

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA DESTEKLİ
SİKİŞTİRİLABİLİR KEMİK GREFTLERİ**

**COMPRESSIBLE BONE GRAFTS SUPPORTED BY
PLATELET RICH PLASMA**

SENA KOÇ

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

ARŞ. GÖR. DR. SONER ÇAKMAK

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

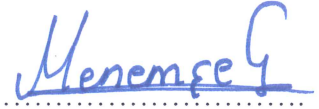
olarak hazırlanmıştır.

SENA KOÇ'un hazırladığı "Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

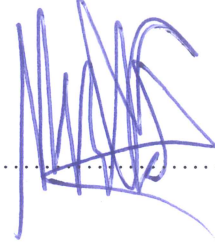
Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ
Başkan



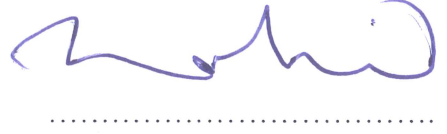
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



Doç. Dr. Mert ÇALIŞ
Üye



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
Üye



Doç. Dr. Erhan BAT
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20.06.2019

Sena KOÇ


YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarda kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yüksek Öğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20 / 06 / 2019

SENA KOÇ

ÖZET

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA DESTEKLİ SIKIŞTIRILABİLİR KEMİK GREFTLERİ

Sena KOÇ

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eş Danışman: Arş. Gör. Dr. Soner ÇAKMAK

Haziran 2019, 102 Sayfa

Bu çalışma “Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri” başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (FYL-2018-16974) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Sunulan tez çalışmasında amaç, geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere üç boyutlu (3B) kolaylıkla şekil alabilen, sıkıştırılabilir formda ve trombositten zengin plazma (PRP) ile biyoaktivitesi artırılmış nanofibröz kemik greftlerinin geliştirilmesidir.

Çalışma kapsamında öncelikle osteoindüktif etkiyi arttırmak için sentetik vücut sıvısından (SBF) mikrodalga yöntemiyle hidroksiapatit (HAp) nanopartikülleri üretilmiş ve poli(L-laktik asit) (PLLA) içerisine katılmıştır. Üç-boyutlu (3B) elektroçirme yöntemiyle nanofibroz yapıda pamuksu alloplastik greft malzemeleri üretilmiş ve üretilen malzemelere farklı süre ve derişimlerdeki NaOH çözeltileri içerisinde modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Modifikasyon öncesi PLLA-HAp gruplarında su temas açısı $128.2\pm 3.1^\circ$ iken, 0.1 M NaOH çözeltisi ile 6 saat gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda su temas açısı $73.8\pm 12.3^\circ$ olarak ölçülmüş ve modifikasyon süresiyle hidrofilitenin arttığı görülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleriyle de yüzey pürüzlülüğünün arttığı ve fiber morfolojisini koruyan malzemelerin başarıyla üretildiği tespit edilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 27.09.2017 tarih ve GO 17/671-23 karar numaralı onayının ardından, gönüllü bireylerden alınan kan ile PRP izolasyonu santrifüj işlemiyle (1,500 g 8 dk) gerçekleştirilmiştir. PRP pipetleme yöntemiyle greftlere yüklenmiş ve % 10 CaCl₂ ile aktive edilmiştir. Aktivasyon etkinliği ise akış sitometrisi ile CD62 (P-selektin) ve CD41/61 (glikoprotein IIb/IIIa) proteinlerinin yüzdelere bakılarak incelenmiştir. Aktivasyon sonrası protein yüzdelere yaklaşık 4 kat arttığı ve aktivasyonun başarıyla gerçekleştiği görülmüştür.

Fare preosteoblast hücreleriyle (MC3T3-E1) yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin proliferasyonu MTT (3-[4,5-Dimetilazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür) analizi, osteojenik farklılaşmaları Alkalın Fosfataz (ALP) aktivitesi tayini ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizleri ile, hücre morfolojileri ise konfokal mikroskopla incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, PRP destekli biyomalzemelerin, hücre proliferasyonu ve osteojenik farklılaşmada anlamlı derece artış sağladığı görülmüştür.

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 26.02.2019 tarih ve 2019/02-15 karar numaralı onayının ardından, *in vivo* hayvan deneyleri 24 adet Wistar Albino Sıçan kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sıçanların kalvariyumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında kemik defektleri oluşturulmuştur. Erken kemikleşmeyi takip etmek için 8. hafta sonunda, geç dönem kemikleşme için de 20. hafta sonunda sıçanlardan kemik dokuları alınmış ve bilgisayarlı tomografi (mikro-CT) görüntüleriyle kemikleşme oranları karşılaştırılmıştır. En yüksek kemik oluşumu altın standart olan otogreftte ölçülmüş, ancak PRP destekli greft malzemelerinin de otogreftte alternatif olarak kemik rejenerasyonunda kullanılabileceği görülmüştür.

Sonuç olarak, hücre kültürü çalışmalarında geliştirilen PRP+PLLA-HAp kompozit nanofiber kemik greftlerinin hücrelerin tutunup çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği görülmüştür. Hayvan deneylerinde ise biyomalzemelerin, hasar bölgesinin şeklini kolaylıkla alarak sıkıştırılabilir formda olduğu kanıtlanmış ve PRP destekli greftlerin kemik rejenerasyonunu hızlandırarak otogreftte alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Üç-boyutlu elektroegirme, Poli(L-laktik asit), Hidroksiapatit, Trombositten zengin plazma, *In vivo*.

ABSTRACT

COMPRESSIBLE BONE GRAFTS SUPPORTED BY PLATELET RICH PLASMA

Sena KOÇ

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Co-Supervisor: Res. Asst. Dr. Soner ÇAKMAK

June 2019, 102 Pages

This study was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with a graduate project entitled “Compressible Bone Grafts Supported By Platelet Rich Plasma” (FYL-2018-16974). The aim of this thesis is to develop compressible 3-dimensional (3D) nanofibrous bone grafts supported by platelet rich plasma (PRP) for use in treatment of irregular bone damage.

Firstly, hydroxyapatite (HAp) nanoparticles were produced from synthetic body fluid (SBF) and added to poly (L-lactic acid) (PLLA) to increase the osteoinductive effect. Alloplastic graft materials were fabricated by using three-dimensional (3B) electrospinning method and modification processes were carried out in different concentrations of NaOH solutions at different times. The water contact angle of PLLA-HAp group was measured as $128.2 \pm 3.1^\circ$, while the water contact angle was $73.8 \pm 12.3^\circ$ after the modification performed with 0.1 M NaOH solution for 6 hours. As a result, it was observed that the hydrophilicity increased with the modification period. In addition, it was determined with scanning electron microscope (SEM) images that the surface roughness increased and the materials protecting the fiber morphology were produced successfully.

According to Hacettepe University Noninvasive Clinical Research Ethics Committee approval of the report dated 27.09.2017 and numbered GO17/671-23, blood of volunteers was taken to isolate PRP with centrifugation (1,500 g, 8 min). PRP was loaded into the grafts by pipetting and activated with 10% CaCl₂. The efficiency of the activation was evaluated with flow cytometry data which give the percentages of CD62 (P-selectin) and CD41/61 (glycoprotein IIb/IIIa) proteins. After activation, it was seen that the percentages of proteins increased approximately 4-fold.

In vitro cell culture studies were carried out with using mouse preosteoblast cells (MC3T3-E1). MTT (3-[4,5-Dimethylazol-2-yl]-Diphenyltetrazolium Bromide) analysis for cell viability, confocal microscopy for cell morphology, Alkaline Phosphatase (ALP) activity and Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analyzes were used to examine for osteogenic differentiation of cells cultured on graft materials. At the end of the cell culture studies, it was observed that graft materials supported by PRP increased cell proliferation and osteogenic differentiation significantly.

According to Hacettepe University Animal Experiments Local Ethics Committee approval of the report dated 26.02.2019 and numbered 2019/02-15, *in vivo* animal experiments were performed with using of 24 Wistar Albino rats. Defects of 5 mm diameter were created in both parietal calvarium bones independently. Bone tissues were obtained at the end of 8th week and 20th week for early and late ossification respectively, also the ossification rate was compared with computed tomography (micro-CT) images. The highest bone formation was observed in the gold standard autograft, but it was found that the graft materials supported by PRP could be used as an alternative to autograft in bone regeneration.

In conclusion, it was determined that developed PRP+PLLA-HAp nanofiber composite bone grafts supported the attachment and differentiation of preosteoblasts. In animal experiments, it was shown that biomaterials were easily shaped for defect geometry because of their compressible form. Thus, the grafts supported by PRP can be used as an alternative to autograft by accelerating bone regeneration.

Key Words: Bone tissue engineering, Three-dimensional electrospinning, Poly (L-lactic acid), Hydroxyapatite, Platelet rich plasma, *In vivo*.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde engin bilgi ve tecrübeleriyle her türlü destek ve imkânı sağlayan, hoşgörüsü ve anne şefkatiyle beni her zaman cesaretlendiren, bir bilim insanı ve aynı zamanda insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan her daim büyük bir gurur duyduğum çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na** en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tüm aşamasında emeğini asla ödeyemeyeceğim, bilgi ve tecrübeleriyle ufku aydınlatan, sadece eş danışmanım değil aynı zamanda bir ağabey olarak da her zaman yanımda olduğunu bildiğim çok değerli hocam **Arş. Gör. Dr. Soner Çakmak'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca FYL-2018-16974 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne** teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun iş temposu arasında beni kırmayıp her daim vakit ayıran, kendilerini tanımak ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çok değerli hocam **Doç. Dr. Mert Çalış'a, Arş. Gör. Dr. Mahmut Muhsin Yılmaz'a** ve **Dr. Arda Büyüksungur'a** çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince laboratuvar olanaklarını bana açan ve çalışmalarımın başarı ile sonuçlanabilmesi için büyük bir özveri ile bana destek olan çok değerli hocam **Prof. Dr. Sevil Çaylı'ya** ve öğrencisi canım arkadaşım **Gülben Akcan'a** teşekkürlerimi sunarım.

Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'nda sadece iş arkadaşı olarak değil, yakın dost olarak da çok güzel günler paylaştığım sevgili arkadaşlarım, **Gülnihal Tok İlhan'a, Hala Jarrar'a, Arş. Gör. Demet Çakır'a, Arş. Gör. Elvan Konuk'a, Arş. Gör. Tuğçe Gültan'a, Caner Karaaslan'a, Fayit Purkat'a, Arş. Gör. Burcu Sarıkaya'ya** ve tüm diğer değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca değerli dostlarım, **Arş. Gör. Ferdane Betül Bölükbaşı'na, Burçe Koçer'e, Erözen Özsoy'a** ve **Öğr. Gör. Ömer Yeşildal'a** destekleri ve arkadaşlıkları için çok teşekkür ederim.

Bilimsel ve sosyal anlamda bana çok şey katan, 10 parmağında 10 marifet **Özge Ekin Akdere** ve her daim beni motive edip sorularımı asla yanıtızsız bırakmayan **Dr. Öğr. Görevlisi Anıl Sera Çakmak** başta olmak üzere, bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman destek olan değerli hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Arş. Gör. Dr. Damla Çetin Altındal'a, Dr. Gülseren İrmak'a, Dr. Gökçe Kaynak Bayrak'a, Arş. Gör. Fatih Şentürk'e** çok teşekkür ederim.

Anlayışı ve sevgisi ile tanıştığım andan bu yana beni her daim mutlu etmeyi başarabilen, iyi ve kötü her anımı paylaşabildiğim **Nizam Çağrı Kelleci'ye** en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik yaşamda ve ahlaki değerleriyle her daim örnek aldığım, ailemizin gururu canım kuzenim, ablam **Doç. Dr. Rabia Terzi** ve değerli eşi, canım abim **Doç. Dr. Hasan Terzi'ye** her zaman yanımda olup beni destekledikleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu hayatta sahip olduğum en değerli varlıklarım ve aslında başarılarımın gerçek mimarları, canım annem **Aylan Koç**, canım babam **Mustafa Koç** ve canım abim **İshak Koç**, sizi çok çok çok sevdiğim. Her daim yanımda olup aldığım kararları desteklediğiniz, sevgi ve emeklerinizi hiçbir zaman esirgemediğiniz ve varlığınızla bana her zaman huzur verdiğiniz için size çok teşekkür ediyorum.

Sena Koç
Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusu.....	3
2.1.1. Kemik Hücreleri.....	4
2.1.2. Kemik Zarları.....	5
2.1.3. Kemik Tipleri.....	5
2.2. Kemik İyileşme Süreci.....	6
2.2.1. Kemik İyileşme Sürecinde Gerçekleşen Komplikasyonlar	8
2.3. Kemik Hasarları.....	9
2.4. Kemik Greftleri	10
2.4.1. Otogreftler.....	10
2.4.2. Allogreftler	10
2.4.3. Zenogreftler	11
2.4.4. Alloplastik Greftler	11
2.4.4.1. Seramik Temelli Kemik Greftleri.....	11
2.4.4.2. Polimer Temelli Biyobozunur Kemik Greftleri	12
2.5. Seramik Temelli Greft Üretim Yöntemleri.....	14
2.6. Polimer Temelli Greft Üretim Yöntemleri.....	15
2.6.1. Çözücü-Dökümü/Parçacık-Uzaklaştırma Yöntemi.....	16
2.6.2. Eriyik Kalıplama	17
2.6.3. Dondurarak Kurutma.....	17
2.6.4. Elektroegirme.....	18
2.6.4.1. İki Boyutlu (2B) Üretim.....	20
2.6.4.2. Üç Boyutlu (3B) Üretim	21

2.6.4.3. Elektroegirme ile Üretilen Malzemelerin Greft Olarak Uygulamaları	22
2.7. Yüzey Modifikasyon Yöntemleri	23
2.7.1. Plazma İşlemi	24
2.7.2. Yüzey Aşısı Polimerizasyonu	25
2.7.3. Islak Aşındırma Yöntemi	26
2.8. Trombosit Zengin Plazma	26
2.8.1. PRP İzolasyonu, Aktivasyonu ve Salımı	29
2.8.2. PRP’de Bulunan Büyüme Faktörleri	31
2.8.3. PRP’nin Kemik İyileşmesindeki Önemi	33
2.8.4. Ortopedik Cerrahide PRP’nin Klinik Uygulamaları	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler	39
3.2. Etik Kurul Onayları ve Mali Destek	40
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Biyomalzemelerin Üretimi	40
3.3.1. Hidroksiapatit (HAp) Üretimi	40
3.3.2. PLLA-HAp Nanofibröz Alloplastik Greftlerin Üretimi	41
3.3.3. Nanofiberlerin Modifikasyonu	42
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları	43
3.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	43
3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	43
3.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)	43
3.4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	43
3.4.5. Çekme Testi	44
3.4.6. Su Teması Açısı Ölçümleri	44
3.4.7. Fourier Transform Kızılötesi (ATR-FTIR) Analizi	44
3.4.8. Su Tutma Kapasitesi Tayini	44
3.4.9. <i>In Vitro</i> Biyobozunurluk Çalışması	45
3.5. PRP Uygulaması	45
3.5.1. PRP İzolasyonu ve Aktivasyonu	45
3.5.2. Hemogram Testi	46
3.5.3. Akış Sitometrisi (Flow Cytometry)	46
3.5.4. PRP’nin Greftlere Yüklenmesi	47
3.5.5. Trombositlerin Görüntülenmesi	47
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
3.6.1. Dinamik ve Statik Hücre Ekimi	48

3.6.3. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	50
3.6.4. Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi	50
3.6.4.1. Alkalin Fosfataz (ALP) Aktivitesi.....	50
3.6.4.2. Gen Ekspresyonu Analizleri.....	51
3.7. <i>İn Vivo</i> Hayvan Deneyleri.....	52
3.7.1. Deney Modeli ve Çalışma Grupları	52
3.7.2. Anestezi	52
3.7.3. Cerrahi İşlem.....	53
3.7.4. Cerrahi Sonrası İzlem.....	53
3.7.5. Ötenazi.....	53
3.7.6. Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Görüntülemesi	54
3.8. İstatistiksel Analiz	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. Üç-Boyutlu Kompozit Fiber Greftlerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	55
4.1.2. Nanofiber Yüzeylerin Modifikasyonu.....	61
4.2. PRP Uygulaması.....	67
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	71
4.3.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	71
4.3.2. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	74
4.3.3. Osteojenik Farklılaşmasının Belirlenmesi.....	75
4.3.3.1. Alkalin Fosfataz (ALP) Aktivitesi.....	75
4.3.3.2. Gen Ekspresyonu Analizleri.....	76
4.4. <i>İn Vivo</i> Hayvan Deneyleri.....	81
4.4.1. Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Görüntülemesi	82
5. GENEL SONUÇLAR	86
6. KAYNAKLAR	89
7. EKLER.....	98
8. ÖZGEÇMİŞ.....	101

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Hidroksiapatit üretim yöntemleri [35, 42].....	15
Çizelge 2.2.	PRP içinde yer alan bazı önemli biyolojik olarak aktif moleküller ve bunların fizyolojik rolleri ([86]'dan değiştirilerek).....	28
Çizelge 3.1.	Kimyasal ve biyolojik madde listesi.....	39
Çizelge 3.2.	10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1 L) [44].....	40
Çizelge 3.3.	RT-PCR analizi için kullanılan primer dizileri	51
Çizelge 4.1.	PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait termal ve mekanik özellikler.....	61
Çizelge 4.2.	Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş 2 boyutlu PLLA doku iskelelerine ait su temas açısı değerleri.....	62
Çizelge 4.3.	NaOH modifikasyonu uygulanan ve uygulanmayan greft gruplarının karakteristik özellikleri.....	66

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Mikro yapıdaki kemik iskeletinin nanoboyutlara varan hiyerarşik yapısı ([8]'den değiştirilerek).....3
- Şekil 2.2. Kemik dokusunun şematik olarak gösterimi.....5
- Şekil 2.3. Femur kırığı onarımı. Kırık iyileşmesinin ana metabolik fazları mavi çubuklar, biyolojik aşamalar ise kahverengi çubuklar ile gösterilmiştir. Kırık iyileşmesinin birincil metabolik fazları (anabolik ve katabolik), bu fazları kapsayan üç ana biyolojik aşama (enflamatuar, endokondral kemik oluşumu ve birleştirilmiş yeniden biçimlenme) bağlamında sunulmaktadır. Her aşamada bulunan birincil hücre tipleri ve her aşamada aktif oldukları zaman aralığı gösterilmektedir. Kısaltmalar: PMN, polimorfonükleer lökosit ([16]'dan değiştirilerek).....8
- Şekil 2.4. PLA'nın kimyasal yapısı.....14
- Şekil 2.5. Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniğinin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek).....16
- Şekil 2.6. Eriyik kalıplama yönteminin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek).....17
- Şekil 2.7. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek)..18
- Şekil 2.8. Polimer tabanlı nanofiberlerin kullanım alanları ([54]'ten değiştirilerek).....19
- Şekil 2.9. Klasik elektroğirme yönteminin şematik gösterimi.....20
- Şekil 2.10. Üç boyutlu elektroğirme yöntemleri a) ıslak elektroğirme, b) toplayıcı modifikasyonu ([4, 60]'tan değiştirilerek).....21
- Şekil 2.11. a) Beyaz İsviçreli Alp koyunlarında defekt alanının esnek greft malzemeleriyle tedavisindeki cerrahi prosedür, b) implantasyon sonrası görüntü ([64]'ten değiştirilerek).....23
- Şekil 2.12. Nanofiber modifikasyonunda kullanılan yöntemler A) Plazma işlemi veya ıslak kimya yöntemi B) Yüzey aşısı polimerizasyonu C) Eşzamanlı elektroğirme ([5]'ten değiştirilerek).....24
- Şekil 2.13. PRP izolasyonu ve PL preparatının şematik gösterimi. Trombosit aktivasyon süreci: Trombin, kalsiyum klorür ve kolajen veya donma-çözülme döngüleri trombositleri aktive edebilir ve/veya parçalayabilir. Ardından, aktifleşmiş/parçalanmış trombositler, hücre alımında, büyümede ve morfogeneizde rol oynayan sitokinler veya büyüme faktörleri gibi bazı

	molekülleri serbest bırakır. PRP, trombosit zengin plazma; PL, trombosit lizatı ([96]'dan değiştirilerek).....	30
Şekil 2.14.	PRP'nin kemik ve kırıkta oluşumu sürecinde kök hücreler üzerindeki rolü ([93]'ten değiştirilerek).....	34
Şekil 2.15.	PRP'nin kemik rejenerasyonu için klinik uygulamalarda kullanımı ([93]'ten değiştirilerek).....	35
Şekil 3.1.	Tez çalışmasında gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi...	38
Şekil 3.2.	Mikrodalga yöntemiyle 10xSBF'den HAp üretimi.....	41
Şekil 3.3.	Geleneksel elektroçirme yöntemiyle doku iskelesi üretiminde kullanılan toplayıcılar a) 2 boyutlu metal toplayıcı, b) 3 boyutlu plastik toplayıcı.....	42
Şekil 3.4.	Yüzey modifikasyon uygulamasının şematik gösterimi.....	43
Şekil 3.5.	Kan örneklerinin antikoagülan içeren tüplere alındıktan sonraki santrifüj işlemi ve sonuç olarak tüpün orta kısmında elde edilen PRP.....	46
Şekil 3.6.	Aktivasyonu gerçekleştirilen PRP'nin doku iskelelerine yüklenmesi.....	47
Şekil 3.7.	Statik ve dinamik hücre ekiminin şematik gösterimi.....	48
Şekil 3.8.	Tez çalışması kapsamında a) skalpte yapılan V insizyon [121] ve b) 5 mm çapta kraniyal defekt.....	53
Şekil 4.1.	Aynı koşullarda üretilen ve HAp içeren a), b), c) 2B PLLA ve d), e), f) 3B PLLA greftlerin makroskobik ve farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....	56
Şekil 4.2.	Üç-boyutlu nanofiber greftlere ait TEM görüntüleri ve fiber çap dağılımlarını gösteren histogramlar a), c) PLLA ve b), d) PLLA-HAp.....	57
Şekil 4.3.	HAp ve PLLA greftlerinin TGA termogramı (Mavi ok PLLA'nın, kırmızı ok ise PLLA-HAp greftlerinin maksimum bozunma gerçekleştirdiği sıcaklıkları göstermektedir).....	58
Şekil 4.4.	PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait DSC termogramı.....	59
Şekil 4.5.	a) PLLA ve PLLA kompozit doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrisi ve b) PLLA ve c) PLLA kompozit doku iskelelerin kopma öncesi uzama oranlarını gösteren kamera görüntüleri (n=3).....	60
Şekil 4.6.	Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş 2 boyutlu PLLA doku iskeleleri a) 5 dk, b) 10 dk, c) 15 dk, d) 30 dk ve e) 2 sa, f) 4 sa, g) 5 sa, h) 6 sa.....	62
Şekil 4.7.	İki-boyutlu PLLA doku iskelelerine ait su temas açısı görüntüleri a) modifikasyon öncesi, b) 0.1 M NaOH içerisinde 6 saat bekletilen grup.....	63
Şekil 4.8.	Üç-boyutlu malzemelere ait SEM görüntüleri a) PLLA, b) PLLA-HAp, c) PLLA/M, d) PLLA-HAp/M (M: NaOH modifikasyonu). Oklar kopan fiberleri,	

	daireler ise fiber yüzeyinde meydana gelen pürüzlülüğü göstermektedir.....	64
Şekil 4.9.	Malzemelere ait ATR-FTIR spektrumları (M: NaOH modifikasyonu).....	65
Şekil 4.10.	Hidroliz sonucu, PLA zincirlerindeki ester bağlarından yeni karboksil ve hidroksil uç gruplarının oluşumu ([134]'ten değiştirilerek).....	65
Şekil 4.11.	Greft gruplarına ait 28 günlük su tutma kapasitesi grafiği (n=3).....	66
Şekil 4.12.	Kompozit greft gruplarına ait 58 günlük biyobozunma grafiği (n=3).....	67
Şekil 4.13.	Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen PRP izolasyonunun şematik gösterimi.....	68
Şekil 4.14.	PRP aktivasyonunun (fibrin polimerizasyonunun) makroskopik olarak görüntülenmesi (Sayılar, PRP:%10 CaCl ₂ karışımının hacimsel olarak oranlarını göstermektedir). b, c) Farklı büyütmelelerdeki PRP+PLLA-HAp greftlerinin SEM görüntüleri. Kırmızı daireler trombositleri, oklar ise fibrin ağ yapısını göstermektedir.....	69
Şekil 4.15.	PRP ve CaCl ₂ -PRP örneklerinin akış sitometrisi sonuçları a, c) PRP ve b, d) PRP:CaCl ₂ karışımı (CD62: P-Selektin, CD41/61: Glikoprotein-IIb/IIIa).....	70
Şekil 4.16.	Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 1, 7 ve 14. günlerinde elde edilmiş PLLA-HAp içerikli doku iskelelerindeki MTT sonuçları (D: Dinamik, S: Statik ekim). İstatistiksel olarak anlamlı farklar, S/PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.....	72
Şekil 4.17.	Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 1, 7, 14 ve 21. günlerinde elde edilmiş PLLA içerikli doku iskelelerindeki MTT sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.....	73
Şekil 4.18.	PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp greftleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin konfokal mikroskopu görüntüleri. Görüntülerdeki kırmızı renk propidyum iyodür ile boyanmış hücre çekirdeğini, yeşil renk ise Alexa fluor ile iskeletsel F-aktinleri göstermektedir. Çizgiler ölçekleri temsil etmektedir (beyaz: 100 µm, mavi:50 µm, kırmızı:25 µm).....	74
Şekil 4.19.	Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin PLLA içerikli nanofiber doku iskeleleri üzerindeki ALP aktivite değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.....	76
Şekil 4.20.	PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar,	

PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.....78

Şekil 4.21. PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin COLL I ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.....79

Şekil 4.22. PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin OCN ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.....80

Şekil 4.23. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonundaki kemikleşme.....82

Şekil 4.24. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonunda elde edilen mikro-CT görüntüleri.....83

Şekil 4.25. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonunda elde edilen BV/TV oranları. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, kontrol grubu olarak 8. hafta kontrol grubu alındığında: n=3-6; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Kontrol grubu olarak 20. hafta kontrol grubu alındığında: n=3-6; ○ p<0.05, ○○ p<0.01, ○○○ p<0.001, ○○○○ p<0.0001. Haftalara göre her bir grup kendi içinde kıyaslandığında n=3-6; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.....84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

-COOH: Karboksil Grubu

CaCl₂: Kalsiyum Klorür

CaCl₂.2H₂O: Kalsiyum Klorür Dihidrat

CO₃²⁻: Karbonat İyonu

CO₂: Karbondioksit

Da: Dalton

dk: Dakika

HCl: Hidroklorik asit

-NH₂: Amino Grubu

n: Nano

MgCl₂.6H₂O: Magnezyum Klorür Heksahidrat

Mw: Moleküler Ağırlık

NaH₂PO₄.H₂O: Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat

NaHCO₃: Sodyum Bikarbonat

μ: Mikro

OH⁻: Hidroksil İyonları

PO₄³⁻: Fosfat İyonları

SO₂: Kükürdioksit

v/v: Hacim/Hacim Oranı

w/v: Kütle/Hacim Oranı

w/w: Kütle/Kütle Oranı

Kısaltmalar

2B: İki boyutlu

3B: Üç boyutlu

ACP: Amorf Kalsiyum Fosfat

ADP: Adenozin Difosfat

ALP: Alkalen Fosfataz

BMP: Kemik Morfogenetik Proteini

CaP: Kalsiyum Fosfat

CT: Bilgisayarlı Tomografi

COLL: Kolajen
DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DBM: Minerali Uzaklaştırılmış Kemik Matrisi
ECM: Ekstraselüler Matris
ECGF: Endotel Hücre Büyüme Faktörü
EDAC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EDTA: 2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diyldinitrilo)-tetraasetik asit
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA: Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi
FBS: Fetal Sığır Serumumu
FDA: Food and Drug Administration is
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GF: Büyüme faktörü
GM-CSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
hADSC: İnsan Adipoz Kökenli Kök Hücreleri
HAp: Hidroksiapatit
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol
HLA: İnsan Lökosit Antijeni
HDFs: İnsan Derisi Fibroblast Hücreleri
HIV: İmmün Yetmezlik Virüsü
HMDS: Hekzametildisilazan
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL: İnterlökin
LA: Laktik Asit
M: Yüzey Modifikasyonu
MC3T3-E1: Fare Kemik Öncül Hücreleri
mRNA: Haberci RNA
MSC: Mezenkimal Kök Hücre
MMP: Matris metalloproteinazlar
MTT: 3-[4,5-Dimetilazol-2-İl]-Difeniltetrazolyum Bromür
NaOH: Sodyum Hidroksit
nSrCO₃: Nano-stronsiyum karbonat

OCN: Osteokalsin
Pa: Paskal
PAg: Trombosit Aglomerasyonu
PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi
PF: Platelet Faktör
PCL: Poli(kaprolakton)
PDAF: Platelet Kaynaklı Anjiyogenez Faktörü
PDGF: Plateletten Türetilmiş Büyüme Faktörü
PF 4: Platelet Faktör 4
PGA: Poli(glikolik asit)
PHBV: Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
PL: Platelet lizatı
PLA: Poli(laktik asit)
PLLA: Poli(L-laktik asit)
PLGA: Poli(Laktik-ko-Glikolik) Asit
PRP: Trombositten Zengin Plazma
PR-SRGF: Platelet Büyüme Faktörleri Açısından Zengin Olan Süpernatant
PMN: Polimorfonükleer Lökosit
RANTES: Aktivasyon ile Regüle Olan Ekspresye ve Sekrete Edilen Normal T Hücresi.
RNA: Ribonükleik Asit
PU: Poliüretan
SBF: Sentetik Vücut Sıvısı
SEM: Taramalı Elektron Mikroskopu
SEP: Yumurta Kabuğu Membran Proteini
TCP: Trikalsiyum Fosfat
TCPS: Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TIMP: Doku Metalloproteinaz İnhibitörü
TNF α : Tümör Nekroz Faktör
UV: Ultraviyole
VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
XRD: X-ışını Kırınımı Analizi

1. GİRİŞ

Şekil bozukluklarına bağlı patolojik hasarlar veya karmaşık yapıdaki kırıklar gibi klinikte sıklıkla karşılaşılan kemik hasarlarının tedavisinde otogreftleme, allogreftleme gibi yöntemler kullanılmakla beraber, bu yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli biyomalzemelerden hazırlanan yamalar (greftler) tercih edilmektedir. **Doku iskelesi** olarak da adlandırılan bu greft malzemelerinin **osteokondüktif** (öncül hücrelerin çoğalıp olgun kemik hücrelerine farklılaşmasına yardım eden), **osteindüktif** (kök hücrelerin malzemeye göçünü ve kemik hücrelerine farklılaşmasını tetikleyen), **osteointegrasyon** (greftin fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesini sağlayan) ve **osteogenez** (hücresel elemanların hayatta kalıp yeni kemik oluşturabilmesini destekleyen) özelliklerinden bir ya da birkaçına sahip olması gerekmektedir [1].

Kemik doku mühendisliğinde **biyomimetizm**, kemiğin doğal ortamında bulunduğu 3-boyutlu (3B) mikroçevreye (ekstraselüler matris-ECM) benzer yapıların üretilmesi olarak tanımlanmaktadır. Kemik ECM'sinde bulunan ana protein yapı kolajen nanofiberlerden oluşur ve hücre davranışlarını kontrol eder. Kolajen fibrillerin birleşim noktalarında ise amorf formda, kemiğe yüksek mukavemet sağlayan hidroksiapatit (HAp) nanopartikülleri yer almaktadır. Kemik ECM'sinin organik kısmını taklit etmek için sentetik veya doğal polimerler kullanılırken, kemiğin inorganik kısmı için ise genellikle trikalsiyum fosfat (TCP) ve HAp gibi yapılar tercih edilmektedir. ECM benzeri biyomalzemelerin nanofiber yapıda üretiminde, basit kurulumu ve 2B/3B üretime olanak sağlaması nedenleriyle elektroğirme yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Klasik elektroğirme yönteminde yüksek gözenekliliğe sahip malzemeler üretilmesine rağmen, üretilen malzemeler esnek değildir ve şekillendirmesi zordur [2]. Boyuta ve esnekliğe bağlı bu dezavantajların çözümü olarak, 3-boyutlu nanofiber malzemelerin üretilebileceği doğrudan ıslak olarak eğirme ve 3B elektriksel alan oluşturabilen geometrilerle eğirme gibi tasarımlar geliştirilmiştir [3, 4].

Hücresel yapışma ve çoğalma, biyomalzemenin topografisiyle ilişkilendirilmektedir. Örneğin, poli(L-laktik asit) (PLLA), Amerikan Gıda ve Sağlık Bakanlığı (FDA) onaylı ve doku mühendisliği uygulamalarında başarılı sonuçlar veren bir polimer olsa da hidrofobik yapısı nedeniyle proteinlerin, dolayısıyla da hücrelerin doku iskelelerine rahatça tutunup çoğalmasını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için ultraviyole (UV) ışınması ile serbest radikalleri ortaya çıkaran yüzey aşu polimerizasyonu, hava, argon vb. gazlar yardımıyla gerçekleştirilen plazma işlemi ve kimyasal ajanlarla ıslak aşındırma

yöntemi gibi çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir [5]. Islak kimyasal aşındırma yöntemlerinden biri olan hidroliz, biyolojik olarak parçalanabilir alifatik poliesterlerin asidik veya bazik koşullarda, yüzey ıslatılabilirlik özelliğinin değiştirilmesidir. Malzemenin sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içinde bekletilmesiyle yapılan ıslak aşındırma yöntemi, uygulaması kolay bir yöntem olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [5].

Tüm bu anlatılanlara ek olarak, **biyosinyal** molekül olarak tanımlanan çeşitli proteinlerle malzeme biyoaktivitesi artırılarak hücre çoğalması desteklenebilmektedir. Bu biyomoleküller arasında en popüler olan kişinin kendi kanından santrifüj işlemine tabi tutularak elde edilen **trombositten zengin plazma (PRP)**, büyüme faktörlerince zengin bir kokteyl olarak tanımlanmaktadır. Trombositten zengin plazma, vücut içerisindeki kesiklerin onarılmasına yardımcı olan trombositlerin konsantre halde bulunduğu bir kan sıvısıdır. Kanın içerisinde bulunan bu trombositler vücuttaki onarım işlemlerini sürekli olarak yerine getirerek hasarlı dokuyu tamir etmektedir. Trombositten zengin plazma cilt çatlakları, saç ekimi, kas ve bağ dokusu onarımı, diş ve göz tedavileri hatta veterinerlerlik uygulamaları gibi birçok alanda, birçok farklı sorunda etkilidir. Ayrıca, PRP ortopedik işlemlerde eklem içinde iyileştirme sağlama özelliğine sahiptir. Yapısında bulunan transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) ve plateletten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF) bağ dokusu onarımında ve kemik yenilenmesinde etkin rol oynar [6].

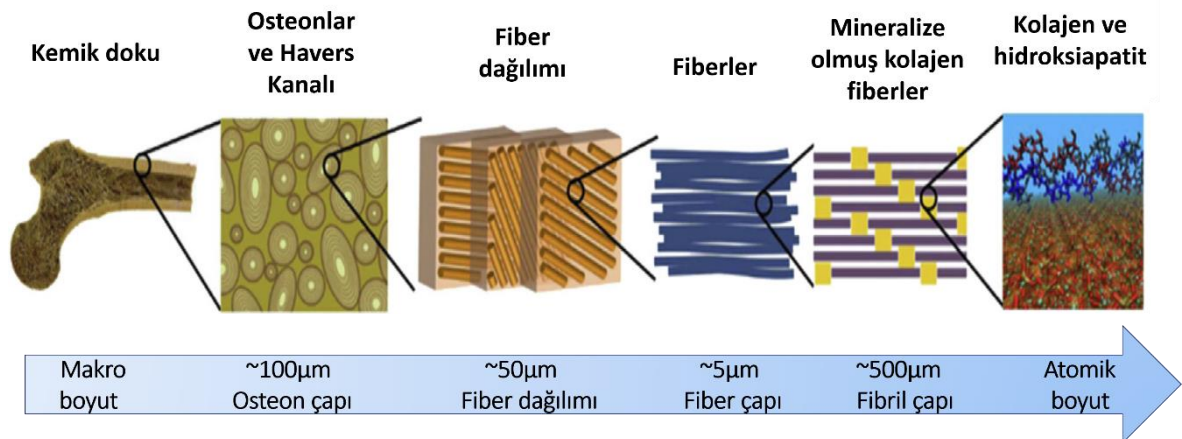
Sunulan tez çalışmasında, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarının tedavisi için kolayca şekil alabilen, PRP ile biyoaktivitesi artırılmış 3B nanofibröz kompozit kemik greftlerin üretimi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, osteoindüktif etkiyi arttırmak için sentetik vücut sıvısından (SBF) mikrodalga yöntemiyle üretilen HAp nanopartikülleri PLLA içerisine katılmış ve 3B elektroçirme yöntemiyle nanofibröz yapıda pamuksu malzemeler üretilmiştir. Farklı süre ve derişimlerde NaOH ile yapılan modifikasyon sonucunda daha hidrofilik yapıda, morfolojisini koruyan malzemelerin başarıyla üretildiği gösterilmiştir. Malzemelerin kemik doku rejenerasyonunda greft olarak kullanımını, fare preosteoblast MC3T3-E1 hücreleriyle yapılan *in vitro* hücre kültürü ve 24 adet Wistar Albino sıçanla yürütülen *in vivo* hayvan deneyi çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Tezin bu bölümünde çalışma kapsamında sıklıkla bahsedilen ve çalışmanın temelini oluşturan konular ayrıntılı olarak sunulmuştur. İlk olarak kemik dokusu ile ilgili literatür bilgisi verilmiştir. Ardından, kemik grefti olarak kullanılan biyomalzeme çeşitleri ve fabrikasyon yöntemleri detaylandırılarak tez kapsamında tercih edilen 3 boyutlu (3B) elektroğirme yöntemi açıklanmıştır. Devam eden bölümlerde, hücre yapışmasında etkili olan malzeme yüzeyinin topografisini değiştirmeye yönelik modifikasyon uygulamalarından bahsedilmiş ve biyomalzemelerin biyoaktivitesini arttırmak için kullanılan trombosit zengin plazma (PRP) ve yapısında bulunan büyüme faktörleri hakkında bilgi verilmiştir. Son olarak, PRP'nin ortopedik cerrahideki klinik uygulamalarından bahsedilerek literatür bilgileri bölümü tamamlanmıştır.

2.1. Kemik Dokusu

Yetişkin bir insan vücudunda 206, yeni doğanda ise sayısı 300'e kadar ulaşabilen kemiklerin % 70'i mineral (inorganik tuzlar), % 22'si protein (organik matris) ve % 8'i sudur. Kemik dokusu, organları koruyarak hareket etkinliğini artırır [6, 7]. Bu özellikler, Şekil 2.1'de gösterilen yumuşak kolajen protein ile kemiğe mukavemet sağlayan sert apatit mineralinin oluşturduğu hiyerarşik mimariyle ilişkilendirilmektedir.



Şekil 2.1. Mikro yapıdaki kemik iskeletinin nanoboyutlara varan hiyerarşik yapısı ([8]'den değiştirilerek).

Kemiğin organik yapısının büyük bölümünü kolajen lifler (Tip I), proteinler ve glikozaminoglikanlardan oluşan amorf kısım oluşturmaktadır. Gelişmiş bir kemik

dokusunda lifler paralel ve belirli boyutlarda gözeneklerin oluşumuna destek verecek şekilde yerleşmiş olup aralarında kemiğe destek ve mukavemet sağlayan hidroksiapatit kristalleri bulunmaktadır. Kemik inorganik bileşenlerinin başında ise kalsiyum, fosfat, sitrat ve magnezyum gibi maddeler gelmektedir.

2.1.1. Kemik Hücreleri

Kemiğin yapısını oluşturan başlıca hücre grupları, osteoprogenitör (osteojenik) hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.

Osteoprogenitör hücreler, mezenşimden köken alan kemik ana hücreleridir. Endosteumda, periosteumun iç tabakasında, Havers ve Volkmann kanallarının yüzeylerinde bulunur. Büyüme sürecinde aktif olarak yer alan bu hücreler, erişkinlerde kırık onarımı gibi durumlarda aktifleşir ve bir bölümü osteoblasta dönüşür [9].

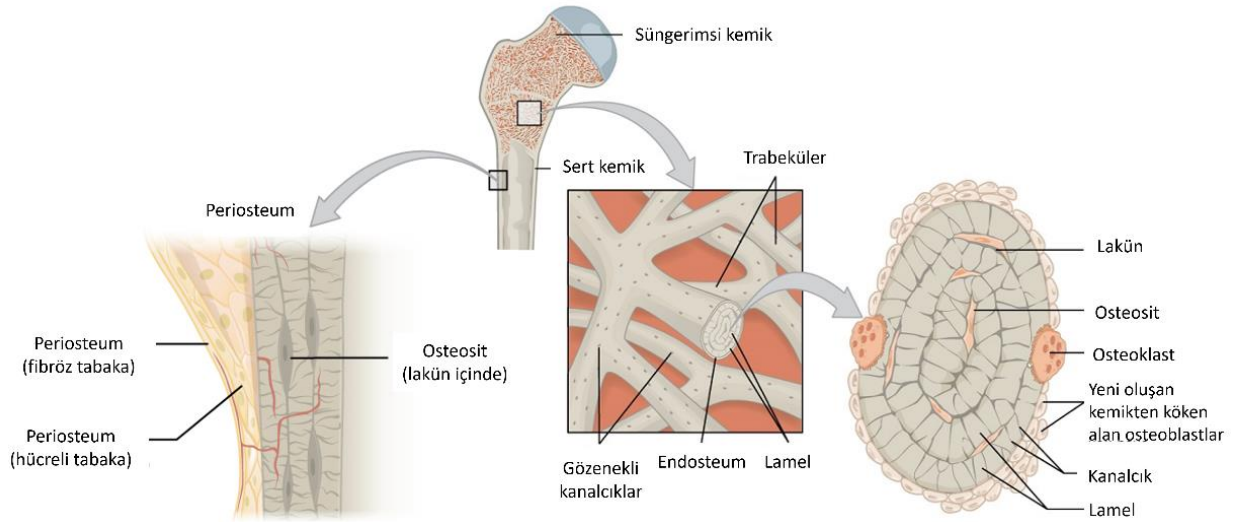
Osteoblastlar, osteoid olarak da bilinmektedirler ve organik ve inorganik kemik ECM'sinin üretiminden sorumludurlar. Osteoblastlar terminal olarak farklılaşmış hücreler değildir, ya kendi kemik matrislerine gömülerek osteosit haline gelirler, ya da apoptoza (programlanmış hücre ölümü) uğrarlar. Ayrıca osteoblastlar, osteoklast aktivitesinin düzenlenmesine de yardımcı olurlar [10].

Osteoklastlar, mononükleer hematopoietik öncülerin kaynaşmasından türeyen çok çekirdekli bir hücre türüdür. Osteoklastların birincil işlevi, kimyasal sinyallerin etkisi altında kemik ECM'sini aşındıran asit ve proteolitik enzimleri salgılamaktır. Bu hücreler, kemik ECM'sinin üretim/emilim sürecinde kemiğin yeniden modellenmesi için önemli rol oynarlar [11].

Osteositler laküna adı verilen boşluklarda hapsolan osteoblastların farklılaşmasıyla oluşur. Tamamen olgunlaşmış hücrelerdir ve sonunda matris içinde hapsedilerek osteoid üretmeyi durdururlar. Fakat mekanik transdüksiyonda (hücre dışı fosfor ve kalsiyum seviyelerinin kontrolünü sağlama) ve hücreler arası etkileşim ile lokal uyarılara yanıt olarak gelişen adaptif yeniden şekillendirmede anahtar rol oynarlar. Kemik yıkımında, hapsedikleri lakünalardan çıkıp osteojenik hücrelere dönüşebilmektedirler [12].

2.1.2. Kemik Zarları

Kemik dokusunun dış yüzeyi periost (periosteum), iç yüzeyi ise endost (endosteum) adı verilen bağ dokusu ve kemik hücrelerini içeren tabakalarla örtülüdür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kemik dokusunun şematik olarak gösterimi.

Periosteum, kemiğin eklem oluşturmeyen yüzeylerini dıştan çevreleyen vasküler yapıda bir bağ dokudur. Periosteumun dış tabakası fibroz tabaka olarak da isimlendirilmektedir. Dış tabaka, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olup fibroblastları ve doku hasar gördüğünde ağrıya sebep olan sinir liflerini içerir. Yapısında bulunan kan ve lenf damarları sayesinde kemiğin beslenmesi ve gelişimine yardımcı olur. Bu damarlara ait uzantılar, Volkmann kanalları boyunca kemiğin uzunluğunu belirleyen Havers kanallarındaki damarlara doğru devam eder. Daha ince olan iç tabaka ise hücre bakımından zengindir ve yapısındaki hücreler kemik onarımında osteoblastlara dönüşerek kemik onarımında görev alır. Ayrıca, iç tabakadan gelen lifler periosteumu kemiğe bağlar [13].

Endosteum, kemiğin içindeki bütün boşlukları örten, bağ dokusu hücrelerinin oluşturduğu bir zardır. Endosteum içinde tek katlı yassı osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve aralarında osteoklastlar bulunabilmektedir [12].

2.1.3. Kemik Tipleri

Mikroskopik incelemeler sonucu kemiğin primer ve sekonder olmak üzere 2 farklı doku yapısında olduğu görülmüştür. Primer kemik, embriyonik gelişim ve onarım süreçlerinde ortaya çıkan ilk kemik türüdür ve yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakır. Kemik, şekil

olarak farklı formlarda olabilmekle birlikte yapısal olarak incelendiğinde primer örgü (nonlamellar) kemik, sekonder sert (kompakt) kemik ve süngerimsi (kansellöz) kemik olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır.

Örgü kemik, olgunlaşmamış kemik dokusu olarak da bilinir ve dağınık kolajen demetler halinde bulunur. Mineralce eksik, hücre bakımından zengindir. Yetişkinlerde yassı kemiklerin eklem bölgeleri, alveoler kemik ve tendonların kemik ile bağlandığı yerler dışında yerini zamanla sert veya süngerimsi kemiğe bırakır.

Trabeküler (üç-boyutlu kafes yapı) ya da kansellöz kemik olarak da adlandırılan **süngerimsi kemik**, insan iskeletinin yaklaşık % 20'sini oluşturur. Büyük bir mekanik strese maruz kalmayan kemik alanlarının çoğunda bulunmaktadır. Uzun kemiklerin genişlemiş uçlarının (epifiz) çoğunu oluşturur ve kaburgaların, omuz bıçaklarının, kafatasının düz kemiklerinin ve iskeletin başka yerlerinde bulunan çeşitli düz kemiklerin ana bileşenidir. Süngerimsi kemik genellikle daha büyük güç ve sertlik sağlayan bir sert kemik kabuğu ile çevrilidir. Süngerimsi kemiğin açık yapısı, eklemler boyunca yük aktarımında olduğu gibi ani streslerin sönümlemesini sağlar. Süngerimsi kemik, osteoblastların hareketi ile sert kemiğe dönüşebilir. Osteoblastlar trabekül etrafındaki tabakalarda yeni kemik matrisleri biriktirir ve aralarındaki boşluklara rağmen büyür. Sonunda boşluklar elimine edilir ve olgunlaşmamış sert kemik üretilir [14].

Kortikal ya da kompakt kemik olarak da adlandırılan **sert kemik**, insan iskelet sisteminin % 80'ini oluşturur. Olgun sert kemik, lamel yapıda veya tabakalıdır. Vasküler kanallardan oluşan Havers sistemine sahiptir ve bu kanalların etrafında eşmerkezli olarak bulunan osteon katmanları ile düzenlenmiştir. Olgunlaşmamış kompakt kemik, osteon içermez ve ağısı bir yapıya sahiptir. Sert kemik, kolajen liflerden oluşan çerçeve etrafında şekillenir ve yeni kemik oluşumu için olgun kemik ile yer değiştirir [15].

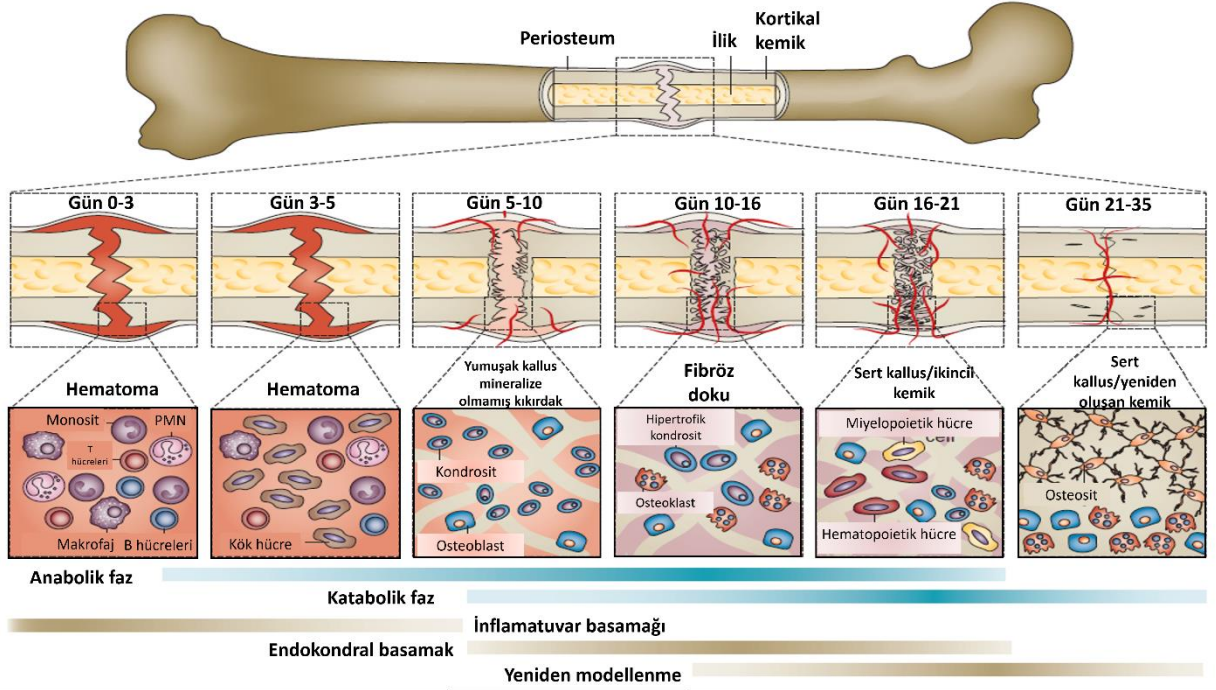
2.2. Kemik İyileşme Süreci

Kemik oluşumu, intramembranöz ve endokondral kemikleşme olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. **Intramembranöz kemikleşme**, insan mezenkimal kök hücreleri (MSC) osteoblastları ayırt ederek, anabolik süreçte doğrudan kemik doku oluşumuna (kafatası ve klavikula gibi düz kemikler gibi) yardım eder. **Endokondral kemikleşme** ise MSC'ler kıkırdak dokusu oluşturan kondrositlere farklılaşmaktadır. Sentezlenen kıkırdak ECM'si

kondrosit apoptozu ile mineralize olmakta ve daha sonra osteoblast hücreler bu ölü yapıya nüfuz ederek yerini kemik dokusuna bırakmaktadır. Uzun kemikler tipik olarak bu süreçte büyür ve iyileşir.

Birincil (primer) ve ikincil (sekonder) olmak üzere iki tür kemik iyileşmesi vardır. İmplantasyon esnasında, kemik fraksiyonlarının sıkıca sabitlenmesiyle **primer kemik iyileşmesi** meydana gelir. Kallus oluşumu yoktur ve iki kemik parçası birbirine bağlanır. Osteoklast ve osteoblast aktiviteleri ile iyileşme gerçekleşir.

İkincil kemik iyileşmesi kırık bölgesi küçük bir alanda olduğunda gerçekleşir ve hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşmeyle sekonder kemik oluşumuna yol açar (Şekil 2.3). Kırık iyileşmesi, iltihap yoluyla lokal doku hacminin arttığı anabolik bir faz ile başlar ve fibröz doku, kırık bölgesinde kök hücrelerin kırıkta ve kemiğe farklılaşması için geçici bir iskele görevi gören bir hematoma oluşturur. Enflamatuar fazda, kemik morfogenetik proteinleri (BMP) ve interleükin (IL) ailesinden IL-1 β , IL-6, IL-17F ve IL-23 gibi çeşitli biyolojik faktörlerin salınımı gerçekleşir. Bu sitokinetik faktörlere ek olarak, suş veya hidrostatik basınç gibi mekanik yükler de kemik hasarlarının iyileşmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Daha sonra, kemik fraksiyonları arasındaki boşluğu köprüleyen iskelet ve endotelial hücrelerin aktiviteleriyle yumuşak kallus oluşur ve yumuşak kallus da daha sonra sert kallusa dönüşür. Kondrosit farklılaşması ilerledikçe, kırıkta hücre dışı matrisi mineralleşmeye başlar ve kırık onarımının anabolik fazı, kondrosit apoptozu ile son bulur. Anabolik fazı, katabolik aktivitelerin baskın olduğu ve kallus dokularının hacminde azalma meydana getiren uzun bir faz takip eder. Kırıkta rezorbe edildiğinde ikincil kemik oluşumu başlatılır ve ortaya çıkan kemik dokular kırıkta yerini alırken birincil anjiyogenez devam eder. Bu dönemde kemik iliği alanı yeniden kurularak hematopoetik doku ve kemiğin orjinal ilik yapısı oluşturulur [16, 17].



Şekil 2.3. Femur kırığı onarımı. Kırık iyileşmesinin ana metabolik fazları mavi çubuklar, biyolojik aşamalar ise kahverengi çubuklar ile gösterilmiştir. Kırık iyileşmesinin birincil metabolik fazları (anabolik ve katabolik), bu fazları kapsayan üç ana biyolojik aşama (enflamatuvar, endokondral kemik oluşumu ve birleştirilmiş yeniden biçimlenme) bağlamında sunulmaktadır. Her aşamada bulunan birincil hücre tipleri ve her aşamada aktif oldukları zaman aralığı gösterilmektedir. Kısaltmalar: PMN, polimorfonükleer lökosit ([16]'dan değiştirilerek).

2.2.1. Kemik İyileşme Sürecinde Gerçekleşen Komplikasyonlar

Kemik hasarlarının çoğu sorunsuz bir şekilde iyileşirken, kaynamama, yanlış kaynama ya da geç kemik oluşumu gibi komplikasyonlar da ortaya çıkabilmektedir. Tibial shaft kırıklarında kaynamamanın % 20'ye varan oranlarda olduğu bildirilmiştir [18]. Uygun koşullarda tedavisi gerçekleşmeyen kemik kırıklarında karşılaşılabilen komplikasyonlar; yarının enfeksiyon kapması ve kırık bölgesine yakın olan deri ve kas gibi dokularda kanamaya bağlı olarak gerçekleşen eklem şişmesi olarak sıralanabilmektedir. Örneğin, femur gibi uzun bir kemik kırıldığında, yağ embolisi adı verilen yağ globülleri akciğer kılcal damarlarında birikir. Bunun sonucu olarak da solunum sıkıntısına yol açan ve tedavi edilmezse ölümcül olabilecek ciddi bir komplikasyon ortaya çıkabilmektedir.

Komplikasyonların sıklığı, komplikasyon tipi ve kırık bölgesine bağlı olarak değişmekte ve ayrıca kırık iyileşmesi komplikasyonları ağrıya ya da fonksiyonel bozukluğa yol açabilmektedir. Proksimal humerusunda kaynama gerçekleşmeyen hastaların, kaynaması başarıyla tamamlanmış hastalara kıyasla günlük yaşam aktivitelerine (örneğin, alışveriş ve ev işi) geri dönüş sürelerinin daha uzun olduğunu bildirmişlerdir [19]. Ek olarak, kırık iyileşme komplikasyonu olan hastalarda sıklıkla komorbidite görülmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, tibia bozukluğunun, diz ve ayak bileği eklemleri yoluyla yük iletimini değiştirerek hastalarda osteoartritini (kireçlenme) arttırabileceğini gösterilmiştir [20]. Yumuşak bağ dokusu hücreleri tarafından kemik boşluğunun doldurulması, kemik defektlerinin iyileşme sürecini engelleyen bir diğer faktördür. Bu durum, defekt iyileşme sürecinde oluşan bağ dokusu migrasyonu ile kemik morfolojisini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca, hasarlı bölgeye tekrar bir operasyon uygulama gereksinimini de ortaya çıkarmaktadır [21]. Fonksiyonel, estetik bozukluklar ya da kemik defektlerinin fibröz doku ile dolarak yeterli miktarda kemik rejenerasyonunun görülememesi gibi sebeplerden dolayı ideal greft materyallerine duyulan gereksinim günden güne artmaktadır.

2.3. Kemik Hasarları

Klinikte en sık karşılaşılan problemlerden biri olan kemik hasarlarının çoğu yüksek kuvvet veya stres nedeniyle meydana gelmektedir. Bununla birlikte kırıklar; kemikleri zayıflatan osteoporoz, bazı kanserler veya cam kemik hastalığı gibi tıbbi durumların bir sonucu olarak da oluşabilmektedir.

Vücudumuzda yük taşıyan kemikler başlıca ayak, kalça, el parmakları ve omurgada bulunmaktadır. Bu tip kemiklerin hasarında yüksek mukavemet sağlayan magnezyum alaşımı gibi metal bazlı implant malzemeleri kullanılırken, kafatası gibi yük taşımayan kemik hasarlarının tedavisinde daha esnek malzemeler tercih edilebilmektedir. Bununla birlikte, cerrahi işlemler genellikle kırılabilirlik (granüllerin) ve ameliyat sırasında implant malzemesini şekillendirme ihtiyacından dolayı karmaşıktır. Kemik hasarlarında kullanılan implant malzemesinin hasar bölgesinin şeklini alabilecek yapıda olması da cerrahi operasyon sürecinde dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta olarak tanımlanabilmektedir. Seramik malzemeler ve biyobozunur polimerler birlikte kompozit malzeme olarak kullanıldığında, seramik içeriğinden dolayı mekanik özellikleri yüksek ve polimer içeriğinden dolayı da işlenebilirliği kolay, hasar bölgesinin şeklini alabilen esnek malzemeler elde edilebilmektedir [22, 23].

Özetle, biyomalzeme tasarımında malzemenin esnek yapıda kolayca şekillendirilebilir ve sıkıştırılabilir olması, geometrisi belli olmayan kemik hasarlarında cerraha zaman kazandırmaktadır. Bu sonuçlara paralel olarak tez kapsamında üretimi gerçekleştirilen pamuksu formdaki nanofibröz greft malzemelerinin geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

2.4. Kemik Greftleri

Kemik doku hasarlarının tedavisinde endojenik mekanizmalar tercih edildiği gibi çeşitli biyomalzemelerden hazırlanan kemik yamaları (greftler) da kullanılmaktadır. Kemik greftleri, kemik doku rekonstrüksiyonunda uyarıcı ve yer tutucu malzemeler olarak tanımlanır. Kemik greftinin birçok formu mevcuttur, ancak bunlar otogreft, allogreft ve kemik greft türevleri olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır [24]. Kemik greft materyallerinde aranan başlıca özellikler; antijenik olmama, kolayca sterillenebilme, revaskülarizasyonu destekleme, osteoindüktif veya osteokondüktif olma, hasarlı bölgeye destek sağlama ve kolayca şekillendirilebilir olma şeklinde sıralanabilir.

2.4.1. Otogreftler

Aynı bireyde bir bölgeden alınıp başka bir bölgeye implante edilen otogreftler, immünolojik reddi minimuma indirme, tam doku uyumu, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri başarılı olarak sunabilmesi sayesinde kemik rejenerasyonunda altın standart olarak kabul edilmektedir [25]. Ancak postoperatif dönemde ağrı, donör sahanın bulunduğu yere göre gelişebilen çeşitli komplikasyonlar, ikinci bir cerrahi işlem gerektiren saha oluşturabilmesi ve sınırlı miktarda elde edilmesi otogreftlerin dezavantajlarıdır [26]. Aspire edilmiş kemik iliği, vaskülarize kemik, non-vaskülarize kortikal kemik ve kansellöz kemik otogreft olarak kullanılmaktadır [1].

2.4.2. Allogreftler

Otogreft uygulamalarının beraberinde getirdiği dezavantajlar klinik olarak farklı arayışlara yol açarak allogreft yaklaşımının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Allogreft, donör kemiğinden elde edilen, hem osteoindüktif hem de osteokondüktif özelliklere sahip ancak yaşayabilir hücrelerin yokluğu nedeniyle osteojenik özellikler bakımından eksik kadavra olarak tanımlanmaktadır [27]. Kadavra kaynaklarından elde edilen allogreft kemiğin en büyük avantajı, çeşitli şekillerde ve boyutlarda hazır bulunabilmesi ve donör alan morbiditesi

içermemesidir. Ancak yine de, sterilizasyon yoluyla tamamen elimine edilemeyen ve büyük bir sorun olan immün yetmezlik virüsü (HIV), hepatit B ve C gibi viral ve bakteriyel hastalıkları taşımasıyla ilgili tartışmalar hala devam etmektedir [24, 28, 29]. Kortikosal ve kortikal greftler, minerali uzaklaştırılmış kemik matrisi (DBM) ve süngerimsi çipler allogreftlere örnek olarak verilebilmektedir [28].

2.4.3. Zenogreftler

Bir türden başka bir türe gerçekleşen doku nakli zenogreft (heterojen greft) olarak tanımlanmaktadır. Bu greftlerin antijenitesi allogreftlere kıyasla daha fazladır. Büyük rezeksiyonlara bağlı olarak defekt bölgesinde kullanımı sınırlıdır. Zenojen greftlerin tek başlarına osteogeneze katılmadığı ve kemik formasyonunun uyarılmasında zayıf etkiye sahip oldukları belirtilmiştir [30]. Ancak bazı araştırmacılara göre ise, zenogreftler sentetik hidroksiapatitten daha karmaşık bir yapıda ve alloplastlardan daha biyouyumlu olabilmektedir. Ayrıca zenogreftlerin, gözeneklilik ve yüzey özellikleri bakımından da alloplastik malzemelerden daha üstün ve sentetik hidroksiapatitten daha emilebilir olduğu düşünülmektedir [31].

2.4.4. Alloplastik Greftler

İnsan ya da hayvan kaynaklı olmayan, sentetik ve inert implant biyomalzemeler alloplast olarak adlandırılmaktadır. Yukarıda bahsedilen greft türlerinin dezavantajlarına bağlı olarak günümüzde alloplastik greftlerle ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Biyomalzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır [30].

Tipik implant metalleri paslanmaz çelikler, kobalt bazlı alaşımlar ve titanyum bazlı alaşımlar olmalarına rağmen metallerin doku mühendisliği uygulamaları için iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi, biyolojik olarak parçalanamazlar ve ikincisi, işlenebilirlikleri çok sınırlıdır [32, 33]. Bu nedenlerden dolayı, seramikler, polimerler ya da bunlardan oluşan kompozit malzemeler bilimsel ve tıbbi açıdan alternatif sunabilmektedir.

2.4.4.1. Seramik Temelli Kemik Greftleri

Greft malzemesi olarak kullanılan seramiklere örnek olarak kalsiyum sülfat, biyoaktif cam ve kalsiyum fosfat bileşenleri verilebilmekte ve bu malzemeler tek başına olduğu gibi birlikte de kullanılabilir [28].

Kalsiyum sülfat seramiklerinin boşluklarda osteokondüktif bir dolgu maddesi olduğu, vaskülerizasyona olanak sağladığı ve fizyolojik kemik iyileşmesini hızlandırarak tamamen emilebileceği belirtilmiştir [34]. Emilimi 6-8 hafta arasında değişkenlik göstermekte ve hızlı emilim sonucu inflamasyonun arttığını belirten çalışmalar bulunmasına rağmen kullanım uygunluğuna dair tartışmalar hala devam etmektedir [28, 34].

Biyoaktif cam fosfat, sodyum ve kalsiyum tuzları gibi moleküllerden oluşmaktadır. Biyoaktif camların gözenekli olmaması vasküler yapıların malzeme içerisine doğrudan penetre olmasını engellemektedir. Fakat bu malzemeler çevre bağ dokusu içerisinde yer alan kolajene etkin bir yapışma gösterebilmektedir. [7].

Kalsiyum fosfat seramikleri, seramik greftler arasında en sık tercih edilen ve bir sıvı ile karıştırıldığında kemik defektlerine uyacak şekilde ameliyat sırasında şekillendirilebilen macunu oluşturarak 20 dakika içinde sertleşebilen, beyaz bir tozdur. Kemik fosfat seramikleri, hidroksiapatit (HAp) ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Örneğin nanokristalin HAp'ı oluşturan sertleştirme reaksiyonu izotermiktir ve fizyolojik pH'da meydana gelir, bu nedenle reaksiyon sırasında doku hasarı meydana gelmez. Ayrıca, nanokristal HAp yapısı osteokondüktif özelliktedir ve zamanla emilerek yeni kemikle yer değiştirmeyi sağlamaktadır. HAp $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, TCP'nin kristal formudur ve dişlerin ve kemiğin temel mineral bileşenidir. HAp ve TCP'nin mukavemetinin konsantrasyon değerlerine bağlı olarak 10 ila 60 MPa arasında değiştiği ve bu değerlerin de kortikal kemik kompresyon mukavemetinden (150-200 MPa) çok daha küçük olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, seramik bazlı biyomateryallerin kullanımını sınırlandıran etmenlerden biri olduğu düşünülmektedir [34].

Literatürde, birçok seramik doku iskelesi bulunmasına rağmen, bu yapıdaki sert biyoaktif seramiklerin klinikte kullanımı, kırılabilirlik, sıkıştırılmama ve kolayca şekillendirilememe gibi özellikleri nedeniyle kısıtlıdır. Dolayısıyla bu malzemelere alternatif, ana matris görevi gören biyobozunur polimerler tek başlarına ya da kalsiyum fosfat seramikleriyle kompozit halinde kullanılmaya başlanmıştır [35].

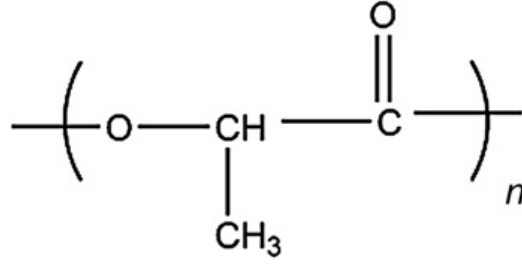
2.4.4.2. Polimer Temelli Biyobozunur Kemik Greftleri

Polimerler, kolay işlenebilirlik ve kontrol edilebilir özellikleri sayesinde biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Polimerik biyomalzemelerin biyobozunurluğu, hidrolitik veya

enzimatik yolla gerçekleşmektedir. Polimerler, kaynağına göre doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. Enzimatik yollarla bozulan doğal polimerler, yüksek biyoaktivite, reseptör bağlayan ligandları hücrelere sunma ve hücre tarafından tetiklenen proteolitik bozunmaya yatkınlık gibi çeşitli avantajlara sahip olduğu gibi immünojenik tepki, saflaştırılması sırasındaki karmaşık süreçler ve enfeksiyon olasılığı gibi dezavantajlara da sahiptir [36]. Literatürde sıklıkla karşılaşılan doğal polimerlere örnek olarak kolajen, kitosan ve ipek verilebilir. Diğer taraftan, hidrolitik yollarla bozulan sentetik polimerler genel olarak biyolojik olarak inerttir ve ayrıca doğal polimerlerin dezavantajlarını elimine ederek özel uygulamalar için kullanılabilir. [36].

Poliesterler, hidrolitik olarak kararsız alifatik ester bağları olan termoplastik polimer grubu olarak tanımlanmaktadır. Esterifikasyon işlemi kimyasal olarak tersinir bir reaksiyon olduğundan teorik olarak bütün poliesterlerin parçalanabilir olduğu düşünülmektedir. Ancak, sadece uygun kısımda alifatik zincirlere sahip olan poliesterler, biyomedikal uygulamalarda gereken sürede bozunabilmektedir. Örneğin, poliglikolid (PGA) 1-2 ayda dayanıklılığını kaybetmekte ve 6-12 ay içinde tamamen bozunabilmektedir [36]. Poliester sınıfı içinde yer alan poli(laktik asit) (PLA) ve poli(laktik-ko-glikolik-asit) PLGA gibi biyobozunur polimerler tek başına ya da otogref ve allogreftlerin katkı maddesi olarak kullanılmıştır [34].

PLA'nın monomer yapısını oluşturan laktik asit (2-hidroksipropanoik asit) kiral optik bir molekül olup L (+) ve D (-) olmak üzere ışıktaki farklı absorbanları veren iki aktif izomere sahiptir [37]. Laktik asit hayvanlar, bitkiler ve doğadaki organizmalar tarafından üretildiği gibi asetaldehit, etanol veya kömür türevli kimyasallardan (örneğin asetilen) da temin edilebilmektedir. Poli (L-laktik asit) (PLLA) % 37 kristaliniteye sahip bir polimer olup kristalinite değeri molekül ağırlığı ve polimer işleme koşullarına göre değişmektedir. PLLA'nın camsı geçiş sıcaklığı 60°-65°C arasındadır, erime sıcaklığı ise yaklaşık 175°C'dir [36]. PLLA, iyi kopma mukavemeti, düşük uzama ve yaklaşık 4.8 GPa gibi yüksek elastik modüle sahiptir ve dolayısıyla ortopedik işlemlerde yük taşıma uygulamaları için ideal bir biyomalzeme olarak kabul edilmiştir [36]. Şekil 2.4'de PLA'nın kimyasal yapısı yer almaktadır.



Şekil 2.4. PLA'nın kimyasal yapısı.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı poli(laktik asit), hidrolitik bozunma sonucu insan metabolik yan ürünü olan laktik aside dönüşür ve daha sonra sitrik asit döngüsüyle su ve karbondioksite ayrışarak vücuttan uzaklaştırılır [38, 39]. Ancak, PLA'nın hidrofobik yapısı nedeniyle degradasyon hızı çok düşüktür ve yüksek molekül ağırlıklığına sahip PLA'nın *in vivo* çalışmalarda rezorpsiyon süresinin 2 ile 6 yıl arasında olduğu bildirilmiştir [36]. Bu nedenle, daha hızlı biyobozunurluğa ve daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip malzemeler üretebilmek için kompozit yapılar geliştirilmiştir. Kemik ECM'sinin organik kısmını taklit etmek amacıyla doğal veya sentetik polimerler kullanılırken, kemiğin inorganik kısmı için ise genellikle yüksek kristaliniteye sahip HAp ve TCP yapıları tercih edilmiştir [35]. Örneğin yapılan bir çalışmada, HAp içeren PLLA nanofiber matrisleri tavşan sternal kemik hasarının olduğu bölgeye implante edilmiş ve kemik iyileşmesinin kontrol grubuna göre kompozit malzeme üzerinde 1 hafta daha erken gerçekleştiği görülmüştür [40]. Bir başka çalışmada ise PLLA-TCP kompozit matrisler üretilmiş ve insan yağ kökenli kök hücrelerin bu matrisler üzerindeki osteojenik farklılaşmasının, TCP içermeyen gruplara göre çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [41]. Tüm bu çalışmalar, proje kapsamında belirlenen polimerin ve seramik malzemenin kemik rejenerasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

2.5. Seramik Temelli Greft Üretim Yöntemleri

Kemik dokusunda bulunan mineral faza, kimyasal ve biyolojik olarak benzerliğiyle ortopedi ve diş hekimliği uygulamalarında en çok tercih edilen implant malzemesi HAp'tır [35]. Çizelge 2.1'de HAp üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları listelenmiş ve tez kapsamında HAp nanopartiküllerin üretiminde biyomimetik çöktürme yöntemi kullanılması sebebiyle bu yöntem detaylandırılmıştır.

Çizelge 2.1. Hidroksiapatit üretim yöntemleri [35, 42].

Üretim Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Sol – jel	<ul style="list-style-type: none">• Mikroyapının ve homojenitenin çok iyi kontrol edilebilmesi• Farklı şekillerde malzeme üretimine olanak sağlaması• Kristalizasyona bağlı olarak düşük maliyet ve yüksek saflık	<ul style="list-style-type: none">• Hammaddelerin yüksek maliyeti• Çözücü uzaklaştırma esnasında malzeme deformasyonu• Çok sayıda işlem basamağı içermesi
İkili kimyasal çöktürme	<ul style="list-style-type: none">• Organik çözücülere ihtiyaç duyulmadan yüksek miktarlarda ve düşük maliyetle üretim	<ul style="list-style-type: none">• Partiküllerin büyük boyut ve boy dağılımında olması ve topaklanması (aglomerasyon)
Hidrotermal sentez	<ul style="list-style-type: none">• Hidrotermal sıcaklığın ve basıncın artırılmasıyla çökeltilerin Ca/P oranının değiştirilebilmesi	<ul style="list-style-type: none">• Elde edilen son ürünün genellikle aglomere olması
Çoklu emülsiyon	<ul style="list-style-type: none">• Reaktör olarak karıştırmalı tankların kullanımı yeterli olduğu için özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması• Reaksiyonun oda sıcaklığına yakın düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi	<ul style="list-style-type: none">• Emülsiyon damlacıklarının kararlı olmaması ve sıcaklık, yüzey aktif hammadde türü ve pH'ya göre değişebilmesi• Topaklaşma

Biyomimetik çöktürme yöntemiyle, insan kan plazmasındaki iyonların bileşimine eşdeğer sentetik vücut sıvısı (SBF) çözeltisinin kendiliğinden çekerdeklenmesiyle çeşitli iyonları yapısında bulunduran biyoaktif, kemik-benzeri HAp üretilebilmektedir. Diğer yöntemlere kıyasla kolay ve hızlı olma, özel ekipman ya da yüksek işleme sıcaklığına gerek kalmama gibi avantajlara sahiptir [43]. Yapay vücut sıvısı ilk olarak tuz çözeltilerinin insan plazması ya da hücre dışı sıvısını taklit etmesiyle başlamış, daha sonra SBF ile yüksek sıcaklıklara ve herhangi bir kimyasal ajana ihtiyaç duyulmadan biyomimetik HAp üretiminin mümkün olduğu anlaşılmıştır. Ancak biyomalzeme yüzeyine SBF'den HAp çöktürme sürecinin haftalar sürebildiği görülmüş ve bu dezavantajı önlemek amacıyla da amorf yapıda karbonatlı HAp, 10 kat deriştirilmiş SBF çözeltisinden bir mikrodalga sentez cihazı vasıtasıyla biyomalzemeler üzerine dakikalar mertebesinde çöktürülebileceği sistemler geliştirilmiştir [42, 44].

2.6. Polimer Temelli Greft Üretim Yöntemleri

Kemik doku rejenerasyonunda kullanılabilecek ideal bir doku iskelesi hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyecek uygun fiziksel, kimyasal ve morfolojik

özelliklere sahip olmalıdır. Örneğin ideal bir kemik doku iskelesi, kemik rejenerasyonunda görev alan osteoblastları ve osteoprogenitör hücreleri yapısında barındırmaya elverişli oranda gözenekli (% 90) olmalıdır. Birbiriyle bağlantılı gözenekler, besinlerin ve metabolitlerin hücre/iskele yapılarından difüze olması için tercih edilmektedir. Ayrıca, malzeme yeni kemik dokusunun oluşumuna ortam sağlayacak şekilde yeterli mekanik kararlılığa ve kemik hücrelerinin yapışabilmesi için de uygun yüzey kimyasına sahip olmalıdır [45]. Bu amaçla geleneksel ve hızlı prototipleme olmak üzere çeşitli fabrikasyon yöntemleri geliştirilmiş ve aşağıdaki başlıklarda geleneksel yöntemler açıklanarak tez kapsamında tercih edilen elektroçirime yöntemi detaylandırılmıştır.

2.6.1. Çözücü-Dökümü/Parçacık-Uzaklaştırma Yöntemi

Bu yöntemde, polimer uygun bir organik çözücüde çözünür. Ardından, hazırlanan çözelti içerisine bu çözeltide çözünmeyecek sodyum klorür, sodyum sitrat gibi tuz parçacıkları eklenir ve elde edilen son karışım bir kalıba dökülür. Çözücü, buharlaştırma veya liyofilizasyon yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra tuz parçacıkları gözenekli bir yapı elde etmek için yıkanarak uzaklaştırılır (Şekil 2.5).

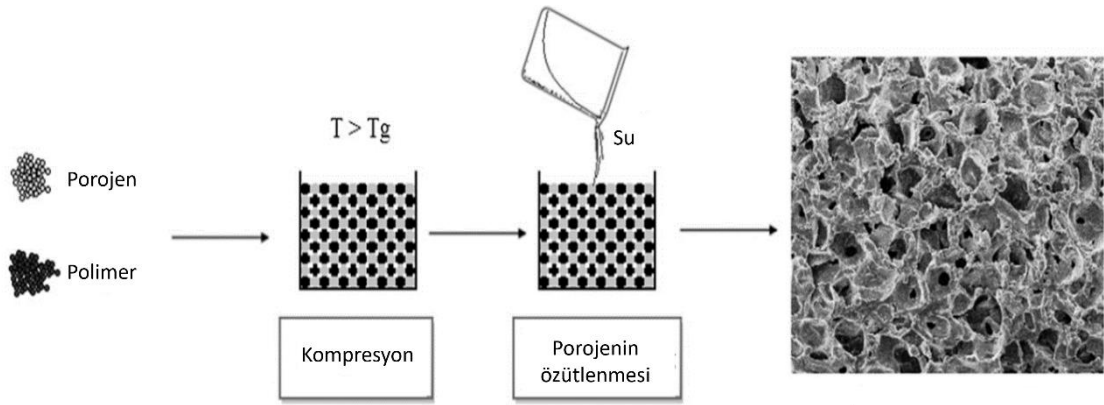


Şekil 2.5. Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniğinin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek).

Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniğinin basit olma ve tuz/polimer oranını değiştirerek gözenek büyüklüğünün ve gözenekliliğin ayarlanabilmesine imkan vermesi bakımından avantaj sağlarken, porojen ve toksik organik çözücülerin istenen düzeyde uzaklaştırılamaması ve elde edilen yapının mekanik özelliklerinin düşük olması bu tekniğin kullanımını sınırlandırmaktadır [42, 47].

2.6.2. Eriyik Kalıplama

Eriyik kalıplama, gözenekli yapıda seramik ve metallerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanıldığı gibi polimerik malzemeler için de uygulanabilmektedir. Porojen bileşikler ve toz haline getirilmiş polimerler ile doldurulan kalıplar, polimerin camsı geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta ve basınç altında ısıtılarak hammaddelerin kalıp şeklinde bir iskele oluşturmasını sağlamaktadır. Çözücü-döküm tekniğinde olduğu gibi kalıptan çıkarılan doku iskelesindeki porojen, su veya organik çözücü yardımıyla uzaklaştırılır (Şekil 2.6) [46].

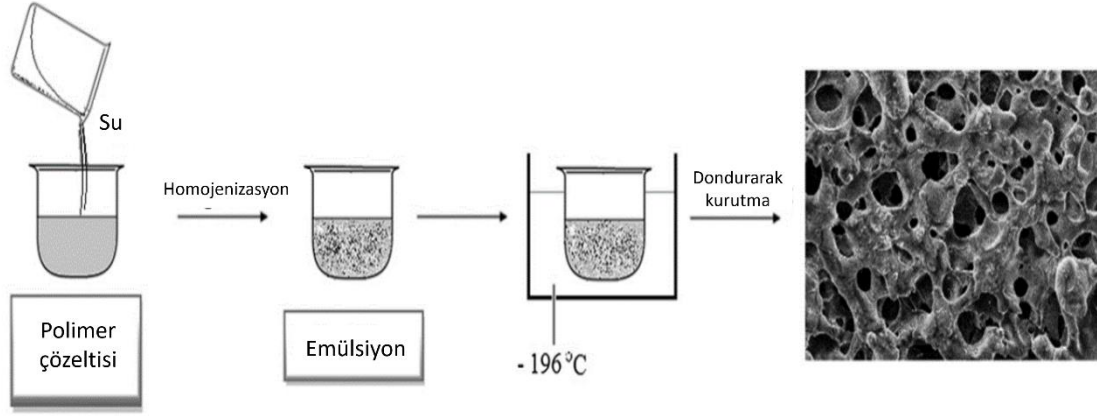


Şekil 2.6. Eriyik kalıplama yönteminin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek).

Bu yöntemde doku iskelesi oluşturmak için organik çözücüye gerek yoktur ve kalıp seçimine bağlı olarak çeşitli şekil ve büyüklükte yapıların oluşumu sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, amorf olmayan polimerler için yüksek işlem sıcaklığı ve porojeni ayırma zorluğu eriyik kalıplama tekniğinin dezavantajları içinde yer almaktadır [42, 46]. Bu yöntem, HAp ve poliüretanın birlikte kullanımına izin verdiği için kemik doku iskelelerin hazırlanmasında tercih edilmiştir [48].

2.6.3. Dondurarak Kurutma

Dondurarak kurutma yöntemi ile % 90'dan daha yüksek oranda gözeneklilikte ve gözenek boyut dağılımı 2 ve 200 µm arasında değişen yapılar üretilebilmektedir [49]. Bu yöntemde, iki karışmaz fazın (polimer çözeltisi ve su) homojenleştirilmesi ile bir emülsiyon elde edilir. Bu homojen emülsiyonun dondurulmasıyla (örneğin sıvı azotta -196°C'de) buz kristalleri oluşturulur ve daha sonra buz kristalleri liyofilizasyon işlemiyle kurularak gözenekli bir doku iskelesi elde edilmektedir.



Şekil 2.7. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi ([46]'dan değiştirilerek).

Elde edilen nihai yapıda makro ve mikro olmak üzere iki tip gözenek görülebilmektedir. Mikro boyuttaki gözenekler sulu çözücünün çıkarılmasıyla oluşturulurken, makro gözenekler homojenleştirme sırasında mikro gözeneklerin birleşmesiyle oluşur [50]. Bu yöntemin avantajları, çözücü kullanımının azaltılması ve projen maddelerin uzaklaştırılma süresinin kısaltılması olarak sıralanabilir. Bu yöntemin dezavantajı ise üretilen yapının genellikle üst kısmında cilt katmanı (skin layer) denen gözeneksiz bölümün oluşmasıdır. Bu sebeple doku iskelesinin üst kısmı ince jilet vb. ekipmanla uzaklaştırılarak kullanılmaktadır.

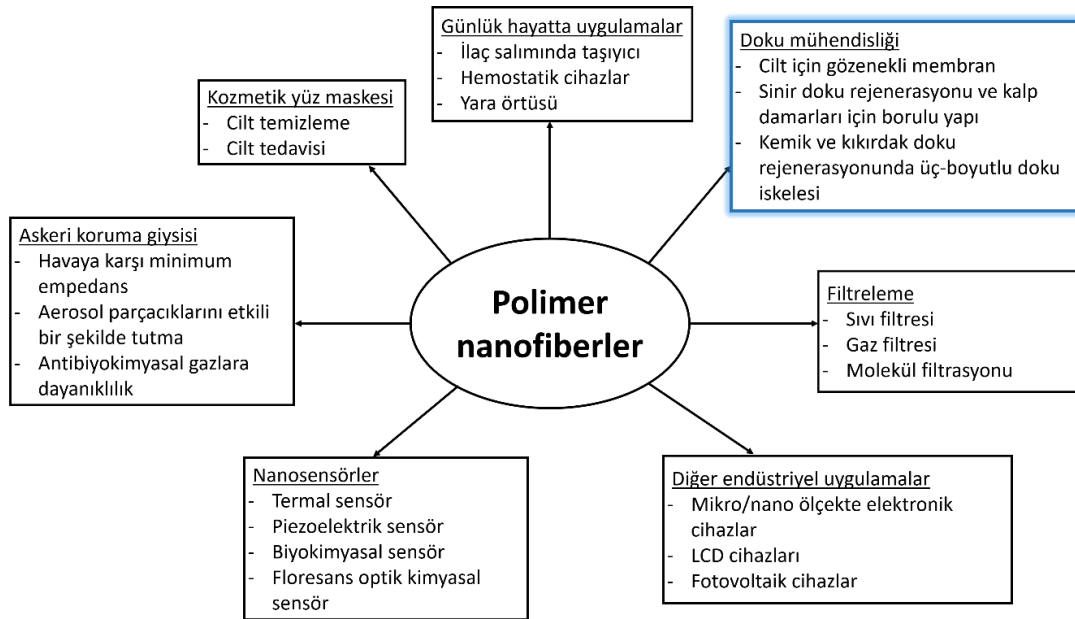
2.6.4. Elektroeğirme

İlk olarak 1902'de Cooley ve Morton tarafından patenti alınan elektroeğirme tekniğinin ticarileşmesine yönelik adımlar 1934-1944 yılları arasında Formhals tarafından atılmıştır [51]. Bu yöntemde sıvı bir çözelti (çözücüde çözülmüş ya da eritilmiş polimer), kuvvetli bir elektriksel alana maruz bırakıldığında çözeltinin molekülleri artı ve eksi yük ile yüklenerek mıknatısın zıt kutupları gibi birbirini çekmeye çalışır. Bu çekme kuvveti, şırınga ucundan çıkan fiber jetin uzayarak incelmelerini ve toplayıcı üzerinde kesintisiz ipliksi fiberler elde edilmesini sağlamaktadır. Elektroeğirme tekniğini etkileyen parametreler, uygulanan voltaj, sıcaklık, çözelti derişimi, toplayıcı tasarımı ve dış etkenler olarak sıralanabilir. Bu parametrelerin optimize edilmesiyle farklı şekillerde fiberlerin elde edildiği tasarımlar yapılabilmektedir.

Literatürde çeşitli polimerlerin uygun çözücü ile çözümlenerek elektroeğirme yöntemiyle fiber olarak üretildiği ve bu fiberlerin farklı uygulamalarda kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır [52, 53]. Ancak, kompozit malzemeler diğer mühendislik ürünü monolitik

malzemelerle elde edilemeyen, yüksek modül ve mukavemet gibi üstün yapısal özellikleri sağlayabilmeleri açısından avantajlı konumda bulunmaktadır [54]. Örneğin bir çalışmada, Nylon-4,6 nanofiber dokunmamış membranlar ve epoksi matris kullanarak nanokompozit üretilmiş ve lif içeriği düşük olmasına rağmen, kompozit yapının hem sertliğinin hem de mukavemetinin, aynı içerikle oluşturulmuş film yapıları malzemeden önemli ölçüde daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [55].

Elektroçirme tekniği, çeşitli amaçlar için doğal ve sentetik polimerleri fonksiyonelleştirme kolaylığı ve geniş yüzey alanı/hacim oranı ve üstün mekanik özelliklere sahip nanometre kalınlığında fiber yapıların üretilmesini sağlamaktadır. Sürecin basitliği ile birlikte büyük ölçekli yapıların elde edilmesine imkân vermesi, bu tekniğin çok işlevli membran, mikrometreden küçük partiküllerin ayrılması için filtre, nanoelektronik makineler için kompozit takviye yapıların üretimi gibi endüstriyel uygulamalarda kullanımını arttırmaktadır. Ayrıca bu özellikler elektroçirme yöntemini, ilaç salımı ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalar için de çekici hale getirmektedir [56-58].



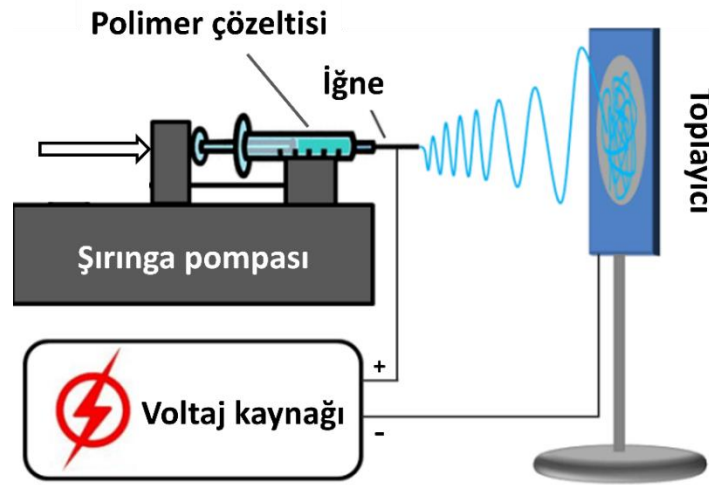
Şekil 2.8. Polimer tabanlı nanofiberlerin kullanım alanları ([54]'ten değiştirilerek).

Nano ölçekteki dokuların mimarisini taklit edebilen iskeleler geliştirmek, doku mühendisliği alanındaki en büyük zorluklardan biridir. ECM benzeri olarak kullanılacak nanofibröz iskeleleri üretmek için kullanılan elektroçirme işlemi, doğal ECM'nin lifli yapılarına benzer

lifler üretebilme kabiliyeti nedeniyle faz ayırma ve kendiliğinden yönlenme (self-assembly) yöntemlerine kıyasla daha ön plana çıkmaktadır.

2.6.4.1. İki Boyutlu (2B) Üretim

Bir elektroëirme sistemi temel olarak, topraklanmış bir toplayıcı ve polimer çözeltili ile doldurulmuş pozitif yüklü bir iğne arasında elektriksel alan oluşturan yüksek voltajlı bir güç kaynağından oluşmaktadır. İlk başta, polimer çözeltili yüzey gerilimi kuvvetlerinden dolayı küresel bir formda bulunur. Ardından, uygulanan potansiyel fark ile elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenerek küresel formdaki polimer damlası koni biçimini (Taylor Konisi) alır. Koni ucundan bir jet fıskırır ve bu jet, üzerindeki yükler nedeniyle, bir noktadan sonra kararlılığını kaybederek dönme hareketi yapmaya başlar. Bu jet, toplayıcıya ulaşana kadar incilir ve çapı nano boyuta ulaşır. Polimeri çözmek için kullanılan çözücü sıvının, şırınga ucu ve toplayıcı arasındaki yol boyunca buharlaşmasıyla da kuru fiberler oluşur (Şekil 2.9) [35].



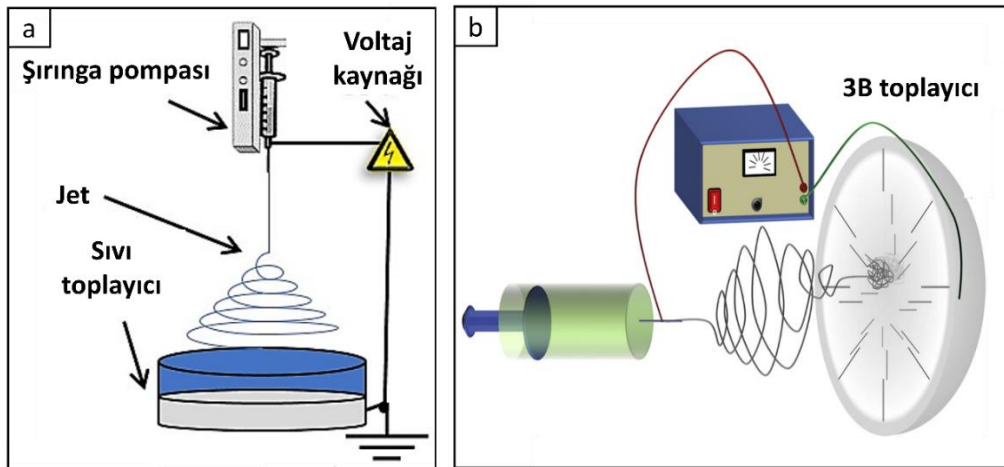
Şekil 2.9. Klasik elektroëirme yönteminin şematik gösterimi.

İki boyutlu elektroëirme yöntemiyle, yüksek gözenekliliğe sahip malzemeler üretilebilmekte, ancak üretilen matrisin gözenek çapları küçük olmakta ve daha da önemlisi sadece belirli kalınlığa sahip 2-boyutlu malzemeler elde edilmektedir. Ayrıca üretilen malzemeler, sıkı istiflenmeye bağlı olarak esnek değildir ve şekillendirilmesi zordur [2]. Bu durumu gidermek amacıyla çeşitli araştırmacılar tarafından 3-boyutlu elektroëirme teknikleri kullanılmaya başlanmıştır.

2.6.4.2. Üç Boyutlu (3B) Üretim

İki boyutlu yapılarıdaki, boyuta ve esnekliğe bağlı dezavantajlarının çözümü olarak fiberleri doğrudan ıslak olarak eğirme ve 3B elektriksel alan oluşturabilen geometrilerle eğirme gibi çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Şekil 2.10). Islak elektroegirme yönteminde klasik yöntemden farklı olarak katı, metal toplayıcı yerine metanol vb. sıvılarla doldurulmuş banyo sistemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde toplayıcı olarak yüzey gerilimi yüksek olan su gibi sıvılar kullanılır ve fiberlerin batmamasına bağlı olarak yoğun fibroz malzemeler elde edilmektedir. Bu nedenle uygun toplayıcı seçimine dikkat edilerek, işlemin etkinliği artırılmalıdır [59].

Bir başka yaklaşım olan toplayıcı tasarımını değiştirmek de geleneksel elektroegirme yöntemiyle 3B yapıların elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Toplayıcı üzerinde elektriksel iletkenlikten etkilenmeyen bölgeler oluşturularak çeşitli geometrilerde iskeleler üretilebilmektedir. Örneğin, bir çalışmada metal çivilerin yalıtkan bir plastik üzerine belirli bir düzende hizalanmasıyla oluşturulan toplayıcı üzerinde, 3B elektriksel alanda pamuksu formda poli(kaprolakton) (PCL) nanofiberler toplanmış ve bu yapıların birçok doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği gösterilmiştir [4]. İlave işlem gerektirmemesi ve ıslak elektroegirme yönteminde olduğu gibi herhangi bir ajan kullanılmasına gerek kalmaması, bu yöntemin tercih edilme sıklığını arttırmaktadır. Bu avantajlara ve hücre davranışında 3B çevrenin önemine bağlı olarak tez kapsamında, greft malzemesinin üretimi için uygun toplayıcı tasarımıyla 3B elektroegirme yöntemi tercih edilmiştir.



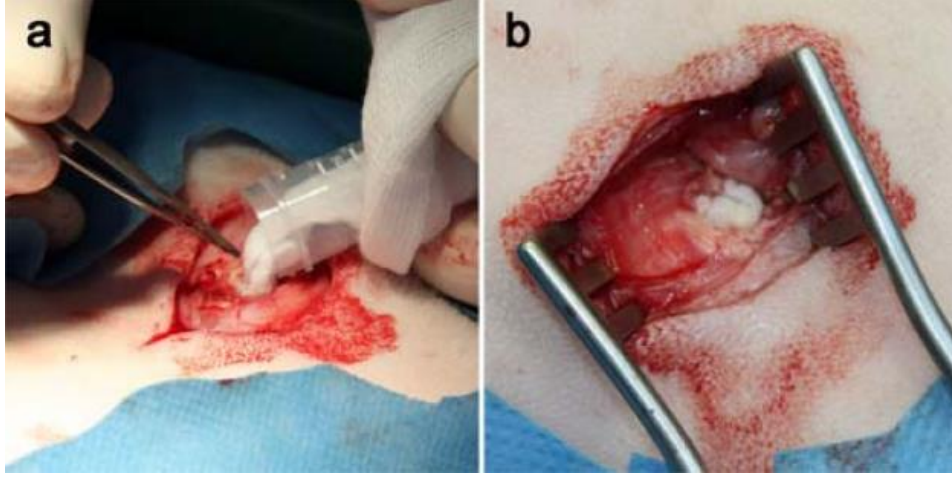
Şekil 2.10. Üç boyutlu elektroegirme yöntemleri a) ıslak elektroegirme, b) toplayıcı modifikasyonu ([4, 60]'tan değiştirilerek).

2.6.4.3. Elektroğirme ile Üretilen Malzemelerin Greft Olarak Uygulamaları

Fiber yapılar cilt, sinir, kırık, tendon ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi/greft malzemesi olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Nanofiber iskeleler yüksek yüzey alanıyla oksijen geçirgenliğine izin vererek yara bölgesinde sıvı birikimini önlemekte ve bu da nanofiber yapıları yara sargısı olarak ideal malzeme haline getirmektedir [61, 62].

Osteoprogenitör/kök hücrelerin işlevi için uygun matris üretimi, doğal kemik ECM'sinin bileşiminin, morfolojik özelliklerinin ve mekanik fonksiyonunun taklit edilmesiyle sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, kemik ECM'sinin büyük bir kısmı, kemik rejenerasyon işleminin mineralizasyon aşamasında gerekli olan kalsiyum fosfat minerallerini içermektedir. Biyomalzeme içindeki inorganik bileşenlerin varlığı genellikle kalsiyum fosfat mineralleşmesini ve ardından osteojenik farklılaşma sürecini desteklemektedir. Bu nedenle, son çalışmalar, polimerik nanofiberlerin içinde hem kemiğe özgü biyoaktivite hem de mekanik özellikler elde etmeyi amaçlayan bir dizi inorganik fazın uygulanmasına odaklanmıştır. *In vivo* yapılan bir çalışmada PLA çözeltisi içine amorf kalsiyum fosfat (ACP) ve HAp katılarak elektroğirme yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiş ve daha sonra bu iskeleler Yeni Zelanda tavşanlarının femurlarına implante edilmiştir. İmplantasyonun ardından histolojik analizlerle mineralizasyonun arttığı ve kemik oluşumunun hızlandığı sonucuna varılmıştır [63].

Poli (laktit-ko-glikolid) ve kalsiyum fosfat nanopartiküllerini (PLGA/CaP 60:40) içeren malzemeler ile gümüş katkılı CaP nanopartiküllerini (PLGA/Ag-CaP 60:40) içeren cam pamuğu benzeri esnek nanokompozitler, koyunların sağ/sol humerus ve femurundaki distal epifiz ve proksimal metafizine implante edilerek 8 hafta boyunca izlenmiştir. Histolojik boyamalarla malzemelerin kemik rejenerasyonunu desteklediği ayrıca esnek yapıları sayesinde defekt bölgesinin şeklini kolaylıkla alabildiği görülmüştür (Şekil 2.11). Kolay uygulanabilir cam pamuğu benzeri malzemelerin yük taşımayan karmaşık şekilli kemik kusurları için önerilebileceği vurgulanmıştır [64].



Şekil 2.11. a) Beyaz İsviçreli Alp koyunlarında defekt alanının esnek greft malzemeleriyle tedavisindeki cerrahi prosedür, b) implantasyon sonrası görüntü ([64]'ten değiştirilerek).

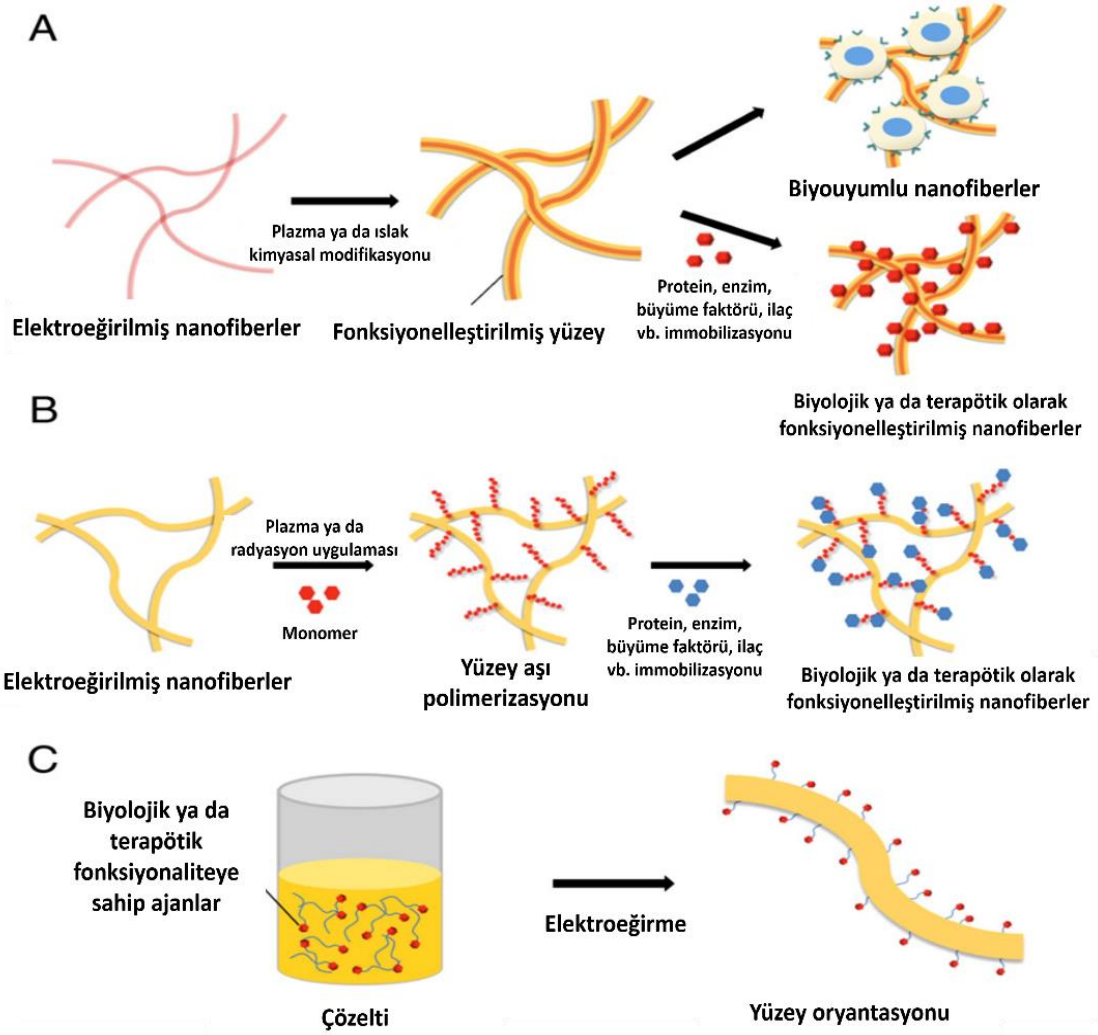
Tüm bu çalışmalar, elektroğirme ile üretilen greft malzemelerinin kemik rejenerasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

2.7. Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Hüresel yapışma ve çoğalma biyomalzemenin topografisiyle ilişkilendirilmektedir. Biyobozunur ve iyi bir mekanik mukavemete sahip PLA, PCL ve PLGA doku mühendisliği uygulamalarında başarılı sonuçlar veren ancak hidrofobik yapıları nedeniyle proteinlerin buna bağlı olarak da hücrelerin doku iskelelerine rahatça tutunup çoğalmasını kısıtlayan polimerlerdir. Bu nedenle, yüzey fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kontrol edilebilmesi, hücre davranışını (yapışma, çoğalma ve farklılaşma) etkilemekte, büyüme faktörlerinin immobilizasyonuna ve serbest kalmasına yardımcı olmaktadır [65]. Biyomimetik özellikte malzeme elde etmek için uygulanan çeşitli yüzey modifikasyon yöntemlerinin, yüzey hidrofilitatesini arttırdığı, malzemelerin biyoyumluluk özelliklerini geliştirdiği, vücut onarımını ve rejeneratif gelişmeyi uyardığı bilinmektedir [66].

Tüm bu özellikler bakımından, biyoaktif moleküllerle yüzeyi modifiye edilmiş sentetik nanofiberler, gelişmiş biyolojik ve terapötik uygulamalar için kullanılmaktadır. Çünkü sentetik polimerler doğal polimerlere kıyasla, elektroğirme yöntemi ile daha kolay işlenebilmekte ve nanofibröz morfoloji de daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sentetik polimer bazlı nanofiberlerin doku mühendisliği ve ilaç salımı uygulamalarında tercih edilen çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri Şekil 2.12'de sunulmuştur. Modifikasyon işlemi

elektroegirme ile fiber oluşturulmadan önce ozelti içine çeşitli biyolojik ve terapötik ajanların eklenmesiyle (ikili elektroegirme) gerçekleştirilebileceği gibi plazma işlemi, hidroliz gibi diğer yöntemlerle de fiber oluşumundan sonra gerçekleştirilebilmektedir [5]. Aşağıda verilen başlıklarda fiberler üzerinde gerçekleştirilen bu modifikasyon yöntemleri detaylandırılmıştır.



şekil 2.12. Nanofiber modifikasyonunda kullanılan yöntemler A) Plazma işlemi veya ıslak kimya yöntemi B) Yüzey aşı polimerizasyonu C) Eşzamanlı elektroegirme ([5]'ten değiştirilerek).

2.7.1. Plazma işlemi

Plazma işlemi, gaz akış hızı, g, basınc ve süre gibi parametrelerin ayarlanmasına olanak verme gibi avantajlar sebebiyle sıklıkla tercih edilen ve aynı zamanda polimerik malzeme yüzeyinde istenen işlevsellikleri ortaya çıkararak hidrofilik özelliklerin iyileştirilmesini

sağlayan bir yöntemdir [67, 68]. Bu işlemde, yük boşalımı (glow discharge) plazmasının oluşturulmasını sağlamak için düşük basınçta argon, amonyak veya oksijen gibi gazlar kullanılır. Gazın uyarılması, elektriksel deşarj, ısı, radyo frekansı enerjisi, mikrodalgalar veya alternatif/doğru akım gibi bir enerji kaynağı kullanılarak elde edilir. Bu, gazın serbest radikaller, iyonlar, protonlar, elektronlar, gaz atomları ve farklı enerjilere sahip moleküller halinde iyonlaşmasına yol açar. Yüksek enerjinin biyomalzeme yüzeyine bombardımanı, plazmadan substrata enerji transferine yol açar ve substratın yüzeyinde bir dizi kimyasal ve fiziksel değişime neden olur [69]. Oksijen, amonyak, hava, kükürt dioksit (SO₂), karbon dioksit (CO₂) vb. kullanılarak yapılan tipik plazma işlemleriyle yüzeyde hidroksil, karboksil, amin veya sülfat grupları oluşmaktadır [70-72]. Bir çalışmada, PCL ve HAp kullanılarak üretilen nanofibröz malzemenin oksijen kullanılarak gerçekleştirilen plazma işlemi sonucunda hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür [73]. Bir başka çalışmada ise elektroegirme yöntemiyle üretilmiş PCL nanofiber yüzeyi argon plazması ile modifiye edilmiş ve yumurta kabuğu membran proteini (SEP) yüzeye immobilize edilmiştir. Su temas açısı ölçümleriyle hidrofilitenin arttığı, insan derisi fibroblast (HDFs) hücreleriyle de malzemelerin hücre yapışması ve çoğalmasını desteklediği sonucuna varılmıştır [74].

Bu yöntem polimer yüzeylerde spesifik grupların indüklenmesini sağladığından özellikle hücrelerin malzemeye olan afinitesini desteklemek için yararlı olabilmektedir [69].

2.7.2. Yüzey Aşı Polimerizasyonu

Yüksek enerji gerektiren modifikasyon yöntemleri, polimer zincirlerini kıran ve dolayısıyla molekül ağırlığını etkileyen yöntemlerdir. Polimerlerde hızlandırılmış bozunmaya bağlı olarak da mekanik mukavemet gibi doğal özellikler kaybedilebilmektedir. Bu nedenle, polimerin doğal özelliklerini korurken yüzey özelliklerinde değişikliklere imkan veren yöntemler araştırılarak polimer yüzeylerin aşılama yoluyla modifikasyonu geliştirilmiştir [69]. Kimyasal olarak inert yüzeyler üzerine başlatıcıların (radikaller veya peroksit grupları) uygulanması argon plazması, ozon oksidasyonu, X-ray, elektron ışını ve lazer ile gerçekleştirilebilmektedir [5].

Örneğin, poliüretan (PU) fiberler ilk olarak yüzey oksit ve peroksit grupları üreten argon plazma ile muamele edilmiş ve PU fiberler UV ışınmasıyla bir 4-vinilpiridin monomer çözeltisine daldırıldığında, poli (4-vinilpiridin) aşı PU fiberler başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Aşılanmış piridin gruplarının heksilbromür ile kuaternizasyonu sayesinde

yüzeyde modifiye edilmiş PU fiberlere antibakteriyel aktiviteler kazandırdığı sonucuna ulaşılmıştır [75].

2.7.3. Islak Aşındırma Yöntemi

Plazma işleminin, nanogözeneklerde sınırlı penetrasyon derinliğine bağlı olarak ağ içinde derinlemesine yerleşmiş gömülü nanofiberlerin yüzeyini etkin bir şekilde değiştiremediği durumlarda, nanofiber yapıların yüzey modifikasyonu için ıslak kimyasal aşındırma yöntemleri tercih edilmektedir [76]. Çünkü bu yöntem, yüksüz polimer zincirleri arasında nispeten kolayca yayılabilen ve dolayısıyla gözenekli 3B iskelelere nüfuz edebilen küçük, yüksek ölçüde hareketli protonlar tarafından gerçekleştirilmektedir [77]. Poliester nanofiber yüzeyinde amin grupları oluşturmak ve pozitif yüzey yükünü sağlamak için etilendiamin, N-aminoetil-1-3-propandiamin, 1,6-hekzandiamin ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) gibi diamin türleriyle yüzey aminoliz yönteminin tercih edildiği çalışmalar bulunmaktadır [5]. Ancak biyobozunur alifatik poliester filmlerin ve iskelelerin asidik veya bazik koşullar altında kısmi yüzey hidrolizi de yüzey ıslanabilirlik özelliğini modifiye etmek veya yeni fonksiyonlar yaratmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [5].

Örneğin bir çalışmada elektroçirme ile üretilmiş PLLA içerikli doku iskelesinin yüzey modifikasyonu, iskelenin NaOH çözeltisinde hidroliziyle gerçekleştirilmiş ve karboksilik asit grupları iskelenin bütünlüğüne zarar vermeden üretilebilmiştir. Modifiye PLLA doku iskeleleri üzerindeki hidroksiapatit mineralizasyonu, kalsiyum iyonlarının malzeme yüzeyindeki karboksilat gruplarına bağlanabilmesi ile önemli ölçüde arttırılmıştır [78]. Literatürdeki başka bir çalışmada ise partikül uzaklaştırma yöntemiyle üretilen PLGA doku iskelelerinin, 1 N NaOH ile muamele edildiğinde kondrosit işlevini arttırdığı görülmüştür. Kondrosit fonksiyonlarını zenginleştirebilen temel malzeme özelliklerinin (PLGA'nın NaOH ile hidrolitik olarak bozunması bağlı olarak) daha hidrofilik yüzey, değişmiş gözeneklilik ve daha büyük nanometre boyutunda pürüzlülük olduğu bulunmuştur [77]. Bu çalışmalardan özetle, tez kapsamında kolay uygulanabilir olması sebebiyle tercih edilen NaOH çözeltisi ile hidroliz işleminin hücreler için toksik etki yaratmayacağı, aksine hücre proliferasyonunu arttıracığı öngörülebilmektedir.

2.8. Trombositten Zengin Plazma

Cilt ve diş tedavisi, kas ve bağ dokusu onarımı hatta veterinerlik uygulamaları gibi birçok alanda tercih edilen trombositten zengin plazma (PRP), kanın santrifüjleme işlemine tabi

tutularak hücrelerin molekül ağırlıklarına göre katman katman ayrıştırılması ile elde edilen, büyüme ve farklılaşma faktörlerince zengin otojen trombosit konsantrasyonudur. Boyutları 2-4 µm ve kandaki konsantrasyon değerleri mikrolitre başına 150.000 ile 400.000 arasında olan trombositler, pıhtı oluşumu ve yara iyileşmesindeki etkin rolleri ile doku rejenerasyonunda önemli bir yere sahiptir [79, 80]. Trombositlerin, periferik kan dolaşımında yarı ömürleri 8-10 gün arasında değişmektedir ve bu sürenin sonunda yaşam döngüleri sona ererek makrofajlar tarafından dolaşım sisteminden uzaklaştırılmaktadırlar [81].

Bir yara iyileşme sürecinde bölgeye diğer birçok hücre grubu ile trombositler de göç etmektedir. Trombosit hücreleri kolajen, trombin ve kalsiyum gibi moleküller ile aktive olup bölgede kararlı bir pıhtı oluşturduktan sonra trombosit içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin ortama salınmasıyla iyileşme sağlanır [82]. Bu büyüme faktörleri farklılaşmayı tetiklemek, iyileşmeyi arttırmak ve doku rejenerasyonunu desteklemekten sorumludur [83]. Yapısında plateletten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri başta olmak üzere 600 büyüme faktörü olduğu tahmin edilmektedir [6, 84].

PRP, hem içerdiği büyüme faktörleri hem de fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde yara iyileşmesinde aktif rol oynar. Çünkü büyüme faktörlerinin dışında fibrinojen, laminin-8 gibi hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinde etkili olan birçok biyoaktif molekül de yapısında barındırmaktadır (Çizelge 2.2). PRP ayrıca, osteokondüksiyon için hücre yapışma molekülü olan ve aynı zamanda kemik, bağ ve epitel doku gelişimi için bir matris görevi gören fibrin, fibronektin ve vitronektin proteinlerini de içermektedir [85]. Son zamanlarda, PRP ile yapılan çalışmalar; bir seferde birden fazla büyüme faktörü kullanımına imkân verdiği, maliyet etkinliğini arttırdığı ve hastanın kendi kanından hazırlanarak immün yanıt riskini azalttığı için ivme kazanmıştır.

Çizelge 2.2. PRP içinde yer alan bazı önemli biyolojik olarak aktif moleküller ve bunların fizyolojik rolleri ([86]'dan değiştirilerek).

Genel kategori	Spesifik moleküller	Fiziksel rol
Yapıştırıcı proteinler	Fibrinojen, fibronektin, laminin 8, vitronektin, trombospondin-1, Von Willebrand faktörü,	Hücre-yüzey etkileşimleri, hücreyel yapışma, kemotaksis, ECM bileşimi, pıhtı oluşumu
Pıhtılaşma faktörleri ve ilişkili proteinler	Faktör V, faktör XI, protein S, antitrombin, doku faktör yolu inhibitörü	Trombin aktivasyonu ve düzenlenmesi, fibrin pıhtı oluşumu
Antimikrobiyal proteinler	Tromboksidinler, kinosidinler	Bakterisidal ve fungusidal özellikler
Fibrinolitik faktörler ve ilişkili proteinler	Plazminojen, plazminojen aktivasyon inhibitörü, α -2 antiplazmin, trombin ile aktive olabilen fibrinoliz inhibitörü	Plazmin üretimi ve düzenlenmesi
Proteazlar ve antiproteazlar	Metalloproteinazların 1-4 (TIMP 1-4) doku inhibitörü, MMP-1, -2, -4, -9, α -1 antitripsin	Matris degradasyonunun ve hücreyel davranışların düzenlenmesi
Membran glikoproteinleri	α IIb β 3, α v β 3, CD-40 ligandı, P-selektin, doku faktörü, PECAM-1, CD63	Trombosit agregasyonu ve yapışması, inflamasyon, trombosit-lökosit etkileşimleri
Lipidler	Sfingosin-1-fosfat, HETE'ler, tromboksan B2, prostaglandin F ₂ α , lökotrien B4, lipoksin A4	İnflamasyonun düzenlenmesi, hücre göçü ve çoğalması
Temel proteinler ve diğerleri	Trombosit faktörü 4, β -tromboglobülin, endostatinler, bağ dokusu aktive edici peptit III, kondroitin-4 sülfat, albümin, immünoglobülinler G ve M	Endotel hücre kemotaksisinin düzenlenmesi ve anjiyogenez, vasküler modelleme, trombosit aktivasyonu

PRP'nin kemik rejenerasyonunu arttırmaya yönelik kullanımı ilk olarak 1998'de Marx tarafından mandibular defektlerin iyileşmesini hızlandırmak içindir [87]. O zamandan beri, diğer kraniyofasiyal uygulamalarda ve uzun kemik kırıkları, ligamentöz onarım, intervertebral disk rejenerasyonu ve spinal füzyon dâhil olmak üzere ortopedik uygulamalarda kullanımı yaygın olarak araştırılmıştır [88]. Literatürde PRP'nin kemik doku mühendisliği uygulamalarında da kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.

Örneğin bir çalışmada, biyobozunur poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV)/nano-stronsiyum karbonat(nSrCO₃)/PRP kompozit yapı iskelesi katman-katman (layer-by-layer) elektroçirime yöntemiyle fiber çapı 400-800 nm olacak şekilde üretilmiştir. nSrCO₃ nanopartikülleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışını kırınımı analizi (XRD) kullanılarak karakterize edilmiştir. *In vitro* çalışmalar için insan mezenkimal hücresi (hMSC) kullanılmış ve bu hücrelerin üretilen doku iskelerine tutunup yaşayabildikleri

DAPI-Aktin boyamasıyla gösterilmiştir. hMSC'lerin osteojenik farklılaşması ise ALP konsantrasyon ölçümleri ve Alizarin Red boyamasıyla gösterilerek mineralizasyonda kayda değer bir artış olduğu vurgulanmıştır. Bu ön sonuçlar, elektroegirme yöntemiyle üretilen bu biyokompozit yapının kemik rejenerasyonu için daha iyi bir platform olarak kullanılabileceğini göstermiştir [89].

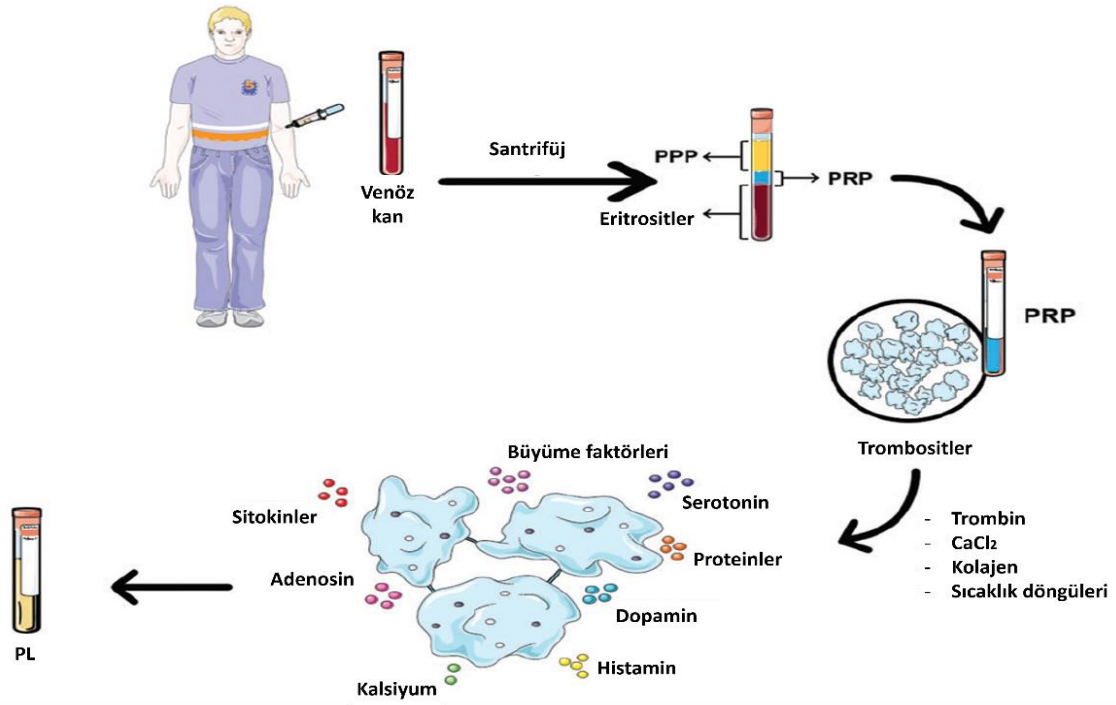
Başka bir çalışmada, PRP'nin hMSC çoğalmasında ve osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi kalsiyumca eksik olan sentetik hidroksiapatit ve β -trikalsiyum fosfat doku iskeleleri kullanılarak incelenmiştir. hMSC ekili iskelelere, trombin ve CaCl_2 pipetleme yöntemiyle yüklenerek PRP uygulanmış ve osteojenik ortamda 3 hafta bekletilmiştir. PRP'nin hücre çoğalmasını ve hücre ekim verimini arttırdığı ancak iki kalsiyum fosfat iskelede de ALP aktivitesinde anlamlı bir artış göstermediği belirtilmiştir [90].

Yapılan *in vivo* bir çalışmada, köpek mandibula kusurlarının yeniden yapılandırılması için 3 boyutlu polikaprolakton-20% trikalsiyum fosfat (PCL/TCP) doku iskelesi PRP ile muamele edilmiştir. Mikro-CT ile altıncı ve dokuzuncu aylarda yapılan ölçümlerle PCL-TCP/PRP grubunun PRP içermeyen kontrole kıyasla daha fazla kemik hacmine sahip olduğu, histolojik analizlerle de osteoit depolarının ve yeni kemik trabekülünün olduğu gösterilmiştir [91].

2.8.1. PRP İzolasyonu, Aktivasyonu ve Salımı

Trombositten zengin plazma, otolog kandan genellikle iki santrifüj adımı ile hazırlanmaktadır. Birincisi, kırmızı kan hücrelerinin santrifüj yoluyla plazma ve trombositlerden ayrıldığı adımdır. Plazma ve trombosit tabakalarının ayrılmasının ardından ikinci santrifüjleme basamağı ile trombositler uzaklaştırılır. Antikoagüle edilen kan santrifüj edildiğinde, üç katman belirgindir: alt tabaka kırmızı kan hücreleri (özellik ağırlık = 1.09), orta tabaka trombositler ve beyaz kan hücreleri (buffy coat, özellik ağırlık = 1.06) ve üst tabaka plazmadır (özellik ağırlık = 1.03) [92]. Bu katmanlar, PRP üretmek için mevcut metotların temelini oluşturmaktadır. Ancak, farklı hazırlama protokollerinin etkinliği hala tartışılmakta ve preparatta değişken miktarlarda lökosit bulunduğu bilinmektedir [88]. Bununla birlikte ticari uygulamalardaki artış, PRP kitlerinin geliştirilmesine yol açmış ve mevcut izolasyon metotları kullanılarak büyüme faktörü (GF) içeriği aynı miktarda olacak şekilde optimize edilmeye çalışılmıştır.

PRP'nin endojen veya ekzojen yollarla gerçekleştirilen aktivasyonu ile GF'ler salınabilmektedir (Şekil 2.13). Süre açısından hızlı ve maliyet bakımından da uygun donma/çözme döngülerine bağlı endojen aktivasyonu, trombositlerin tahribatı nedeniyle GF'lerin salımını etkilemektedir [93]. Kısaca bu yöntemde, PRP -80°C'de gece boyunca dondurulur ve daha sonra +37°C'de çözülerek döngü 1-3 defa tekrarlanır. Hücre kalıntılarını gidermek için havuzlama ve bir veya daha fazla santrifüjleme/filtrasyon adımından sonra platelet lizatı (PL), büyüme ortamına eklenmeye hazır hale gelir [94]. Diğer bir yaygın aktivasyon yöntemi ise kalsiyum klorür, trombin veya kolajen kullanımınıdır. Trombinin antikoagülant gibi davranması ve buna bağlı olarak da istenmeyen reaksiyonlara zemin hazırlayabilmesi sebebiyle kalsiyum klorür daha çok tercih edilmektedir [95].



Şekil 2.13. PRP izolasyonu ve PL preparatının şematik gösterimi. Trombosit aktivasyon süreci: Trombin, kalsiyum klorür ve kolajen veya donma-çözülme döngüleri trombositleri aktive edebilir ve/veya parçalayabilir. Ardından, aktifleşmiş/parçalanmış trombositler, hücre alımında, büyümede ve morfogenezde rol oynayan sitokinler veya büyüme faktörleri gibi bazı molekülleri serbest bırakır. PRP, trombositten zengin plazma; PL, trombosit lizatı ([96]'dan değiştirilerek).

Bir çalışmada, platelet türevlerinin (PL ve platelet büyüme faktörleri açısından zengin olan süpernatant (PR-SRGF)) aktivasyonu, donma/çözme ve CaCl_2 ile büyüme faktörlerinin salımı ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (BM-MSK) *ex vivo* davranışları açısından karşılaştırılmıştır. ELISA (enzime bağlı immüno sorbent analizi) kitleri ile yapılan salım çalışmalarında PR-SRGF'de PDGF-AB, PDGF-AA, PDGF-BB konsantrasyonu, PL'ye göre sırasıyla 5.7, 1.7 ve 2.3 kat daha yüksek olmuştur. Bu çalışma sonunda trombosit faktörlerini serbest bırakmak için kullanılan yöntemin, büyüme faktörleri ve genel ürün performansındaki zenginleşmeyi önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Trombosit türevlerinin üretim sürecinin standardizasyonu ve bunların serbest bırakma kriterlerinin tanımlanması daha fazla araştırmayı gerektirdiği sonucuna ulaşılmıştır [97].

PRP doku iskelesi üzerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan CaCl_2 miktarının hücre davranışı üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada kütle/hacim oranı 2.5, 5 ve 10% olacak şekilde PRP, CaCl_2 ile karıştırılmıştır. Doku iskelelerin gerilme mukavemeti, biyobozunurluğu ve su tutma kapasitesi değerlendirilmiştir. Fiber dağılımı SEM ile hücre fenotipi ise immün boyama yöntemleriyle belirlenmiştir. Hücre tutunma oranının ve kısa sürede proliferasyonun en yüksek olduğu değerler %2.5 CaCl_2 ile yapılan PRP jelleşmesinde görülürken, %10 CaCl_2 içeren iskeleler ise en yüksek ozmolarite, fiber kalınlığı, gözenek boyutu ve en uzun pıhtılaşma süresi göstermiştir. Tüm bunların yanında su tutma kapasitesi, gözeneklilik ve gerilme mukavemetinin farklı CaCl_2 konsantrasyonlarıyla değişmediği görülmüştür. Sonuç olarak, çeşitli CaCl_2 konsantrasyonları ile hazırlanan PRP iskelelerin farklı fiziksel ve biyolojik özellikler gösterebileceği vurgulanmıştır [98].

2.8.2. PRP'de Bulunan Büyüme Faktörleri

PRP, yüksek trombosit ve doğal fibrinojen konsantrasyonuna sahiptir. Trombositlerin trombin ve kalsiyum klorür gibi çeşitli ajanlarla gerçekleştirilen aktivasyonu ile birlikte platelet alfa granülleri içerisinde bulunan ve çeşitli dokuların büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli role sahip polipeptit yapılı büyüme faktörleri dizisinin salımı gerçekleşir [99]. PRP'nin yapısında başta PDGF, TGF— β 1, TGF-- β 2 olmak üzere pek çok önemli büyüme faktörünün bulunduğu ve IGF-I'in de periferik kandaki trombositlerde mevcut olduğu gösterilmiştir [100]. Etki mekanizmaları, otokrin, parakrin veya endokrin yolla gerçekleşmektedir. Büyüme faktörleri, hedef hücrelerin yüzey reseptörleriyle bağlantı kurarak hücre içi sinyalleşmeyi sağlar ve bunun sonucunda rejenerasyon için gerekli olan mRNA'nın ve proteinlerin transkripsiyonunu artırır [101].

Plateletten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF): PDGF, molekül ağırlığı 30 kDa olan katyonik polipeptit grubudur [99]. Makrofajlar, yumuşak kas dokusu hücreleri ve gliyal hücreler gibi çeşitli hücre gruplarından salımı gerçekleşmekte ve nötrofil kemotaksisi, kolajen üretimi, kan damarlarının onarım ve rejenerasyonu gibi önemli olayların gerçekleşmesine katkı sağlamaktadır. Hemostazda da rol oynuyor olması sebebiyle hemen hemen tüm yara iyileşmesi olaylarında yer almaktadır [100].

Transforme edici büyüme faktörü (TGF): TGF, iki zincirli polipeptit yapıda olup insanlarda TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 farklı gen yapısında bulunabilmektedir. T-lenfosit ve nötrofil hücrelerinden salınan molekül ağırlığının 25 kDa olduğu bilinmektedir. Endotel hücrelerinin kemotaksi ve anjiyogenezini arttırdığı, ayrıca diğer büyüme faktörlerinin mitogenezinde de etkin olduğu gösterilmiştir [99]. En önemli fonksiyonları; osteoblast prekürsörlerinin bağ dokusunda yara iyileşmesini ve kemik formasyonu amacıyla kolajen matris oluşumunu uyarmasıdır [100].

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF): IGF, kemik matrisinde en fazla bulunan büyüme faktörü olup IGF I ve IGF II olmak üzere iki formu vardır. IGF-I'in kemik oluşumuna etkisinin IGF-II'den fazla olduğu düşünülmekte ve bu nedenle çalışmalar genellikle IGF-I üzerinde yapılmaktadır [101]. IGF, kemik matris oluşumunu, kırıldak büyümesinin artmasını, yara iyileşmesini ve osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu desteklemektedir [93].

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF): Hipoksi (dokulara yeteri miktarda oksijen gidememesi) varlığında VEGF'in miktarı artar ve kılcal damar geçirgenliğini artırır [93]. En etkili fizyolojik ve patolojik anjiyogenez uyarıcısı olduğu bilinmektedir [100].

Platelet Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü (PDEGF): PDEGF, 1962 yılında Cohen tarafından keşfedilen tanımlanmış ilk büyüme faktörüdür. Epidermal rejenerasyonu uyarır ve diğer büyüme faktörlerinin etkilerini ve üretimini artırır. Elli üç amino asitten oluştuğu ve molekül ağırlığının 6 kDa olduğu bilinmektedir [99].

Platelet Kaynaklı Anjiyogenez Faktörü (PDAF): PDAF, 45 kDa ağırlığında olan asidik yapıda bir polipeptittir. Hipoksi durumundan yüksek derecede etkilenir ve PDAF'nin

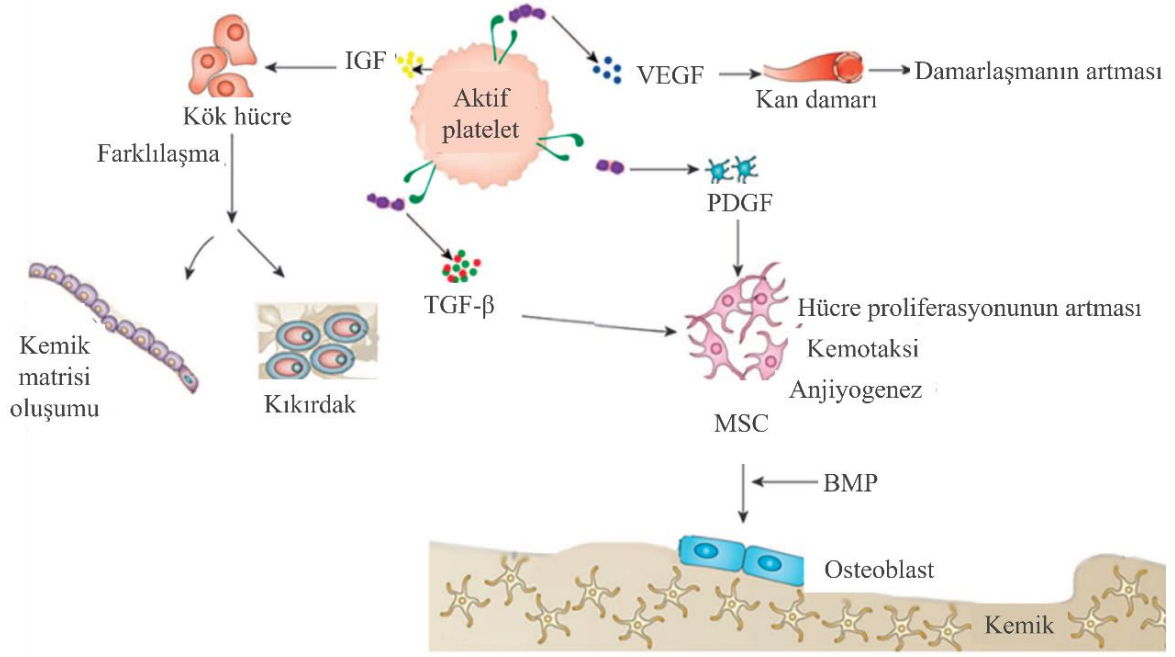
fonksiyonu ve etkinliği; aralarında IGF-I, TGF, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), PDEGF ve interlökin 1-beta'nın (IL-1 β) bulunduğu pek çok başka büyüme faktörü tarafından düzenlenir [99].

Platelet Faktör 4 (PF 4): PF 4, nötrofiller ve fibroblastlar için kemoatraktan ve güçlü antiheparin maddesi olup homotetramer yapıdadır [99].

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF): FGF, mast hücresi, makrofaj, osteoblast ya da olgunlaşmamış kondrosit hücreleri kaynaklı olup hücre büyümesi ve hiyalüronik asit üretiminde görev alır [103]. Üzerinde en çok araştırma yapılmış alt grup olan bFGF; anjiyogenez ve endotelial hücre göçünde aktif rol alır [102].

2.8.3. PRP'nin Kemik İyileşmesindeki Önemi

Plateletler aktivasyon durumuna ve kandaki sayısına göre doğal yara iyileşmesinde rol oynamaktadır. Kemik rejenerasyonu da plateletlerin degranülasyonuna bağlı olarak PDGF, TGF-1,2 ve IGF'nin serbestleşmesiyle başlamaktadır. Plateletten türetilmiş büyüme faktörü, greft ile taşınan kemik iliği kök hücrelerinin sayısını arttırmak amacıyla mitogenezi uyarır ve anjiyogenezi başlatır. Transforme edici büyüme faktörü- β ise, hem fibroblast ve preosteoblastları uyararak mitozu başlatmakta hem de olgunlaşmış osteoblastların farklılaşmasını hızlandırmaktadır. Ayrıca, osteoblastları uyararak kemik matrisi depolamalarını, fibroblastları aktive ederek de kapiller büyüme desteklemek amacıyla kolajen matris depolamalarını sağlamaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörü de greft olarak kullanılan süngerimsi kemiğin trabeküllerinde bulunan endosteal osteoblastlar üzerine etki etmektedir (Şekil 2.14) [100].



Şekil 2.14. PRP'nin kemik ve kıkırdak oluşumu sürecinde kök hücreler üzerindeki rolü ([93]'ten değiştirilerek).

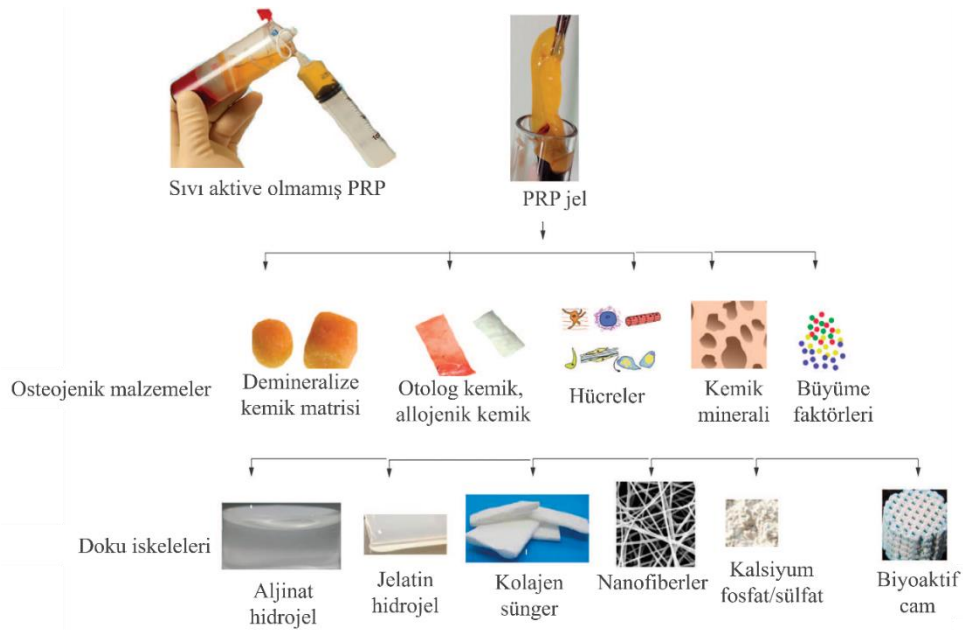
Yukarıda bahsedilen büyüme faktörlerini yapısında bulundurması, izolasyon kolaylığı ve immün bir reaksiyona sebep olmaması nedeniyle kırık bölgesine PRP eklenmesi, kemik rejenerasyonunu arttırmak için etkili bir yaklaşımdır [104]. *In vitro* çalışmalar PRP uygulaması ile yetişkin mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu, fibroblastların proliferasyonu ve hücre dışı matrisi üretimi ile travma ve ortopedik prosedürlerde kullanımı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir ve *in vivo* çalışmalarla da (sadece hayvanlarda değil, insanlarda da) osteoid oluşumunun arttığı gösterilmiştir [105-107].

2.8.4. Ortopedik Cerrahide PRP'nin Klinik Uygulamaları

PRP, defektlerin ve kırıkların rejenerasyonu için ortopedi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır [108, 109]. Erken çözünmesi ve fibrin rezorpsiyonu nedeniyle PRP'nin olumsuz bir reaksiyon geliştirme riskinin nadir olduğu düşünülmektedir [93]. Sinclair ve ark. [110], MSC'lerin ve PRP'nin beraber kullanımının kırık onarımını önemli ölçüde desteklediğini ve aynı zamanda yara iyileşmesini sinerjik olarak hızlandığını bildirmişlerdir [110]. Örneğin, titanyum implantlarda MSC ve PRP beraber uygulandığında oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir [111]. Labibzadeh ve ark. [96], PL ile birlikte mezenkimal stromal hücrelerini yedi hastanın kemik hasarı olan bölgesine implante etmiş

ve çalışma sonunda PL ile mezenkimal stromal hücrelerin beraber kullanımının psödoartoz (kemik kaynanamaması) tedavisinde güvenli olduğunu göstermişlerdir.

Ortopedik cerrahide genellikle PRP sıvı halde kullanılmaktadır. Cerrahi bölge açılır ve takiben (2-4 dakika içinde) aktive edilmemiş PRP, yumuşak dokulara sıvı halde enjekte edilir. Bir doku ECM'sinin bileşenleri (kolajen, glikozaminoglikanlar ve yapışkan proteinler) ile büyüme faktörleri arasında doğrudan bir etkileşim vardır. Lokal ve kademeli aktivasyona bağlı farklı dokuların ECM ile etkileşimi sonucu olarak da PRP, matris benzeri sıkıştırılabilir bir yapıya dönüşür [112]. *In situ* üretilen fibrin yapıdaki nano iskele, ECM proteinleri ve hücreleri ile etkileşime girerek fibronektine bağlanır, geçici üç boyutlu bir iskele oluşumunun ardından büyüme faktörleri serbest bırakılır. PRP'de birçok büyüme faktörü bol miktarda bulunmasına rağmen, 24 saat içinde bu faktörlerin hemen hemen hepsinin salını gerçekleşmektedir. Ancak kemik rejenerasyonu 4-6 haftalık bir süreçtir ve bu nedenle, PRP'nin kemik iyileşmesindeki etkisi neredeyse ihmal edilecek kadar azdır [93]. PRP'den ortama salınan büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yarılanma ömürlerinin kısa olması ve ortamda yeterli sürede etkin konsantrasyonda bulunmaması, PRP'nin rejeneratif tedavilerde kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, PRP çeşitli taşıyıcı sistemlerle beraber kullanılarak içeriğinde bulunan büyüme faktörlerinin biyoyararlanımının artırılabilmesi hedeflenmektedir (Şekil 2.15).



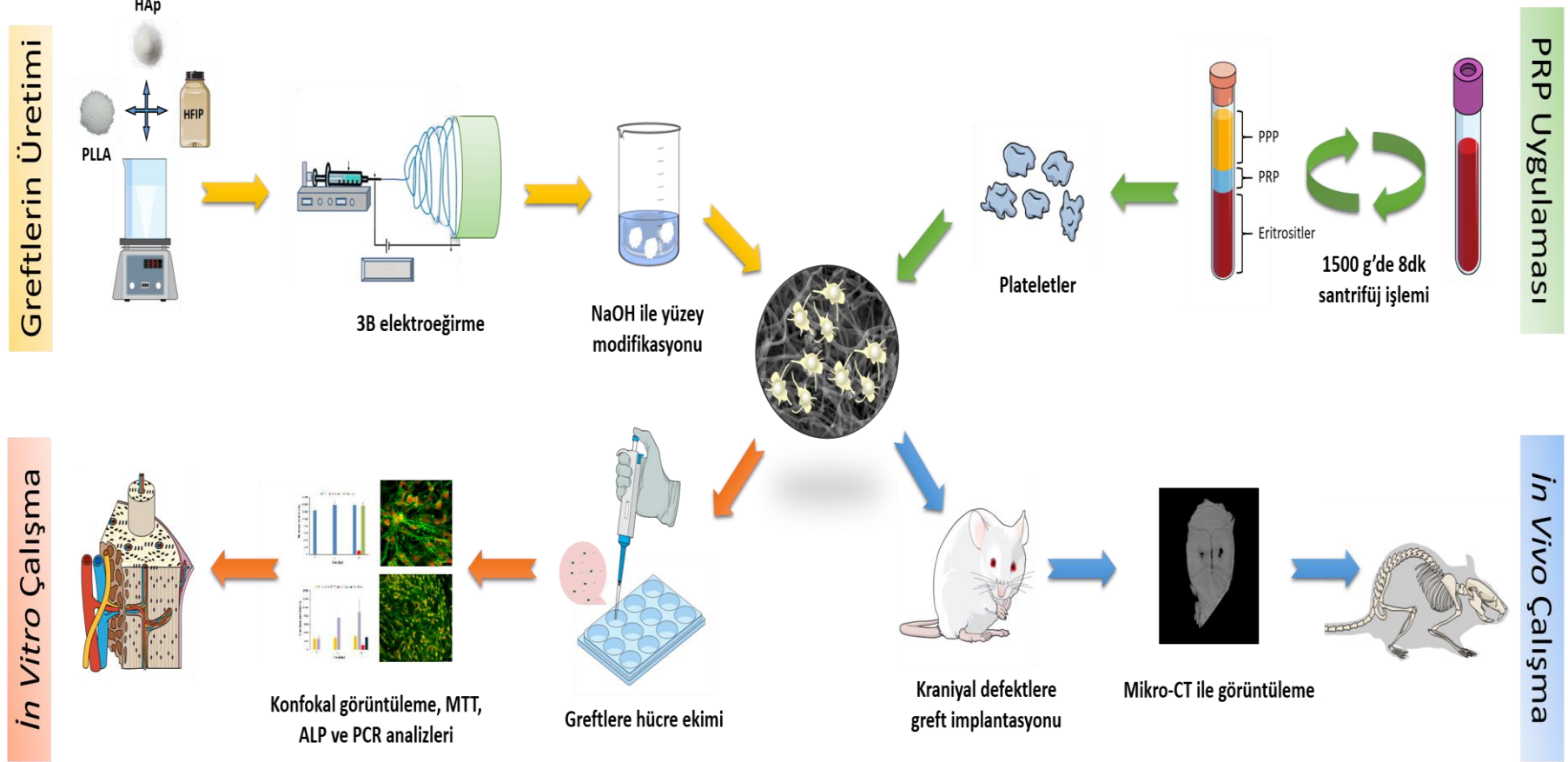
Örneğin, PRP ve bir donörden alınan demineralize otolog kemik matrisi beraber kullanıldığında farelerde ve klinik deneylerde umut vaat eden sonuçlar elde edilmiştir [113]. Bir başka çalışmada ise tavşan tibiazlarında, PRP ve ticari bir kemik grefti beraber kullanılmış ve bu şekilde sadece PRP veya kemik greftleriyle yapılan çalışmalara göre daha üstün bir iyileşme potansiyeli görülmüştür [114]. İnsanlar üzerinde yapılan başka bir klinik çalışmada PRP, dış fiksatiflere kıyasla ekstremitte uzatma iyileşme sürecini başarılı bir şekilde azaltırken; PRP ile sıçanlardan elde edilen hücresizleştirilmiş ve liyofilize edilmiş Aşil amalgamı da allojenik implantasyonda üstün iyileşme potansiyeli göstermiştir [115, 116].

PRP'nin kişinin kendi kanından elde edilmesi sebebiyle immün bir yanıt oluşturmadığı bilinmektedir, ancak son zamanlarda allojenik PRP kullanımına yönelik tartışmalar devam etmekte olup bu alanda araştırmalar hız kazanmıştır. Örneğin, tip II diyabet hastası ve tibia kırığı bulunan 50 yaşında erkek bir bireyde, otolog süngerimsi kemikle allojenik trombosit konsantrasyonunu beraber kullanılarak bir vaka çalışması yapılmıştır. İmmünojenik reaksiyonları önlemek için allojenik trombosit konsantrasyonunda lökosit miktarı azaltılmış ve radyasyon uygulanmıştır. İşlemi takiben 14. haftada, trombosit veya tip I insan lökosit antijenine (HLA) ait antikolar saptanmamış ve 12 ay sonunda ise tam yük taşıma sağlanmıştır [117]. Bu çalışmanın ardından, aynı grup tarafından dokuz hastada uzun kemik psödoartozunu tedavi etmek için aynı tip allojenik ürün (allojenik trombosit konsantrasyonu ve otolog süngerimsi kemik) kullanılarak yeni bir klinik çalışma yapılmıştır. Standart kan bankası stoklarından rastgele tek donörlü allojenik platelet türevleri temin edilmiştir. Vaka çalışmasında olduğu gibi, implantasyondan önce ve 3 ay sonra tip I HLA insan trombosit antikoları için tarama yapılmış ve herhangi bir immünolojik reaksiyon işareti saptanmamıştır. Ameliyattan 1 yıl sonra ise tedavi edilen 9 hastanın 7'sinde tamamen iyileşme olduğu gözlemlenmiştir [117].

Tüm bu bilgilerden yola çıkılarak, sunulan literatür bilgileriyle otojen veya allojen PRP'nin kemik rejenerasyonunu destekleyebileceği görülmektedir. Bu amaçla tez kapsamında ise kemik ECM'sini taklit edebilen 3B nanofiber greftlerin üretimi ve PRP ile biyoaktivitesi artırılmış, kemik rejenerasyonunu destekleyen biyomalzeme sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışmasında ilk olarak, osteoindüktif etkiyi arttırmak için sentetik vücut sıvısından (SBF) mikrodalga yöntemiyle üretilen hidroksiapatit (HAp) nanopartikülleri, poli(L-laktik asit) (PLLA) içerisine katılmış ve 3-boyutlu (3B) elektroğirme yöntemiyle nanofibroz yapıda pamuksu alloplastik greft malzemeleri üretilmiştir. Daha hidrofilik yapıda, morfolojisini koruyan malzemeler elde edebilmek için üretilen malzemelere farklı süre ve derişimlerde sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileri içerisinde yüzey modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Ardından, T-Lab kit protokolüne göre izole edilen trombosit zengin plazma (PRP), pipetleme yöntemiyle greftlere yüklenmiş ve aktive edilmiştir. Fare preosteoblast hücreleri (MC3T3-E1) kullanılarak yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve 24 adet Wistar Albino Sıçan kullanılarak gerçekleştirilen *in vivo* hayvan deneyleri ile PRP yüklenen malzemelerin, kemik doku rejenerasyonunda greft olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tez çalışmasında gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler

Çizelge 3.1’de deneysel çalışmalar için kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kimyasal ve biyolojik madde listesi.

Malzeme	Firma	Ülke
1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP)	Merck	Almanya
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus	Solis Biodyne	Estonya
β-actin primerleri	Alpha DNA	ABD
β-gliserol fosfat	Sigma-Aldrich	Almanya
Alexa Fluor 488	Thermo Fischer	ABD
ALP primerleri	Macrogen	Kore
Batticon (Antiseptik çözelti)	Drogsan	Türkiye
BSA (Bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich	Almanya
CD41-PC5 (GP IIb)	Beckman Coulter	ABD
CD61-PC7 (GP IIIa)	Beckman Coulter	ABD
CD62P-PE (P-Selektin)	Beckman Coulter	ABD
cDNA reverse transkripsiyon kiti	Applied Biosystems	ABD
Etil Alkol	Teksoll	Türkiye
Fetal sığır serumu (FBS),	Biowest	Fransa
Gluteraldehit (hacimce %25’lik)	Sigma-Aldrich	Almanya
Hekzametildisilazan (HMDS)	Merck	Almanya
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich	Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich	Almanya
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck	Almanya
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Merck	Almanya
Ketamin hidroklorür	Alfasan International BV	Hollanda
Kolajen tip 1 (Coll I) primerleri	Alpha DNA	ABD
Ksilazin hidroklorür (Alfazyne %2)	Alfasan International BV	Hollanda
L-askorbik asit	Sigma-Aldrich	Almanya
Lizozim	Sigma-Aldrich	Almanya
L-glutamin	Biowest	Fransa
Magnezyum klorür hekzahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Merck	Almanya
MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı	Riken	Japonya
Minimum Essential Medium Alpha Modification (α-MEM)	Biowest	Fransa
Osteokalsin (OCN) primerleri	Alpha DNA	ABD
Paraformaldehit	Merck	Almanya
Penisilin-streptomisin	Biowest	Fransa
Poli(L-laktik asit) (PLLA) (PURASORB PL 18)	Corbion	Hollanda
P-nitrofenil fosfat sıvı substrat sistemi (pNPP)	Sigma-Aldrich	Almanya
Potasyum klorür (KCl)	Merck	Almanya
Propidyum iyodür	Sigma-Aldrich	Almanya
PRP kiti	T-Lab	Türkiye

Çizelge 3.1. Kimyasal ve biyolojik madde listesi (devamı).

RNEasy kit	Qiagen	ABD
Sodyum azid	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck	Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O),	Merck	Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck	Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	Almanya
Sütür materyali	Doğsan	Türkiye
Tripsin/EDTA çözeltisi	Sigma-Aldrich	Almanya
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Almanya

Malzemeler alfabetik sıraya göre verilmiştir.

3.2. Etik Kurul Onayları ve Mali Destek

“Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri” başlıklı tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.09.2017 tarih ve GO 17/671-23 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Ayrıca, tez çalışmasının Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi’ne uygun olduğu saptanarak 26.02.2019 tarih ve 2019/02-15 karar numarası ile onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Tez çalışmasının mali desteği, “Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri” başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (FYL-2018-16974) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanmıştır.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Biyomalzemelerin Üretimi

Bu bölümde, öncelikle HAp nanopartiküllerin ve PLLA-HAp nanofiber greftlerin üretim yöntemleri anlatılmış, ardından üretilen greft malzemelerinin yüzey modifikasyonu için izlenen yöntem açıklanmıştır.

3.3.1. Hidroksiapatit (HAp) Üretimi

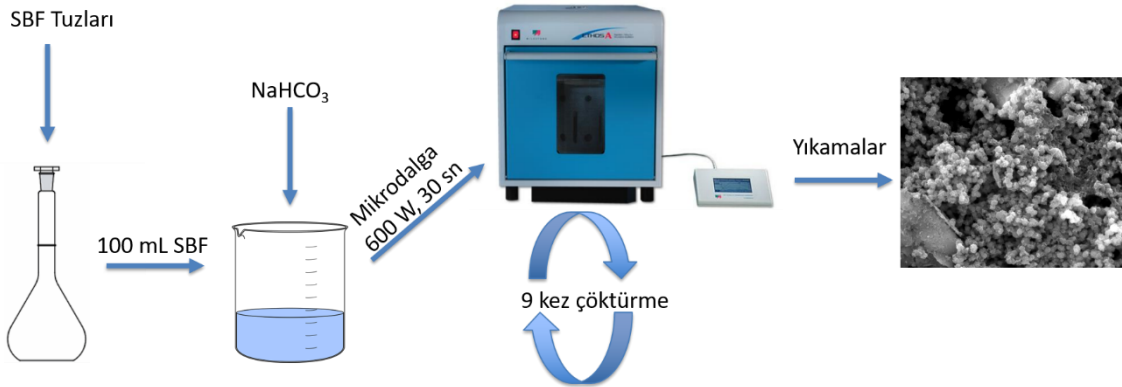
Biyomimetik yöntemle HAp üretimi için, Çizelge 3.2’de belirtilen reçeteye göre 10 kat derişik SBF çözeltisi (10xSBF) hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. 10xSBF çözelti reçetesi (Toplam hacim 1 L) [44].

Bileşenler	Ekleme Sırası	Miktar (g)	Derişim (mM)
NaCl	1	58.443	1000.00
KCl	2	0.373	5.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3	3.675	25.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	4	1.016	5.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	0.500	3.62
*NaHCO ₃	6	0.084	10.00

*100 mL SBF için.

Stok çözeltiyi hazırlamak için ilk beş tuz sırasıyla 800 mL distile su içinde çözülerek hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Çöktürme işleminin hemen öncesinde, NaHCO₃ tuzu 10xSBF stok çözeltisinden alınan her bir 100 mL çözeltiye eklenmiştir. SBF içinde bulunan iyonları aktifleştirmek için mikrodalga fırın (Milestone, İtalya) kullanılmıştır. Beher içerisindeki 10xSBF çözeltisi, 30 sn boyunca 600 Watt'lık mikrodalga ışımada tutularak bu işlem 9 kere tekrarlanmıştır [44]. Ardından, istenmeyen fazların uzaklaştırılması amacıyla 5 dk 6,000 rpm döngüsünde santrifüj işlemi ile örnekler 3 defa etanol ve 2 defa distile su kullanılarak yıkanmıştır (Şekil 3.2). Elde edilen HAp partikülleri 37°C sıcaklıkta kurutularak kullanımdan hemen önce havanda öğütülmüştür.

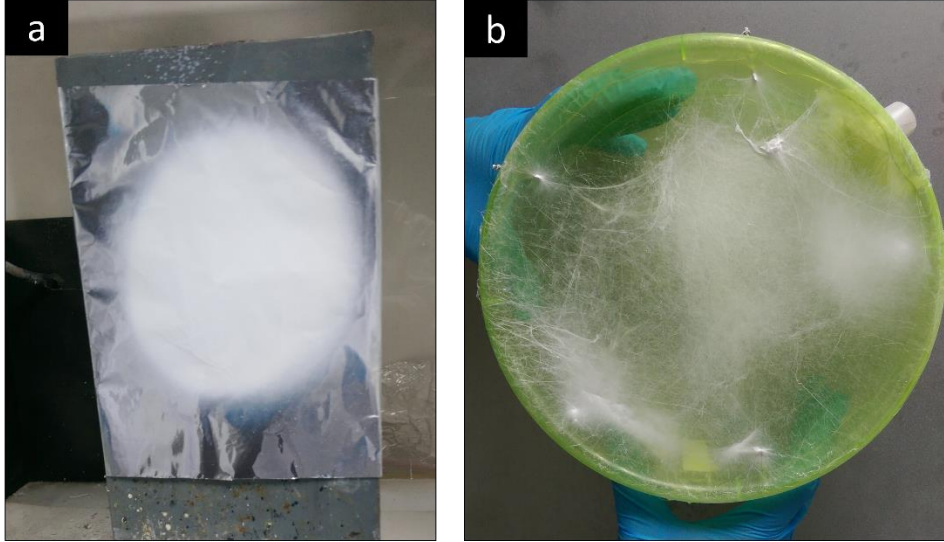


Şekil 3.2. Mikrodalga yöntemiyle 10xSBF'den HAp üretimi.

3.3.2. PLLA-HAp Nanofibröz Alloplastik Greftlerin Üretimi

PLLA (Mw= 260,000 g/mol) polimer pelletleri derişimi %8.0 (w/v) olacak şekilde HFIP içerisinde çözdürülmüş ve daha sonra %0-60 (w/w) oranlarında HAP nanopartikülleri çözelti içerisinde katılmıştır. Bu karışımlar 30 dk boyunca ultrasonik banyoda (Sonorex Super 10 P, Bandelin, Almanya) soniklenerek 1 gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımlar, plastik şırıngalara enjekte edilerek bir şırınga pompasına (New

Era Systems, ABD) yerleştirilmiştir. Belirli bir hızla akıtılan şırınganın ucuna yüksek voltaj güç kaynağı (Gamma High Voltage Research, ABD) aracılığıyla elektrik akımı uygulanarak nanofiber formda 3B kompozit doku iskeleleri, özel olarak tasarlanan toplayıcıda biriktirilmiştir. Yaklaşık 15 cm çapa sahip içi boş, yarım daire şeklinde bir plastik kap, toplayıcı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3.b). Kabın merkezine bir metal çivi yerleştirilerek bu merkezden eşit açılı olacak şekilde 5 adet metal çivi hattı oluşturulmuştur. Bu bölgede birikecek fiberlerin bir cam çubuk vasıtasıyla sarılmasıyla, sıkıştırılabilir ve kolayca şekil alabilen pamuksu formda greft malzemeleri üretilmiştir. Elektroegirme parametreleri; uygulanan voltaj 14-20 kV, çözelti akışı hızı 1.0-2.0 mL/sa, şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 10-20 cm olacak şekilde değiştirilmiş ve uygun koşullar sonucunda boncuk (bead) oluşturmayan uygun üretim koşulları belirlenmiştir [2].

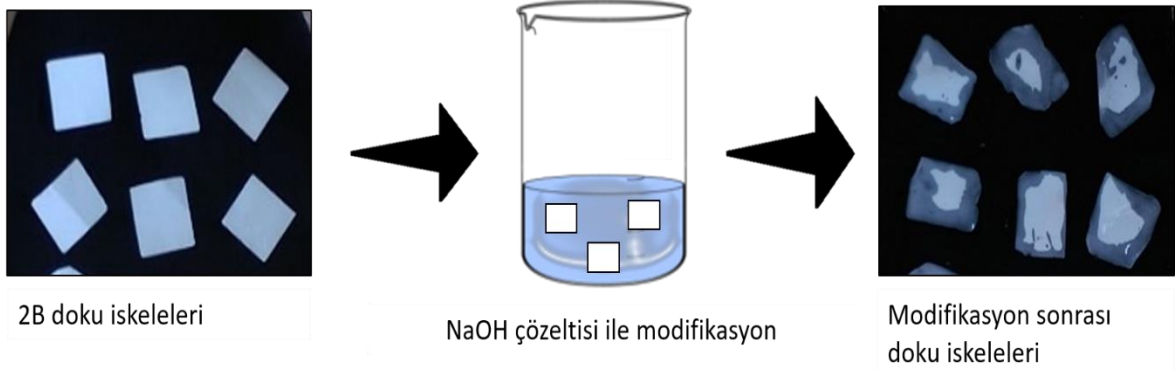


Şekil 3.3. Geleneksel elektroegirme yöntemiyle doku iskelesi üretiminde kullanılan toplayıcılar a) 2 boyutlu metal toplayıcı, b) 3 boyutlu plastik toplayıcı.

3.3.3. Nanofiberlerin Modifikasyonu

Greft malzemelerinin üretiminin hemen ardından yüzey modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidrofilisite değerinin yaklaşık 70° olmasını sağlayacak uygun süreyi belirlemek için PLLA içerikli doku iskeleleri farklı derişimlerde (0.1, 0.2 ve 0.5 M) NaOH çözeltisi içerisinde farklı sürelerde (5-30 dk ve 1-6 sa) bekletilerek en uygun derişim ve zaman değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, malzemelerin pH'ı distile suyunki ile aynı oluncaya kadar distile su ile yıkama yapılarak malzemeler 2 gün boyunca kurumaya

bırakılmıştır. Modifiye edilen greft malzemeleri, çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle karakterize edilmiştir.



Şekil 3.4. Yüzey modifikasyon uygulamasının şematik gösterimi.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üç-boyutlu (3B) ve iki-boyutlu (2B) nanofibröz greftlerin morfolojileri SEM (Quanta 400F Field Emission, FEI, ABD) ile görüntülenmiştir. ImageJ (NIH, ABD) programı yardımıyla fiberlerin çap dağılımları, SEM görüntüleri kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

HAp nanopartiküllerinin fiberler içerisindeki dağılımı geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM, FEI, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Üç-boyutlu nanofibröz greftlerin ve HAp partiküllerin ısısal karakteristik özellikleri EXSTAR 6000 TG/DTA 6300 (SII Nanotechnology Inc., Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler, azot atmosferinde 25°C'den 600°C'ye kadar 10°C.dk⁻¹ ısıtma hızıyla ısıtılmıştır. Elde edilen termogramlardan, kütle kayıpları ve ısısal özellikler tespit edilmiştir.

3.4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Üç-boyutlu nanofibröz greftlerin ısısal karakteristikleri Diamond DSC (Perkin Elmer, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Azot atmosferinde ve 10°C.dk⁻¹ ısıtma hızıyla PLLA ve PLLA kompozit greftler 0-200°C arasında ısıtılarak analiz gerçekleştirilmiştir. DSC grafiğindeki

erime entalpilerinden, Eşitlik 3.1'e göre biyomalzemelerin % kristalinite değerleri hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Kristalinite } (X_c) = (\Delta H_m / \Delta H_0) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Bu eşitlikte ΔH_m örneklere ait erime entalpisini ve ΔH_0 ise her bir örneğin %100 kristalin haldeki erime entalpisini ifade etmektedir. Literatürde %100 kristaliniteye sahip PLLA için verilen değer 93 J/g'dır [118].

3.4.5. Çekme Testi

Üretilen nanofibröz greftlerin mekanik özellikleri çekme testiyle belirlenmiştir. Çekme testlerinde, düzgün geometride örneklerle analiz gerçekleştirilebildiğinden malzemeler için benzer nanofiber çaplarında ve aynı PLLA-HAp kütle oranında olacak şekilde 2B matrisler üretilmiştir. Bu matrisler düz bir metal elektroegirme toplayıcısı üzerinde yaklaşık 3 saat süreyle toplanmıştır.

3.4.6. Su Temas Açısı Ölçümleri

Yüzey modifikasyonunun HAp içeren ve içermeyen greft malzemelerin ıslatılabilirlik özelliklerine etkisi 3B elektroegirme ile aynı koşullarda üretilmiş 2B nanofiber biyomalzemeler üzerine yaklaşık 5 μL distile su damlatılarak temas açısı ölçüm cihazıyla (Krüss DSA 100, Almanya) belirlenmiştir.

3.4.7. Fourier Transform Kızılötesi (ATR-FTIR) Analizi

Üç-boyutlu nanofibröz greftlerin kimyasal yapıları, HAp partiküllerin greftlere katılımları ve yüzey modifikasyonu ile oluşan fonksiyonel grupların etkisi Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi (Thermo Scientific, MA, ABD) ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında belirlenmiştir.

3.4.8. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Greft gruplarının su tutma kapasitesini belirlemek için yapılan çalışmalar, 1×10^{-5} g/mL oranında sodyum azid içeren 25 mL fosfat tamponu (PBS) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ağırlığı 10 mg olacak şekilde kesilen örnekler, sodyum azidli PBS çözeltisi içeren 15 mL'lik santrifüj tüplerine koyulup ve örnekler 37°C'de karıştırılmalı ortamda 28 gün boyunca bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında, örnekler PBS'ten çıkarılıp, filtre kağıdı ile fazla

PBS uzaklaştırılarak analitik terazide tartılmış ve ardından tekrar aynı ortama konulmuştur. Bu işlem örneklerin su tutma kapasitesi dengeye ulaşmaya kadar sürdürülmüştür. Ölçülen yaş ağırlık değerleri ve örneklerin başlangıçtaki kuru ağırlığı, Eşitlik 3.2’de yerlerine konularak “Su Tutma Kapasitesi (%)” bulunmuştur.

$$\text{Su Tutma Kapasitesi} = (\text{Yaş Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Kuru Ağırlık} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

3.4.9. *In Vitro* Biyobozunurluk Çalışması

Üretilen 3B nanofibröz greftlerin *in vitro* biyobozunurluk çalışmaları, 10 µg/mL lizozim içeren 10 mL PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ağırlığı 10 mg olacak şekilde kesilmiş örnekler, lizozimli PBS çözeltisi içeren 15 mL’lik santrifüj tüplerine koyulmuş ve örnekler 37°C’de karıştırmalı ortamda bekletilmiştir. Bozunurluk ortamı haftada bir yenisiyle değiştirilmiş ve örneklerin ağırlıkları 58 gün boyunca takip edilmiştir. Her hafta sonunda örnekler tüplerden alınmıştır ve liyofilizasyon (Christ, Almanya) sonrası ağırlıkları not edilmiştir. Kuru örnekler tartılmış ve doku iskelelerinin kütleli değişimleri (%) Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

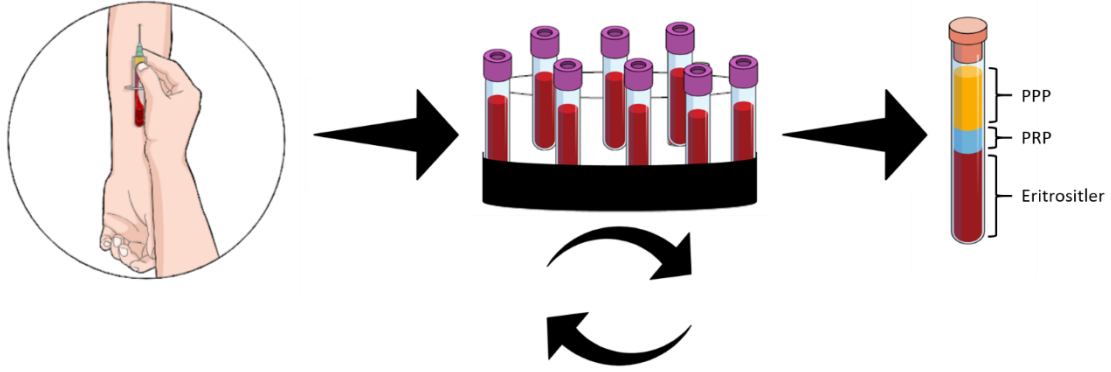
$$\text{Kütlece Değişim} = (W_t/W_0) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

Bu eşitlikte W_t herhangi bir t anındaki doku iskelesinin kütleli, W_0 doku iskelesinin başlangıç kütleli göstermektedir.

3.5. PRP Uygulaması

3.5.1. PRP İzolasyonu ve Aktivasyonu

Yirmi beş yaşlarında “Aydınlatılmış Onam Formunu” okuyan, sağlıklı erkek gönüllü kişilerin onayının alınmasından sonra Beytepe Gün Hastanesi’nde görevli sağlık personelleri tarafından kan alınmıştır. Alınan kan örneği laminar kabin içerisinde, PRP izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Kan örneklerinin antikoagülan içeren tüplere alındıktan sonraki santrifüj işlemi ve sonuç olarak tüpün orta kısmında elde edilen PRP.

Yöntem kısaca şu şekildedir: içerisinde pıhtılaşmayı önleyici ajan bulunan vakumlu flebetomi tüpüne 10 mL kan çekilmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Kan örneği, 1,500 g'de 8 dk çöktürülerek üç katman elde edilmiştir [119]. Bunlar, kırmızı kan hücrelerinin yer aldığı en alttaki katman; bu katmanın üzerinde yer alan ince beyaz renkteki katman (buffy coat); beyaz kan hücreleri ve bunun üzerindeki açık sarı renkteki katman olarak sıralanır. PRP, beyaz kan hücreleri katmanının hemen üzerindeki ve açık sarı renkteki katmanın ise en altındaki kısımdır. PRP, enjektör ucuna takılan uzun iğne yardımıyla beyaz katmanın üzerinde gezdirilerek dikkatlice alınmıştır.

Daha sonra % 10 CaCl₂ çözeltisi 2:5, 3:4, 4:3 PRP:CaCl₂ (v/v) olmak üzere farklı oranlarda PRP ile karıştırılıp 1 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve büyüme faktörlerinin salımında etkili olan fibrin polimerizasyonu (jelleşme) gözlenerek optimum CaCl₂ oranı belirlenmiştir.

3.5.2. Hemogram Testi

Gönüllü bireylerden alınan kandaki ve kanın santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla elde edilen PRP'deki trombosit sayısı hemogram testiyle (Sysmex, XN-1000, Almanya) belirlenmiştir.

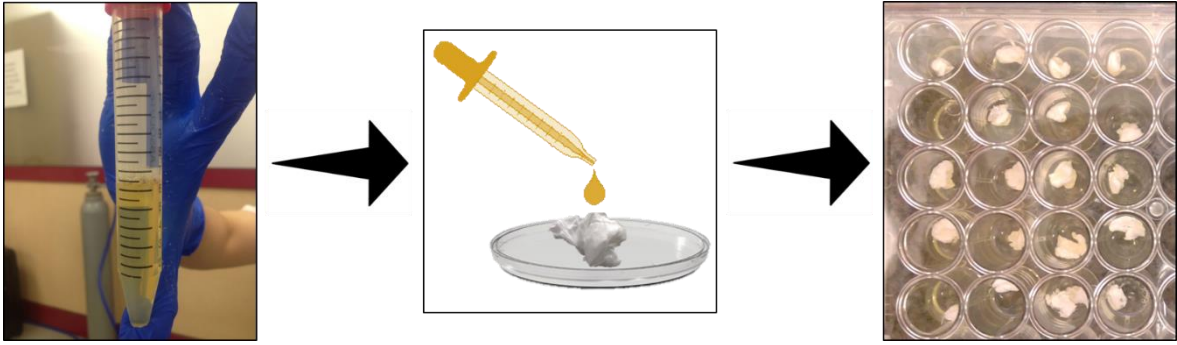
3.5.3. Akış Sitometrisi (Flow Cytometry)

Trombosit aktivasyonunu belirlemek için CD41-PC5 ve CD61-PC7 (GP IIb/IIIa) ve CD62P-PE (P-Selektin) monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Analiz tüplerine PRP veya aktive edilmiş PRP örneklerinden 100 µL ve üzerine 10 µL monoklonal antikorlar eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk inkübe edilmiştir. Ardından, örnekler 1,200 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Boyanmış örnekler yıkama solüsyonu ile seyreltilmiş ve akış sitometrisi

(Beckman Coulter Navious EX, ABD) ile analiz edilmiştir. Sonuçlar monoklonal antikor pozitif trombosit yüzdesi olarak Kaluza programıyla (Beckman Coulter, ABD) belirlenmiştir.

3.5.4. PRP'nin Greftlere Yüklenmesi

Üç-boyutlu nanofibröz greft malzemelerine, CaCl_2 ile karıştırılmış PRP çözeltisi mikropipetler ile damlatılarak emdirilmiştir. Greftlerin sıvı tutma kapasitesini belirlemek için 3 farklı miktarda (200 μL , 250 μL , 300 μL) PRP çözeltisi, 48-gözlü kültür kabı içinde greft malzemelerine yüklenmiş ve ardından 1 saat süreyle 37°C 'de inkübe edilmiştir (Şekil 3.6.). İnkübasyonun sonunda kültür kabındaki gözlerde kalan çözelti, pipetle çekilerek malzemelerin ne kadar sıvı tuttuğu belirlenmiş ve optimum hacim not edilmiştir.



Şekil 3.6. Aktivasyonu gerçekleştirilen PRP'nin doku iskelelerine yüklenmesi.

3.5.5. Trombositlerin Görüntülenmesi

Trombositler, SEM (Tescan, GAIA, Çek Cumhuriyeti) ile görüntülenmiştir. Bu amaçla, öncelikle PRP yüklenmiş 3B nanofibröz greft malzemeleri, % 2.5 gluteraldehit ile 15 dk fikse edilmiş ve ardından 3 kere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, örnekler 1 gece -20°C 'de bekletilmiş ve liyofilizatörde (Christ, Almanya) 2 gün kurumaya bırakılmıştır. Örnekler altın-paladyum tabakası ile kaplanarak incelenmiştir.

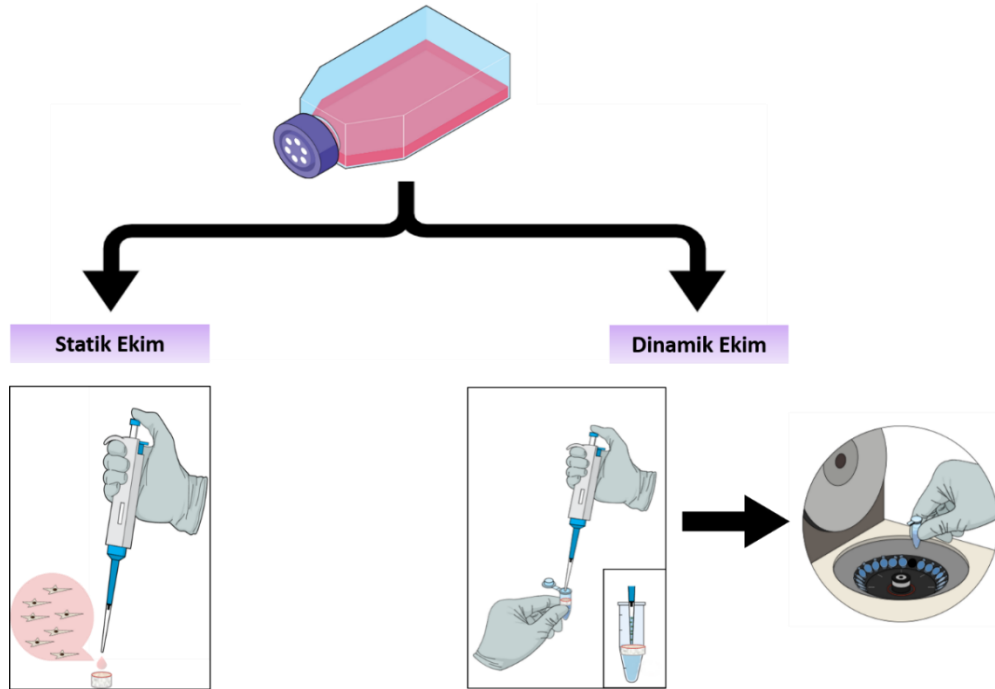
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, laminar akışlı kabinde (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet, İtalya) gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri kullanılmıştır. Fare kalvaryum dokusundan elde edilen bu hücreler yüzeye bağımlı olup monolayer kültürlerde çoğalmaktadır. Hücreler hacimce (v/v), % 10 FBS ve % 1 antibiyotik çözeltisi içeren (penisilin-streptomisin) α -MEM besi ortamı ile kültür kaplarında (Corning,

ABD) ve 37°C'deki nemli CO₂ atmosferinde (Panasonic Instruments, Japonya) çoğaltılmış ve ardından greftler üzerine ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Dinamik ve Statik Hücre Ekimi

Ağırlığı 10 mg olacak şekilde kesilmiş örneklerin gama radyasyonu ile sterilizasyonu, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu - Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi Tesisleri'nde gerçekleştirilmiştir. Uygun bir şekilde paketlenen örnekler, Kobalt-60 radyasyon kaynağı ile 2.5 MRad doz hızında sterillemiştir. Steril fiber formda doku iskeleleri, Statik ve dinamik ekim gibi iki farklı yöntem uygulamak için PRP içeren ve içermeyen (kontrol) olmak üzere gruplandırılmıştır (Şekil 3.7). Hücre ekimi öncesinde her bir doku iskelesi bir gece şartlandırma ortamında (α -MEM içerisinde %10 v/v FBS, 2 mM glutamin ve %1 v/v penisilin-streptomisin) bekletilerek serum içerisinde bulunan proteinlerin malzeme yüzeylerinde adsorplanması sağlanmıştır. Ardından, vakum yardımıyla iskelelerdeki ortam tamamen uzaklaştırılmış ve her bir iskele, CaCl₂ ile karıştırılmış PRP içerisinde 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 3.7. Statik ve dinamik hücre ekiminin şematik gösterimi.

Statik ekimde, MC3T3-E1 hücreleri (pasaj 17), her bir greft malzemesinde 100,000 hücre olacak şekilde normal büyüme ortamında (α -MEM içerisinde %10 v/v FBS, 2 mM glutamin

ve %1 v/v penisilin-streptomisin) süspanse edilmiştir. Hücreler 50 µL büyüme ortamıyla doku iskelelerine ekilmiş ve her bir iskeleye saat başı 50 µL ortam eklenerek doku iskelelerinin kuruması engellenmiştir. Üç saatin sonunda 24-gözlü kültür kaplarına 1 mL büyüme ortamı eklenerek hücre ekimi tamamlanmıştır. Haftada 2 kez ortam değişimi yapılarak hücre kültürü 21 gün boyunca devam ettirilmiştir.

Dinamik ekim, her bir greft malzemesi steril Eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilerek Zhang vd. [120]'nin izledikleri protokole göre gerçekleştirilmiştir. Greftlerin her birine 100,000 hücre 50 µL'de süspanse edilerek ekilmiş ve hücrelerin tutunmasını desteklemek için 1 dakika arayla 500 rpm 2dk santrifüj döngüsü 3 kere tekrar edilmiştir. Statik ekime benzer olarak greftler 24-gözlü kültür kaplarına alınmış doku iskelelerinin kurumasını engellemek için her bir iskeleye saat başı 50 µL ortam eklenmiştir. Üç saatin sonunda 1 mL büyüme ortamı eklenerek hücre ekimi tamamlanmıştır. Haftada 2 kez ortam değişimi yapılarak hücre kültürü 14 gün boyunca devam ettirilmiştir. Ana çalışmada tercih edilecek ekim yöntemi 1., 7. ve 14. günlerde gerçekleştirilen proliferasyon testi sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Ekim yönteminin belirlenmesinin ardından MC3T3-E1 hücreleri her bir greft malzemesinde 400,000 hücre olacak şekilde normal büyüme ortamında süspanse edilmiştir. Hücreler 10 µL büyüme ortamıyla doku iskelelerine ekilmiş ve her bir iskeleye saat başı 10 µL ortam eklenerek doku iskelelerinin kuruması engellenmiştir. Üç saatin sonunda 24-gözlü kültür kaplarına 1 mL büyüme ortamının eklenmesinin ardından hücre ekimi tamamlanmıştır. Ekimin 2. gününün ardından osteojenik farklılaşma ortamına (50 µg/mL askorbik asit ve 10 mM β-gliserol fosfat içeren α-MEM) geçilmiş, haftada 2 kez ortam değişimi yapılarak hücre kültürü 21 gün boyunca devam ettirilmiştir.

3.6.2. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Ekim yönteminin ve PRP'nin hücrelere olan etkisini incelemek için doku iskeleleri üzerinde çoğalan fare preosteoblast MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri, kültür süresinin farklı zamanlarında, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu analiz için doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılarak her bir örnek yeni bir 24-gözlü kültür kabına alınmıştır. Ardından, kültür kabının her bir gözüne 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve hücreler 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, hücreler

üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir göze 400 µL izopropanol eklenmiştir. Elde edilen çözeltinin optik yoğunluğu, 650 nm referans olmak üzere 570 nm dalga boyunda mikropılaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) vasıtasıyla belirlenmiştir.

3.6.3. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi

Greft malzemeleri içerisindeki hücrelerin morfolojisi ve iskelet organizasyonu, 7. ve 21. günlerde konfokal mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ile görüntülenmiştir. İlk olarak, greftler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve greftler yeni bir 24-gözlü kaba alınmıştır. Ardından, greftler 3 defa PBS ile yıkanarak %4'lik paraformaldehit ile 4°C'de 15 dk. fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından, greft malzemeleri PBS ile 3 kere tekrar yıkanmış ve hücrelerin geçirgenliğini arttırmak için %0.1'lik Triton X-100 ile 5 dk muamele edilmiştir. Hücre filamentöz aktinleri, 400 µL Alexa Fluor 488 Phalloidin ile 20 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve ardından %1 (w/v) BSA çözeltisi ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Hücre çekirdeği ise 500 µL propidyum iyodür ile 5 dk inkübe edilmiş ve aynı şekilde BSA ile yıkanarak görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

3.6.4.1. Alkalın Fosfataz (ALP) Aktivitesi

Osteojenik farklılaşmanın erken dönem belirteçlerinden biri olan alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin tayini ile MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşması belirlenmiştir. Belirlenen günlerde doku iskelelerindeki ortam uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri analiz gününe kadar -80°C'de bekletilmiştir. Örnekler liyofilizatörde kurutulmuş ve bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Örnekler 250 µL Triton X-100 çözeltisi (%0.1'lik (v/v) çözelti, ultrasaf su içinde) içerisinde 30 dk boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve daha sonra 10 dk boyunca 4°C'de, 12,000 rpm hızda santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Triton X-100 lizatından 50 µL alınarak üzerlerine 100 µL ALP çözeltisi (1 mM MgCl₂ ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat sıvı substrat sistemi) eklenmiştir. Otuz dk, 25°C'de inkübasyondan sonra her bir örneğe 50 µL 2 M NaOH çözeltisi eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Mikroplate okuyucu ile 405 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans ölçülmüştür. Kontrol amacıyla her bir örnekten alınan 50 µL lizata, 50 µL 2 M NaOH çözeltisi eklenmiş ve sonrasında bu çözeltilere 100 µL ALP sıvı substrat sistemi eklenerek ölçüm yapılan örneklerle beraber aynı koşullarda inkübe

edilmiştir. Örneklerden elde edilen absorbanlar, kontrol örnek absorbanlarından çıkarılmış ve kalibrasyon grafiğinden p-nitrofenol miktarı belirlenmiştir.

3.6.4.2. Gen Ekspresyonu Analizleri

Moleküler düzeyde osteojenik farklılaşma incelemeleri, 7., 14. ve 21. günlerde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşma, alkalın fosfataz (ALP), osteokalsin (OCN) ve tip I kolajen (COLL I) gen ifadeleri ile incelenmiş ve β -Aktin kontrol geni olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Hedef genin bağıl ifadesi, β -Aktin genine göre normalize edilmiş ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Kemiğe özgü genlerin analizinde, her bir örnek grubu için PRP içermeyen greft malzemesinin 7. gün değerleri kontrol olarak alınmış ve tüm değerler kontrol grubunun matematiksel katları olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. RT-PCR analizi için kullanılan primer dizileri.

β-Aktin	Forward: 5'-GTG CTA TGT TGC CCT AGA CTT CG-3' Reverse: 5'-GAT GCC ACA GGA TTC CAT ACC C-3'
ALP	Forward: 5'-GGA GAT GGT ATG GGC GTC TC-3' Reverse: 5'-GGA CCT GAG CGT TGG TGT TA-3'
COLL I	Forward: 5'-CAA GAT GTG CCA CTC TGA CT-3' Reverse: 5'-TCT GAC CTG TCT CCA TGT TG-3'
OCN	Forward: 5'-CTT TCT GCT CAC TCT GCTG-3' Reverse: 5'-TAT TGC CCT CCT GCT TGG-3'

Örnekler mikromakas vasıtasıyla parçalanmış ve örnekler 200 μ L Trizol eklenmiştir. RNA izolasyonu RNEasy kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Reverse transkripsiyon basamağı ise yüksek kapasiteli cDNA Reverse Transkripsiyon kiti ile SimpliAmp™ programlanabilir termal kontrol cihazında (Life Technologies, ABD) gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için termal kontrol cihazındaki sıcaklık profilleri; 25°C'de 10 dk., 37°C'de 120 dk., 85°C'de 5 dk. ve PCR yapılmaya kadar 4°C'dedir. RT-PCR analizi, 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus kullanılarak kit protokolüne göre LightCycler® NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yürütülmüştür. Yirmi μ L'lik her bir reaksiyon karışımı EvaGreen'i, QuantiTect RT Mix'i, RNase içermeyen suyu, forward- ve reverse-spesifik primerleri ve hücrelerden izole edilen RNA'ları içermektedir. PCR'in ilk aktivasyon basamağı 95°C'de 12 dk'da, çoğalma basamağı 95°C'de 15 s'de, primerlerin ortamda bulunan hedef DNA bileşeni ile birleşip, ayrılma basamağı 60°C'de 20 s'de ve uzatma basamağı ise 72°C'de 20 s'de gerçekleştirilmiştir.

3.7. *In Vivo* Hayvan Deneyleri

3.7.1. Deney Modeli ve Çalışma Grupları

Tez çalışması kapsamında 24 adet, 200-250 g ağırlığında erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, her bir grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanların kalvariyumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında yuvarlak şekilde biparietal kemik defektleri oluşturulmuştur. Oluşturulan defektler birbirinden bağımsız iyileştiği ve tedavi sürecine de birbirinden bağımsız olarak yanıt verdiği için her bir sıçandan 2 örnek elde edilmiştir. Erken ve geç dönemlerde kemikleşmeyi karşılaştırılmak için erken kemikleşmeye ait doku örnekleri 8. ve geç kemikleşmeye ait olan doku örnekleri ise 20. haftanın sonunda alınmıştır.

Birinci grup, kontrol grubu (n=6): Bu grupta, herhangi bir tedavi edici uygulama olmaksızın işlem tamamlanmıştır (şam grubu).

İkinci grup, otogreft (n=6): Bu grupta, defekte sıçanın kafatasından alınan kemik tozlarının implante edilmiştir (altın standart).

Üçüncü grup, boş greft malzemesi grubu (PLLA-HAp) (n=6): Bu grupta, defekte herhangi bir kimyasal veya biyolojik ajanın yüklü olmadığı 5 mm çap ve 3 mm kalınlığında boş PLLA-HAp kompozit greft malzemesi implante edilmiştir.

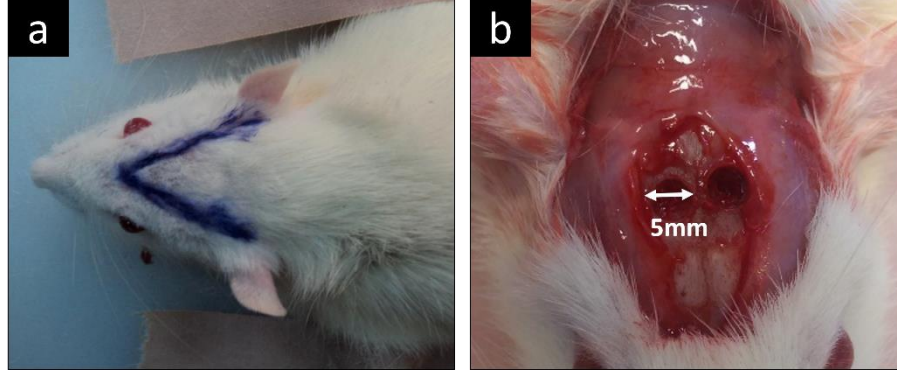
Dördüncü grup, PRP yüklenmiş greft malzemesi (PRP+PLLA-HAp) (n=6): Bu grupta, PRP yüklü greft malzemesi 5 mm çapında ve 3 mm kalınlığındaki defekte implante edilmiştir.

3.7.2. Anestezi

Sıçanların genel anestezisinde intraperitoneal olarak gerçekleştirilerek anestezi için ketamin hidroklorür 87.5 mg/kg ve ksilazin hidroklorür 12.5 mg/kg kullanılmıştır. Anestezi etkinliği, cilt veya parmak kıstırma testine ekstremitelere çekme yanıtı ile değerlendirilmiştir. Deney sırasında, sıçanın idrar veya dışkı çıkarması ya da uyanması halinde anestezinin devamlılığını sağlamak için 10 mg/kg ketamin ve 2 mg/kg ksilazin ek doz olarak verilmiştir.

3.7.3. Cerrahi İşlem

Cerrahi alan, gerekli asepsi-antisepsi prosedürlerine uygun olarak steril örtü ile örtülmüş, kafatası ve çevresi Batikon ile temizlenmiştir. Dorsal V şeklinde bir insizyonla periost da dahil edilecek şekilde skalp flebi kaldırılarak kemik ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.8a). Saggittal sütür hattına göre simetrik olacak şekilde sağ ve sol parietal kemikler üzerinde dental burr vasıtasıyla 5 mm çapta kemik defektleri oluşturulmuştur (Şekil 3.8b).



Şekil 3.8. Tez çalışması kapsamında a) skalpte yapılan V insizyon [121] ve b) 5 mm çapta kraniyal defekt.

Cerrahi işlem sırasında, %0.9 (v/v) serum fizyolojik çözeltisi ile sürekli irrigasyon uygulanarak duranın ve venöz sinusün travmatize olmamasına dikkat edilmiştir. Kaldırılan skalp flebi kemik defektlerini örtecek şekilde yerine iade edilmiş ve cilt insizyonu 4-0 ipek sütür materyali ile yapılmıştır.

3.7.4. Cerrahi Sonrası İzlem

Cerrahi operasyon sonrası ortaya çıkabilecek ağrıları önlemek için sıçanların içme sularına 2 mg/mL parasetamol eklenmiştir. Hayvanlar deney süreci boyunca ad libitum olarak standart yem ile beslenmiş ve genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden günlük olarak değerlendirilmiştir.

3.7.5. Ötenazi

Sekizinci ve 20. haftaların sonunda yüksek doz anestetik ile deneyde kullanılan hayvanlara ötenazi işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7.6. Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Görüntülemesi

Bilgisayarlı tomografi (mikro-CT) görüntülemesi için sakrifiye edilen hayvanlardan alınan kranial kemikler %10 fosfat formalin içeren çözelti içine bırakılarak oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Mikro-CT öncesi örnekler, hızla sertleşen bir macun vasıtasıyla buldukları kaplara sabitlenmiş, böylelikle tarama süresince hareket etmemeleri sağlanmıştır. Elde edilen kemik dokularının mikro-CT yöntemiyle taranma işlemi Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜNİTEK) gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri Skyscan (Bruker) marka 1272 model X-ışınları tomografisi ile görüntülenmiş ve ham X-ışınları tomografisi verileri NRecon (Skyscan) yazılımı ile yeniden oluşturulmuştur. Yeniden oluşturulan kesitler CTVox ve CTAn (Skyscan) yazılımları ile analiz edilmişlerdir. Bu kesitlerde kemikte açılan defekt kadar bir alan (region of interest-ROI) oluşturulmuş ve yeni oluşan kemik yüzdesi kemik hacmi/defekt hacmi (BV/TV) oranı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, Graphpad Prism 6 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Veriler, ortalama \pm standart sapma değerleri ile birlikte 3 bağımsız tekrar yapılarak sunulmuştur. Gruplar arası kıyaslama için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), grup içi kıyaslama da ise t-test kullanılmıştır. En düşük $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

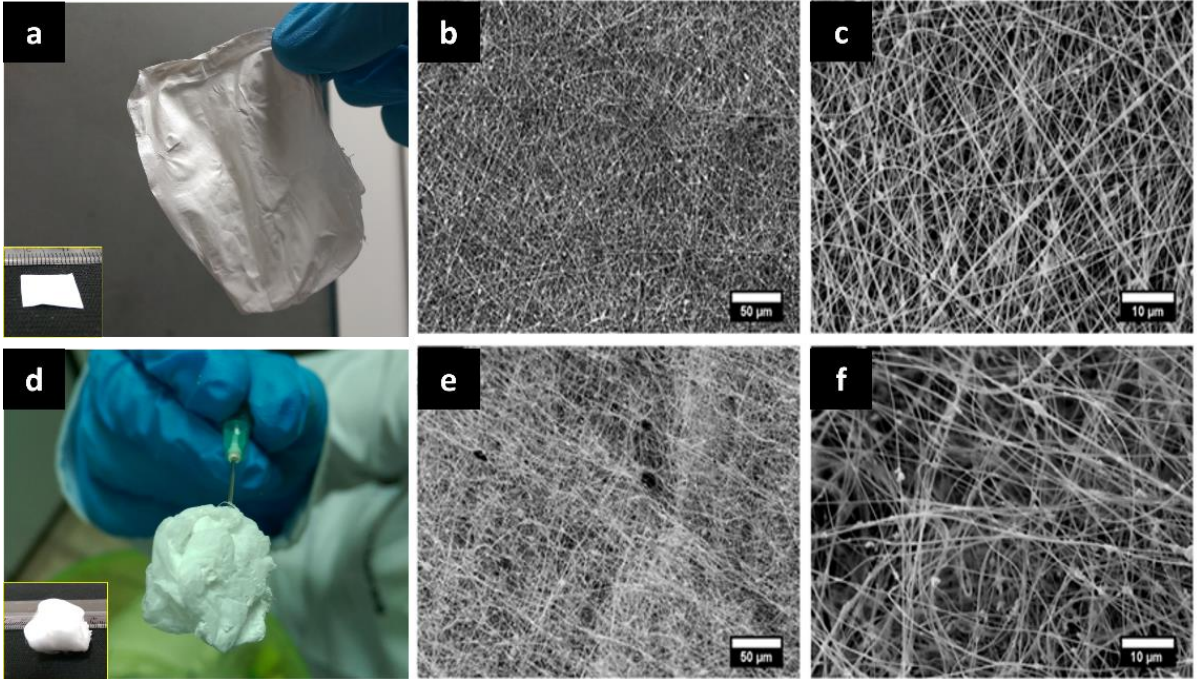
Sunulan tez çalışması, 4 temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar; (1) 3B kompozit fiber greftlerin üretimi ve üretilen biyomalzemelerin çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle karakterizasyonu; (2) biyomalzemelere yüklenmesi hedeflenen uygun PRP miktarının ve aktivasyon yönteminin belirlenmesi; kemik rejenerasyonunda biyomalzemelerin etkisini göstermek için yürütülen (3) *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve (4) *in vivo* hayvan deneyleridir. Bu amaçla, öncelikle biyomalzemelerin elektroğirme yöntemiyle 3B üretimi literatürle karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Sonrasında, farklı süre ve derişimlerde NaOH modifikasyonu ile daha hidrofilik yapıda ve morfolojisini koruyan biyomalzemelerin başarıyla üretildiği, karakterizasyon çalışmalarıyla gösterilmiştir. PRP ile biyoaktivitesi artırılan greft malzemelerinin, fare preosteoblast hücreleri (MC3T3-E1) kullanılarak yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve 24 adet Wistar Albino Sıçan kullanılarak gerçekleştirilen *in vivo* hayvan deneyleri ile kemik doku rejenerasyonu için umut verici sonuçlar gösterdiği desteklenmiştir.

4.1. Üç-Boyutlu Kompozit Fiber Greftlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışması kapsamında, geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere hasarlı bölgenin şeklini kolaylıkla alabilen, 3B sıkıştırılabilir formda ve PRP ile biyoaktivitesi artırılmış kemik greftlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Kemik matrisi incelendiğinde, ana protein yapının doğal bir polimer olan kolajenden ve kolajen fibrillerin arasında bulunan nanopartikül yapıdaki HAp seramiğinden oluştuğu görülmektedir. Ancak, sert biyoaktif seramiklerin klinikte kullanımı, kırılabilirlik ve kolayca şekillendirilememe gibi özellikleri nedeniyle kısıtlıdır. Tez kapsamında bu amaçla, kemiğin inorganik kısmına benzer HAp seramiği, kemik organik matrisine benzer FDA onaylı PLLA polimeri ile beraber kullanılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada literatürden farklı olarak grubumuz tarafından geliştirilen biyomimetik yöntemle kemik benzeri amorf HAp üretilmiş ve kullanılmıştır [44]. Bu yöntemde kütlece % 9.22 karbonat içeriğine ve 1.61 Ca/P oranına sahip amorf yapıda, kemik B-tipi benzeri HAp nanopartikülleri üretilmektedir [44] ve bu sebeplerle tez çalışması kapsamında kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca greftlerin üretiminde klasik elektroğirme yönteminden farklı olarak 3B elektroğirme yönteminin kullanılması da çalışmanın diğer özgün noktalarından biridir.

Öncelikle, PLLA pelletleri, %8 derişimde (w/v) HFIP içerisinde bir gece çözülmüş ve sonrasında bu çözeltiye polimere göre kütlece % 40 HAp katılarak elde edilen % 29 HAp (w/w) içerikli homojen dağılımlı süspansiyon, 3B elektroğirme işlemi için bir şırıngaya transfer edilmiştir. Elektroğirme için en uygun üretim koşulları; uygulanan voltaj 14 kV, çözelti akışı hızı 1.4 mL/saat ve şırınga ucu toplayıcı uzaklığı 15 cm olarak belirlenmiştir [2].

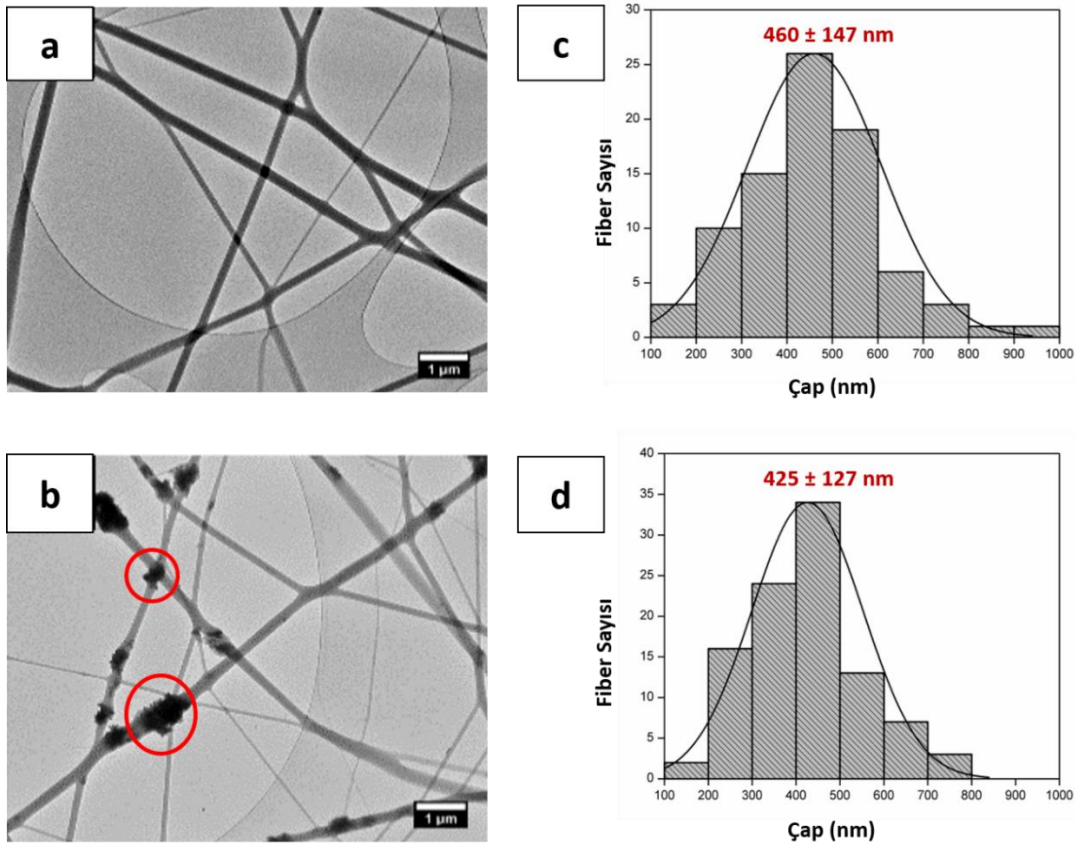
PLLA nanofiber greftlerinin gözenek büyüklükleri, aynı elektroğirme koşullarıyla düz bir levha üzerine toplanmış 2-boyutlu PLLA nanofiber membranlar ile karşılaştırılmıştır. İki- ve üç-boyutlu PLLA içerikli nanofiber greftlere ait SEM görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1b ve c, HAp içeren 2-boyutlu PLLA doku iskelelerinin düşük ve yüksek büyütmedeki SEM görüntülerini vermektedir. Şekil 4.1e ve f ise aynı oranda HAp içeren 3-boyutlu PLLA doku iskelelerinin SEM görüntülerine aittir. Üretilen PLLA-HAp greftlerinin SEM görüntüleri, ImageJ programına aktarılarak nanofiberlerin ortalama çap ve çap dağılımları hesaplanmıştır. PLLA ve PLLA-HAp nanofiber gruplarının ortalama çap ve çap dağılımları, sırasıyla 460 ± 147 ve 425 ± 127 nm olarak hesaplanmıştır. Nanofiber çap ve çap dağılımlarının benzer olması, yapıya HAp eklenmesinin, polimer çözeltisinin fiziksel özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.1. Aynı koşullarda üretilen ve HAp içeren a), b), c) 2B PLLA ve d), e), f) 3B PLLA greftlerin makroskobik ve farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

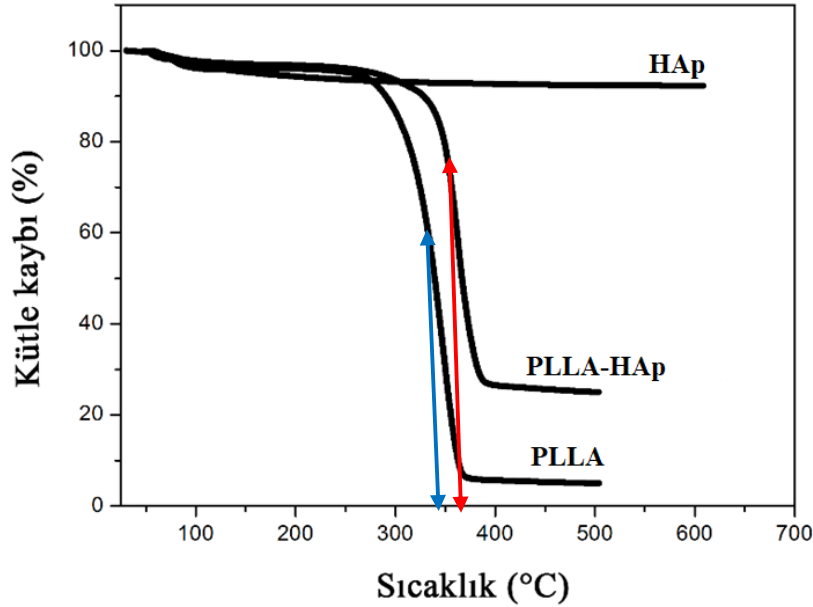
Doku iskelesi tasarımında gözenek boyutu, gözeneklilik ve gözeneklerin birbiriyle bağlantılı olması hücrel aktiviter için önemli özelliklerdir [122]. İdeal bir doku iskelesinin 100–400 μm aralığında gözenek boyutuna sahip olması gerektiği düşünülse de yapılan çalışmalar ile 5-15 μm gözenek boyutunun fibroblast hücrelerinin çoğalmasını ve neovaskülarizasyonu, 40-350 μm gibi daha büyük gözeneklerin ise osteoid proliferasyonunu ve kemik rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [122, 123]. SEM görüntülerinin Image J programına aktarılmasıyla 2-boyutlu doku iskelelerindeki gözenek büyüklükleri 2-10 μm , 3-boyutlu biyomalzemelerdeki gözenekler ise 30-50 μm olarak hesaplanmıştır. Bu da 3-boyutlu üretimle, çok daha büyük gözenek çaplarında nanofiber doku iskeleleri elde edilebildiğini göstermiştir.

Hidroksiapatit partiküllerinin PLLA nanofiberler içerisindeki dağılımı TEM görüntüleriyle de incelenmiştir (Şekil 4.2). Görüntülerde, SEM verilerini destekler nitelikte HAp'ın bölgesel topaklanmalara sebep olarak fiberlerin yapısına katıldığı görülmüştür.



Şekil 4.2. Üç-boyutlu nanofiber greftlere ait TEM görüntüleri ve fiber çap dağılımlarını gösteren histogramlar a), c) PLLA ve b), d) PLLA-HAp.

PLLA yavaş bozunan bir polimerdir ve Şekil 4.3'te verilen termograma göre, PLLA tek basamaklı bir süreçle bozunmaktadır. PLLA doku iskeleleri, 275°C'de bozunmaya başlamış ve maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklık 350°C olarak bulunmuştur. HAp 600°C'e kadar neredeyse hiç bozunmamış ve termal olarak kararlı kalmıştır. PLLA-HAp kompozit doku iskeleleri ise 300°C'de bozunmaya başlamış ve bozunmanın maksimum hızla gerçekleştiği sıcaklığın 364°C olduğu görülmüştür. Böylelikle, yapıya HAp'ın katılmasıyla PLLA'nın termal özelliklerinin iyileştiği sonucuna ulaşılmıştır. Iqbal vd. [124], kolajen/aljinat/HAp'ı farklı oranlarda kullanarak elde edilen malzemenin mekanik ve antibakteriyel testler ile kemik dolgu maddesi olarak kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Yapıya %40, %50, %60 ve %70 oranlarında HAp katılmış ve TGA sonuçları ile % 70 HAp içeren malzemenin, daha yüksek sıcaklıkta bozunduğu ve kütle kaybının diğer gruplardan daha az olduğu görülmüştür. Bu durum, HAp varlığında malzemelerin termal özelliklerinin artmasının literatürle uyumlu olduğunu desteklemektedir.

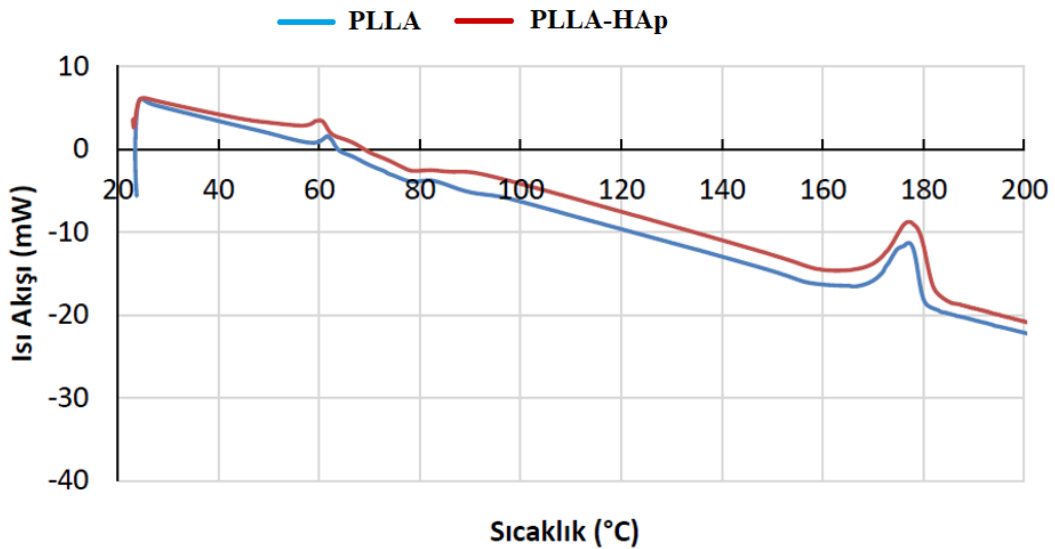


Şekil 4.3. HAp ve PLLA greftlerinin TGA termogramı (Mavi ok PLLA'nın, kırmızı ok ise PLLA-HAp greftlerinin maksimum bozunma gerçekleştirdiği sıcaklıkları göstermektedir).

Laktik asit kiral bir moleküldür ve L- ve D- laktik asit olmak üzere doğada optik olarak iki aktif formda bulunur. Bu monomerlerin polimerizasyonu ile yarı-kristalin polimerler elde edilir. Tez kapsamında kullanılan PLLA, ~%37 kristaliniteye sahip bir polimerdir ve

kristalinite derecesi molekül ağırlığına ve işleme yöntemine göre değişebilmektedir [36]. Literatür verilerine göre PLLA'nın camsı geçiş sıcaklığı 60-65°C aralığındadır, erime sıcaklığı ise ~175°C'dir [36]. Tez kapsamında hazırlanan PLLA ve PLLA-HAp fiber doku iskelelerine ait DSC termogramları Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Her iki malzeme için de 61.6 ve 60.3°C'lerde görülen pikler PLLA'nın camsı geçiş sıcaklığını göstermektedir. PLLA ve PLLA-HAp için erime entalpileri sırasıyla 33.6 ve 43.6 J/g bulunmuş ve bunlara karşılık gelen % kristalinite değerleri %36 ve %47 olarak hesaplanmıştır. Buradan yola çıkarak, PLLA'nın yapısına HAp katılmasıyla kompozit malzemenin % kristalinitesinin arttığı görülmüştür.

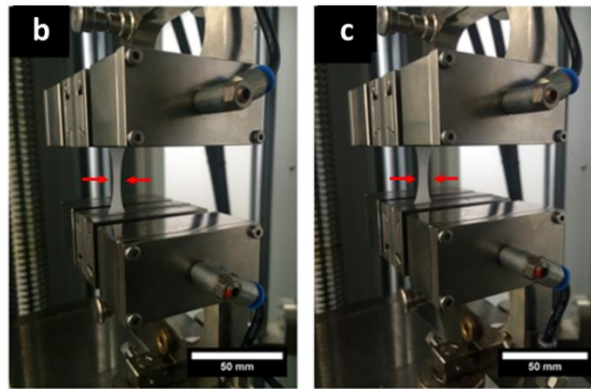
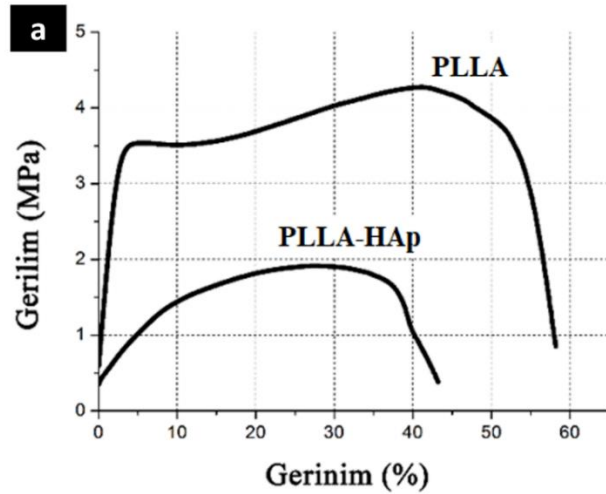
Bir çalışmada, HAp ile desteklenmiş poli (eter-eter-ke-ton) (PEEK) kompozitlerinin yük taşıyan kemikler için implant malzemesi olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Geliştirilen malzemelerin kristalinitesi yoğunluk analizi ve DSC ile incelenmiştir ve DSC sonuçlarına göre, HAp miktarıyla kristalinitenin %26.8'den %30.6'ya arttığı görülmüştür [125]. Bir başka çalışmada ise HAp partikülleri kütle oranı (polimer/HAp) 98/2 ve 80/20 aralığında olacak şekilde PLLA ile kullanılarak kompozit yapılar elde edilmiştir. HAp miktarıyla beraber, erime sıcaklığı, entalpisi ve kristalinite artarken camsı geçiş sıcaklığının düştüğü görülmüştür [126]. Dolayısıyla, PLLA-HAp greftlerine ait termal analiz sonuçları literatürle uyumludur.



Şekil 4.4. PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait DSC termogramı.

PLLA doku iskelelerine ait tipik gerilim-gerinim eğrisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Çekme testlerinde analiz düzgün geometride örneklerle gerçekleştirilebildiğinden analiz için benzer

nanofiber çaplarında ve aynı PLLA-HAp kütle oranında olacak şekilde 2B matrisler üretilmiştir. PLLA doku iskeleleri için elastik modülü 80.4 ± 24.2 MPa, kopma noktasındaki maksimum dayanım 4.25 ± 0.80 MPa ve % uzama 43 ± 12 olarak bulunmuşken bu değer PLLA kompozit doku iskeleleri için sırasıyla 15.9 ± 3.5 MPa, 1.7 ± 0.3 MPa ve % 22.0 ± 5.0 olarak hesaplanmıştır. Yapıya HAp'ın eklenmesiyle PLLA'nın elastik modülü yaklaşık 5 kat, kopma noktasındaki maksimum güç yaklaşık 2.5 kat azalmıştır. Kemik dokusunun inorganik ve kırılabilir bir bileşeni olan HAp seramiğinin aşırı miktarı, tahmin edildiği gibi kompozit yapının elastikliğini değiştirerek yapıyı daha kırılabilir hale getirmiş ve mekanik özelliklerini azaltmıştır. Ancak makroskobik incelemelerde ve *in vivo* çalışmalarda geliştirilen greft malzemesinin geometrisi düzgün olmayan kemik hasarında bölgenin şeklini rahatlıkla alabildiği ve yeterince esnek olduğu ve sıkıştırılabilir formunu koruduğu görülmüştür.



Şekil 4.5. a) PLLA ve PLLA kompozit doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrisi ve b) PLLA ve c) PLLA kompozit doku iskelelerinin kopma öncesi uzama oranlarını gösteren kamera görüntüleri (n=3).

Elde edilen tüm bu sonuçlar PLLA ve PLLA-HAp doku iskeleleri için karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerine ait termal ve mekanik özellikler.

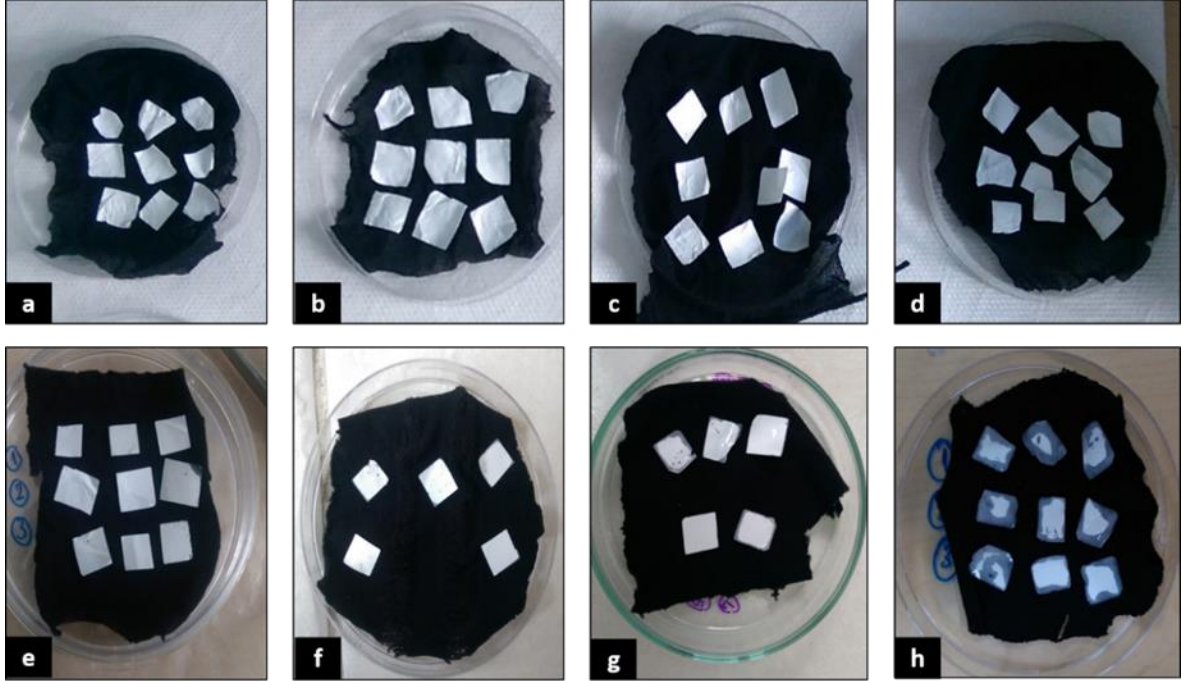
	PLLA	PLLA-HAp
Ortalama çap (nm)	460 ± 147	425 ± 127
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	61.6	60.3
Erime entalpisi (J/g)	33.6	43.6
Kristanilite (%)	36	47
Elastik modül (MPa)	80.4 ± 24.2	15.9 ± 3.5
Maksimum dayanım (MPa)	4.25 ± 0.80	1.7 ± 0.3
Uzama (%)	43.0 ± 12.0	22.0 ± 5.0

4.1.2. Nanofiber Yüzeylerin Modifikasyonu

Hücre sel yapışma ve çoğalma, biyomalzemenin topografisiyle ilişkilendirilmektedir. PLLA FDA onaylı ve doku mühendisliği uygulamalarında başarılı sonuçlar veren bir polimer olsa da hidrofobik yapısı nedeniyle proteinlerin, dolayısıyla da hücrelerin doku iskelelerine rahatça tutunup çoğalmasını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için ultraviyole (UV) ışınması ile serbest radikalleri ortaya çıkaran yüzey aşırı polimerizasyonu, hava, argon vb. gazlar yardımıyla gerçekleştirilen plazma işlemi ve kimyasal ajanlarla ıslak aşındırma yöntemi gibi çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir [5].

Su temas açısı analizi düzgün geometrideki örneklerle gerçekleştirilebildiğinden, yüzey modifikasyonunun HAp içeren ve içermeyen greft malzemelerin ıslatılabilirlik özelliklerine etkisi 3B elektroçirime ile aynı koşullarda üretilmiş 2B nanofiber biyomalzemeler ile incelenmiştir. İki-boyutlu elektroçirime ile üretilen doku iskelelerinin su temas açısı ölçümleri PLLA ve PLLA-HAp için sırasıyla 131.5±2.3° ve 128.2±3.1° olarak bulunmuştur. HAp’ın yapıya katılmasının hidrofilitede anlamlı bir fark yaratmadığı ve iki grubun da hidrofobik olduğu görülerek modifikasyon işlemleri PLLA doku iskeleleri üzerinden gerçekleştirilmiş, sonrasında, belirlenen uygun koşullar PLLA-HAp grubuna uygulanmıştır. İki saat süreyle 2 boyutlu olarak üretilen PLLA doku iskeleleri NaOH muamelesi için kullanılmıştır. Doku iskeleleri yaklaşık 1 x 1 cm² alana sahip olacak şekilde kesilmiş ve çalışmalar 3 paralel üzerinden gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonunda kullanılan PLLA örneklerinin kütleleri yaklaşık 10 mg olacak şekilde seçilmiştir. PLLA için örnekler 0.1, 0.2 ve 0.5 M NaOH çözeltisinde 1 saat bekletilmiş 0.5 M ve 0.2 M NaOH içerisindeki yapıların bozunmaya başladığı, 0.1 M’de ise herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Bu

sebeple uygun NaOH derişimi 0.1 M olarak belirlenmiş ve 5, 10, 15 ve 30 dakika ve 2, 4, 5 ve 6 saat süreleri denenerek su temas açısı ölçüm sonuçlarına göre uygun modifikasyon süresi belirlenmiştir (Şekil 4.6).

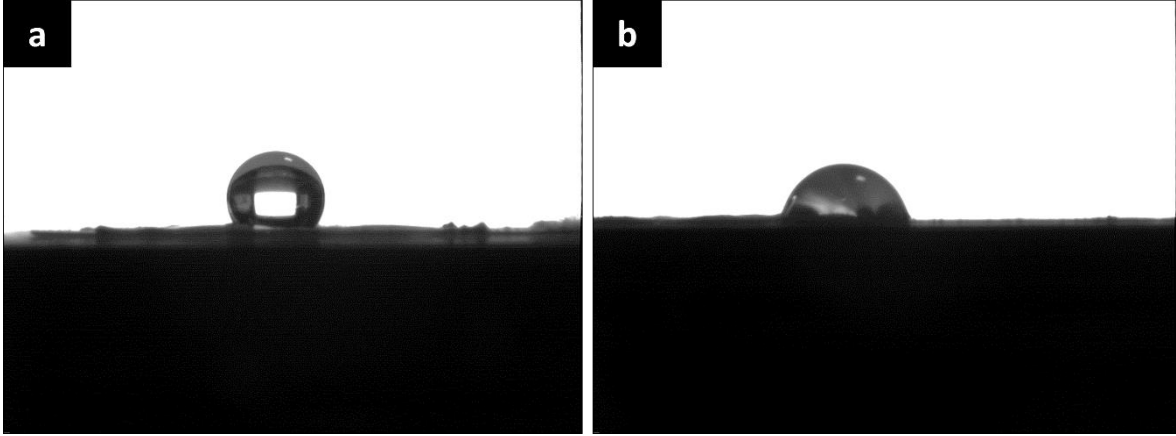


Şekil 4.6. Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş 2 boyutlu PLLA doku iskeleleri a) 5 dk, b) 10 dk, c) 15 dk, d) 30 dk ve e) 2 sa, f) 4 sa, g) 5 sa, h) 6 sa.

Çizelge 4.2’de NaOH modifikasyon süresinin artmasıyla su temas açısının azaldığı görülmüş ve bu sonuçlara paralel olarak modifikasyon için örneklerin 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde 6 saat bekletilmesine karar verilmiştir (Şekil 4.7). Literatürde yapılan bir çalışmada PLA doku iskelesinin farklı yöntemlerle modifiye edilmesinin su temas açısını 69-72° aralığında değiştirdiği ve hücre yapışmasını desteklediği görülmüştür [127]. Bir başka çalışmada ise PLGA doku iskelesinin 5 dk süreyle 0.1 M NaOH modifikasyonu sonucu su temas açısının 98 dereceye düştüğü ve hücre yapışmasının arttığı belirlenmiştir [128]. Su temas açısı ölçüm sonuçları literatürle kıyaslandığında, modifikasyon işleminin hücrelerin malzeme yüzeyine tutunup yapışmasını destekleyeceği düşünülmektedir.

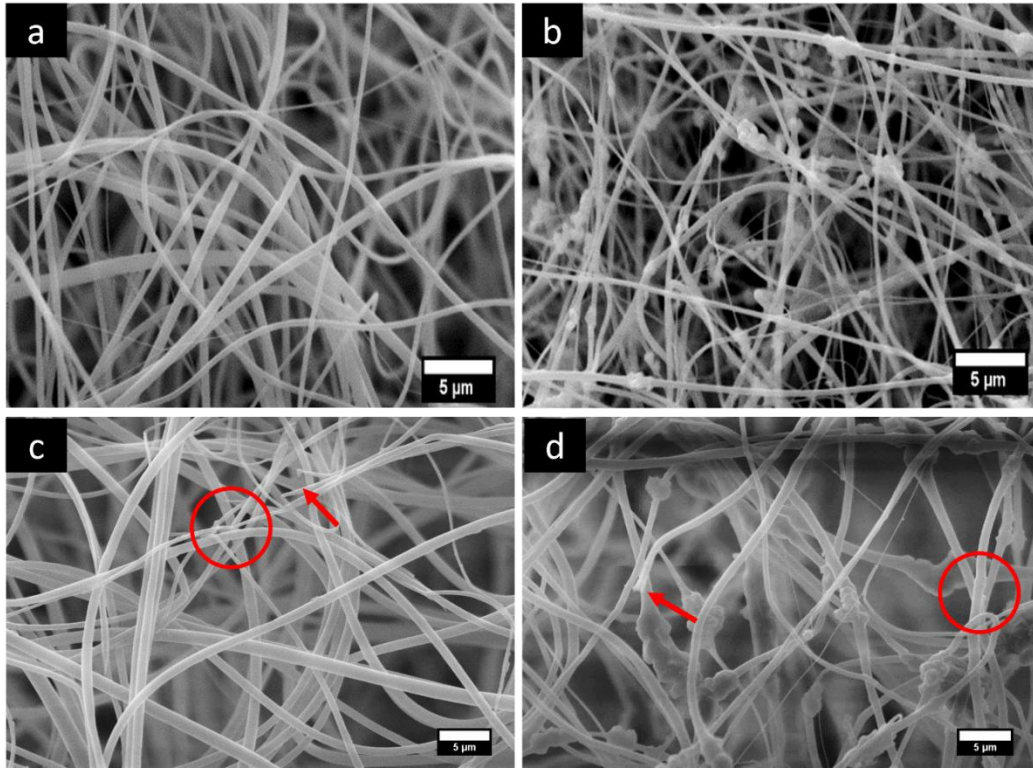
Çizelge 4.2. Farklı sürelerde 0.1 M NaOH çözeltisi içinde bekletilmiş 2 boyutlu PLLA doku iskelelerine ait su temas açısı değerleri.

5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	2 sa	4 sa	5 sa	6 sa
123.1±8.1	117.1±11.8	121.9±6	106.3±8.3	113.9±5.3	118.1±6.9	107.9±12.5	73.8±12.3



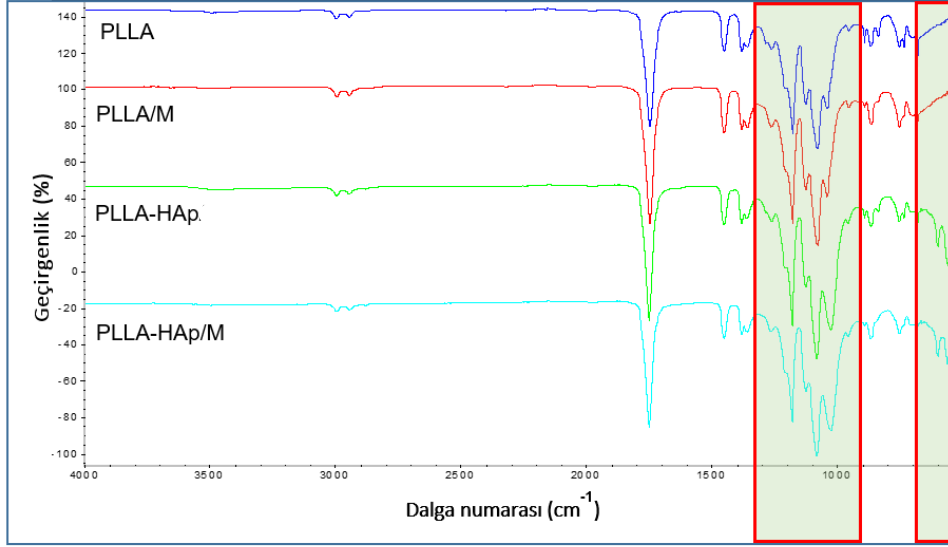
Şekil 4.7. İki-boyutlu PLLA doku iskelelerine ait su temas açısı görüntüleri a) modifikasyon öncesi, b) 0.1 M NaOH içerisinde 6 saat bekletilen grup.

Şekil 4.8’de verilen SEM görüntüsü, yüzey modifikasyonunun fiberlerin genel itibariyle morfolojisini koruyarak yapıyı bozmadığı ve başarılı bir şekilde uygulandığını göstermiştir. NaOH kullanımının, fiber yüzeylerde gözenek miktarının artmasına sebep olduğu ve NaOH derişimiyle hidroliz şiddetinin arttığı bilinmektedir [129]. Şekil 4.8c ve d’ye bakıldığında gözeneklerin modifikasyon uygulanmayan gruplara kıyasla daha büyük boyutta olduğu görülmektedir. Modifikasyon gruplarında gözenek boyutları yaklaşık $\sim 70 \mu\text{m}$ ’ye kadar ulaşmıştır. Literatürde gözenek boyutu $70\text{--}250 \mu\text{m}$ aralığında olduğu zaman kemik hücrelerinin büyümesinin desteklendiği gösterilmiş, buradan da çalışmada geliştirilen greft malzemelerin literatürle uyumlu olarak kemik doku rejenerasyonunu destekleyebileceği düşünülmüştür [130]. Ayrıca, alkalizasyonun yüzey topografisini değiştirdiği ve pürüzlülüğü arttırdığı bilinmektedir. Yoon vd. [131], pürüzsüz bir yüzeyin hücre yapışması için yeterli olmadığını göstermişlerdir. Şekil 4.8c ve d’de daire içine alınarak gösterilen bölgelerde fiber yüzeylerindeki pürüzlülüğün literatüre benzer şekilde arttığı görülmüştür.



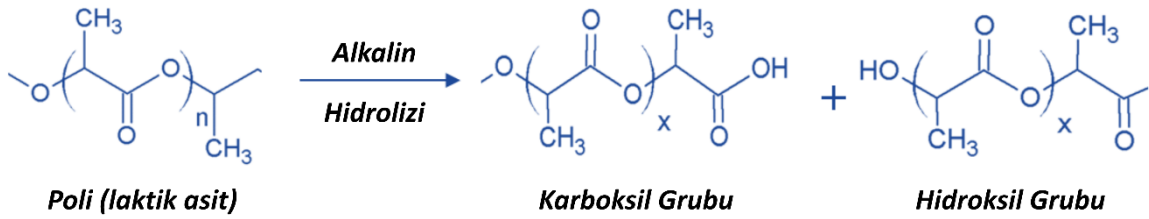
Şekil 4.8. Üç-boyutlu malzemelere ait SEM görüntüleri a) PLLA, b) PLLA-HAp, c) PLLA/M, d) PLLA-HAp/M (M: NaOH modifikasyonu). Oklar kopan fiberleri, daireler ise fiber yüzeyinde meydana gelen pürüzlülüğü göstermektedir.

Şekil 4.9’da HAp, PLLA ve PLLA kompozit doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, 1000-1500, 1700-1800 ve 2900-3000 cm^{-1} dalga boyu aralıklarında PLLA polimerine ait karakteristik pikler görülmektedir [132]. 1749, 1178, 1128 ve 1083 cm^{-1} ’de görülen pikler PLLA ana zincirindeki ester gruplarına ait karakteristik absorpsiyon bandlarına aittir [132]. HAp’ın yapıya katılmasıyla 558, 605 ve 1020 cm^{-1} ’de görülen yeni pikler fosfat gruplarının varlığını göstermektedir. ATR-FTIR sonuçlarıyla HAp’ın PLLA doku iskeleleri yapısına başarılı bir şekilde katıldığı görülmüştür.



Şekil 4.9. Malzemelere ait ATR-FTIR spektrumları (M: NaOH modifikasyonu).

Hidroliz reaksiyonu sonucunda, ester bağları karboksil ve hidroksil grupları oluşturmaktadır (Şekil 4.10) [77]. Modifikasyon sonrasında C=O bandının şiddetindeki azalma yapıdaki ester gruplarının karboksilik asit oluşumunu sağladığı ve yapının hidrofilitesinin arttığını göstermektedir [133]. PLLA ana zincirindeki ester gruplarına ait 1178, 1128 ve 1083 cm^{-1} 'de görülen piklerin şiddetindeki azalmalarla NaOH etkisi doğrulanmıştır. 1 M NaOH kullanılarak yapılan bir çalışmada PLLA fiberlerin FTIR spektrumunun 3200-3500 cm^{-1} aralığında değişim gözlenmiş ve bunun NaOH konsantrasyonuna bağlı olarak artan -OH- etkisi sonucunda olduğu düşünülmüştür [66]. Şekil 4.9'da bu şekilde anlamlı bir değişim görülmemiş, bu durumun düşük molaritede NaOH tercih edilmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 4.10. Hidroliz sonucu, PLA zincirlerindeki ester bağlarından yeni karboksil ve hidroksil uç gruplarının oluşumu ([134]'ten değiştirilerek).

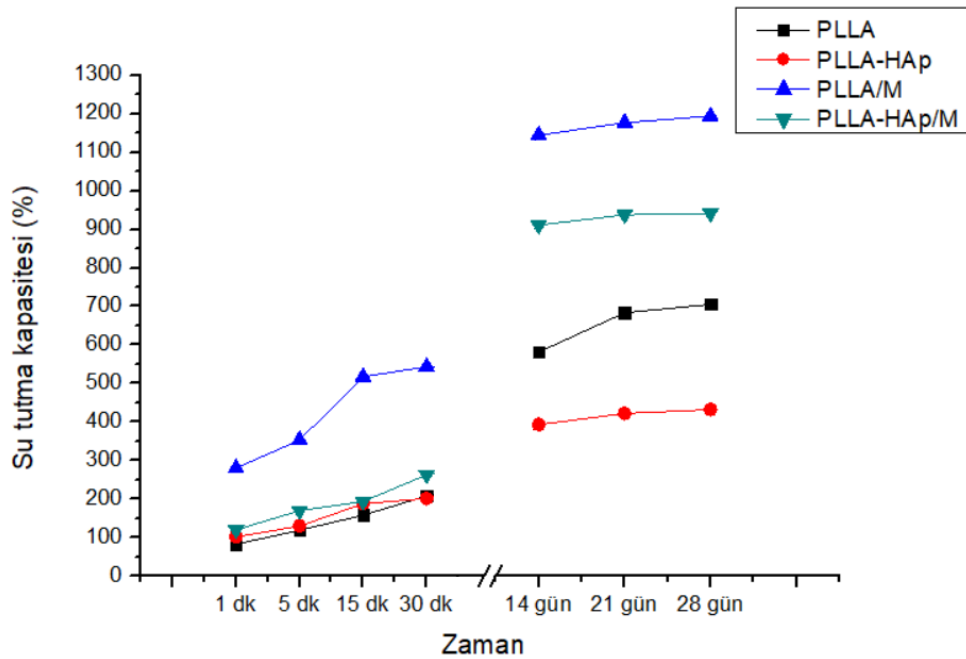
Çizelge 4.3'te NaOH modifikasyonu uygulanan ve uygulanmayan greft gruplarının özellikleri verilmiştir. Modifikasyonun, bozunma hızı ve su tutma yüzdesi gibi değerleri

önemli ölçüde değiştirdiği görülmüştür. Kemik ECM'si, temelde çapları 50-500 nm arasında değişen nanofiber formda, yapısıyla hücre davranışlarını kontrol eden kolajen proteininden oluşur ve kolajen nanofiberlerin arasına amorf formda HAp nanoparçacıklar yerleşmiştir [135]. PLLA içerikli farklı greft gruplarına ait sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiş ve bu sonuçlarla kemik ECM'sini taklit edebilen fiber yapıların üretildiği doğrulanmıştır.

Çizelge 4.3. NaOH modifikasyonu uygulanan ve uygulanmayan greft gruplarının karakteristik özellikleri.

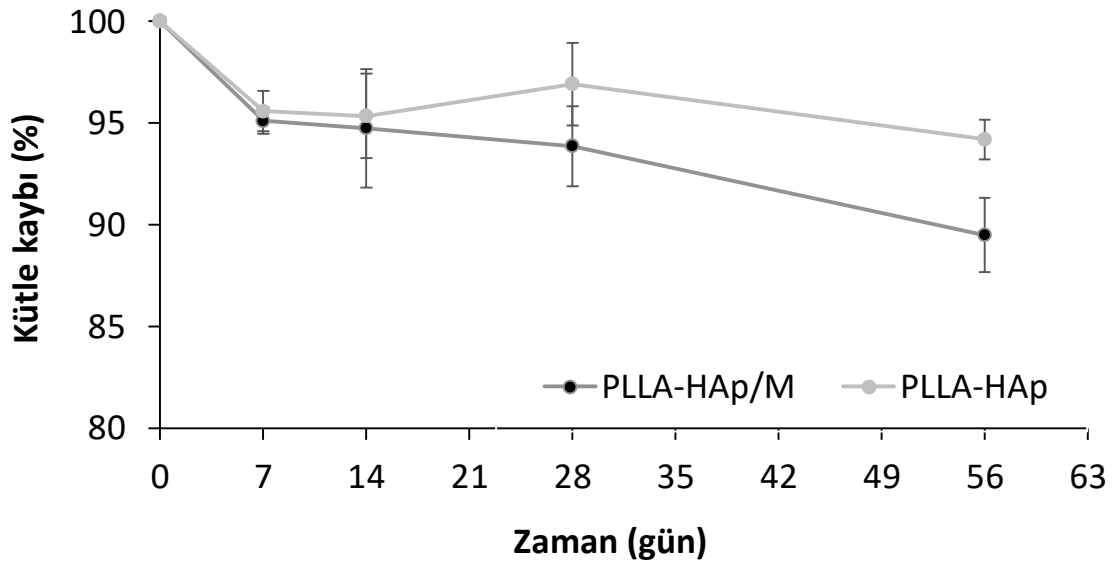
Malzemeler	Ortalama çap (nm)	Su temas açısı (°)	Kütlece bozunma (%)	Su tutma kapasitesi (%)
PLLA	460 ± 147	131.5 ± 3.3	3.0 ± 0.8	942 ± 325
PLLA/M	492 ± 196	73.8 ± 12.3	-	1194 ± 206
PLLA-HAp	425 ± 127	128.2 ± 2.5	5.0 ± 0.9	431 ± 188
PLLA-HAp/M	508 ± 102	84.2 ± 8.1	10.0 ± 0.8	705 ± 405

Şekil 4.11'de 28 gün boyunca 25 mL PBS içerisinde bekletilmiş doku iskelelerine ait su tutma kapasitesi grafiği verilmiştir. İlk 10 günde tüm grupların su tutma kapasitelerinde çok hızlı bir artış olmuş, sonrasında dengeye ulaşılmıştır. Yirmi sekiz gün sonunda yukarıdaki çizelgede verildiği üzere modifiye edilmiş doku iskelelerinin modifiye edilmemiş olanlara kıyasla su tutma kapasitesi değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler, alkali muamelesinin, iskelelerin hidrofilitelerini arttırdığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.11. Graft gruplarına ait 28 günlük su tutma kapasitesi grafiği (n=3).

PLA yarı kristalin ve hidrofobik bir polimerdir ve biyobozunurluğu *in vitro*'da 1-2 yıl arasında değişmekle birlikte yapılan bir çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip PLA'nın tamamen emiliminin *in vivo* süreçte 2 ile 6 yıl arasında gerçekleştiği rapor edilmiştir [36]. Çizelge 4.3'ten görüldüğü üzere 58 günlük bir biyobozunma sürecinde PLLA ve PLLA-HAp doku iskelelerindeki kütle kaybı yaklaşık %4-5 seviyelerinde gerçekleşirken, modifiye edilen PLLA-HAp/M gruplarında bu oran %10 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12). Modifiye grubunun 2 aylık süre sonunda %10 bozunmasıyla, orta dönemde iyileşmesi beklenen kemik hasarlarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.12. Kompozit greft gruplarına ait 58 günlük biyobozunma grafiği (n=3).

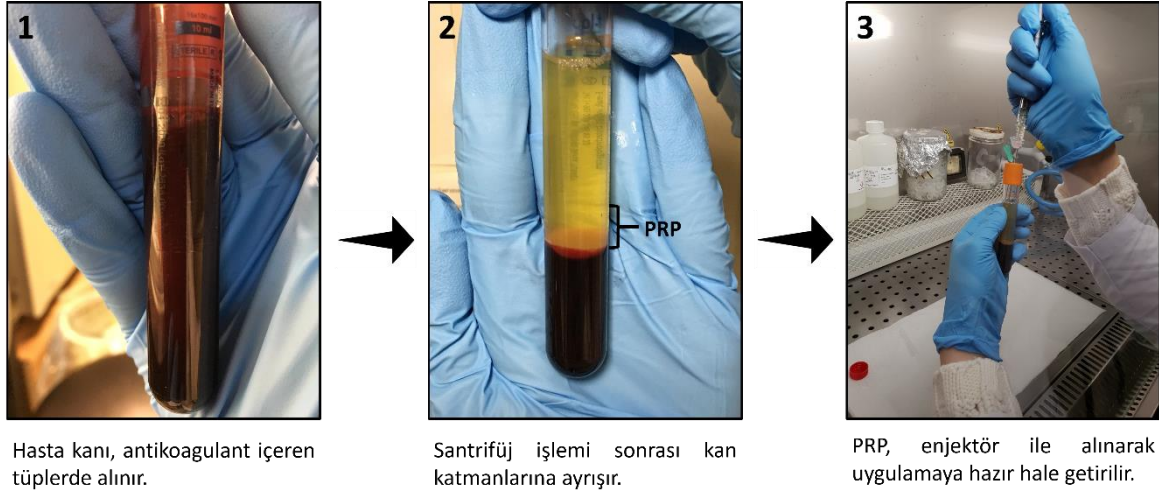
Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, PRP uygulaması ve diğer çalışmalar için uygun malzeme grubu olarak 0.1 M NaOH içerisinde 6 saat muamele edilen kompozit PLLA-HAp/M seçilmiştir.

Bundan sonraki başlıklarda, seçilen kompozit malzeme grubu PLLA-HAp olarak isimlendirilmiş, PRP destekli olan gruplar ise PRP+PLLA-HAp olarak ifade edilmiştir.

4.2. PRP Uygulaması

Kanın santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla PRP izolasyonu gerçekleştirilir. Tez çalışması kapsamında da sağlıklı bireylerden kan alınmış ve santrifüj işleminin ardından PRP başarı ile izole edilmiştir (Şekil 4.13). Büyüme ve farklılaşma faktörlerince zengin otojen trombosit konsantrasyonu (PRP), normal kandakinin 3 katı kadar yaklaşık (1,000,000/ μ L) trombosit

içermektedir [79, 80]. Gönüllü bireylerden alınan kandaki ve bu kandan elde edilen PRP'deki trombosit sayısı hemogram testiyle belirlenmiştir. Hazırlanan tüm PRP örneklerinde trombosit sayısının tam kana göre arttığı görülmüştür. Venöz kanda 200,000 trombosit/ μ L bulunurken, PRP'de yaklaşık 1,100,000 trombosit/ μ L olarak tespit edilmiştir. Normal kana kıyasla izole edilen PRP'de yaklaşık 5 kat daha fazla trombosit bulunması, bu verilerin literatürle uyumlu olduğu göstermektedir.

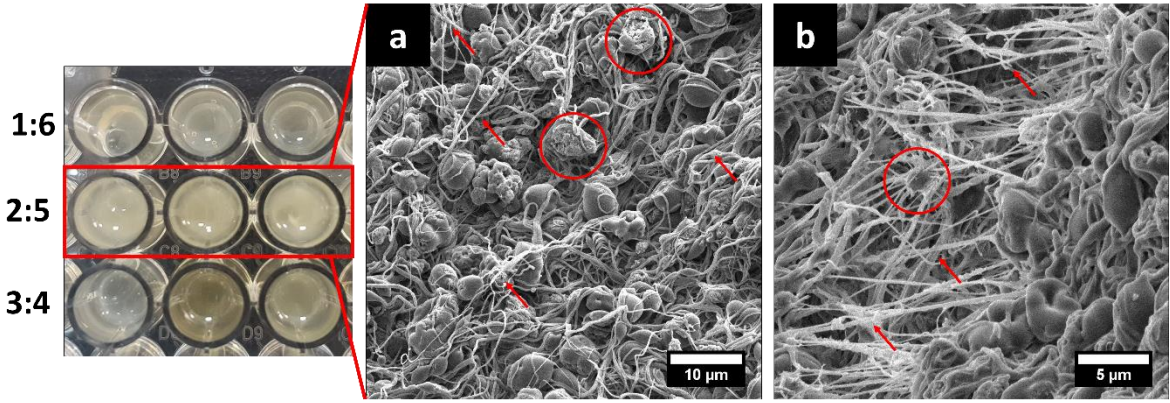


Şekil 4.13. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen PRP izolasyonunun şematik gösterimi.

Trombositlerin aktivasyonu ile birlikte platelet alfa granülleri içerisinde bulunan ve çeşitli dokuların büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol sahip polipeptit yapılı büyüme faktörlerinin (GF) salımı gerçekleşir [99]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda PRP içinde başta PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2 olmak üzere pek çok önemli büyüme faktörü bulunduğu ve IGF-1'in de periferik kandaki trombositlerde mevcut olduğu gösterilmiştir [100]. Büyüme faktörleri, hedef hücrelerin yüzey reseptörleriyle bağlantı kurarak hücre içi sinyalleşmeyi sağlar ve bunun sonucunda rejenerasyon için gerekli olan mRNA'nın ve proteinlerin transkripsiyonunu artırır [101]. Ayrıca, PRP ortopedik işlemlerde eklem içinde iyileştirme özelliğine sahiptir. Yapısında bulunan ve transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) ve plateletten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF) bağ dokusu onarımında ve kemik yenilenmesinde etkin rol oynar [6].

PRP'nin aktivasyonu endojen veya ekzojen yollarla gerçekleştirilebilmektedir. Süre açısından hızlı ve maliyet bakımından da uygun donma/çözme döngülerine bağlı endojen

yolla aktivasyon, trombositlerin tahribatı nedeniyle GF'lerin salımını etkilemektedir. Ekzojen yolla aktivasyonda ise trombin, kolajen ve kalsiyum klorür gibi ajanlar kullanılmaktadır. Ancak, kullanılan trombinin antikoagülant gibi davranması ve buna bağlı olarak da istenmeyen reaksiyonlara zemin hazırlayabilmesi sebebiyle tez çalışması kapsamında PRP aktivasyonu için %10 (w/v) CaCl_2 tercih edilmiştir (Şekil 4.14) [93, 95].

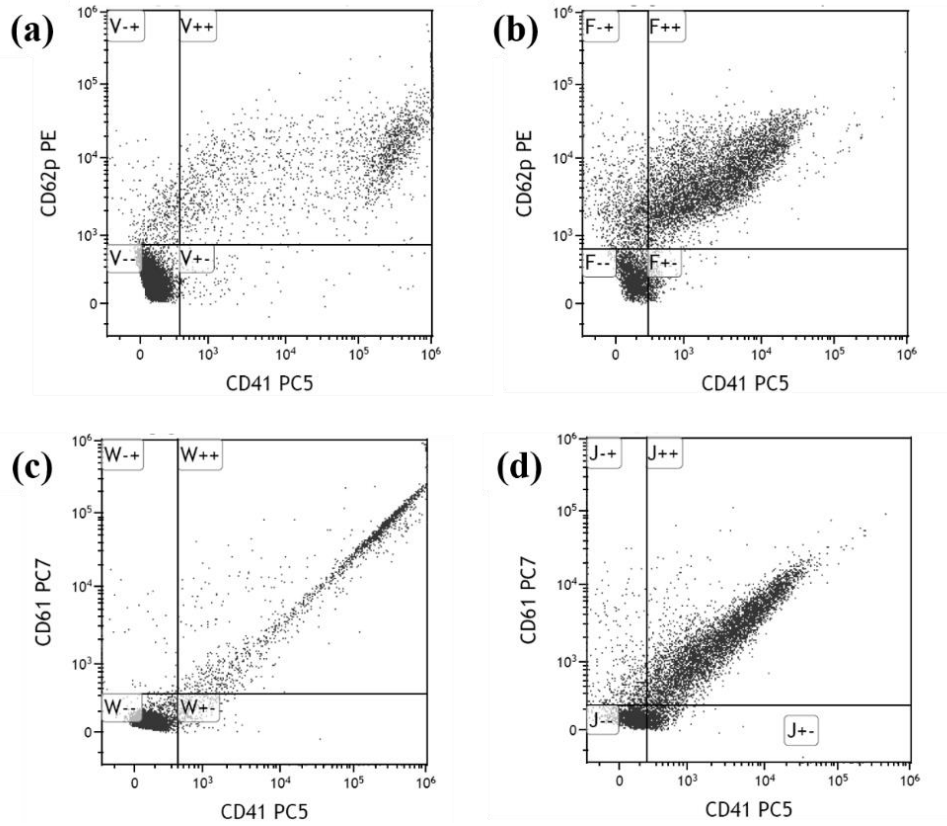


Şekil 4.14. PRP aktivasyonunun (fibrin polimerizasyonunun) makroskopik olarak görüntülenmesi (Sayılar, PRP:%10 CaCl_2 karışımının hacimsel olarak oranlarını göstermektedir). b, c) Farklı büyütmelelerdeki PRP+PLLA-HAp greftlerinin SEM görüntüleri. Kırmızı daireler trombositleri, oklar ise fibrin ağ yapısını göstermektedir.

PRP'nin, trombosit aktivasyonunu sağlayan kalsiyum ile muamelesinin fibrin ağ oluşumuna yol açtığı bilinmektedir [136]. Trombositlerin boyutları 2-4 µm olup Şekil 4.14'te gösterilen yapı büyüklükçe ve fibrin ağ yapısı bakımından literatürle uyumludur [137-139]. Trombositlerin dinlenme durumlarındaki küresel tipik morfolojide değil, aktivasyona yönelik oval morfolojide olduğu görülmüştür. Ayrıca ekzositik veziküllerin varlığı da aktivasyonu kanıtlamaktadır [140]. Şekil 4.14'te fibriller arasında hapsolmuş çoklu trombosit hücre elemanları da gözlenmiştir [140]. Buradan yola çıkarak malzeme yüzeyinin trombositlerle kaplandığı ve kalsiyum kaynağı olarak seçilen CaCl_2 ile aktivasyonun başarı ile gerçekleştiği görülmektedir.

Trombosit aktivasyonunun belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise akış sitometrisidir. Akış sitometrisi, granüllerin trombosit membranına yapışarak hücre yüzeyinde ortaya çıkan P-selektin (CD62) ve glikoprotein-IIb/IIIa (CD41/61) gibi proteinlerin fibrinojene bağlanması sonucu oluşturduğu yeni epitoplara antikor

kullanımıyla belirlenmesi ilkesine dayanır [141]. Aktivasyonun en önemli belirteçlerinden olan CD62 ve CD41/61 yüzdesi Şekil 4.15a ve c’de gösterilen PRP örneklerine (%15) kıyasla, Şekil 4.15d’deki CaCl₂ ile karıştırılmış PRP örneklerinde yaklaşık 4 kat (%60) fazla bulunmuştur. Kutlu vd. [102], PRP izolasyonu için üç farklı yöntem denemişler ve akış sitometrisi ile antikor yüzdelerini incelemiştir. Analiz sonuçlarında üç farklı yöntemde de CD62 antikor pozitif hücre değeri, tez çalışmasında aktifleşmemiş PRP için sunulan değerlere benzer şekilde bulunmuştur. Wenche vd. [142], trombosit aktivasyonu sonucunda oluşan topaklaşmayı (aglomerasyon-PAg) incelemek için aktivasyon belirteci olan CD62P ekspresyonunu ve lökositlerin içeriğini akış sitometrisi ile incelemiştir. Trombosit aktivasyonu için ise agonist olarak adenosin difosfat (ADP) ve kolajen kullanmışlardır. Akış sitometrisiyle elde edilen sonuçlar, aktifleşen serbest haldeki trombosit sayısının, ADP veya kolajen ile arttığını göstermiş ve bu da trombositlerin aktive olurken PAg oluşturmak için kolayca etkileşime girdikleri şeklinde yorumlanmıştır. Tez kapsamında elde edilen bu sonuçlarla, PRP aktivasyonunun başarılı bir şekilde literatürle uyumlu olarak gerçekleştiği ortaya konmuştur.



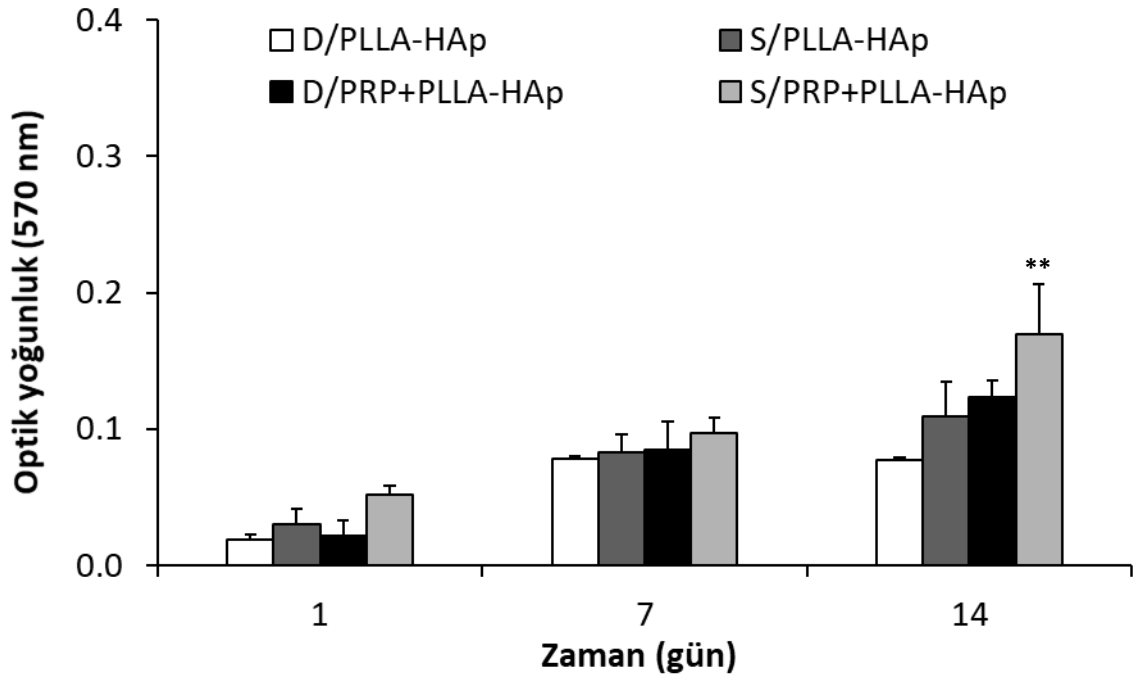
Şekil 4.15. PRP ve CaCl₂-PRP örneklerinin akış sitometrisi sonuçları a, c) PRP ve b, d) PRP:CaCl₂ karışımı (CD62: P-Selektin, CD41/61: Glikoprotein-IIb/IIIa).

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

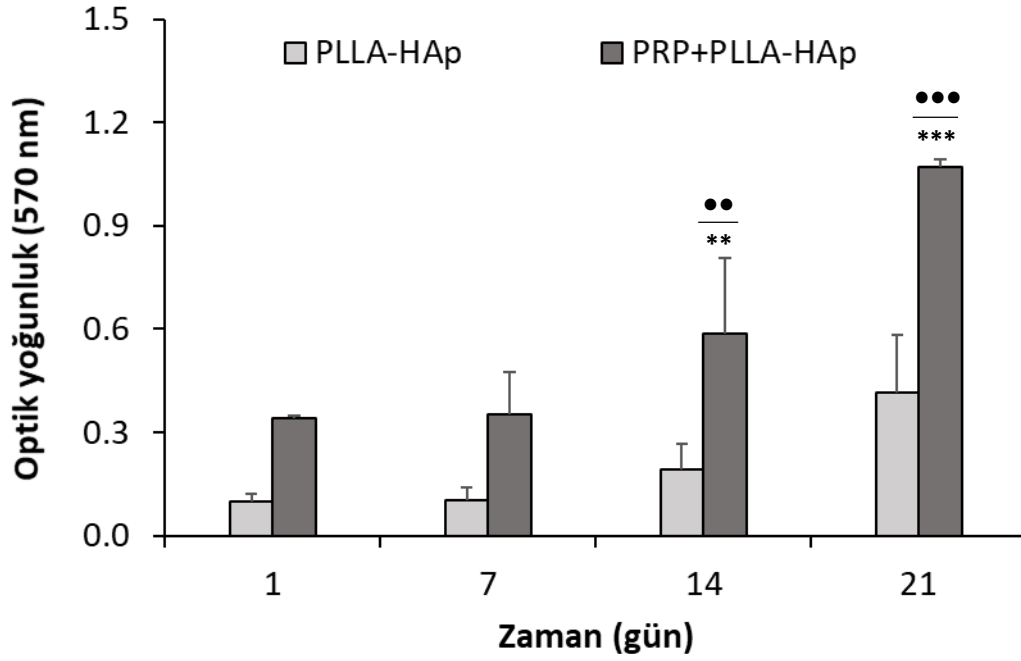
Doku iskelesine hücre ekimi doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki ayrı kategoride gerçekleştirilmektedir. Doğrudan ekim, Petri kabına yerleştirilen iskelenin merkezine küçük hacimdeki hücre süspansiyonunun enjekte edilmesi işlemidir ve bu yöntem genellikle düşük verimle sonuçlanır [120]. Dolaylı ekim yöntemlerinde ise dinamik bir ortam vasıtasıyla süspansiyon haldeki hücrelerin tutunması sağlanır. Hücrelerin iskele boyunca hareketini sağlayan döner kap (spinner flask) tekniğinde, statik ekime göre hücre tutunmasının daha etkili ve büyümenin daha hızlı olduğu görülse de çelişkiler hala devam etmektedir [120]. Daha da önemlisi, doku mühendisliği uygulamaları için birçok yöntem olsa da ideal teknik henüz belirlenmemiştir. Bu sebeple, hücre kültürü çalışmalarında öncelikle uygun ekim tekniğini belirlemek için statik ve dinamik ekim yöntemleri denenmiş ve uygun yönteme karar verildikten sonra ana çalışmaya geçilmiştir. Statik ekimde hücreler iskele üzerine mikropipetlerle ekilirken, dinamik ekimde steril Eppendorf tüpleri kullanılmış ve santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri içerisinde bulunan hücrelerin metabolik aktivitesi ve proliferasyonu MTT analizi ile takip edilmiştir.

Şekil 4.16'da ilk 7 gün boyunca tüm gruplar benzer absorban değerleri vermiştir. Ancak, 14. günün sonunda ise hücre proliferasyonunun tüm doku iskeleleri için belirgin hale geldiği görülmüştür. Kültür süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamasa da beklenenin aksine statik ekim gerçekleştirilen gruplarda hücre proliferasyonu daha yüksek bulunmuştur. Dinamik ekimde de hücre proliferasyonu kültür boyunca devam etmiş, ancak statik ekimdeki kadar hızlı gerçekleşmemiştir. Bunun sebebi 3 döngüde gerçekleştirilen 500 rpm santrifüj işleminin hücre tahribatına neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Dinamik ve statik ekim grupları kendi içinde PRP yüklü olan ve olmayan doku iskeleleri şeklinde karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da özellikle 14.günde PRP varlığının hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür.



Şekil 4.16. Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 1, 7 ve 14. günlerinde elde edilmiş PLLA-HAp içerikli doku iskelelerindeki MTT sonuçları (D: Dinamik, S: Statik ekim). İstatistiksel olarak anlamlı farklar, S/PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Gelecek çalışmalarda, santrifüj hızı ve süresi için optimizasyon yapılarak hücrelerin proliferasyonunun artırılacağı öngörülebilmektedir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak bundan sonraki *in vitro* çalışma için statik hücre ekimi tercih edilmiş ve hücre proliferasyonu 21 günlük MTT analizi sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.17). Yedinci günün sonunda, hücrelerde anlamlı bir metabolik aktivite artışı gözlemlenmemiş ve bu durum, hücrelerin buldukları ortama alışma fazının uzun sürmesiyle açıklanmıştır. On dördüncü gün sonunda PRP yüklü greftlerdeki hücrelerin absorbansı başlangıca göre yaklaşık 2 kat artmış, ancak diğer grupta absorbansın anlamlı olarak değişmediği ve adaptasyon süresinin devam ettiği görülmüştür (p<0.01). Yirmi bir günün sonunda ise PRP yüklü kompozit greft gruplarında absorbans değerinin 4 kat, diğer grupta ise 2 kat arttığı görülmüştür (p<0.001). Bu fark PRP'nin hücre proliferasyonunu desteklediğini ve hücrelerin metabolik aktivitesini arttırdığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, 14. ve 21. günler arasında hücre proliferasyonunun devam etmesi, PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp doku iskelelerinin, hücre yapışmasını ve proliferasyonunu desteklediğini göstermektedir.

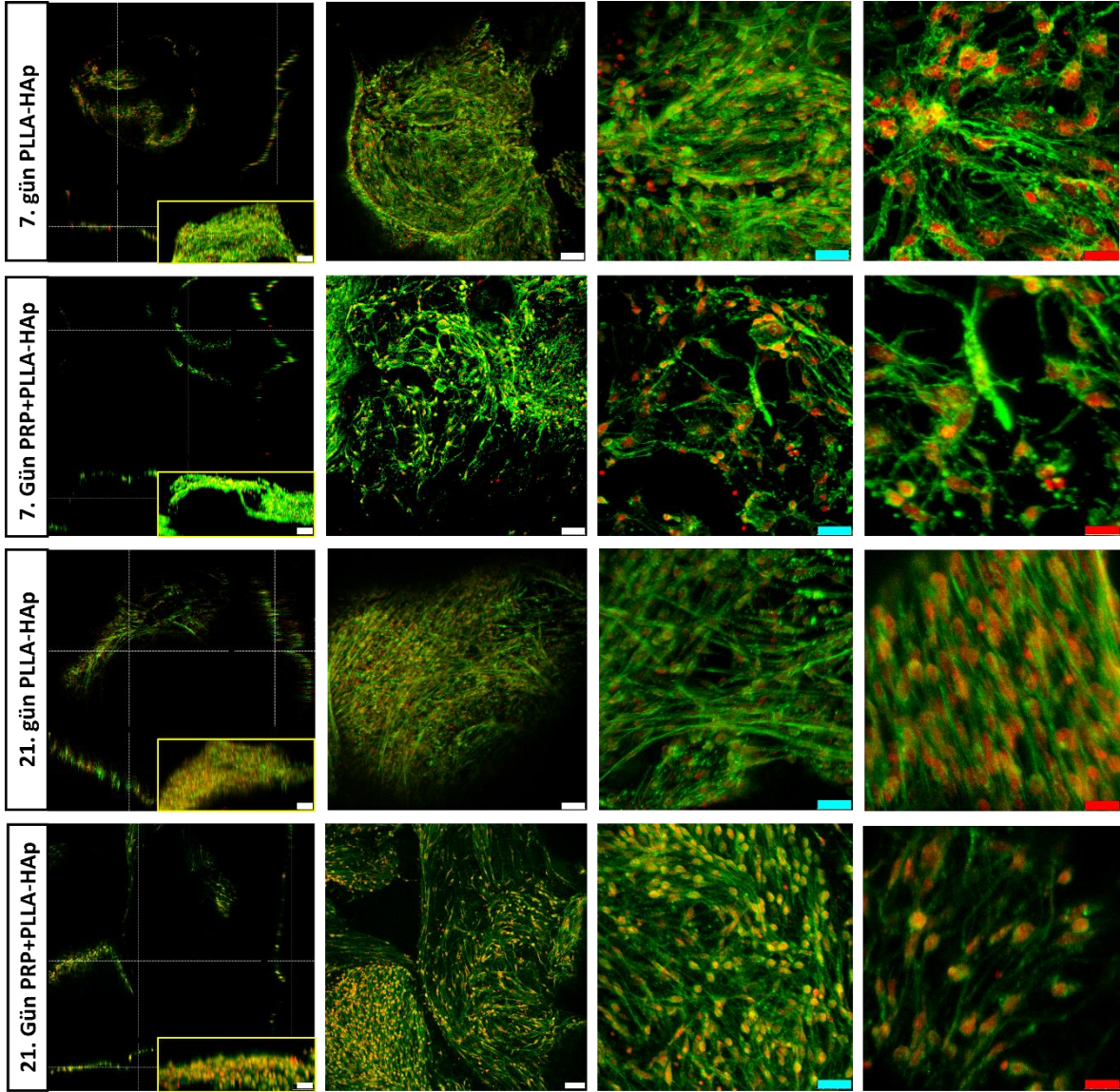


Şekil 4.17. Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 1, 7, 14 ve 21. günlerinde elde edilmiş PLLA içerikli doku iskelelerindeki MTT sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere bağlı olarak kendi içinde kıyaslandığında n=3; • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001, •••• p<0.0001.

Zhang vd. [143], PRP'nin klinikte kullanılabilirliğini belirlemek için farklı antikoagülan ve pıhtılaştırıcıların PRP üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (BMSCs) PRP jel üzerine ekilerek, hücre proliferasyonu 7 günlük MTT analizi ile değerlendirilmiştir. PRP içermeyen kontrol grubuna kıyasla aktive edilmeyen ve edilen PRP gruplarının, kültür süresi boyunca hücre sayısını arttırdığı görülmüştür. Bir başka çalışmada ise kıkırdak rejenerasyonunu desteklemek için BMSC'nin lentivirüs kaynaklı kemik morfogenetik proteini-2 (BMP2) ve PRP ile kullanımı, hücre kültürü çalışmaları ve tavşan dizindeki defekt modeli ile araştırılmıştır. Hücre proliferasyonu MTT analizi ile incelenmiş ve bir önceki çalışmaya benzer olarak PRP'nin BMSC'lerin çoğalmasını desteklediği görülmüştür [144]. Bu analizler ile tez kapsamında üretilen PRP destekli PLLA-HAp nanofiber doku iskelelerinin, literatürle uyumlu olarak hücrelerin yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını desteklediği sonucuna ulaşılmıştır.

4.3.2. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi

PLLA içerikli greft malzemelerindeki hücrelerin morfolojisi ve ECM'leri kültürün 7. ve 21. günlerinde, konfokal mikroskobu ile incelenmiştir. Hücreler biyomalzemeler üzerine yapışmış, çoğalmış ve yoğun bir şekilde ECM sentezi gerçekleştirmişlerdir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp greftleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin konfokal mikroskobu görüntüleri. Görüntülerdeki kırmızı renk propidyum iyodür ile boyanmış hücre çekirdeğini, yeşil renk ise Alexa fluor ile iskeletsel F-aktinleri göstermektedir. Çizgiler ölçekleri temsil etmektedir (beyaz: 100 µm, mavi:50 µm, kırmızı:25 µm).

Yedinci gün örnekleri üzerinde hücre yoğunluğunun az olduğu ancak uzun mesafelerde bile hücreler arasında bağlantı kurulabildiği görülmüştür. F-aktin fiberlerin varlığı ile hücrelerin, hücrel faaliyetler için gerekli bilgileri birbirleriyle paylaştığı anlaşılmaktadır. Konfokal mikroskobu görüntülerinden elde edilen sonuçlar, MTT analiziyle uyumlu olarak kültürün 21. gününde, 7. güne kıyasla tüm iskelelerde daha fazla hücre olduğunu desteklemektedir. Kullanılan konfokal mikroskobuyla malzemelerin en fazla 500 µm derinliğine kadar inilebilmektedir. İskelelerin farklı koordinatlarda çekilen görüntüleriyle (sol baştan ilk resimler) hücrelerin sadece yüzeyde çoğalmadığı aynı zamanda malzemenin içine doğru da difüze olup homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür.

Büyüme ortamındaki osteoprogenitör hücrelerin, genellikle aktin stres fiberlerinin paralel uzandığı fibroblast benzeri yapıda olduğu ve farklılaşma ortamında hücre morfolojisinin kübik bir yapıya dönüştüğü bilinmektedir [145]. Bu durum, osteojenik farklılaşma ile birlikte hücre morfolojisinde organizasyonel değişimlerin de olduğunu göstermektedir [146]. Özellikle PRP+PLLA-HAp grupları içerisinde bulunan hücre iskeletindeki aktinlerin çapraz yerleşiminin, MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasına yönelik bir işaret olduğu düşünülmüştür.

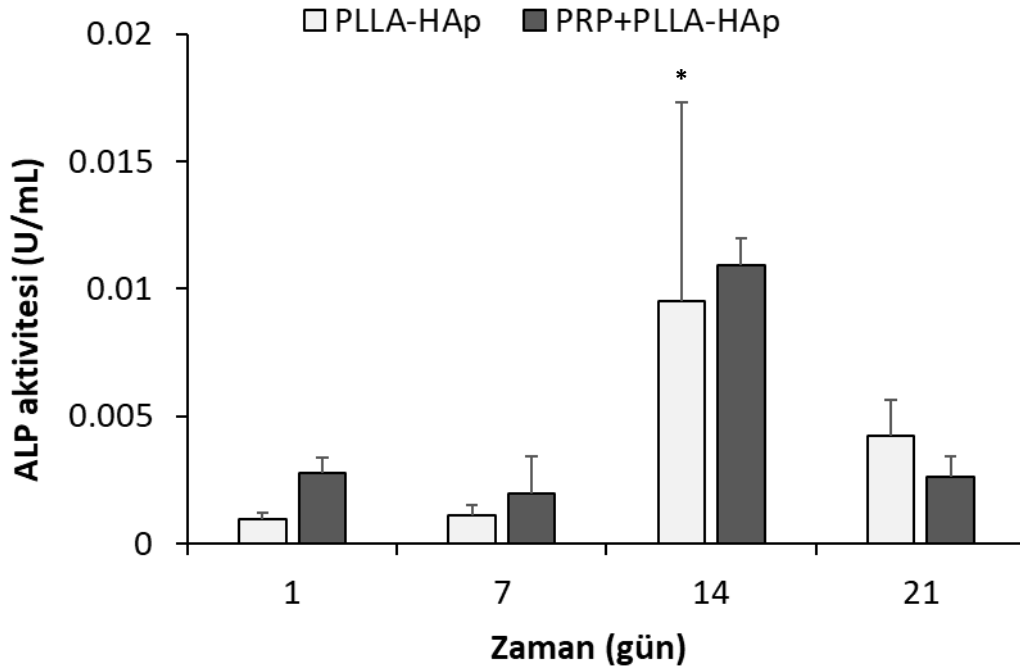
4.3.3. Osteojenik Farklılaşmasının Belirlenmesi

4.3.3.1. Alkalın Fosfataz (ALP) Aktivitesi

Alkalın fosfataz (ALP), fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzim olup kemik matrisi mineralizasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu enzim, preosteoblastik hücrelerin erken dönem farklılaşmasını değerlendirmek için kullanılır [2, 147]. Hücrelerin PRP ve PLLA-HAp içerikli doku iskeleleri üzerindeki ALP aktivitesi değerlerine ait grafik Şekil 4.19'da gösterilmiştir. ALP aktivitesi 14. gün sonunda PRP+PLLA-HAp gruplarında 3 kat artmış, sonrasında ise her iki grup için de azalmıştır ($p < 0.05$). Mineralizasyon, ALP üretimi maksimum seviyeye ulaştıktan yani matris olgunlaştıktan sonra başlamaktadır [35]. Dolayısıyla, ALP aktivitesi seviyesindeki azalma, MC3T3-E1 hücrelerinin tüm iskelelerde matris mineralizasyonuna doğru ilerlediğini göstermektedir.

Analiz süresi boyunca 14. gün verileri dışında anlamlı bir fark olmamasına rağmen PLLA-HAp doku iskelelerindeki ALP aktivitesinin, PRP yüklü iskelelere kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Kasten vd. [90], PRP'nin hMSC çoğalmasında ve osteojenik farklılaşması

üzerindeki etkisini kalsiyumca eksik olan sentetik hidroksiapatit (CDHA) ve β -trikalsiyum fosfat doku iskelelerini kullanarak incelemiştir. Çalışma sonunda, tez kapsamındaki sonuçlara paralel olarak PRP ilavesinin, iskeleler üzerindeki hücre proliferasyonunu artırırken ALP aktivitesinde anlamlı bir fark yaratmadığını görmüşlerdir. Bunun sebebi olarak da hücre donörlerinin ve PRP havuzlarının yüksek standart sapmaya sebep olması düşünülmüştür. Çünkü PRP içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin miktarı, yaşa ve cinsiyete göre değişebilmekte ve bu da ALP aktivitesini etkilemektedir [90].



Şekil 4.19. Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin PLLA içerikli nanofiber doku iskeleleri üzerindeki ALP aktivite değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

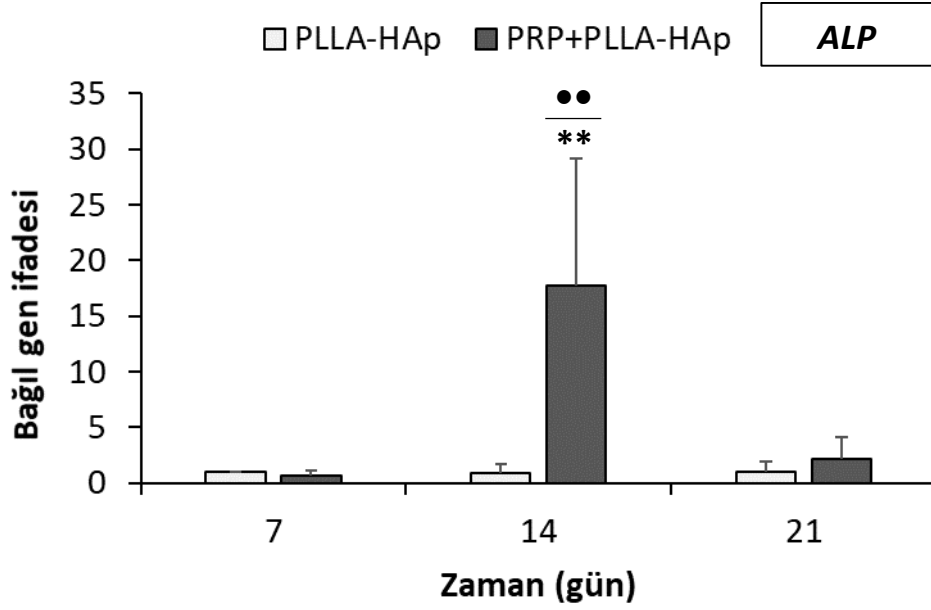
4.3.3.2. Gen Ekspresyonu Analizleri

MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması RT-PCR analizleriyle incelenmiş ve bu amaçla erken, orta ve geç dönem genleri olan ALP, COLL I ve OCN genlerinin ekspresyon ifadeleri değerlendirilmiştir. Hücrelerin PRP ve PLLA içerikli doku iskelelerindeki gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle hesaplanmış ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol geni olan β -aktin ifade seviyesi ile normalize edilmiştir. Kontrol grubu olarak PLLA-

HAp gruplarındaki 7. gün ekspresyon seviyeleri 1 olarak alınmıştır. Diğer gruplardaki gen ekspresyon seviyeleri ise PLLA-HAp gruplarındaki 7. gün değerlerinin katları şeklinde verilmiştir.

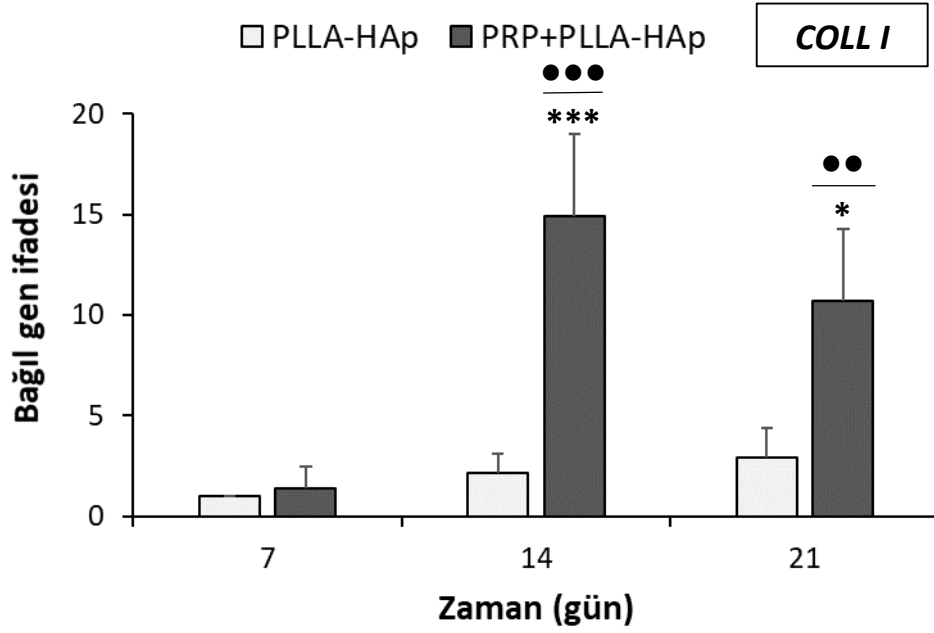
Şekil 4.20’de hücrelerin PLLA içerikli doku iskelelerinde eksprese ettiği ALP genine ait sonuçlar gösterilmiştir. On dördüncü gün dışında ALP ekspresyon seviyesi bakımından iki malzeme arasında anlamlı bir fark bulunamamış, ancak PRP içeren PLLA-HAp doku iskelelerinde ALP gen ekspresyonunun 14. günde yaklaşık 17 kat arttığı görülmüştür ($p<0.01$). PLLA-HAp doku iskelelerinde de ALP ekspresyonu, ALP aktivitesi değerlerine (Şekil 4.19) benzer olarak en yüksek değeri kültürün 14. gününde göstermiş ve sonrasında azalmıştır. Mineralizasyonun, ALP üretimi maksimum seviyeye ulaşmış matrisin olgunlaştıktan sonra başladığı bilinmekte ve Şekil 4.20’deki sonuçlar da ALP aktivitesindeki azalmanın iskelelerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin matris mineralizasyonuna doğru ilerlediğini doğrulamaktadır.

Bir çalışmada, Hint ipeği ve HAp kullanılarak nano yapıda kemik doku iskeleleri geliştirilmiştir. Fabrikasyon yöntemi olarak koaksiyel elektroçirme yöntemi ve çözücü olarak da yeşil su (green water) tercih edilmiştir. Osteoblast benzeri hücreler (MG63) kullanılarak malzemelerin hücre proliferasyonu ve farklılaşmasındaki etkinliği incelenmiştir. Alkalın fosfataz aktivitesinin 7 gün süresince arttığı, ancak 10. günün sonunda ise belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar da kemik gelişiminde erken dönemin tamamlandığı ve ileri fazlara geçildiği şeklinde yorumlanmıştır [148]. Chen vd. [149], insan adipoz kökenli kök hücrelerin (hADSC) proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını desteklemek için PRP ve BMP’nin etkisini incelemiştir. Kontrol geni olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenazın (GAPDH) kullanıldığı RT-PCR analizlerinde, 14. güne kadar PRP ve BMP içeren malzemelerde ALP/GADH oranının yaklaşık 10'lara kadar arttığı ve 21. günde ise ALP/GADH oranının 5'lere kadar düştüğü görülmüştür. Tüm bu sonuçlar ve RT-PCR ile eksprese edilen ALP değerleri, PRP’nin erken dönem osteojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermektedir.



Şekil 4.20. PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.

Kolajen I (COLL I) kemik dokusunun ana bileşenlerinden ve osteojenik farklılaşmanın orta dönem belirteçlerinden biridir [2]. Yeni kemik oluşumu sırasında hücreler çoğalmakta ve çoğalan osteoblastlar da birincil gen ürünü olan COLL I salgılamaktadır. Kolajen I, proliferasyon süresince yoğun olarak sentezlenen bir protein olup osteoblastik farklılaşma ve olgunlaşma döneminde sentezi azalmaktadır [2, 150]. Şekil 4.21'den COLL I ifade seviyesinin PRP+PLLA-HAp doku iskelelerinde, 14. gün 7 kat ve 21. günde 5 kat farkla PRP içermeyen gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu ve PRP'nin osteojenik farklılaşmayı desteklediği görülmektedir (p<0.05 ve p<0.001). PRP gruplarında 14.gün sonunda COLL I seviyesi başlangıca göre 14 kat artmış, 21. güne geçildiğinde COLL I ifade seviyesi 10 seviyesine düşmüştür. Bu durum, MC3T3-E1 hücrelerinin bu doku iskeleleri üzerinde erken dönem farklılaşmayı tamamlayarak matris mineralizasyonuna geçtiğini göstermektedir.

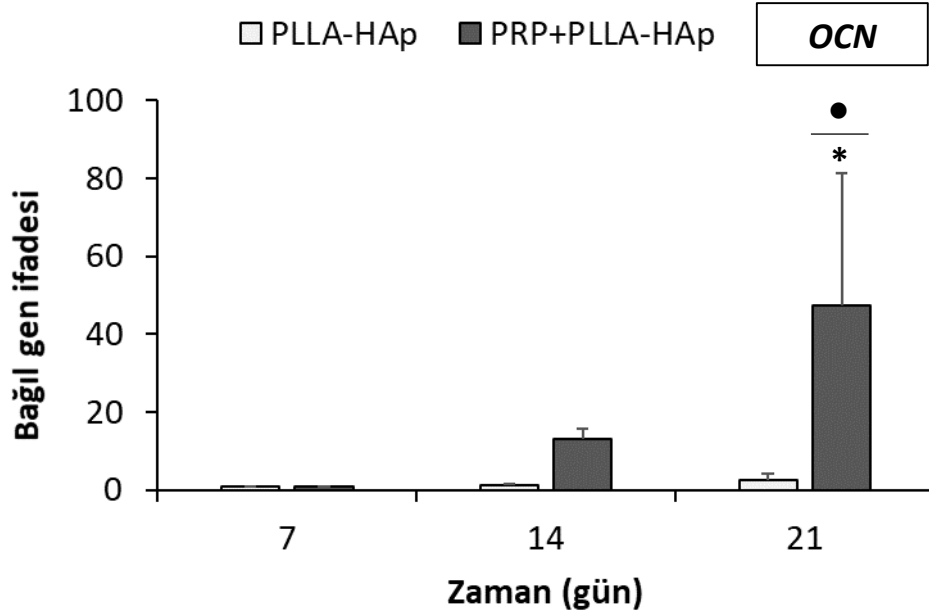


Şekil 4.21. PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin COL I ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001, •••• p<0.0001.

Osteokalsin (OCN), COL I'den sonra kemik dokusunda en fazla bulunan osteoblastik bir protein ve aynı zamanda kemik matrisinin sentezi ve mineralizasyonundan sorumlu bir gendir [2]. Osteojenik farklılaşmanın geç dönem belirteçlerinden biri olan osteokalsin, *in vivo* koşullarda kemik oluşumunu yavaşlatarak minerallerinin olgunlaşmasını destekler. *In vitro*'da ise çekirdeklenmeyi geciktirir ve aşırı kristal oluşumunun önüne geçer [150]. OCN ekspresyon seviyeleri, iki biyomalzeme için de kültür boyunca artmaya devam etmiştir ve bu durum kültürün ilerleyen günlerde matris mineralizasyonunda artış olacağını göstermektedir (Şekil 4.22). Beklenildiği gibi OCN, kültürün geç dönemlerinde ortaya çıkmış ve PRP destekli greft gruplarında, boş grefte kıyasla 21. günün sonunda yaklaşık 20 kat artmıştır (p<0.05). Tez çalışması kapsamında RT-PCR ile elde edilen OCN ekspresyon değerleri, PRP'nin MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını özellikle 14. ve 21. günler arasında uyardığını göstermektedir (p<0.05).

Trombositten zengin plazma ve BMP-2'nin sert doku rejenerasyonuna olan etkisini gözlemlemek için yapılan bir çalışmada, MG63 hücreleri HAp ve TCP ile desteklenmiş

kolajen/PCL içerikli biyomalzemeler üzerine ekilmiş ve OCN ekspresyon değerleri 14 günlük kültür süresi boyunca incelenmiştir. Kalsiyum depoları ve OCN değerlerinin 14 gün boyunca arttığı, ayrıca OCN değerlerinin PRP bulunan gruplarda BMP-2 içerikli gruplara kıyasla daha yüksek olmasıyla PRP'nin mineralizasyonu desteklediği gösterilmiştir [151].



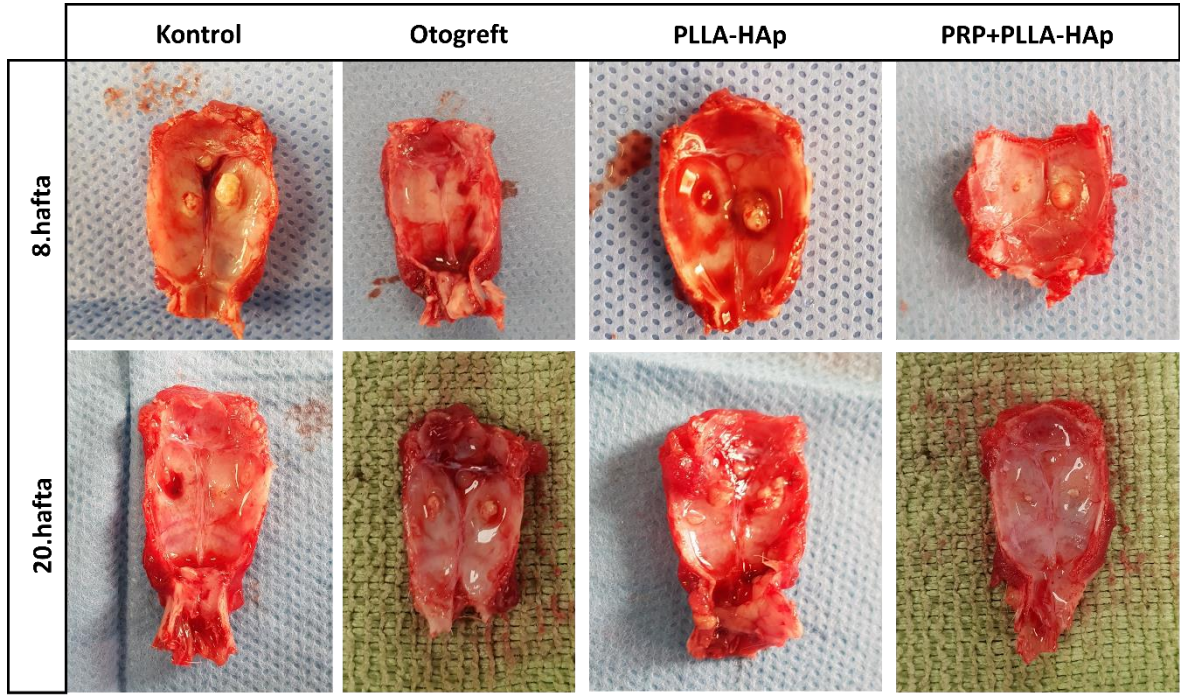
Şekil 4.22. PLLA içerikli nanofiber doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin OCN ekspresyon seviyeleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, PLLA-HAp iskelesi kontrol grubu iken: n=3; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. PRP+PLLA-HAp iskelesi günlere göre kendi içinde kıyaslandığında n=3; ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001, ●●●● p<0.0001.

Hücre kültürü çalışmaları sonucunda, MTT analizi ve konfokal mikroskopu görüntüleriyle PRP yüklü PLLA-HAp greft grubunun hücrelerin malzeme yüzeyine tutunmasını ve hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Osteojenik farklılaşmayı incelemek için yapılan RT-PCR analiziyle ise orta ve geç dönem belirteci olan ALP, COLL I ve OCN genlerinin ekspresyonları, PRP yüklü PLLA-HAp greft grubunun MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını arttırdığını göstermiştir. *In vitro* çalışmalardan literatürle uyumlu başarılı sonuçların alınmasının ardından *in vivo* hayvan deneylerine geçilmiştir.

4.4. *In Vivo* Hayvan Deneyleri

Hayvan deneyleri için 24 adet, 200-250 g ağırlığında erkek Wistar Albino sıçan kullanılmış ve her bir grupta 6 hayvan olacak şekilde, sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır. Araştırmada kullanılacak hayvan sayısı gerekli ön çalışmalar yapılarak hesaplanmıştır. Gruplar sırasıyla kontrol (şam), otogreft (altın standart), PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp'tır. PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp gruplarındaki sonuçlar, grup başına 5'er hayvan olacak şekilde verilmiştir çünkü gruplardaki eksik hayvanlara ait analizler halen devam etmektedir. Sıçanların kalvariyumunda her iki parietal kemikte birbirinden bağımsız 5 mm çapında kemik defektleri oluşturulmuştur. Oluşturulan defektler tedavi sürecinde birbirinden bağımsız iyileştiği için her bir sıçandan 2 örnek elde edilmiştir. Farklı dönemlerdeki kemikleşmeyi karşılaştırılmak için erken kemikleşmeye ait doku örnekleri 8. haftanın, geç kemikleşmeye ait olan doku örnekleri ise 20. haftanın sonunda alınmıştır. Deney hayvanlarının seçiminde nörofizyolojik olarak çalışmaya uygun gelişmişlik olarak en basit canlılar seçilmiştir. Hayvan deneylerini gerçekleştirecek ekip deney hayvanı kullanım sertifikalarına sahip, hayvan deneyi çalışmalarında deneyimli araştırmacılardan oluşturulmuş ve deneyler 3R (replacement=hayvan kullanımını azaltıcı alternatif yöntem kullanımı, reduction=mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı, refinement=hayvan kaybını azaltıcı ve hayvan refahını artırıcı önlemler) kuralına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Makroskobik incelemede kontrol grubunda 8. ve 20. haftalık grupların her ikisinde de defekt bölgesinin dolduğu, ancak kemikleşme yerine sadece ince bir membran yapısının olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23). Altın standart olarak kabul edilen otogreft yönteminde, 8. hafta sonunda defektlerin kapanıp kemikleşmenin başladığı görülmüştür. Yirminci hafta sonunda elde edilen görüntülerde de kemikleşmenin devam ettiği ancak fibröz tabakaların da olduğu tespit edilmiştir. Herhangi bir kimyasal veya biyolojik ajanın yüklü olmadığı greft (PLLA-HAp) ve PRP yüklenmiş greft grubu (PRP+PLLA-HAp) incelendiğinde 8. ve 20. hafta örneklerinde herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu ya da enfeksiyon gözlenmemiştir. Sekizinci hafta sonunda elde edilen örneklerde greft malzemelerinin bozunmadığı ve üzerinde fibröz bir membran tabakasının olduğu görülmüştür. Yirminci hafta sonunda elde edilen PRP yüklü örnek gruplarında ise greftlerin büyük bir çoğunluğunun bozunmaya başladığı ve PLLA-HAp gruplarının aksine fibröz bağ dokusundan ziyade kemik benzeri dokuların geliştiği gözlemlenmiştir.

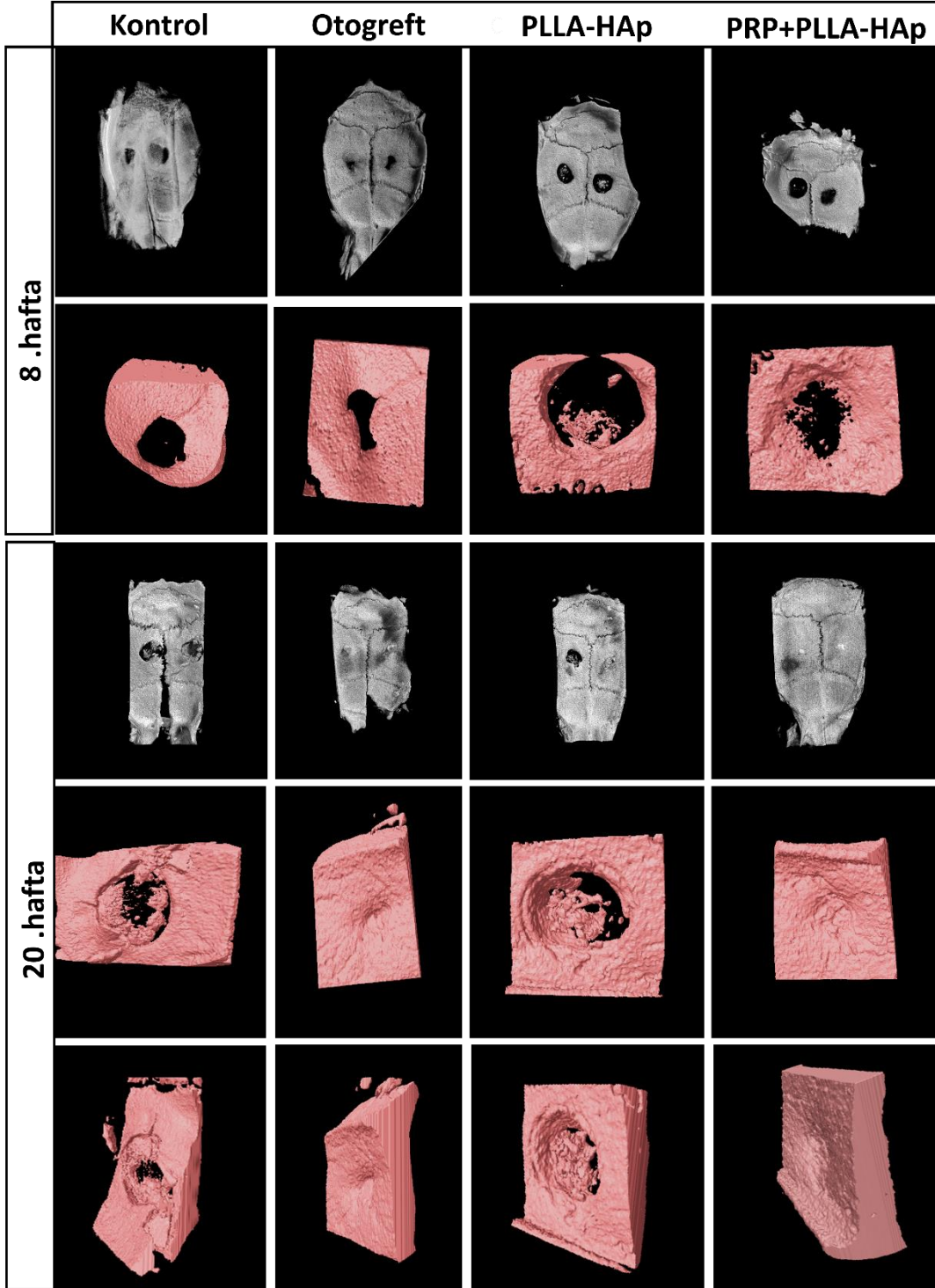


Şekil 4.23. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonundaki kemikleşme.

Klinik gözlem sonucunda, 20. hafta örneklerinde greft gruplarında malzemenin büyük bölümünün bozunduğu ayrıca PRP yüklenmiş greft gruplarında, otogrefttekiler gibi kemik benzeri dokuların geliştiği tespit edilmiştir.

4.4.1. Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Görüntülemesi

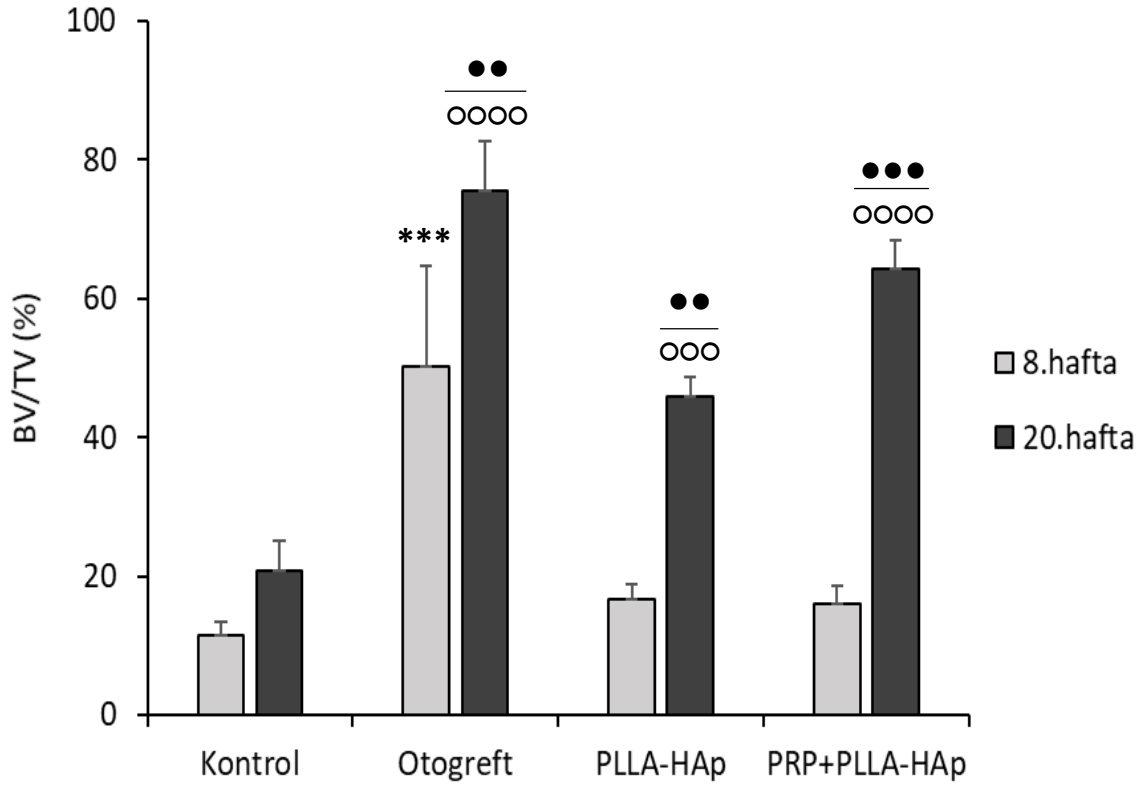
Doku örneklerine μ -CT analizi yapılmış ve analiz görüntüleri Şekil 4.24'te verilmiştir. Mikro-CT görüntülerinde, 8. haftanın sonunda tüm gruplarda defekt bölgesinin büyük bölümünün iyileşmediği ve kemik rejenerasyonu için bu sürenin yeterli olmadığı görülmüştür. Yirminci haftanın sonunda ise klinik gözlemdaki sonuçlara benzer olarak otogreftlerde defekt bölgesinin neredeyse tamamen dolduğu ve PRP yüklenmiş greft gruplarında, otogrefttekiler gibi kemik benzeri dokuların geliştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.24. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonunda elde edilen mikro-CT görüntüleri.

Kantitatif analiz için ise CTVox ve CTAn (Skyscan, Bruker, İngiltere) yazılımlarıyla sadece defekt bölgesinde oluşan yeni kemik hacmi ölçülmüş ve 5 mm çapında defekt hacmine oranlanmıştır. Böylece yeni oluşan kemik yüzdesi kemik hacmi/defekt hacmi (BV/TV) oranı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.25). Sekizinci haftada gruplar arasında kontrol grubuna göre sadece otogreftteki iyileşme anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0.001$), 20.

haftanın sonunda kemik rejenerasyonunun her grupta arttığı ve anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.001$ ve $p<0.0001$). Çalışma sonunda, en yüksek kemik rejenerasyonu %76 olup, beklenildiği gibi altın standart olan otogreft grubunda görülürken; en yüksek BV/TV oranına sahip ikinci grup PRP içerikli PLLA-HAp grefti (%64) olarak belirlenmiştir. En düşük BV/TV oranı ise ~%25 ile kontrol (şam) grubundadır. Bu sonuçlar geliştirilen PRP+PLLA-HAp greft malzemesinin altın standarda alternatif olarak kullanılabileceğini ve şam grubu ve boş PLLA-HAp grubu düşünülduğünde PRP'nin kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.



Şekil 4.25. Tüm gruplarda 8. ve 20. hafta sonunda elde edilen BV/TV oranları. İstatistiksel olarak anlamlı farklar, kontrol grubu olarak 8. hafta kontrol grubu alındığında: $n=3-6$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. Kontrol grubu olarak 20. hafta kontrol grubu alındığında: $n=3-6$; ○ $p<0.05$, ○○ $p<0.01$, ○○○ $p<0.001$, ○○○○ $p<0.0001$. Haftalara göre her bir grup kendi içinde kıyaslandığında $n=3-6$; ● $p<0.05$, ●● $p<0.01$, ●●● $p<0.001$, ●●●● $p<0.0001$.

Yapılan bir çalışmada, tavşan modelinde mandibula hasarının onarımı için PRP'nin nano boyutta gözenekli HAp/kolajen/PLA doku iskelesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. X-ışınması sonuçları, kemik mineral yoğunluğunun çift enerjili röntgen ölçümleri, taramalı

elektron mikroskopisi ve histoloji sonuçları, PRP'nin osteogenezi hızlandırdığını (özellikle ilk 4 haftada) göstermiş ve bu hibrit yapının kemik hasarlarının iyileştirilmesinde etkili bir yaklaşım olabileceği vurgulanmıştır [152]. Bir başka çalışmada, PLGA doku iskelesi PRP ve kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerle birlikte osteokondral hasarı olan tavşanın dizine implante edilmiştir. Altı ayın sonunda kolajen II ekspresyonu, histolojik skorlama ve diğer analizlerle PRP içeren grubun yeni kemik oluşumunu diğer gruplardan daha fazla desteklediği gözlemlenmiştir [153].

PRP'nin kişinin kendi kanından elde edilmesi sebebiyle immün bir yanıt oluşturmadığı bilinmektedir. Ancak türler arasında etkisini inceleyen çalışmalar yok denecek kadar azdır. Nakatani vd. [154], yaptığı bir çalışmada 3 farklı insan kanından taze izole edilmiş ve liyofilize edilip distile suda çözdürülmüş iki farklı PRP formununun 6 haftalık bağışıklığı olmayan farelerdeki etkisini incelemiştir. PRP çözeltileri, TCP partikülleri ile karıştırılarak farelerde kranial defekt bölgesine implante edilmiş ve 4. ve 8. haftalardaki doku örnekleri incelenmiştir. Histolojik ve immünohistokimyasal boyamalarla PRP konsantrasyonunun kemik doku rejenerasyonundaki etkinliğini arttırabileceği görülmüştür. Bir başka çalışmada ise 4 farklı bireyden izole edilen PRP kullanılmıştır. PRP'lerin kalsiyum ve trombin ile aktivasyonunun *in vitro* deneylerde büyüme faktörleri salımını ve endotel hücre bölünmesini düzenlediği görülmüş ancak timüs bezi olmayan (atimik) sıçan modeliyle yapılan *in vivo* hayvan deneylerinde PRP'nin erken veya geç dönem kemik oluşumunu arttırmadığı görülmüştür [155]. Türler arasında PRP kullanım etkinliği hala tartışılmaktadır ve otogreft gruptaki kemik rejenerasyonunun geliştirilen greft malzemesinden yüksek olmasının insan kaynaklı PRP'nin sıçanlarda kullanılmış olmasından kaynaklanabildiği düşünülmektedir.

In vivo hayvan deneyleri sonuçları, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarını destekler nitelikte bulunmuştur. Yirmi bir günlük hücre kültürü çalışmalarında geliştirilen PRP+PLLA-HAp kompozit nanofiber kemik greftlerinin hücrelerin tutunup çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği görülmüştür. Hayvan deneylerinde ise biyomalzemelerin, geometrisi düzgün olmayan hasar bölgesinin şeklini kolaylıkla aldığı ve sıkıştırılabilir formda olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca 20. haftanın sonunda PRP destekli greflerin kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı ve altın standart olan otogreftte alternatif olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar devam etmekte olup, boyamalar henüz sonuçlanmadığı için tez kapsamında sonuçlar sunulamamıştır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere PRP ile biyoaktivitesi artırılmış kemik greftlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Öncelikle, HAp nanopartikülleri PLLA polimerine katılarak 3B elektroğirme yöntemiyle nanofibröz kompozit malzemeler üretilmiştir. Ardından, NaOH çözeltisi ile fiberlerin pürüzlülüğü artırılarak hücre yapışması için uygun doku iskelesi topografisi elde edilmeye çalışılmıştır. Çeşitli fiziksel ve kimyasal karakterizasyon yöntemlerinin ardından *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen önemli bulgular ise aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.

- ✓ Kemik ECM'sini taklit edebilmek için kemik inorganik yapısına benzer B-tipi HAp nanopartikülleri ve organik yapısına benzer olarak ise PLLA polimeri kullanılmış ve kompozit nanofiber malzemeler 2B ve 3B elektroğirme ile üretilmiştir.
- ✓ SEM görüntülerinin Image J programına aktarılmasıyla elde edilen sonuçlarda, 2B elektroğirme ile üretilen PLLA-HAp greftlerinde gözenek boyutları 2-10 μm arasında bulunurken, 3B gruplarda gözenek boyutları 50 μm 'ye kadar çıkmıştır. Böylelikle 3B elektroğirmeyle daha büyük gözeneklere sahip malzemelerin başarıyla üretilebildiği gösterilmiştir.
- ✓ Üretilen malzemelerin termal özelliklerini belirlemek için TGA ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. TGA sonuçlarına göre, PLLA-HAp doku iskelelerinin PLLA'ya kıyasla daha yüksek sıcaklıkta bozunmaya başladığı ve yapıya HAp katılmasının PLLA'nın termal özelliklerinin iyileştiği sonucuna ulaşılmıştır. DSC termogramından elde edilen sonuçlara göre PLLA ve PLLA-HAp için % kristalinite değerleri %36 ve %47 olarak hesaplanmıştır. PLLA'nın yapısına HAp katılmasıyla polimerin % kristalinitesinin arttığı görülmüştür.
- ✓ Yüzey pürüzlülüğü artırılarak hücrelerin malzeme yüzeyine tutunması ve çoğalmasını desteklemek amacıyla modifikasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Alkali derişimi arttıkça yapının bozunmaya başladığı görülmüş ve bu sebeple optimum derişim değeri 0.1 M seçilmiştir. PLLA-HAp için su temas açısı $128.2 \pm 3.1^\circ$ iken modifikasyon sonrası PLLA-HAp için su temas açısı $84.2 \pm 8.1^\circ$ olarak bulunmuş ve alkali modifikasyonuyla hidrofilitesinin arttığı görülmüştür.

- ✓ NaOH modifikasyonu uygulanmış PLLA-HAp greftinin fiber çap uzunluğu 508 ± 102 nm olarak ölçülmüş PBS içerisinde gerçekleştirilen 28 günlük su tutma kapasitesi (%) ve lizozimli ortamda 58 günlük kütlece bozunma (%) değerleri sırasıyla 705 ± 405 ve 10.0 ± 0.8 olarak hesaplanmıştır. Modifikasyon uygulanmayan PLLA-HAp grupları için bu değerler sırasıyla 409 ± 73 , 5.0 ± 0.9 , 431 ± 188 'dir. Modifikasyon fiber çapında anlamlı bir fark yaratmazken bozunmayı ve su tutma kapasitesini yaklaşık 2 kat arttırmıştır.
- ✓ Üretilen biyomalzemelerin biyoaktivitesini arttırmak için biyosinyal molekül olarak sağlıklı bireylerden alınan kan ile izole edilen PRP kullanılmış ve hemogram testiyle, izole edilen PRP'nin normal kana kıyasla yaklaşık 5 kat trombosit içerdiği bulunmuştur.
- ✓ PRP % 10 CaCl₂ ile 2:5 (PRP:CaCl₂) hacimsel oranında aktive edilmiş ve aktivasyon etkisini incelemek için yapılan akış sitometrisi analizinde, CD62 ve CD41/61 proteinlerinin yüzdesinin aktivasyon sonrası yaklaşık 4 kat arttığı görülmüştür.
- ✓ PRP etkisini incelemek için yapılan MTT analizinde analiz günlerinde PRP yüklü gruplarda proliferasyonun daha yüksek olduğu ve 21. günün sonunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat daha fazla hücre sayısına ulaşıldığı görülmüştür.
- ✓ Alexa Flour 488 ve propidyum iyodür ile boyanan PLLA-HAp ve PRP+PLLA-HAp greftlerindeki hücre morfolojisi, konfokal mikroskopuyla incelenmiş ve hücrelerin biyomalzemeler üzerine yapışıp çoğalarak yoğun bir şekilde ECM sentezi gerçekleştirdiği görülmüştür.
- ✓ RT-PCR analizi ile preosteoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşma kapasiteleri ALP, COLL I ve OCN gen ekspresyon seviyelerine göre belirlenmiştir. Erken dönem farklılaşmanın belirteci olan ALP ekspresyonu 14. günde PRP yüklü gruplarda yaklaşık 17 kat artmış ve PRP'nin erken dönem osteojenik farklılaşmayı desteklediği görülmüştür. Orta dönem farklılaşmanın belirteci olan COLL I ise 14. gün ve 21. gün sonunda eksprese edilmiştir. Geç dönem farklılaşma belirteci olan OCN de kültürün 21. gününde PRP yüklü grupta ortaya çıkmış ve kontrol grubuna göre 20 kat yüksek bulunmuştur. PRP destekli greftlerin erken, orta ve geç dönem osteojenik farklılaşmayı desteklediği gösterilmiştir.
- ✓ *In vivo* çalışmalarda, 24 Wistar Albino'nun kafatasında oluşturulan kraniyal defektlerden alınan doku örnekleri mikro-CT görüntüleriyle incelenmiş ve kemik mineralizasyonu ölçülmüştür. En yüksek değer otogreft gruplarında elde edilmiş ve geliştirilen PRP+PLLA-HAp biyomalzemelerinin de erken ve geç dönem

farklılaşmada otogreftte alternatif kemik grefti olarak kullanılabilceği gsterilmiştir. Ayrıca hayvan deneyleriyle, geliştirilen malzemenin herhangi bir metalik ekipmanla kesilmesine gerek kalmadan hasarlı bölgenin şeklini rahatlıkla alabildiği ve cerrahi süreçte manipölasyon kolaylığı nedeniyle uygulama süresini kısalttığı görölmüştür.

Yukarda açıklanan tüm deneysel veriler değerlendirildiğinde, PRP yüklü PLLA-HAp nanofibröz kompozit malzemelerinin hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklediği görölmüştür. Geliştirilen greftler geometrisi düzgün olmayan kemik hasarlarının tedavisinde aday bir sistem olarak düşünölmektedir. Gelecekteki çalışmalar için hücre canlılığını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyen greftlerin *in vivo* değerlendirmesinde, 12. hafta sonunda da örnek alınarak malzemelerin orta dönem osteojenik farklılaşmada etkisinin incelenmesi önerilebilir. Ayrıca, borun kemik rejenerasyonundaki etkisini inceleyen çalışmalar artmaktadır. HAp yerine bor katkılı HAp kullanılarak da malzemelerin *in vitro* kültür ve *in vivo* hayvan çalışmalarının yürütölmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Şimşek, G. Çakmak ve E. Cila, Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, 3 (2004) 1–11.
- [2] S. Çakmak, Kemik Hasarlarının Tedavisi için Sıkıştırılabilir ve Kolay Şekil Alabilen 3-Boyutlu Kompozit Fibröz Malzemeler-Üretim, Karakterizasyon ve İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları, Tübitak, No.215M179, Ankara, 2017.
- [3] V. Raeisdsteh Hokmabad, S. Davaran, A. Ramazani ve R. Salehi, Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 28 (2017) 1797–1825.
- [4] B. A. Blakeney, A. Tambralli, J. M. Anderson, A. Andukuri, D. J. Lim, D. R. Dean ve H. W. Jun, Biomaterials, 32(6) (2011) 1583-1590.
- [5] H. S. Yoo, T. G. Kim ve T. G. Park, Advanced Drug Delivery Reviews, 61(12) (2009) 1033–1042.
- [6] H. T. Liao, J.P. Chen ve M.-Y. Lee, Materials, 6(11) (2013) 4911-4929.
- [7] F. Baino, S. Hamzehlou ve S. Kargozar, Journal of Functional Biomaterial, 9(1) (2018) 1-26.
- [8] A. K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang ve M. J. Buehler, Nature Communications, 4 (2013) 1724.
- [9] J. S. Lowe, P. G. Anderson ve S. I. Anderson, Steves & Lowe's Human Histology, 5. Baskı, Elsevier, Çin, Bölüm 13, 2018.
- [10] E. J. Mackie, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35(9) (2003) 1301–1305.
- [11] J. R. Porter, T. T. Ruckh ve K. C. Popat, Biotechnology Progress, 25(6) (2009) 1539-1560.
- [12] I. H. Kalfas, Neurosurgical Focus, 10(4) (2001) 1-4.
- [13] Britannica Academic, <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/periosteum/59266> (Erişim tarihi: 07 Kasım 2018).
- [14] Britannica Academic, <https://www.britannica.com/science/cancellous-bone> (Erişim tarihi: 07 Kasım 2018).
- [15] Britannica Academic, <https://www.britannica.com/science/compact-bone> (Erişim tarihi: 07 Kasım 2018).
- [16] T. A. Einhorn ve L. C. Gerstenfeld, Nature Reviews Rheumatology, 11(1) (2015) 45.
- [17] M. S. Ghiasi, J. Chen, A. Vaziri, E. K. Rodriguez ve A. Nazarian, Bone Reports, 6 (2017) 87-100.

- [18] R. K. Hernandez, T. P. Do, C. W. Critchlow, R. E. Dent ve S. S. Jick, *Acta Orthopaedica*, 83(6) (2012) 653-660.
- [19] M. M. McQueen, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 64(6) (2008) 1517–1521.
- [20] H.A. Mckellop, G. O. R. A. N. Sigholm, F. C. Redfern, B. R. I. A. N Doyle, A. Sarmiento ve J. V. Luck Sr, *JBJS*, 73(9) (1991) 1382-1391.
- [21] M. Kaya Yıldız, *Kemik İyileşmesinde Trombositten Zengin Plazmanın Etkisinin Deneysel Olarak Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [22] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker ve A. R. Boccaccini, *Biomaterials*, 27(18) (2006) 3413-3431.
- [23] M. M. Stevens, *Materials Today*, 11(5) (2008) 18–25.
- [24] Y. Fillingham ve J. Jacobs, *The Bone & Joint Journal*, 98 (2016) 6–9.
- [25] D. Samartzis, F. H. Shen, E. J. Goldberg, ve H. S. An, *Spine*, 30(15) (2005) 1756-1761.
- [26] A. R. Amini, C. T. Laurencin ve S. P. Nukavarapu, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40(5) (2012) 363-408.
- [27] P. Habibovic ve K. de Groot, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(1) (2007) 25-32.
- [28] S. K. Nandi, S. Roy, P. Mukherjee, B. Kundu, D. K. De, ve D. Basu, *Indian Journal of Medical Research*, 132(1) (2010) 15-30.
- [29] J. R. Grove, *Surgeon*, 15(33) (2008) 47.
- [30] D. F. Öztöpalan, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1) (2017) 76–82.
- [31] E. Grageda, *Implant Dentistry*, 13(4) (2004) 301–309.
- [32] B. G. Pijls, I. M. J. G. Sanders, E. J. Kuijper ve R. G. H. H. Nelissen, *Bone & Joint Research*, 7(11) (2018) 609-619.
- [33] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, ve C. K. Chua, *Tissue Engineering*, 7(6), (2001) 679-689.
- [34] V. Campana, G. Milano, E. Pagano, M. Barba, C. Cicione, G. Salonna ve G. Logroscino, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10) (2014) 2445-2461.
- [35] S. Çakmak, *Kemik Doku Onarımı İçin Hidroksiapatit Peptit Amfifil Bazlı Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
- [36] L. S. Nair ve C. T. Laurencin, *Progress in Polymer Science*, 32(9) (2007) 762–798.
- [37] M. S. Lopes, A. L. Jardini ve R. Maciel Filho, *Procedia Engineering*, 42 (2012) 1402-1413.

- [38] B. Gupta, N. Revagade ve J. Hilborn, *Progress in Polymer Science*, 32(4) (2007) 455-482.
- [39] P. B. Maurus ve C. C. Kaeding, *Operative Techniques in Sports Medicine*, 12(3) (2004) 158–160.
- [40] A. Rainer, C. Spadaccio, P. Sedati, F. De Marco, S. Carotti, M. Lusini ve E. Covino, *Annals of Biomedical Engineering*, 39(7) (2011) 1882-1890.
- [41] McCullen, S. D., Zhu, Y., Bernacki, S. H., Narayan, R. J., Pourdeyhimi, B., Gorga, R. E. Ve Loba, E. G., *Biomedical Materials*, 4(3) (2009) 035002.
- [42] Ö. E. Tunçay, *Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013.
- [43] S. Aday ve M. Gümüşderelioğlu, *Polymer Composites*, 31(8) (2010) 1418-1426,
- [44] T. T. Demirtaş, G. Kaynak ve M. Gümüşderelioğlu, *Material Science Engineering: C 49* (2015) 713-719.
- [45] D. W. Hutmacher, *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, D. F. Williams, Ed. Oxford: Elsevier Science, 175-189, 2000.
- [46] H. Janik ve M. Marzec, *Materials Science and Engineering: C 48* (2015) 586-591.
- [47] X. Liu ve P. X. Ma, *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3) (2004) 477-486.
- [48] F. Shokrolahi, H. Mirzadeh, H. Yeganeh ve M. Daliri, *Iranian Polymer Journal*, 20(8) (2011) 645-658.
- [49] K. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy ve G. Nuber, *Polymer*, 36(4) (1995) 837–842.
- [50] O. Grinberg, I. Binderman, H. Bahar ve M. Zilberman, *Acta Biomaterialia*, 6(4) (2010) 1278–1287.
- [51] W. Cui, Y. Zhou ve J. Chang, *Scientific Technolgy Advanced Materials* 11(1) (2010) 014108.
- [52] M. Bognitzki, W. Czado, T. Frese, A. Schaper, M. Hellwig, M. Steinhart ve J. H. Wendorff, *Advanced Materials*, 13(1) (2001) 70-72.
- [53] B. Torres, *Proceeding of The National Conference On Undergraduate Research* (2001) 15-17.
- [54] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki ve S. Ramakrishna, *Composites Science and Technology*, 63(15) (2003) 2223-2253.
- [55] M. M. Bergshoef ve G. J. Vancso, *Advanced Materials*, 11(16) (1999) 1362-1365.
- [56] S. Agarwal, J. H. Wendorff ve A. Greiner, *Polymer*, 49(26) (2008) 5603-5621.
- [57] M. Li, M. J. Mondrinos, M. R. Gandhi, F. K. Ko, A. S. Weiss ve P. I. Lelkes, *Biomaterials*, 26(30) (2005) 5999-6008.
- [58] X. Zong, S. Li, E. Chen, B. Garlick, K. S. Kim, D. Fang ve B. Chu, *Annals of Surgery*, 240(5) (2004) 910.

- [59] E. Çatıker, E. Konuk, T. Gültan ve M. Gümüşderelioğlu, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, (2018) 1-11.
- [60] A. Sonseca, R. Sahay, K. Stepien, A. Wcislek, A. McClain, P. Sobolewski ve M. El Fray, *Researchgate* (2018) 1-25.
- [61] X. Wang, B. Ding ve B. Li, *Materials Today*, 16(6) (2013) 229-241.
- [62] C. Huang, X. Fu, J. Liu, Y. Qi, S. Li ve H. Wang, *Biomaterials*, 33(6) (2012) 1791-1800.
- [63] H. Zhang, Q. W. Fu, T. W. Sun, F. Chen, C. Qi, J. Wu ve Y. J. Zhu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2015) 27-36.
- [64] O. D. Schneider, D. Mohn, R. Fuhrer, K. Klein, K. Kämpf, K. M. Nuss ve W. J. Stark, *The Open Orthopaedics Journal*, 5 (2011) 63.
- [65] D. A. Wang, C. G. Williams, F. Yang ve J. H. Elisseeff, *Advanced Functional Materials*, 14(12) (2004) 1152-1159.
- [66] Z. A. Abdul Hamid, C. Y. Tham ve Z. Ahmad, *Journal of Materials Science*, 53(7) (2018) 4745-4758.
- [67] G. Greene, G. Yao ve R. Tannenbaum, *Langmuir*, 19(14) (2003) 5869-5874.
- [68] J. M. Grace ve L. J. Gerenser, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24(4) (2003) 305-341.
- [69] D. Katti, R. Vasita ve K. Shanmugam, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(4) (2008) 341-353.
- [70] X. Zhu, K. S. Chian, M. B. E. Chan-Park ve S. T. Lee, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 73A(3) (2005) 264-274.
- [71] S. C. Baker, N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson, D ve J. Southgate, *Biomaterials*, 27(16) (2006) 3136-3146.
- [72] H. Park, K. Y. Lee, S. J. Lee, K. E. Park ve W. H. Park, *Macromolecular Research*, 15(3) (2007) 238-243.
- [73] J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, A. B. Kumar ve S. Ramakrishna, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A(2) (2008) 408-417.
- [74] J. Jia, Y. Y. Duan, J. Yu ve J. W. Lu, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 86(2) (2008) 364-373.
- [75] C. Yao, X. Li, K. G. Neoh, Z. Shi ve E. T. Kang, *Journal of Membrane Science*, 320(2) (2008) 259-267.
- [76] T. I. Croll, A. J. O'Connor, G. W. Stevens ve J. J. Cooper-White, *Biomacromolecules*, 5(2) (2004) 463-473.
- [77] G. E. Park, M. A. Pattison, K. Park ve T. J. Webster, *Biomaterials*, 26(16) (2005) 3075-3082.

- [78] J. Chen, B. Chu ve B. S. Hsiao, *Journal of Biomedical Materials Research Part* 79(2) (2006) 307-317.-
- [79] N. E. Carlson ve R. B. Roach Jr, *The Journal of the American Dental Association*, 133(10) (2002) 1383–1386.
- [80] L. Boyapati ve H.-L. Wang, *Implant Dentistry*, 15(2) (2006)160–170.
- [81] S. Y. Cho ve M. Hur, *Annals of Laboratory Medicine*, 39(4) (2019) 343-344.
- [82] C. H. Evans, *Mayo Clinic Proceedings*, 2013, 88(11) (2013) 1323–1339.
- [83] S. Huang ve Z. Wang, *Cell Biology International*, 36(12) (2012) 1195–1205.
- [84] K. Yoshida, Y. Sumita, E. Marukawa, M. Harashima ve I. Asahina, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 23(3) (2013) 163–172.
- [85] E. Prosecká, M. Rampichová, A. Litvinec, Z. Tonar, M. Králíčková, L. Vojtova ve J. Jančář, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(2) (2015) 671-682.
- [86] S. A. Sell, J. J. Ericksen ve G. L. Bowlin, *Polymer International*, 61(12) (2012) 1703–1709.
- [87] R. E. Marx, E. R. Carlson, R. M. Eichstaedt, S. R. Schimmele, J. E. Strauss ve K. R. Georgeff, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6) (1998) 638–646.
- [88] B. D. Elder, C. Holmes, C. R. Goodwin, S. F. Lo, V. Puvanesarajah, T. A. Kosztowski ve T. F. Witham, *Annals of Biomedical Engineering*, 43(5) (2015) 1057-1070.
- [89] K. M. Sajesh, K. Kiran, S. V. Nair ve R. Jayakumar, *Composites Part B: Engineering*, 99 (2016). 445–452.
- [90] P. Kasten, J. Vogel, I. Beyen, S. Weiss, P. Niemeyer, A. Leo ve R. Luginbuhl, *Journal of Biomaterials Applications* 23(2) (2008) 169-188.
- [91] B. Rai vd, K. H. Ho, Y. Lei, K. M. Si-Hoe, C. M. J. Teo, K. bin Yacob ve S. H. Teoh, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 65(11) (2007) 2195-2205.
- [92] W. J. Welsh, *Cosmetic Derm*, 11(13) (2000).
- [93] G. Fernandes ve S. Yang, *Bone Research*, 4 (2016) 16036.
- [94] K. Schallmoser ve D. Strunk, *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 32 (2009) 1-4.
- [95] J. A. Textor ve F. Tablin, *Veterinary Surgery*, 41(7) (2012) 784–794.
- [96] S. C. N. da S. Santos, Ó. E. Sigurjonsson, C. de A. Custódio ve J. F. C. da L. Mano, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24(6) (2018) 454-462.
- [97] M. Bernardi, F. Agostini, K. Chierigato, E. Amati, C. Durante, M. Rassu ve G. Astori, *Journal of Translational Medicine*, 15(1) (2017) 90.
- [98] M. Sadeghi-Ataabadi, Z. Mostafavi-Pour, Z. Vojdani, M. Sani, M. Latifi ve T. Talaei-Khozani, *Materials Science and Engineering: C*, 71 (2017) 372–380.

- [99] A. R. Sánchez, P. J. Sheridan ve L. I. Kupp, *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(1) (2003) 93-103.
- [100] M. Çakır ve M. C. Durmuşlar, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24(2) (2014) 336-342.
- [101] G. Armutçu, *Periodontal Kemik İçi Defektlerin Tedavisinde Trombositten Zengin Plazma ve Otojen Kemik Grefti ile Kombinasyonunun Etkinliğinin Klinik ve Radyografik Olarak Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011.
- [102] B. Kutlu, *Trombositten Zengin Plazma Emdirilmiş Kitosan Temelli Taşıyıcıdan PDGF, TGF-B ve IGF-1 Büyüme Faktörlerinin Salım Kinetiklerinin Saptanması ve Kitosan Taşıyıcı Jel ile Uygulanan Trombositten Zengin Plazmanın Periodontal Ligament Hücreleri ve Sementoblastlar Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi: İn Vitro*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
- [103] Y. Fei, G. Gronowicz ve M. M Hurley, *Current Pharmaceutical Design*, 19(19) (2013) 3354–3363.
- [104] P. Parsons, A. Butcher, K. Hesselden, K. Ellis, J. Maughan, R. Milner ve A. Horner, *Journal of Orthopaedic Trauma*, 22(9) (2008) 595-604.
- [105] R. Cancedda, P. Giannoni ve M. Mastrogiacomo, *Biomaterials*, 28(29) (2007) 4240–4250.
- [106] E. H. Gumieiro, M. Abrahão, R. S. Jahn, H. Segretto, M. T. D. S. Alves, M. T. U. Nannmark ve L. L. Dib, *Acta Cirurgica Brasileira*, 25(3) (2010) 257–263.
- [107] Y.-G. Koh ve Y.-J. Choi, *The Knee*, 19(6) (2012) 902–907.
- [108] Y. Yamada, S. Nakamura, M. Ueda ve K. Ito, *Clinical Oral Implants Research*, 24(4) (2013) 468–474.
- [109] Y. Yamada, M. Ueda, H. Hibi ve S. Baba, *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 26(4) (2006) 362-369.
- [110] M. Kanişkar, H. D. Tailor ve W. S. Khan, *The Open Orthopaedics Journal*, 5 (2011) 271-275.
- [111] Y. Yamada, K. Hara, S. Nakamura, M. Ueda, K. Ito ve T. Nagasaka, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2) (2013) 260–263.
- [112] M. Sánchez, D. Delgado, A. Garate, P. Sánchez, J. Oraa, A. M. Bilbao, A. M ve S. Padilla, *Plasma Medicine-Concepts and Clinical Applications*, IntechOpen, Bölüm 3, 2018.
- [113] S. Nayak, G. Manivasagam ve D. Sen, *Current Osteoporosis Reports*, 16(2) (2018) 169-181
- [114] S. Kanthan, G. Kavitha, S. Addi, D. Choon ve T. Kamarul, *Injury*, 42(8) (2011) 782–789.
- [115] M. Latalski, Y. A. Elbatrawy, A. M. Thabet, A. Gregosiewicz, T. Raganowicz ve M. Fatyga, *Injury*, 42(8) (2011) 821–824.

- [116] R. Mcgoldrick, A. Chattopadhyay, C. Crowe, G. Chiou, K. Hui, S. Farnebo S ve J. Chang, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 140(6) (2017) 1169-1184.
- [117] L. Gato-Calvo, J. Magalhaes, C. Ruiz-Romero, F. J. Blanco ve E. F. Burguera, *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 10 (2019) 1-18.
- [118] W. A. R. Neto, I. H. Pereira, E. Ayres, A. C. de Paula, L. Averous, A. M. Góes ve R. E. S. Bretas, *Polymer Degradation and Stability*, 97(10) (2012) 2037-2051.
- [119] G. Irmak, 3 Boyutlu Yazıcı ile Metakrilatlanmış Jelatin/PRP Hidrojel ve Mezenkimal Kök Hücre içeren Osteokondral Gradyan Sistemlerin Hazırlanması ve İn-Vitro Etkinliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- [120] Z. Z. Zhang, D. Jiang, S. J. Wang, Y. S. Qi, J. Y. Zhang ve J. K. Yu, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(28) (2015) 15294-15302.
- [121] M. Çalış, 17 β -Östradiolün Kitosan-Hidroksiapatit Yapıdaki Doku İskelesine Yüklene Yağ Dokusundan Türetilmiş Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Osteojenik Etkisinin Deneysel Kemik Defekti Modelinde Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2012.
- [122] T. Jiang, E. J. Carbone, K. W. H. Lo ve C. T. Laurencin, *Progress in Polymer Science*, 46 (2015) 1-24.
- [123] H. L. Kim, G. Y. Jung, J. H. Yoon, J. S. Han, Y. J. Park, D. G. Kim ve D. J. Kim, *Materials Science and Engineering: C*, 54 (2015) 20-25.
- [124] B. Iqbal, Z. Sarfaraz, N. Muhammad, P. Ahmad, J. Iqbal, Z. U. H. Khan ve A. Rahim, *Polymer Edition*, 29(10) (2018) 1168-1184.
- [125] M. A. Bakar, P. Cheang ve K. A. Khor, *Journal of Materials Processing Technology*, 89 (1999) 462-466.
- [126] Z. Hong, P. Zhang, C. He ve X Qiu, A. Liu, L. Chen ve X. Jing, *Biomaterials*, 26(32) (2005) 6296-6304.
- [127] Y. Hu, S. R. Winn, I. Krajbich ve J. O. Hollinger, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 64(3) (2003) 583-590.
- [128] A. R. Sadeghi, S. Nokhasteh, A. M. Molavi, M. Khorsand-Ghayeni, H. Naderi-Meshkin ve A. Mahdizadeh, *Materials Science and Engineering: C*, 66 (2016) 130-137.
- [129] A. Oushabi, S. Sair, F. O. Hassani, Y. Abboud, O. Tanane ve A. El Bouari, *South African Journal of Chemical Engineering*, 23 (2017) 116-123.
- [130] E. Sharifi, M. Azami, A. M. Kajbafzadeh, F. Moztafzadeh, R. Faridi-Majidi, A. Shamousi ve J. Ai, *Materials Science and Engineering: C*, 59 (2016) 533-541.
- [131] H. Yoon, G. H. Kim ve Y. H. Koh, *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition*, 21(2) (2010) 159-170
- [132] C. C. Lin, S. J. Fu, Y. C. Lin, I. K. Yang, I. K ve Y. Gu, *International Journal of Biological Macromolecules*, 68 (2014) 39-47.

- [133] Z. Karahaliloğlu, B. Ercan, S. Chung, E. Taylor, E. B. Denkbaş ve T. J. Webster, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12) (2014) 4598-4608.
- [134] C. Y. Tham, Z. A. A. Hamid, Z. A. Ahmad ve H. Ismail, *Key Engineering Materials*, 594 (2014) 214-218).
- [135] T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane ve R. Langer, *Nature Nanotechnology*, 6 (2011) 13-22.
- [136] J. H. Lee, J. Nam, H. J. Kim ve J. J. Yoo, *Biomedical Materials* 10(2) (2015) 025002.
- [137] H. Wang, Y. Feng, H. Zhao, R. Xiao, J. Lu, L. Zhang ve J. Guo, *Macromolecular Research*, 20(4) (2012) 347-350.
- [138] Y. Chen, J. Lin, Y. Fei, H. Wang ve W. Gao, *Fibers and Polymers*, 11(8) (2010) 1128-1131.
- [139] L. Diaz-Gomez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, M. Silva, F. Dominguez, F. A. Sheikh ve J. Macossay, *Materials Science and Engineering: C*, 40 (2014) 180-188.
- [140] J. E. Fernández-Barbero, P. Galindo-Moreno, G. Ávila-Ortiz, O. Caba, E. Sánchez-Fernández ve H. L. Wang, *Clinical Oral Implants Research*, 17(6) (2006) 687-693.
- [141] P. Metcalfe, L. M. Williamson, C. P. Reutelingsperger, I. A. N. Swann, W. H. Ouwehand ve A. H. Goodall, *British Journal of Haematology*, 98(1) (1997) 86-95.
- [142] W. Jy, L. L. Horstman, H. Park, W. W. Mao, P. Valant ve Y. S. Ahn, *American Journal of Hematology*, 57(1) (1998) 33-42.
- [143] N. Zhang, K. Wang, Z. Li ve T. Luo, *Cell and Tissue Banking*, (2019) 1-15.
- [144] S. Ruan, J. Deng, L. Yan ve W. Huang, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(6) (2018) 4569-4577.
- [145] J. P. Rodriguez, M. Gonzalez, S. Rios ve V. Cambiazo, *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(4) (2004) 721-731.
- [146] Y. Meng, Y. X. Qin, E. DiMasi, X. Ba, M. Rafailovich ve N. Pernodet, *Tissue Engineering Part A*, 15(2) (2009) 355-366.
- [147] M. C. Yu, K. M. Chan, C. F. Lee, Y. S. Lee, F. Z. Eldeen, H. S. Chou, M. F. Chen ve W. C. Lee, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(8) (2011) 1440-1449.
- [148] W. Shao, J. He, F. Sang, B. Ding, L. Chen, S. Cui ve W. Tan, *Materials Science and Engineering: C*, 58 (2016) 342-351.
- [149] L. Chen, X. Lu, S. Li, Q. Sun, W. Li ve D. Song, *Orthopedics*, 35(9) (2012) e1402-e1409.
- [150] E. Sunal, *Periodontal Rejenerasyon için Kitosan/nano-Hidroksiapatit/PCL Bariyer Membranların Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.*
- [151] W. Kim, C. H. Jang ve G. Kim, *Materials Science and Engineering: C*, 78 (2017) 763-772.

- [152] L. N. Xie, P. Wang, J. L. Pan, Z. Sun ve F. Z. Cui, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25(6) (2010) 603–621.
- [153] Y. T. Zhang, Z. Pan, L. H. Xia, X. N. Liu, X. L. Guo, Y. He ve J. D. Ding, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 5(10) (2015) 757-765.
- [154] Y. Nakatani, H. Agata, Y. Sumita, T. Koga, I. Asahina, *Archives of Oral Biology*, 73 (2017) 172-178.
- [155] Y. Roussy, M. P. Bertrand Duchesne ve G. Gagnon, *Clinical Oral Implants Research*, 18(5) (2007) 639-648.

7. EKLER

EK 1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1319

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27 EYLÜL 2017 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2017/21
Proje No : GO 17/671 (Değerlendirme Tarihi: 24.08.2017)
Karar No : GO 17/671- 23

Üniversitemiz Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU' nun sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Soner ÇAKMAK, Gülseren IRMAK ile birlikte çalışacakları ve Sena KOÇ' un yüksek lisans tezi olan, GO 17/671 kayıt numaralı, "*Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri*" başlıklı proje önerisi araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye) | İZİNLİ |
| 4. Prof. Dr. Neadet SAĞLAM (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | İZİNLİ |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| İZİNLİ | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin TURNAGÖL (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | İZİNLİ |
| | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye) |
| | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |

EK 2: Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı



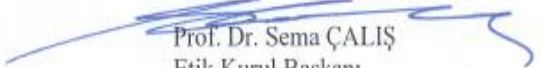
T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 34

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 26.02.2019 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2019/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/24 (2.Onay Tarihi : 04.09.2018)
KARAR NUMARASI	: 2019/02 – 15
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Arş. Gör. Dr. Soner ÇAKMAK
HAYVAN DENEYLERİNDE	Dr. Öğr. Üyesi Mert ÇALIŞ, Arş. Gör. Sena KOÇ, Arş.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Gör. Tülay Selin ERTEKİN, Gülseren IRMAK, Arş. Gör. Dr. Mahmut Muhsin YILMAZ
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 32 Adet Wistar Albino Rat (200-250g)

Kurulumuzun 29.05.2018 tarihli toplantısında 2018/24 kayıt numarası onaylanmış olan “*Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri*” başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 05.02.2019 tarihli başlık değişikliği ve araştırmacı revizyonu dilekçeniz, Kurulumuzun 26.02.2019 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve **uygun bulunmuştur**. Araştırmanın başlığı “*Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftlerinin in vivo Etkinliğinin İncelenmesi*” olarak ve proje yürütücüsü Arş. Gör. Dr. Soner ÇAKMAK olarak değiştirilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Sema ÇALIŞ çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 26.02.2019 (SALI)
TOPLANTI SAATİ : 13.30
TOPLANTI SAYISI : 2019/02
PROJE NUMARASI : 2018/24
KARAR NUMARASI : 2019/02-15

(KATILMADI) Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Ömek BÜKEN (Üye)	 Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
 Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	(İZİNLİ) Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
(İZİNLİ) Doç. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)	 Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	 Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
 Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	 Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
 Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	(İZİNLİ) Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	 Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 20/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA DESTEKLİ SIKIŞTIRILABİLİR KEMİK GREFTLERİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 89 sayfalık kısmına ilişkin, 20/06/2019 tarihinde ~~gözetim~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %8'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~çözümler~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: SENA KOÇ
Öğrenci No: N16126761
Anabilim Dalı: KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

20.06.2019

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı: Sena KOÇ
Doğum Yeri: Kocaeli
Medeni Hali: Bekar
E-posta: senakoc.41@gmail.com
Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

Eğitim

Lise: Merkez Bankası Derince Anadolu Lisesi (2011)
Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (2016)
Fachhochschule Köln, Proses Mühendisliği (Erasmus) (2015)
Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (2019)
Hacettepe Üniversitesi Polimer Bilimi ve Teknolojisi (1 dönem) (2017)

Yabancı Dil ve Düzeyi:

İngilizce (ileri), Almanca (orta)

İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi - Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye (2018-halen).

Üretim Stajyeri – BASF Dilovası Fabrikası, Kocaeli, Türkiye (2014).

Araştırma Alanları:

- Doku mühendisliği
- Hücre kültürü çalışmaları
- Biyomalzemeler
- Polimerik nanofiberler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklen Lisansüstü Tez Projesi, Proje No: FYL-2018- 16974, Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri, 30,000 TL.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

Koç, S., Ertekin, T. S., Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri, Poster Sunumu, 13. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 3-6 Eylül 2018, Van, Türkiye.

Tezden Kazanılan Ödüller:

Koç, S., Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Trombositten Zengin Plazma Destekli Sıkıştırılabilir Kemik Greftleri, İlaç ve Eczacılık Kategorisi Üçüncülük Ödülü - 8. Kimya Ar-Ge Proje Pazarı, 27 Nisan 2019, İstanbul, Türkiye.

Tezden Üretilmiş Yayınlar: -