-554, **2012**.
- [40] Çakmak, S., Çakmak, A.S., Gümüşderelioğlu, M., RGD-bearing peptide-amphiphile hydroxyapatite nanocomposite bone scaffold: an in vitro study, *Biomedical Materials*, 8:045014, 1-15, **2013**.
- [41] Murugan, R., Ramakrishna, S., Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65, 2385-2406, **2005**.
- [42] Livingston, T., Ducheyne, P., Garino, J., In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research* 62, 1-13, **2002**.
- [43] Kim, S.-S., Park, M.S., Jeon, O., Choi, C.Y., Kim, B.S., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 1399-1409, **2006**.
- [44] Malafaya, P. B., Silva, G.A., Reis, R.L., Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 207-233, **2007**.
- [45] Sabir, M. I., Xu, X., Li, L., A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *Journal of Materials Science*, 44, 5713-5724, **2009**.

- [46] Okamoto, M., John, B., Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds, *Progress in Polymer Science*, 38, 1487-1503, **2013**.
- [47] Place, E. S., George, J.H., Williams, C.K., Stevens, M.M., Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, *Chemical Society Reviews*, 38, 1139-1151, **2008**.
- [48] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2126-2146, **2010**.
- [49] Butscher, A., Bohner, M., Gauckler, M., Müller, R., Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing., *Acta Biomaterialia*, 7, 907-920, **2011**.
- [50] Wu, X., Liu, Y., Li, X., Wen, P., Zhang, Y., Long, Y., Wang, X., Guo, Y., Xing, F., Gao J., Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method, *Acta Biomaterialia*, 6, 1167-1177, **2010**.
- [51] Zhu, N., Chen, X., Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. (eds: R. Pignatello), InTech, **2013**.
- [52] Marra, K. G., Biodegradable polymers and microspheres in tissue engineering. *Bone Tissue Engineering*. (eds, CRC Press, Florida, 149-157, **2005**.
- [53] Reignier, J., Huneault, M.A., Preparation of interconnected poly(ϵ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching, *Polymer*, 47, 4703-4717, **2006**.
- [54] Cho, Y. S., Kim, B.-S., You, H.-K., Cho, Y.-S., A novel technique for scaffold fabrication: SLUP (salt leaching using powder), *Current Applied Physics*, 14, 371-377, **2014**.
- [55] Oh, S. H., Kang, S.G., Lee, J.H., Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: Comparison with control hydrophobic one, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 131-137, **2006**.
- [56] Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering, *Biomaterials*, 33, 6020-6041, **2012**.
- [57] Kumbar, S. G., James, R., Nukavarapu, S.P., Laurencin, C.T., Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues, *Biomedical Materials*, 3, 034002, 1-15, **2008**.
- [58] Doshi, J., Reneker, D.H., Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of Electrostatics*, 35, 151-160, **1995**.
- [59] Thompson, C. J., Chase, G.G., Yarin, A.L., Reneker, D.H., Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model, *Polymer*, 48, 6913-6922, **2007**.
- [60] Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H.L., Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning, *Progress in Polymer Science*, 39, 862-890, **2014**.
- [61] Katti, D. S., Robinson, K.W., Ko, F.K., Laurencin, C.T., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters, *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 70, 286-296, **2004**.

- [62] Rodoplu, D., Mutlu, M., Effects of electrospinning setup and process parameters on nanofiber morphology intended for the modification of quartz crystal microbalance surfaces, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7, 118-123, **2012**.
- [63] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., Ma, Z., An introduction to electrospinning, World Scientific, Singapore, **2005**.
- [64] Ghorani, B., Tucker, N., Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food technology, *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240, **2015**.
- [65] Hardick, O., Stevens, B., Bracewell, D.G., Nanofibre fabrication in a temperature and humidity controlled environment for improved fibre consistency, *Journal of Materials Science*, 46, 3890-3898, **2011**.
- [66] Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B.S., Chu, B., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer*, 43, 4403-4412, **2002**.
- [67] Arslan, A., Şimşek, M., Aldemir, S.D., Kazaroğlu, N.M., Gümüşderelioğlu, M., Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: effect of honey on electrospinning process, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25, 999-1012, **2014**.
- [68] Migliaresi, C., Ruffo, G.A., Volpato, F.Z., Zeni, D., Advanced electrospinning setups and special fibre and mesh morphologies. Electrospinning for Advanced Biomedical Applications and Therapies. (eds: N. M. Neves), 23-68, **2012**.
- [69] Cai, S., Xu, H., Jiang, Q., Yang, Y., Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study, *Langmuir*, 29, 2311-2318, **2013**.
- [70] Levorson, E. J., Sreerekha, P.R., Chennazhi, K.P., Kasper, F.K., Nair, S. V., Mikos, A.G., Fabrication and characterization of multiscale electrospun scaffolds for cartilage regeneration, *Biomedical Materials*, 8, 014013, 1-11, **2013**.
- [71] Joshi, V., Lei, N.Y., Walthers, C.M., Wu, B., Dunn, J.C.Y., Macro-porosity enhances vascularization of electrospun scaffolds, *Journal of Surgical Research*, 183, 18-26, **2013**.
- [72] <http://electrospintech.com/stack-layers.html> - .VciWvxPtmko.
- [73] Leung, L. H., Fan, S., Naguib, H.E., Fabrication of 3D electrospun structures from poly(lactide-co-glycolide acid)-nano-hydroxyapatite composites, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50, 242-249, **2012**.
- [74] Wright, L. D., Young, R.T., Andric, T., Freeman, J.W., Fabrication and mechanical characterization of 3D electrospun scaffolds for tissue engineering, *Biomedical Materials*, 5, 055006, 1-9, **2010**.
- [75] Blakeney, B. A., Tambralli, A., Anderson, J.M., Andukuri, A., Lim, D.-J., Dean, D., Jun, H.-W., Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold, *Biomaterials*, 32, 1583-1590, **2011**.
- [76] Vaquette, C., Cooper-White, J.J., Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration, *Acta Biomaterialia*, 7, 2544-2557, **2011**.

- [77] Zhang, D., Chang, J., Electrospinning of three-dimensional nanofibrous tubes with controllable architectures, *Nano Letters*, 8, 3283-3287, **2008**.
- [78] Bhrany, A. D., Beckstead, B.L., Lang, T.C., Farwell, D.G., Giachelli, C.M., Ratner, B.D., Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold, *Tissue Engineering*, 12, 319-330, **2006**.
- [79] Kim, T. G., Chung, H.J., Park, T.G., Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles, *Acta Biomaterialia*, 4, 1611-1619, **2008**.
- [80] Bhardwaj, N., Kundu, S. C., Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28, 325-347, **2010**.
- [81] Bulysheva, A. A., Bowlin, G.L., Klingelhutz, A.J., Yeudall, W.A., Low-temperature electrospun silk scaffold for in vitro mucosal modeling, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100, 757-767, **2012**.
- [82] Simonet, M., Schneider, O.D., Neuenschwander, P., Stark, W.J., Ultraporous 3D polymer meshes by low-temperature electrospinning: use of ice crystals as a removable void template, *Polymer Engineering & Science*, 47, 2020-2026, **2007**.
- [83] Yousefzadeh, M., Latifi, M., Amani-Tehran, M., Teo, W.E., Ramakrishna, S., A note on the 3D structural design of electrospun nanofibers, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7, 17-23, **2012**.
- [84] Yokoyama, Y., Hattori, S., Yoshikawa, C., Yasuda, Y., Koyama, H., Takato, T., Kobayashi, H. , Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric, *Materials Letters*, 63, 754-756, **2009**.
- [85] Ki, C. S., Kim, J.W., Hyun, J.H., Lee, K.H., Hattori, M., Rah, D.K., Park, Y.H., Electrospun three-dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold, *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 3922-3928, **2007**.
- [86] Yang, W., Yang, F., Wang, Y., Both, S.K., Jansen, J.A., In vivo bone regeneration via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers, *Acta Biomaterialia*, 9, 4505-4512, **2013**.
- [87] Hong, S., Kim, G., Fabrication of size-controlled three-dimensional structures consisting of electrohydrodynamically produced micro/nanofibers, *Applied Physics A*, 103, 1009-1014, **2011**.
- [88] Gang, E. H., Ki, C.S., Kim, J.W., Lee, J., Cha, B.G., Lee, K.H., Park, Y.H., Highly porous three-dimensional poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) microfibrous scaffold prepared by electrospinning method: A comparison study with other PLGA type scaffolds on its biological evaluation, *Fibers and Polymers*, 13, 685-691, **2012**.
- [89] Stankus, J. J., Guan, J., Fujimoto, K., Wagner, W.R., Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix, *Biomaterials*, 27, 735-744, **2006**.
- [90] Jayasinghe, S. N., Warnes, G., Scotton, C.J., Bio-electrosprayed living composite matrix implanted into mouse models, *Macromolecular Bioscience*, 11, 1364-1369, **2011**.
- [91] Ribba, L., Parisi, M., D'Accorso, N.B., Goyanes, S., Electrospun nanofibrous mats: from vascular repair to osteointegration, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 1-28, **2014**.

- [92] Müller, R.-J., Kleeberg, I., Deckwer, W.-D., Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents, *Journal of Biotechnology*, 86, 87-95, **2001**.
- [93] Müller, R.-J., Witt, U., Deckwer, W.-D., Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents, *Polymer Degradation and Stability*, 59, 203-208, **1998**.
- [94] Siegenthaler, K. O., Künkel, A., Skupin, G., Yamamoto, M., Ecoflex and Ecovio: biodegradable, performance-enabling plastics *Advanced Polymer Science*, 245, 91-136, **2012**.
- [95] Chieng, B. W., Ibrahim, N.A., Yunus, W.M.Z.W., Effect of organo-modified montmorillonite on poly(butylene succinate)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) nanocomposites, *Express Polymer Letters*, 4, 404-414, **2010**.
- [96] Ecoflex F Blend C1200 Product Information, BASF Chemical Company,
- [97] Witt, U., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Studies on sequence distribution of aliphatic/aromatic copolyesters by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for evaluation of biodegradability, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 197, 1525-1535, **1996**.
- [98] Rantze, E., Kleeberg, I., Witt, U., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Aromatic components in copolyesters: model structures help to understand biodegradability, *Macromolecular Symposia*, 130, 319-326, **1998**.
- [99] Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, R. M., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Biodegradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by *Thermomonospora fusca* and Other Thermophilic Compost Isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1731-1735, **1998**.
- [100] Rychter, P., Kawalec, M., Sobota M., Kurcok, P., Kowalczyk, M., Study of aliphatic-aromatic copolyester degradation in sandy soil and its ecotoxicological impact, *Biomacromolecules*, 11, 839-847, **2010**.
- [101] Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S.S., Mah, J.-H., Kang, D.-H., Zhang, J., Tang, J., Biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films incorporated with nisin: characterization and effectiveness against *Listeria innocua*, *Journal of Food Science*, 75, 215-224, **2010**.
- [102] Liu, H., Zhang, J., Research progress in toughening modification of poly(lactic acid), *Polymer Physics*, 49, 1061-1083, **2011**.
- [103] Brookes, C. K., *Advancement of biobased products through design, synthesis and engineering of biopolyesters*, Doktora Tezi, Michigan State University, Department of Chemical Engineering and Materials Science, **2007**.
- [104] Jiang, L., Liu, B., Zhang, J., Properties of poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate)/nanoparticle ternary composites, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 7594-7602, **2009**.
- [105] Correlo, V. M., Boesel, L.F., Pinho, E., Costa - Pinto, A.R., Alves da Silva, M.L., Bhattacharya, M., Mano, J.F., Neves, N.M., Reis R.L., Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91, 489-504, **2009**.
- [106] Ribeiro Neto W.A., d. P., A.C.C., Martins, T.M.M., Goes, A.M., Averous, L., Schlatter, G., Bretas, R.E.S., Poly(butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite

composite structures for bone tissue recovery, *Polymer Degradation and Stability*, 120, 61-69, **2015**.

[107] Lin, L., Chow, K.L., Leng, Y., Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89, 326-335, **2008**.

[108] Kaynak, G., *Mikroalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.

[109] Venugopal, J., Prabhakaran, M.P., Zhang, Y., Low, S., Choon, A.T., Ramakrishna, S., Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368, 2065-2081, **2010**.

[110] Cao, J. M., Feng, J., Deng, S.G., Chang, X., Wang, J., Liu, J.S., Lu, P., Lu, H.X., Zheng, M.B., Zhang, F., Tao, J., Microwave-assisted solid-state synthesis of hydroxyapatite nanorods at room temperature, *Journal of Materials Science*, 40, 6311-6313, **2005**.

[111] Rodriguez-Lorenzo, L. M., Vallet-Regi, M., onrolled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites, *Chemical Materials*, 12, 2460-2465, **2000**.

[112] Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C. A., Groot, K., Layrolle, P., Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants, *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 517-522, **2002**.

[113] Dorozhkina, E. I., Dorozhkin, S.V., Structure and properties of the precipitates formed from condensed solutions of the revised simulated body fluid, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67, 578-581, **2003**.

[114] Feng, W., Mu-sen, L., A Biomimetic Method of Hydroxyapatite Powders Synthesized in Simulated Body Fluid, *Key Engineering Materials*, 297, 1371-1375, **2005**.

[115] Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü. , Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098-3111, **2009**.

[116] Amos, F. F., Olszta, M.J., Khan, S.R., Gower, L.B., Relevance of a polymer-induced liquid-precursor (PILP) mineralization process to normal and pathological biomineralization. *Biomineralization-Medical Aspects of Solubility*. (eds: E. Königsberger, L. Königsberger), **2007**.

[117] Nazir, R., Iqbal, N., Khan, A.S., Akram, A., Asif, A., Chaudhry, A.A., Rehman, I., Hussain, R., Rapid synthesis of thermally stable hydroxyapatite, *Ceramics International*, 38, 457-462, **2012**.

[118] Demirtaş, T. T., Kaynak, G., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation, *Materials Science and Engineering C*, 49, 713-719, **2015**.

[119] Morgan, J., Holtman, K.R., Keller, J.C., Stanford, C.M., In vitro mineralization and implant calcium phosphate-hydroxyapatite crystallinity, *Implant Dentistry*, 5, 264-271, **1996**.

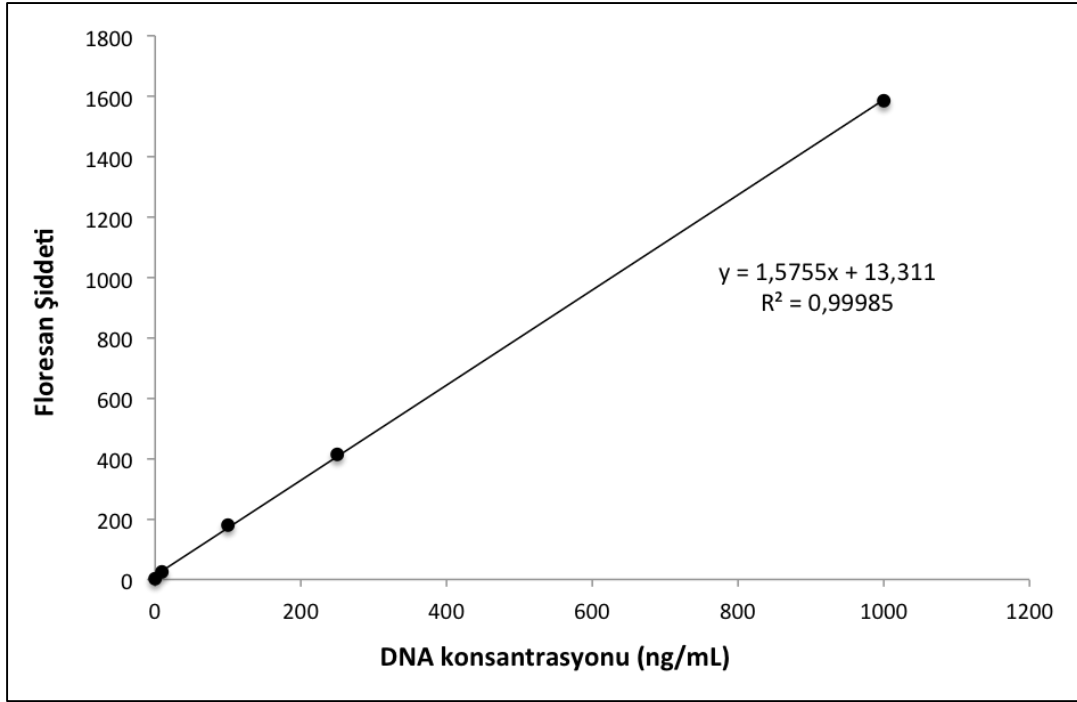
- [120] Evis, Z., Çeşitli iyonlar eklenmiş nano-hidroksiapatitler: üretim yöntemleri, iç yapı, mekanik ve biyoyumluluk özellikleri yönlerinden incelenmesi, *International Journal of Research and Development*, 3, 55-61, **2011**.
- [121] Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Bizios, R., Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research* 59, 312-317, **2001**.
- [122] Webster, T. J., Massa-Schlueter, E.A., Smith, J.L., Slamovich, E.B., Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*, 25, 2111-2121, **2004**.
- [123] Shi, C., Gao, J., Wang, M., Fu, J., Wang, D., Zhu, Y., Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity, *Materials Science and Engineering C*, 55, 497-505, **2015**.
- [124] Naghii, M. R., The significance of dietary boron, with particular reference to athletes, *Nutrition and Health*, 13, 31-37, **1999**.
- [125] Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F.H., Guglielmotti, M.B., Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet, *The Anatomical Record*, 291, 441-447, **2008**.
- [126] Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F.H., Guglielmotti, M.B., A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet, *Archives of Oral Biology*, 53, 677-682, **2008**.
- [127] Hakkı, S. S., Bozkurt, B.S., Hakkı, E.E., Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243-250, **2010**.
- [128] Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T.T, Aydın, S.T., Hakkı, S.S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, **2015**.
- [129] Çakmak, S., *Kemik doku onarımı için hidroksiapatit/peptit amfil bazlı nanokompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, **2015**.
- [130] Beşkardeş, I. G., Gümüşderelioğlu, M., Biomimetic apatite-coated PCL scaffolds: effect of surface nanotopography on cellular functions, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24, 507-524, **2009**.
- [131] Roy, P. K., Surekha, P., Rajagopal, C., Choudhary, V., Thermal degradation studies of LDPE containing cobalt stearate as pro-oxidant, *Express Polymer Letters*, 1, 208-216, **2007**.
- [132] Hsieh, H. L., Quirk, R.P., Anionic Polymerization, Principles and Practical Applications, Marcel Dekker, New York, **1996**.
- [133] Zan, Q., Wang, C., Dong, L., Cheng, P., Tian, J., Effect of surface roughness of chitosan-based microspheres on cell adhesion, *Applied Surface Science*, 255, 401-403, **2008**.
- [134] Tamada, Y., Ikada, Y., Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces *Journal of Colloid Interface Science*, 155, 334-339, **1993**.
- [135] Mochizuki, M., Hirami, M., Structural effects on the biodegradation of aliphatic polyesters, *Polymers for Advanced Technologies*, 8, 334-339, **1997**.

- [136] Lin, C.-H., Chang, C.-H., Jao, W.-C., Yang, M.-C., Organic-inorganic hybrid membranes prepared from the sol-gel process of poly(butyleneadipate-co-terephthalate) and TiO₂, *Polymers for Advanced Technologies*, 20, 672-679, **2008**.
- [137] Gerçek, I., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioǧlu M., A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 86, 1012-1022, **2008**.
- [138] Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., Liu, C., Yang, X., Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Material Science and Engineering R*, 80, 1-36, **2014**.
- [139] Betz, M. W., Yoon, D.M., Fisher, J.P., Engineering polymeric scaffolds for bone grafts. Engineering of functional skeletal tissues. (eds: F. Bronner, Farach-Carson M.C., Mikos, A.G.), Springer, New York, **2006**.
- [140] Gümüşderelioǧlu, M., Dalkıranoǧlu, S., Aydın, R.S.T., Çakmak, S., A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 98, 461-472, **2011**.
- [141] Chen, M., Patra, P.K., Warner, S.B., Bhowmick, S., Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds, *Tissue Engineering*, 13, 579-587, **2007**.
- [142] Woo, K. M., Chen, V.J., Ma, P.X., Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 67, 531-537, **2003**.
- [143] Guo, X., Gough, J., Xiao, P., Ltu, J., Shen, Z., Initial in vitro interaction of human osteoblasts with nanostructured hydroxyapatite (NHA), *Advances in Bioceramics and Biocomposites II, Ceramic Engineering and Science Proceedings*, 27, 3-14, **2007**.
- [144] Mi, H.-Y., Palumbo, S., Jing, X., Turng, L.-S., Li, W.J., Peng, X.-F., Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size, *Journal of Biomedical Materials Research B*, 102, 1434-1444, **2014**.
- [145] Mountford, J. C., Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy, *Transfusion Medicine*, 18, 1-12, **2008**.
- [146] Gomes, M. E., Holtorf, H.L., Reis, R.L., Mikos, A.G., Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor, *Tissue Engineering*, 12, 801-809, **2006**.
- [147] Bancroft, G. N., Sikavitsas, V.I., van den Dolder J., Sheffield, T. L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., Mikos, A.G., Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12600-12605, **2002**.
- [148] Birmingham, E., Niebur, G.L., McHugh, P.E., Shaw, G., Barry, F.P., McNamara, L.M., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche, *European Cells and Materials*, 23, 13-27, **2012**.
- [149] Boyer, P. D., *The Enzymes*, Vol. IV, Academic Press, New York, **1971**.
- [150] Millan, J. L., Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes, *Purinergic Signalling*, 2, 335-341, **2006**.

- [151] Kirkham, G. R., Cartmell, S.H., Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. Topics in Tissue Engineering 3. (eds: N. Ashammakhi, Reis, R., Chiellini, E.), **2007**.
- [152] Ruckh, T. T., Carroll, D.A., Weaver, J.R., Popat, K.C., Mineralization content alters osteogenic responses of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffolds, *Journal of Functional Biomaterials*, 3, 776-798, **2012**.
- [153] Ruckh, T. T., Kumar, K., Kipper, M.J., Popat, K.C., Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly(ϵ -caprolactone) nanofiber scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 6, 2949-2959, **2010**.
- [154] Popat, K. C., Daniels, R.H., Dubrow, R.S., Hardev, V., Desai, T.A., Nanostructured surfaces for bone biotemplating applications, *Journal of Orthopedic Research*, 24, 619-627, **2005**.
- [155] Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., Rompis F.A., Peng, L., Zhu Lu, C., Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells., *Biological Trace Element Research*, 144, 306-315, **2011**.
- [156] Lee, J. H., Rim, N.G., Jung, H.S., Shin, H., Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co(glycolic acid)] and hydroxyapatite, *Macromolecular Bioscience*, 10, 173-182, **2010**.

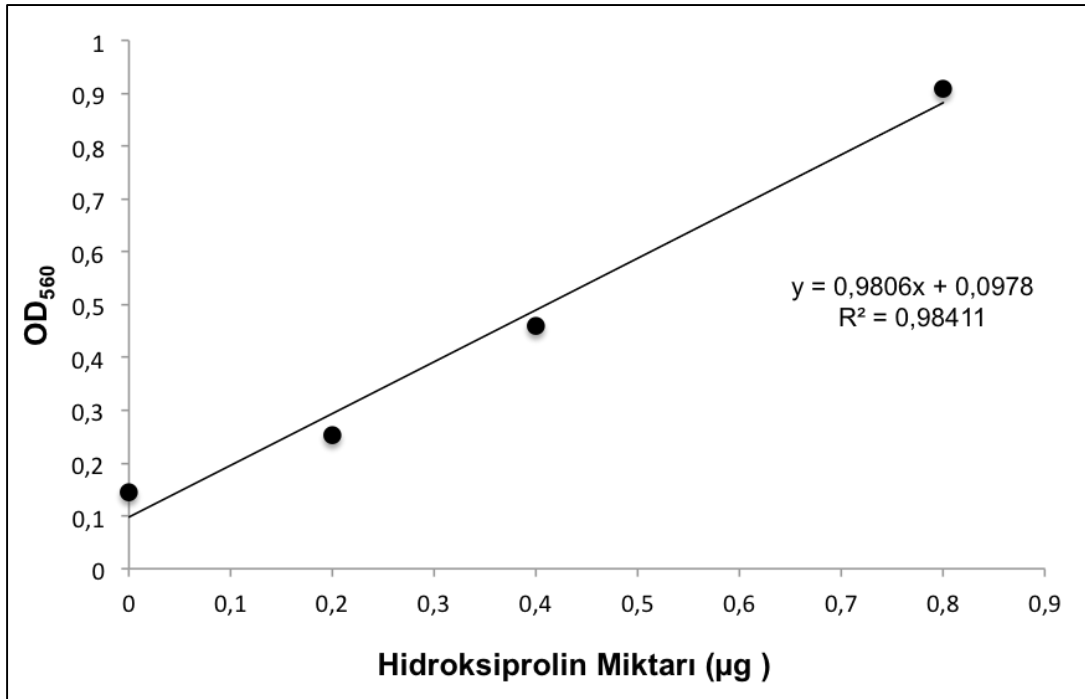
EK-1

DNA Kalibrasyonu



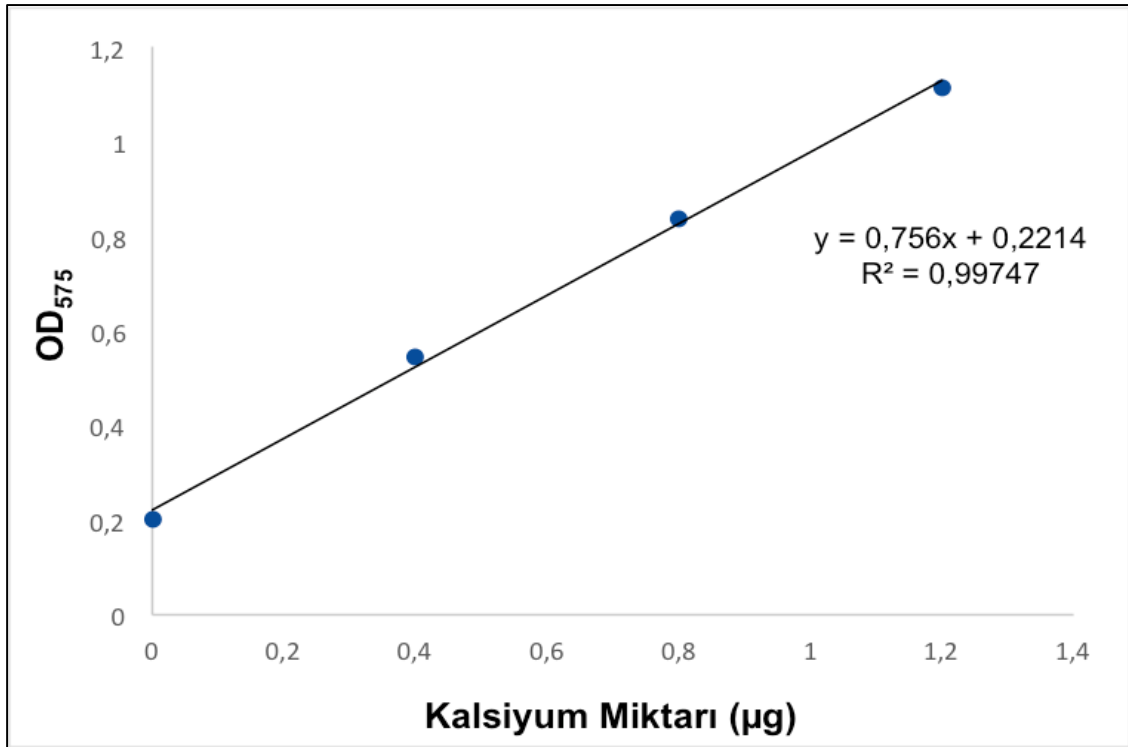
EK-2

Hidroksiprolin Kalibrasyon Grafiği



EK-3

Kalsiyum Kalibrasyon Grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Aysu ARSLAN

Doğum Yeri : Zonguldak

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : aysuarslan@gmail.com

Adres : Pınarbaşı Mah. 734 sk. No:20, D:5, Konyaaltı, ANTALYA

Eğitim

Lise : Adem Tolunay Anadolu Lisesi (2009)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2013)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

İş Deneyimi

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje Kodu: FHD-2015-6667, Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) Doku İskeleleri: Fabrikasyon ve *in vitro* Testler – 20,227 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Diğer Yayınlar

- **Arslan, A.**, Şimşek, M., Aldemir, S.D., Kazaroğlu, N.M., Gümüşderelioğlu, M. 2014. Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: effect of honey on electrospinning process. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 25, No. 10, 999–1012.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Arslan, A.**, Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Poly(butyleneadipate-co-terephthalate) scaffolds for tissue engineering applications, 4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine, 27-29 Temmuz 2015, Roma, İTALYA (sözlü sunum)
- **Arslan, A.**, Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., 3D electrospun PBAT-based fibrous scaffolds for bone regeneration., 21st International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), 22-24 Ekim 2015, Antalya, TÜRKİYE (Poster sunumu)

Diğer Sunumlar

- **Arslan, A.**, Şimşek, M., Aldemir, S.D., Kazaroğlu, N.M., Gümüşderelioğlu, M., Honey containing electrospun PET wound dressings, 2nd International Congress on Healthcare and Medical Textiles (EgeMeditex), 25-26 Eylül 2014, İzmir, TÜRKİYE (sözlü sunum)

