

**KRİYOJEL BAZLI DOKU İSKELELERİNE TESTOSTERON
VE 17- β ESTRADIOL YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI İLE SIÇANLARDA
KEMİK REJENERASYONUNUN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF RAT BONE REGENERATION WITH
THE USE OF CRYOGEL BASED SCAFFOLDS AND PLGA
NANOPARTICLES LOADED WITH TESTOSTERONE AND
17- β - ESTRADIOL**

DİLARA PERVER

**PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR
PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU**

Tez Danışmanları

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Genel Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

DİLARA PERVER' in hazırladığı “**Kriyojel Bazlı Doku İskelelerine Testosteron Ve 17- β Estradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Kullanımı İle Sıçanlarda Kemik Rejenerasyonunun İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Danışman

.....

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan

.....

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye

.....

Prof. Dr. Handan YAVUZ

Üye

.....

Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Üye

.....

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

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

- 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 başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/06/2015

DİLARA PERVER

ÖZET

KRİYOJEL BAZLI DOKU İSKELELERİNE TESTOSTERON VE 17- β ESTRADIOL YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI İLE SIÇANLARDA KEMİK REJENERASYONUNUN İNCELENMESİ

Dilara PERVER

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Haziran 2015, 122 sayfa

Sunulan tez çalışmasında, kemik doku rejenerasyonuna yönelik olarak Testosteron (TST) ve 17- β estradiol (E2) yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) PLGA nanopartikül-PHEMA/Jelatin doku iskelesi sistemi geliştirilmesi ve oluşturulan sistemin *in-vitro* ve *in-vivo* etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk kısmında salım çalışmaları ve *in-vitro* hücre kültür çalışmaları için kullanılmak üzere uygun kriyojel doku iskele yapısı belirlenmiştir. 1/6 PEGDA poli(etilenglikol diakrilat) ve 1/20 gluteraldehit çapraz bağlayıcı içerikli PHEMA poli(2-hidroksietil metakrilat) iskeleler kriyojelleşme yöntemi ile farklı HEMA (2-hidroksietil metakrilat) ve Jelatin monomer bileşimlerinde sentezlenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonrası %10 HEMA %4 Jelatin içerikli PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesinin kullanımına karar verilmiştir.

Tez çalışmasının diğer aşamasında emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemi ile poli-laktik asit/poli-glikolik asit kopolimerlerinden (PLA/PGA 65:35), boş ve TST ve/veya E2 yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucu, boş ve hormon yüklü partikül büyüklüklerinin sırasıyla yaklaşık 200 ve 250 nm olduğu saptanmıştır. Üretilen nanopartiküllerin TST enkapsülasyon veriminin %63, E2 enkapsülasyon veriminin ise %53 olduğu, belirlenmiştir. Nanopartiküllerden TST salım çalışması 62 gün sürdürülmüş ve nanopartiküllere yüklenen TST'nin %75'inin salındığı saptanmıştır.

TST veya E2 yüklü nanopartiküller önceden hazırlanan doku iskelelerine emdirilerek yüklenmiş ve SEM görüntüleri alınarak yapıya başarılı bir biçimde katıldıkları gözlemlenmiştir. Doku iskelelerinden salım çalışması TST için 62 gün, E2 için 35 gün sürdürülmüştür. 62 günde TST'nin %62'si, 35 günde E2'nin %45'inin salındığı saptanmıştır.

TST ve/veya E2 içeren PLGA nanopartikül-PHEMA/Jelatin kriyojel doku iskelesi sisteminin osteojenik aktivitesi ADMSC'ler kullanılarak *in-vitro* koşullarda hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir. Doku iskelelerinde hücre üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile hücrelerin doku iskelesi içerisindeki morfolojileri ise SEM (taramalı elektron mikroskobu) ile belirlenmiştir. Erken dönem osteojenik farklılaşma, ALP (alkalen fosfataz) aktivitesinin ölçümü ile belirlenmiştir. RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile ADMSC'lerin kollajen I, runX2, osteokalsin, osteopontin ve β -aktin ekspresyon (ifade) seviyeleri tespit edilmiştir. *In-vitro* çalışma sonuçlarına göre hücrelerin yapışması, üremesi ve farklılaşmaları üzerinde testosteron ve 17- β estradiol yüklü PLGA emdirilen doku iskelelerinin ayrı ayrı, nanopartikülsüz doku iskelelerine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca iki hormonun birden yüklü olduğu doku iskelelerindeki ADMSC'lerin yapışma, üreme ve farklılaşma özelliklerinin diğer gruplardan daha üstün olduğu belirtilmiştir.

Son aşama olarak, deney hayvanlarında kritik boyuttaki kranial defekt oluşturularak, farklı hormon yüklü doku iskeleleri defekt bölgesine implante edilmiş ve altı ile on iki haftalık inceleme süreleri sonunda morfolojik ve histolojik olarak incelenmiştir. *In-vivo* rejenerasyon çalışma sonuçları da *in-vitro* çalışma sonuçlarıyla paralellik göstererek, hormon yüklü implantların hormon içermeyen kriyojel implanta göre kemik doku ile daha uyumlu ve rejenerasyonu destekleyici olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: PHEMA-kriyojel, Testosteron, 17- β Estradiol, PLGA Nanopartiküller, Kontrollü salım, Kritik boyutlu defekt rejenerasyonu, Kemik doku mühendisliği.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RAT BONE REGENERATION WITH THE USE OF CRYOGEL BASED SCAFFOLDS AND PLGA NANOPARTICLES LOADED WITH TESTOSTERONE AND 17- β - ESTRADIOL

Dilara PERVER

Master of Sciences, Department of Biology

Supervisors: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

June 2015, 122 pages

The aim of the present study was to develop a system of testosterone (TST) and 17- β estradiol (E2) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles-PHEMA-Gelatin tissue scaffold and to investigate the *in-vitro and in-vivo* effectiveness of this system.

In the first part of the study, structure of cryogel tissue scaffolds was determined for the studies of hormone release and in vitro cell culture. Scaffolds which have different monomer concentrations of HEMA and gelatin were prepared by the method of cryogelation with the concentration of 1:6 PEGDA and 1:20 glutaraldehyde crosslinkers. After several characterization studies, content of 10% HEMA- 4% Gelatine was decided to use in PHEMA-gelatin cryogel as bone tissue scaffolds.

In the next steps of experiments, testosterone and 17- β estradiol loaded PLGA nanoparticles were prepared from the compositions of PLA/PGA (65:35) by using emulsion-solvent evaporation technique. Characterization studies showed that free and TST or E2 loaded particle sizes were approximately 200 nm and 240 nm, respectively. Encapsulation efficiency of nanoparticles was calculated as 63% and 53% for TST and E2, respectively by using UV spectrophotometer and HPLC. Release study from nanoparticles was continued up to 62 days and cumulative release (%) of TST from nanoparticles was determined as 75 %. TST and E2

loaded PLGA nanoparticles in the aqueous phase were loaded into the PHEMA-Gelatin scaffolds by embedding. SEM (scanning electron microscope) analysis observed that PLGA nanoparticles were successfully loaded into the scaffolds. *In-vitro* release studies indicated that 62 % of TST and 45 % of E2 was released from the scaffolds loaded with PLGA nanoparticles by embedding, during 62 and 35 days respectively.

In the other part of the study, osteogenic activities of TST and/or E2 loaded PLGA nanoparticles-PHEMA/Gelatin tissue scaffold were determined *in-vitro* cell culture studies by using ADMSCs. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT assay and morpho-logical examination was performed with SEM. Early cell differentiation was quantified by the determination of ALP (alkaline phosphatase) activity. Collagen I, RunX2, osteocalcin, osteopontin and β -actin expression levels were determined using RT-PCR (real time polymerase chain reaction).

According to the results, it was observed that nanoparticle loaded systems supported the osteogenic differentiation of ADMSCs and extracellular matrix mineralization much more than other scaffolds. Also, PHEMA-Gelatin tissue scaffolds which sorbed PLGA nanoparticles loaded with TST and E2 separately were found to be more effective on cell adhesion, proliferation and differentiation than the nanoparticles-free PHEMA-Gelatin tissue scaffolds. Additionally, superior properties at adhesion, proliferation and differentiation of the ADMSCs were noted on tissue scaffolds which loaded TST and E2 hormones both.

Finally, critical size cranial defects were created in experimental animals. Different hormones loaded tissue scaffolds were implanted in defects and were examined morphologically and histologically at the end of six and twelve-week study period. Regeneration study results are parallel with the *in vitro* studies: hormone loaded implant cryogels are more compatible with bone tissue and also, it has been shown to support regeneration.

Keywords: PHEMA-Cryogel, Testosteron, 17- β Estradiol, PLGA Nanoparticles, Controlled release, Critical size defect regeneration, Bone tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan, bana olan güvenini her daim hissettiğim, çok saygıdeğer hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Onur öncelikle danışmanım olmayı kabul ettiği için ve sonrasında tecrübe ve engin bilgilerini benimle paylaşıp tez çalışmalarına olan katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Eğitimim sırasında yol göstericiliğiyle her daim bana ışık tutan değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, eş danışmanım olması ve çalışmalarımın her aşamasına ayrı ayrı sağladığı tüm olanaklar ve verdiği tüm emekleri için teşekkürü borç bilirim.

Çok sevdiğim ve bir o kadar da saydığım ve kendime örnek aldığım değerli hocam Dr. Esin Akbay'a çalışmalarına olan büyük emeklerinin dışında vermiş olduğu güven, oluşturduğu sıcak çalışma alanı ve bana ayırdığı her bir dakika için ayrı ayrı teşekkür ederim.

Çalışmalarımın yürümesindeki önemli bilimsel katkıları ve öğretileriyle birlikte, sağladığı tüm imkanlar ve her daim olumlu duruşu için çok değerli ve sevgili hocam, Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Sağlamış oldukları labaratuvar olanakları ve tüm yardımları için sayın hocalarım Prof. Dr. Adil Denizli, Prof. Dr. Güldeniz Selmanoğlu ve Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Doç. Dr. Bora Garipcan, Prof. Dr. H. Hamdi Çelik ve Dr. Alper Vatansever'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Karşılıklı sevgi, saygı ve güven ortamında benimle geçirdikleri vakitlerde samimiyetle bana tüm kattıkları ve eşsiz yardımları için Mehmet Ozan Yücedağ'a, Tuğrul Tolga Demirtaş'a, Gülseren Irmak'a, Gizem Ertürk'e, Handan Sevim'e, Salih Güdücüler'e, İsmail Bekar'a, Özge Demirci'ye ve sevgili aileme sonsuz kez teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Bursu'ndan faydalandığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'nın Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir: Proje Numarası: 014 D01 601 012.

Dilara Perver

2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Doku Mühendisliği ve Yaklaşımları	4
2.2. Kemik Doku Mühendisliği	6
2.2.1. Kemik doku: Yapısı, oluşumu ve yenilenme özellikleri	6
2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımları	10
2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	11
2.3.1. Kök hücreler	11
2.3.2. Mezenşimal kök hücreler (MSC) ve Adiposit kökenli mezenşimal kök hücreler (ADMSC)	13
2.4. Kemik Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler	15
2.4.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri	15
2.4.2. Kemik doku mühendisliğinde doku iskeleleri	16
2.5. Kriyojeller	20
2.5.1. Jel-kriyojel farkı	23
2.5.2. Kriyojellerin farklı uygulama alanları	24
2.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyal Molekülleri	25
2.6.1. Steroid hormonlar: Testosteron ve Östrojen	26
2.6.2. Testosteron ve 17-β Estradiol'ün kemik üzerine etkileri	31
2.6.3. Testosteron ve östrojenin MSC'ler üzerine etkileri	34
2.7. Nanopartiküller ve Özellikleri	35
2.7.1. Nanopartikül sentezinde kullanılan polimerler ve PLGA	38
2.7.3. PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması	41
2.7.2. Nanopartikül üretim yöntemleri	42

2.7.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları	43
2.8. Kemik Rejenerasyonunda Hayvan Modelleri.....	43
2.8.1. Kranium (Kalvaria) Defektleri.....	45
2.8.2. Sıçanlarda İskelet Sistemi	46
2.8.3. Etik İlkeler ve İzin	46
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	48
3.1. Deneysel Malzemeler	48
3.2. PHEMA-Jelatin Kriyojel Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	49
3.2.1. Sentez çeşitleri: Farklı şekillerde ve bileşim oranlarında kriyojeller	50
3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları	52
3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	52
3.2.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrofotometre analizi	52
3.2.2.3. Şişme çalışmaları	52
3.2.2.4. Bradford yöntemi ile jelatin tutma analizleri	53
3.2.2.5. Mekanik analiz.....	53
3.3. Testosteron ve/veya 17- β Estradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	53
3.3.1. PLGA nanopartiküllerin sentezi ve partiküllere hormon yüklenmesi	54
3.3.2. PLGA nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları	54
3.3.2.1. PLGA nanopartiküllerin boyut ölçümü	54
3.3.2.2. Hormonların enkapsülasyon verimlerinin belirlenmesi.....	54
3.4. Salım Sistemlerinin Hazırlanması.....	55
3.4.1. PHEMA-Jelatin doku iskelelerine hormonla yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin yüklenmesi	55
3.4.2 SEM analizleri	55
3.4.3. Salım çalışmaları	56
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	57
3.5.1. ADMSC'lerin eldesi ve karakterizasyon çalışmaları	57
3.5.1.1. ADMSC'lerin izolasyonu	57
3.5.1.2. Akış sitometri analizi.....	59
3.5.1.3. Farklılaştırma Çalışmaları.....	60
3.5.2. İn-vitro kemik doku incelemesi için hücre kültürü koşulları	60
3.5.3. MTT analizi.....	62

3.5.4. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi	62
3.5.5. ALP aktivitesinin tayini.....	63
3.5.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri	63
3.5.7. İstatistiksel analiz	66
3.6. Hayvan Deneyi Çalışmaları	67
3.6.1. Cerrahi prosedür	68
3.6.2. Mikro bilgisayarlı tomografi (Micro CT) çalışmaları.....	69
3.6.3. Histolojik yöntem	70
3.6.4. İstatistiksel analiz	70
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE YORUMLAR	72
4.1. PHEMA-Jelatin Doku İskelelerinin Seçimi ve Karakterizasyon Çalışmaları... ..	72
4.1.1. SEM görüntülerinin alınması	74
4.1.2. Gözenek oranlarının belirlenmesi.....	76
4.1.3. Şişme oranlarının belirlenmesi	78
4.1.4. Kaybedilen jelatin miktarı tayini	79
4.1.4. FTIR analizi sonuçları.....	80
4.1.5. Mekanik dayanım testi sonuçları	81
4.1.6. Doku iskelesinin seçimi	81
4.2. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Salım Çalışmaları.....	82
4.2.1. PLGA Nanopartiküllerin TST ve E2 Enkapsülasyon verimleri	84
4.2.1. Nanopartiküllerin doku iskelesine yüklenmesi	84
4.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi görüntüleri	84
4.2.3. İn-vitro salım çalışmaları.....	86
4.2.3.1. PLGA nanopartiküllerden testosteron salımı sonuçları.....	86
4.2.3.2. PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinden testosteron ve 17-β estradiol salımı sonuçları	87
4.3. Hücre Kültür Çalışmaları	89
4.3.1. Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin karakteristikleri	89
4.3.2. MTT analizi sonuçları	91
4.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi görüntüleri	92
4.3.4 ALP aktivitesi tayini sonuçları	97
4.3.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçları..	100
4.4. Rejenerasyon Çalışmaları Sonuçları	104

4.4.1. Makroskopik bulgular.....	104
4.4.2. Mikro bilgisayarlı tomomografi (Micro CT) sonuçları	104
4.4.3. Histolojik analiz sonuçları	107
5. GENEL SONUÇLAR	112
KAYNAKLAR DİZİNİ	115
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı	5
Şekil 2.3. Kaynağına göre kök hücre çeşitleri.....	13
Şekil 2.4. Kök hücrelerin çevreyle etkileşimlerinin şematik gösterimleri	13
Şekil 2.5. Kollajenin denatürasyonu ile jelatin oluşumu	17
Şekil 2.6. Jelatinin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.7. PHEMA' nın kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.8. Kriyojel oluşumunun şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.9. (a) Kriyojellerin performansını etkileyen parametrelerin şematik gösterimi	22
ve (b) Süpermakrogözenekli kriyojelin kompozisyonu.....	22
Şekil 2.10. Steroid hormonların kimyasal yapıları ve başlıca sentez basamakları	28
Şekil 2.11. Erkek bireyde zamana bağlı testosteron seviyeleri.....	31
Şekil 2.12. Cinsel yaşam süresince kadında östrojen salgısı	31
Şekil 2.13. İlerleyen yaşla birlikte A) Kortikal kemik değişikliklerin şematik gösterimi. B) Trabular kemik değişikliklerin şematik gösterimi. C) Kemik kütleindeki azalışı gösteren temsili grafik.....	34
Şekil 2.14. Nanokapsül ve nanoküre yapısının şematik gösterimi ile biyobozunur nanopartiküllerin çeşitleri.....	36
Şekil 2.15. Nanopartiküllerin A) Yığın ve B) Yüzey erozyonu sonucu bozunması	36
Şekil 2.16. Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-koglikolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları ve PLGA polimerinin hidrolizi	40
Şekil 2.17. PLGA nanopartikülün hidrolizi ve etkin madde salım aşamaları [61]..	41
Şekil 2.18. Tekli emülsiyon w/o çözücü evaporasyon yöntemi ile nanopartiküllerin üretimi	43
Şekil 3.1. PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi deney grupları	50
Şekil 3.2. A. Doku iskelelerinden testosteron ve 17-β estradiol ile B.Nanopartiküllerden testosteron salım çalışması için hazırlanan salım sistemleri	58

Şekil 3.3. Sıçanlardan alınan yağ dokularının ADMSC izolasyonu için kültüre edilmesi.	58
Şekil 3.4. İn-vitro hücre kültür çalışmasında incelenen deney grupları, yapılan analizler ve günlerini gösteren şema.	61
Şekil 3.5. A. 8mm çaplı kritik boyutlu kranial kemik defekti açılması B.Malzemenin oluşturulan defekte yerleştirilmesi C. Kafa derisinin kapatılması	69
Şekil 3.6. Histoloji ve Micro CT incelemeleri için malzemelerin kafataslarından çıkarılması işlemi görüntüleri A. Kafatası derisinin kaldırılması B. Malzemeyle birlikte çıkarılan kafatası parçasının üstten görünüşü C. Malzemeyle birlikte çıkarılan kafatası parçasının alttan görünüşü.	70
Şekil 4.1. Farklı monomer oranlarına ve sentez şekillerine göre çeşitli kriyojel doku iskelelerinin 250x büyütmedeki SEM görüntüleri	75
Şekil 4.2. %4 jelatin içerikli, %8 HEMA (a,b,c,d) ve %10 HEMA (e,f,g,h) içeren PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. (a ile e x100, b ile f x250, c ile g x500, d ile h x1000 büyütme oranlarındadır).....	77
Şekil 4.3. Doku iskelelerinin zamana bağlı ortalama şişme oranlarını gösteren grafik (H:Hema, J:Jelatin)	78
Şekil 4.4. İskelelerin kaybettikleri jelatin miktarının yüzde değerlerini (sayısal ifadeler) ve birbirlerine göre kayıp oranlarını (renkli barlar) gösteren şema	79
Şekil 4.5. PHEMA kriyojel ve PHEMA-Jelatin kriyojelin infrared spektrumları.	80
Şekil 4.6. 17- β estradiol ve testosteron içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri: (a) x1000 (b)x2500, (c) ve (d) ~ x5000 (e) x10,000 (f) x20,000	85
Şekil 4.7. PLGA nanopartiküllerden testosteron salım grafiği.....	86
Şekil 4.8. Testosteron (TST) içeren PLGA nanopartiküllerin yüklendiği PHEMA-Jelatin kriyojel iskelelerden testosteron salım grafiği.....	87
Şekil 4.9. 17- β estradiol (E2) içeren PLGA nanopartiküllerin yüklendiği PHEMA-Jelatin kriyojel iskelelerden östrojen salım grafiği.....	88
Şekil 4.10. A) Sıçan kökenli ADMSC'lere ait akış sitometri analizi sonuçları. B. ve C. ADMSC'lerin pasaj 2' de alınan ters (inverted) mikroskop görüntüleri	90
Şekil 4.11. Boş PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri (Kontrol) , testosteron grubu doku iskeleleri, östrojen grubu doku iskeleleri ve TST+E2 grubu doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC'lere ait MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı	

farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2' li iskele iken ●● p<0.01, ●●● p<0.001).	91
Şekil 4.12. Dört farklı deney grubunun, kültürün 4. Ve 7. Günlerinde alınan SEM görüntüleri: A,B,C,D,E,F,G,H 2500x; a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede	93
Şekil 4.13. Dört farklı deney grubunun kültürün 4. ve 7. günlerinde alınan, farklı morfolojideki hücreleri göstermeyi amaçlayan 5000x büyütmedeki SEM görüntüleri	94
Şekil.4.14. Dört farklı deney grubunun, kültürün 14. ve 21. günlerinde alınan SEM görüntüleri: A,B,C,D,E,F,G,H 2500x; a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede	96
Şekil 4.15. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde çoğalan hücrelere ait ALP aktivitesi analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ## p<0.01; kontrol grubu TST+E2' li iskele iken ● p<0.05, ●● p<0.001).	98
Şekil 4.16. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC' lere ait bağıl tip I kolajen gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2' li iskele iken ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).	100
Şekil 4.17. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC' lere ait bağıl RunX2 gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2' li iskele iken ● p<0.05, ●●● p<0.001).	101
Şekil 4.18. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC' lere ait bağıl (A) OPN, (B) OCN gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu	

iskele iken # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, kontrol grubu TST+E2' li iskele iken • $p < 0.05$)	102
Şekil 4.19. (a) ve (b) 6 haftalık, (c) 12 haftalık inceleme için çıkarılan kriyojel implantların kemik doku ile entegrasyonlarının makroskobik görüntüsü.....	105
Şekil 4.20. Mikro CT görüntüleri (a) Üzerinde hiçbir işlem yapılmamış sıçan kraniyumu (KONTROL) ve kritik boyutta oluşturulmuş kraniyal kemik defektinin (SHAM) (b) 6 haftalık görüntüsü, (c) 12 haftalık görüntüsü.	105
Şekil 4.21. Mikro bilgisayarlı tomografi incelemesine alınan kraniyumların fotoğraf görüntüleri. (a ve b) Hormon içermeyen boş PHEMA doku iskelesi, (c ve d) Testosteron içerikli PHEMA doku iskelesi, (e ve f) Östrojen içerikli PHEMA doku iskelesi, (g ve h) her iki hormonu birden içeren doku iskelesi. (a,c,e,g) 6 haftalık incelemeye alınan deney gruplarına, (b,d,f,h) 12 haftalık incelemeye alınan deney gruplarına ait fotoğraflar.	106
Şekil 4.22. 6 haftalık implantasyonların Hematoksilin Eozin (A,B,C,D) ve Masson' s Trichrome (a,b,c,d) boyamalarına ait görüntüler: (A) ve (a) yalnız doku iskelesi grubuna (PHEMA); (B) ve (b) Testosteron içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST); (C) ve (c) Östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+E2); (D) ve (d) Testosteron ve östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST+E2) ait mikrograftlardır. M: İmplant edilen malzeme (PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi), CT: Bağ dokusu, NB: Yeni trabeküler kemik.	108
Şekil 4.23. 12 haftalık implantasyonların Hematoksilin Eozin (A,B,C,D) ve Masson' s Trichrome (a,b,c,d) boyamalarına ait görüntüler: (A) ve (a) yalnız doku iskelesi grubuna (PHEMA); (B) ve (b) Testosteron içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST); (C) ve (c) Östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+E2); (D) ve (d) Testosteron ve östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST+E2) ait mikrograftlardır. M: İmplant edilen malzeme (PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi), CT: Bağ dokusu, NB: Yeni trabeküler kemik.	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Kemik yenilenmesini regüle eden hormon ve faktörler [13]	9
Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyosinyaller ve özellikleri.....	27
Çizelge 2.3. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler	39
Çizelge 3.1. RT-PCR’ da kullanılan primer dizileri; F:Forward, R:Reverse.....	66
Çizelge 3.2. Hayvan deneyi rejenerasyon çalışmaları için kullanılan deney grupları ve miktarları.....	68
Çizelge 3.3. Histolojik skorum sistemi özeti	71
Çizelge 4.1. Farklı oranda (v/v) HEMA içeren doku iskelelerinin gözenek boyutları	76
Çizelge 4.2. PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin elastik modül (E) değerleri	81
Çizelge 4.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi ve Histolojik Analizlerin Tanımlayıcı İstatistik Bilgileri	110
Çizelge 4.4. Deneysel grupların Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan çoklu karşılaştırma analizi.....	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	mikro
K	kilo
m	mili
mm	milimetre
M	molar
n	nano
nm	nanometre
Pa	Pascal
v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/w	Ağırlık/Ağırlık Oranı

Kısaltmalar

α (PPAR α)	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
ADMSC	Adipoz Kökenli Mezenşimal Kök Hücre
ALP	Alkale Fosfataz
BMSC	Kemik İliği Kökenli Mezenşimal Kök Hücre
BMP	Kemik Morfojenik Protein
DMEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
DMAB	Dido desil dimetil amonyum bromür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco Fosfat Tampon Tuzu
E2	17- β Estradiol, Östrojen
ECM	Hücre Dışı Matris
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi
GA	Glikolik Asit
GH	Büyüme Faktörü
HCl	Hidroklorik Asit
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat

HMDS	Hekzametildisilazan
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
J	Jelatin
Kol I	Kollajen I
LA	Laktik Asit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MSC	Mezenşimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PEO	Polietilen oksit
PGA	Poli(Glikolik Asit)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
PLGA	Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
PS	Polistiren
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimerik Zincir Reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGA	Termogravimetrik Analizör
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TST	Testosteron

1. GİRİŞ

Klasik doku mühendisliği neredeyse yirmi yıl önce Langer ve Vacanti tarafından tanıtıldığı üzere izole edilmiş hücrelerin katı iskelelere ekimi anlamına gelir [1] ve hala çoğunlukla kullanılan bu teknolojidir. Bir biyomateryal olan doku iskeleleri ideal olarak biyolojik açıdan uyumlu ve bozunabilir özelliktedirler. Üretilen hücre-iskele yapıları otolog greftleme ve organ değiştirilmesi için umut verici bir alternatif olarak gösterilmektedir. 3B iskeleler, hücreler kendi fonksiyonel matrikslerini üretinceye kadar henüz oluşmamış hücre dışı matriksin (ECM) işlevini gerçekleştirmektedirler. Özellikle kök hücreler olmak üzere birçok hücre tipinin, bulunan proteinleri, substrat yüzey kimyası, yüzey sertliği, kimyasal taşınımı ve çözünebilir sinyalleri gibi ECM'nin birçok iç özelliğine karşı duyarlı olduğunun anlaşılması dolayısıyla, doku iskelelerinin yapısal özellikleri çok büyük önem arz etmektedir. Materyal kimyası, biyouyumluluğu, sertliği, porözlülüğü (gözenekliliği), gözenek boyutu ve geometrisi bir hücrenin nasıl "hissedeceğine" ve iskeleye ne şekilde tepki vereceğine kuvvetle etki eder.

Kriyojeller monomerik veya polimerik başlatıcıların donmuş çözeltilerinde üretilen jel yapılarıdır. Kriyojeller tipik olarak birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden oluşan açık hücre yapısına sahiptir. Bu yapıları sayesinde farklı boyda çözülmüş maddenin difüzyonuna, nano veya mikro partiküllerin kütle transferine ve hatta mikroorganizma ve hücrelerin kütle transfer ve difüzyon mekanizmalarına destek olacak niteliktedir. Bugüne kadar kriyojeller biyoteknolojide, kromatografik ayırma, hücrelerin veya biyomoleküllerin immobilizasyonu ve hücrelerin saflaştırılması gibi alanlarda kullanılmak üzere tasarlanmış ve uygulanmıştır [43]. Bunların dışında kriyojeller, hücrelerin üzerinde gelişimi ve üremesi için uygun üç boyutlu yapıya sahiptirler. Özellikle doku mühendisliğinde kullanılan destek malzemelerinin özellikleri hücre afinitesini büyük ölçüde etkilediği göz önüne alınarak, kriyojellerin birbiriyle bağlantı halinde süpermakro gözenekli bir yapıda olması, hücre gelişimi, üremesi ve doku oluşumu için uygun malzemeler olmalarını sağlar.

Nanopartiküller doğal ya da sentetik yapıdaki bileşenlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin (ilaç/biyojan/biyomolekül) partikül içinde çözüldürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı

matriks sistemlerdir [61]. PLGA; fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, nanopartikül sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyopolimerdir. PLGA, yapısındaki ester bağlarının hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit son ürünlerine bozunmaktadır. Polimerin bozunma davranışı salım kinetiğini belirleyen önemli bir parametredir [63].

Mezenşimal kök hücreler (MSC), multipotent özellikteki erişkin kök hücreleridir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MSC’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli ve dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar.

MSC’ler yüksek proliferasyon yeteneği ve çok iyi farklılaşma kapasitesine sahip oldukları için kemik rejenerasyonunda hücre kaynağı olarak kullanımları giderek artmaktadır [22]. Yetişkin kök hücreler arasında son yıllarda giderek artan bir öneme olan adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücreler (ADMSC), yağ dokusunun damardan zengin olan stromasından elde edilirler ve günümüzde yetişkin organizmasından alınan MSC’ler arasında kemik iliğinden sonra ikinci sırayı almaktadırlar. Yağ dokunun kolay ulaşılabilir olması, vücutta bol miktarda bulunabilmesi, erişilebilir erişkin kök hücre kaynaklarına sahip olması ve plastik cerrahi için rutin bir işlem olan yağ aldırma (liposakşın) tekniği ile elde edilebilmesi nedeniyle kök hücre çalışmalarında çok önemli bir kaynak haline gelen (ADMSC)’lerin, yağ, kemik, kıkırdak, kas ve sinir dokularına dönüşebildikleri gösterilmiştir.

Kemik oluşumu ve rejenerasyonu biyosinyal moleküller tarafından kontrol edilmektedir. Genlerin ürünü olan ve vücudun doğal işleyiş mekanizmasında çok önemli roller üstlenen biyosinyal moleküller; yapışma, yayılma, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonları düzenleyen çoğunlukla protein/peptit yapılı moleküllerdir. İzole edildikten sonra rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde büyük ölçekli üretilmekte, doku mühendisliği çalışmalarında ve klinikte tedavilerde kullanılabilirler. Vücutta

büyüme, farklılaşma ve üreme sisteminin fonksiyonları üzerinde etkili olup kolesterol türevi steroid yapıda olan testosteron ve östrojen hormonları kemik yapımı ve yıkımının düzenlenmesinde de görev almaktadırlar. Ayrıca bu hormonların MSC'ler üzerinde osteojenik farklılaşmayı etkilediği yönünde az sayıda ve özellikle testosteron açısından birbirleriyle çelişen çalışmalar yer almaktadır [57, 60].

Yukarıda da kısaca özetlenen literatür bilgisi ışığında, steroid yapılı Testosteron ve 17- β estradiol hormonlarının kriyojel doku iskelelerinden kontrollü salımının sağlanarak uzun dönemde kemik doku oluşumu üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sunulan tez çalışmasının amacı; kemik rejenerasyonuna yönelik olarak, en uygun monomer oranlarına sahip olabilecek kriyojel doku iskelesini belirlemek, testosteron ve 17- β estradiolün PLGA nanopartiküller yardımıyla kontrollü ve uzun dönem salımını gerçekleştirebilmek, hazırlanan iskeleler ile hormon yüklü nanopartiküllerin kullanımıyla testosteron ve östrojenin ADMSC'ler üzerindeki kemik farklılaşmasına olan etkilerini belirleyebilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği ve Yaklaşımları

Doku mühendisliği, yaşam bilimlerini ve mühendislik prensiplerini kullanarak doku ve organ fonksiyonlarını iyileştirmeyi, geliştirmeyi ve belli bazı durumlarda ise yeniden oluşturmayı da amaçlayan, başta malzeme mühendisliği, hücre biyolojisi ve tıbbi bilimler olmak üzere birçok alanın kesiştiği disiplinler arası bir bilim dalıdır [1].

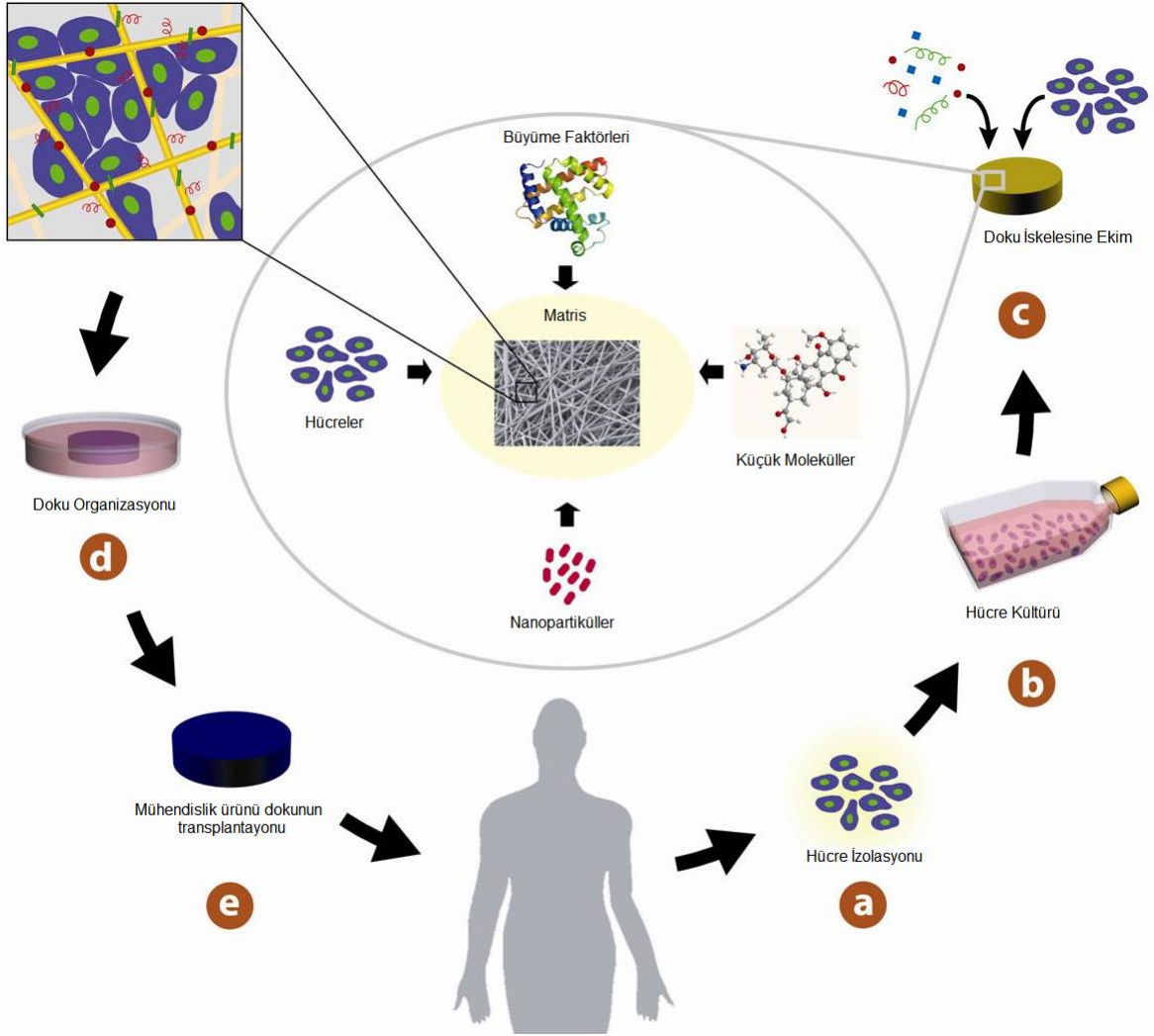
Çeşitli nedenlerle meydana gelen doku veya organ kayıplarında uygulanan en yaygın tedavi, doku/organ transplantasyonudur. Hastalardan dokuların alınması ve hastanın hasarlı bölgesine nakledilmesi için uygulanan cerrahi müdahaleler çoğunlukla başarılıdır. Ancak nakil işlemi için her zaman yeterli donör bulunamadığından ve ikincil cerrahi müdahaleler ile fazladan enfeksiyon riskleri içerdiğinden dolayı, işlevini yitiren doku/organların yenilenebilmesi veya ikame bir ürünle değiştirilebilmesi amaçlanarak yapay malzemeler kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılabilecek alternatif doku kaynakları, diğer insanlardan ya da bazı hayvanlardan alınan dokular ya da organlar da olabilmektedir. Ancak, implantasyon sonrasında oluşabilecek olumsuz immünojenik etkiler ve uygun donör organ bulunmasının zorluğu, bu kaynakların kullanımında da problem yaratmaktadır [2].

Her ne kadar kullanılacak yapay bir malzeme ile organların işlevsel bir biçimde yenilenebilmesi tam anlamıyla mümkün olmasa da, araştırmacılar 1960'lı yıllarda bu konudaki çalışmalara hız vermiş ve ortaya doku mühendisliği olarak adlandırılan, malzeme bilimi ile hücre biyolojisini birleştiren yeni bir çalışma alanı çıkmıştır [3]. Doku mühendisliğinin en çok kabul gören tanımı olarak denilebilir ki: Doku mühendisliği; biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin tek başlarına veya birlikte kullanılarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır [4].

Geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif sunan doku mühendisliği yaklaşımları dört ana başlık altında toplanabilir. Bunlardan ilki hasarlı bölgeye sadece biyomalzeme yerleştirilmesi ile tedaviyi amaçlayan yaklaşımdır. İkinci yaklaşımda ise ya hastadan izole edilip *in-vitro* ortamda çoğaltılan hücrelerin tekrar hastaya verilmesi yoluyla, ya da genetik olarak işlem görmüş hücrelerin hasarlı bölgeye

çeşitli yollar ile yerleştirilmesiyle sağlıklı doku oluşumu hedeflenmiştir. Üçüncü yaklaşımda hücrelerin yapışma ve farklılaşma gibi eğilimlerini arttıran biyosinyal molekülleri ile biyomalzemelerin birlikte kullanımı sayesinde hasarlı bölgenin tedavi edilmesi öngörülmüştür. Bu yaklaşımların ciddi doku hasarları ve kayıplarının olduğu bazı durumlarda yetersiz kalması dolayısıyla doku mühendisliğinin dördüncü yaklaşımı ortaya çıkmıştır.

Son zamanlarda en çok üzerinde durulan bu yaklaşımda, Şekil 2.1’ de şematik olarak açıklandığı gibi, hücre, biyomalzeme ve biyosinyal moleküllerinin bir arada kullanımı ile hasarlı dokunun yeniden yapılanması amaçlanmaktadır.



Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı [5]

Bu yaklaşımda öncelikle hastanın sağlıklı bölgesinden hücreler izole edilir ve uygun besi ortamında kültüre edilerek çoğaltılır. Çoğaltılan hücrelerin biyosinyal

moleküllerle birlikte, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç boyutlu doku iskelesi üzerine ekimleri yapılır. Doku iskeleleri, fonksiyonları onarmaya ve ana doku ile iletişimi desteklemeye yardımcı olmak amacıyla tasarlanmış, hücrelerin çoğalmalarına, farklılaşmalarına ve bu sayede yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirmelerine olanak vererek yapay bir hücre dışı matris görevi üstlenmiş biyomalzemelerdir. Son olarak, elde edilen yapı, doku hasarının olduğu bölgeye implante edilir. Ayrıca, hücre üremesini ve işlevini gerçekleştirmek üzere gerçek doku mikroçevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler de kullanılabilir [4].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

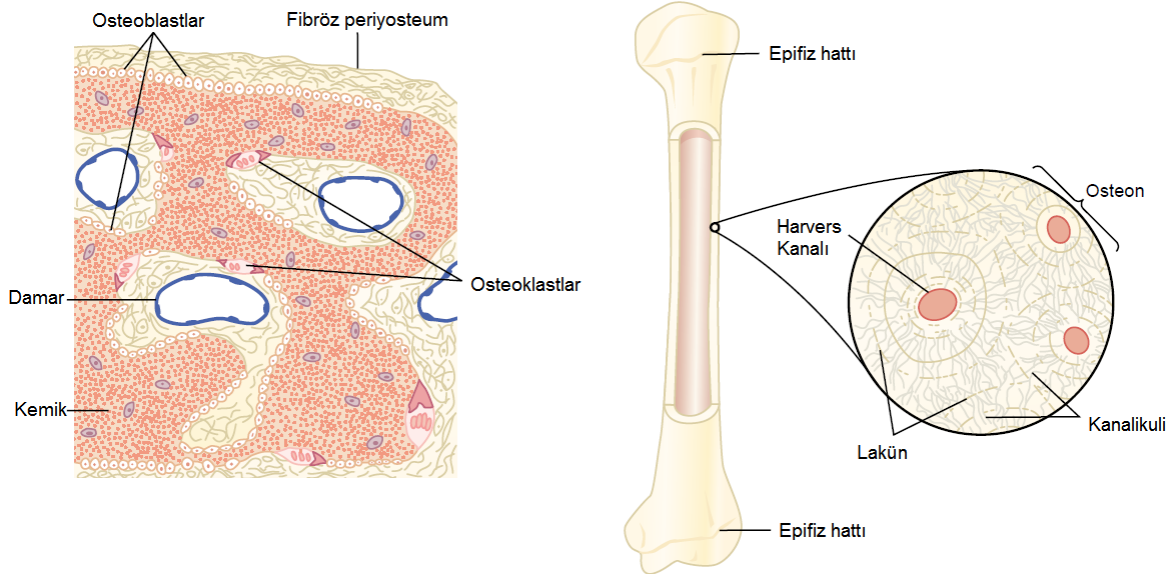
2.2.1. Kemik doku: Yapısı, oluşumu ve yenilenme özellikleri

Dişlerin mine katmanından sonra organizmadaki en sert doku, yumuşak doku ve organları destekleyen ve koruyan kemik dokusudur. Kemikler bundan başka kalsiyum ve fosfat gibi birçok iyonun depolanmasından ve gerekli durumlarda bu iyonların kontrollü salınımı ile vücut sıvılarındaki miktarlarının sabit kalmasından sorumludur [6].

Kemik matrisi, kemiğe elastiklik veren organik kısım (%30-35) ve kemiğe sertlik veren inorganik (%65-70) bileşenlerden oluşan kompozit bir yapıdır. Dokuya sertlik kazandıran inorganik maddelerin %85'lik kısmını kalsiyum ve fosfattan oluşan düşük kristaliniteye sahip, sitokiyometrik olmayan hidroksiapatit (HA) oluşturur. Kalsiyum karbonat, kalsiyum florid, magnezyum, hidroksit ve sülfat bileşikleri inorganik kısmın diğer önde gelen bileşiklerindedir. Organik kısmın ise, %95'i tip I kollajen ipliklerinden oluşur. Kollajen yapı, sert olan bu dokuya kolay kırılmamasını sağlayan elastiki bir form katar. İnorganik bileşiklerin oluşturduğu hidroksiapatit kristalleri bu kollajen ipliklerin üzerinde yerleşerek sertliğe katkıda bulunur. Bunun dışında organik kısmında Tip III-V-XI ve XIII kollajen, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler yer alır [6,7].

Olgunlaşan kemikler iki tiptir. Bunlar süngerimsi (trabeküler) kemik ve kompakt (kortikal, sıkı, sert) kemiklerdir. Süngerimsi kemik, birbiriyle ağzlaşan kemik trabeküllerinden oluşurlar. Trabeküllerin aralarında kemik iliği ile dolu düzensiz boşluklar yer alır ve süngerimsi kemik toplamda %50-90 gözenekliliğe sahiptir. Sert kemikte ise toplam iskeletin % 20' sini oluşturur ve % 10 oranında

gözenekliliğe sahiptir. Kan damarları taşıyan mikroskobik kanallar içerir. Bunlar, sert kemiğin uzun eksenine paralel uzanan Havers kanalları ve bu kanalları birbirine bağlayan Volkmann kanallarıdır. Kan damarları bu kanallar içinden geçerek kemik iliğine kadar uzanır. Sonuç olarak Bir Havers kanalı volkmann kanalları aracılığıyla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Matris ve hücreler bu kan damarlarındaki besin maddelerinin difüzyonu ile beslenir [7]. Kemiğin makroskopik yapısının farklı kesitlerden şematik görüntüsü Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2. Kemik doku yapısı.

Kemiğin gelişiminde osteojenik hücre, osteoblast, osteosit ve osteoklast olmak üzere dört tip hücre vardır. Kemik doku hücreleri farklı kökenlerden türetilir ve farklı sinyallere yanıt vererek çoğalıp farklılaşırlar [8]. **Osteoblastlar** mezeneşimal kökenli hücrelerdir ve mineralize olmamış kemik matriksini (osteoid) sentezlerler. BMP (Bone Morphogenetic Protein), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-derived Growth Factor), IGF (Insulin like Growth Factor) ve TGF- β (Transforming Growth Factor) gibi birçok faktör osteoblastlar tarafından sentezlenip kemik matriksinde depolanırlar [9]. Bu faktörler içerdikleri hücreye özgül bağlanma bölgeleriyle ekstraselüler matrikste hücre göçü, tutunması ve hücre-hücre iletişimde görev alırlar. Osteoblastlar kemik oluşumunu düzenlediği gibi, salgılamış oldukları faktörler aracılığıyla osteoklastları etkileyerek dolaylı yoldan kemik rezorpsiyonunu da kontrol ederler.

Osteoblast hücrelerinin karakterizasyonu için kullanılan iki temel protein yapı alkalen fosfataz ve osteokalsindir [10].

Alkalen fosfataz (ALP), osteoblast hücreleri tarafından salgılanan bir hidrolaz enzimidir ve organik fosfat esterlerini hidrolize ederek minerali eritmekte görevlidir. Serbest kalan inorganik fosfatlar mineralizasyonda tekrar kullanılmak üzere döngüye katılır. Kemik oluşumu ve mineralizasyonda indikatör görevi gördüğü bilindiğinden dolayı tipik bir biyobelirteç olarak kullanılır. Osteoblast aktivitesiyle doğru orantılı olarak çalışılan numunede ALP miktarının da artması beklenir. Osteokalsin ise Vitamin-K ve vitamin-D bağımlı çalışarak osteoklast göçünde ve osteoblast fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir proteindir. Kollajen ise proteinler arasında matrikste en bol miktarda bulunandır. Kollajenden başka bulunan proteinlerinden biri de osteonektindir. Yüzeyinde birçok Ca⁺⁺ ve kollajen bağlama bölgeleri vardır. Osteopontin çok fonksiyonlu bir ECM proteindir: Hücre göçü ve mineral depolanma regülasyonlarından sorumludur. Bütün bu sayılan ECM proteinleri ile kemik matriksinde bulunan proteoglikan (dekorin, biglikan), glikoprotein (fibronektin, vibronektin), ve siyaloprotein yapıların her biri de osteoblastlar tarafından sentezlenip, salgılanır. Osteoblast yüzeyinde, tanımlanmış 50'nin üzerinde hücre tutunma molekülü yer alır. Bu moleküller, integrinler, kaderinler, selektinler ve immunoglobulin süper ailesinin üyelerindedir. Başta integrin olmak üzere bu yüzey proteinleri hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimlerinden sorumludur [11].

Osteoklastlar ise hematopoietik kökenli hücreler olup monositlerin birleşmeleriyle şekillenir. Salgılamış oldukları asit ve proteazlarla kemik rezorpsiyonunda görevlidirler. **Osteositler**; osteoidlerin mineralizasyonu tamamlandıktan sonra onun içinde gömülü kalan osteoblastlardan oluşup, sıkı kemikte gözlenen en temel hücre tipidir. Stoplazmik uzantılarıyla kanalikuli adı verilen kanallar oluşturur ve aralarındaki iletişimi bu şekilde sağlarlar. **Osteoprogenitor hücreler**, kan dolaşımı ile kemik doku içerisine yayılan ve uygun faktörler aracılığıyla osteoblast olma yönünde koşullanmış mezenşimal hücrelerdir.

Kemikler, osteoblastik hücreleri içeren ve periosteum olarak adlandırılan bir dış zarla çevrilidir. Bu zar kollajen lifler ve fibroblastlardan İki kat halinde oluşmuştur: dış katı düzensiz sıkı bağ dokudan, iç katı ise hücreler bakımından daha zengindir. Kan damarları bakımından zengin olması dolayısıyla kemik yapımı ve onarımı sırasında aktif rol alır. Periosteumdan daha ince olan Endosteum ise kompakt kemiklerin iç yüzeyini ve süngerimsi kemikleri oluşturan trabeküllerin dış yüzeyini

kaplayan zardır ve retiküler bağ doku içerir. Kemik yapımı ve onarımı sırasında üzerindeki progenitör hücreler bölünerek osteoblastlara dönüşür [11].

Kemik oluşumunda iki farklı süreçten bahsedilir. Bunlar **intramembranöz kemikleşme** ve **endokondral kemikleşmedir**. Her iki kemikleşmede de, kemik yapı son şeklini alıncaya kadar bir taraftan yeni kemik yapılırken, diğer taraftan mineralize kemik yıkıma uğrar. Kemikleşme sürecini büyüme hormonu, paratiroid hormonu, kalsitonun ve cinsiyet hormonları kontrol eder. Büyüme sürecinde transkripsiyon faktörleri, sistemik ve lokal hormonlar (paratiroid hormonu gibi) osteoblastları çoğalma ve farklılaşma yönünde etkiler [12].

Intramembranöz kemikleşme, doğrudan mezenşimal dokudan kemik dokunun şekillenmesidir. Kafatası kemikleri, mandibula ve maksilla kemiklerinin bir kısmı bu tip kemikleşmeyle meydana gelir. Endokondral kemikleşmede ise, kemik dokunun oluşacağı alanlarda önce hiyalin kıkırdak doku şekillenir ve daha sonra yerini kemik dokuya bırakır.

Çizelge 2.1. Kemik yenilenmesini regüle eden hormon ve faktörler [13]

Kemik Yenilenmesini Düzenleyen Hormonlar	Kemik Yenilenmesini Düzenleyen Büyüme Faktörleri
Polipeptid Hormonlar	İnsülin benzeri büyüme (IGF) faktörü I ve II
Paratiroid Hormon	Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β)
Kalsitonin	süper ailesi,
İnsülin	Kemik morfogenetik proteinleri (BMP)
Büyüme hormonu	Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
Steroid Hormonlar	Platlet kökenli büyüme faktörü (PDGF)
1,2,5-Dihidroksi vitamin D3	Sitokin salgılayan İnterlökinler (IL)
Glikokortikoidler	Tümör nekroz faktörü (TNF)
Eşey Hormonları	Koloni stimüle edici faktör (CSF) ailesi
Tiroid Hormonları	

Kemik yenilenmesi, eski kemiğin rezorpsiyonu ve yeni şekillenen kemikle yer değiştirmesinden oluşan karmaşık bir süreçtir. Kemiğin rezorpsiyon ve formasyon fazları birbirini takip eder. Kemikteki anormallikler kemik yenilenmesini tetikler ve farklı hücre tipleri arasındaki iletişimle gerçekleşir ki bu etkileşimi değişik biyokimyasal ve mekanik faktörler sağlar. Tahmin edilebileceği gibi bu süreçte etkili temel hücreler osteoblastlar ve osteoklastlardır. Normal bir yetişkinde osteoklastlar tarafından resorbe edilen kemik miktarı ile osteoblastlar tarafından

oluşturulan yeni kemik miktarı arasında bir denge vardır. Bu dengenin bozulması sağlık açısından sıkıntılı durumlar yaratır.

Kemik yenilenmesi, basic multicelluler units (BMUs) olarak adlandırılan birbirlerinden bağımsız alanlarda yerleşmiş bulunan lakünlerde gerçekleşir. Bu da hücrel aktivasyonun otokrin ve parakrin faktörler sayesinde lokal olarak kontrol edilmesini sağlar. Salgılanan hormonlar ve faktörler farklılaşmamış hücrelerin replikasyonunu ve farklılaşmalarını düzenler. Bu düzenlemenin içinde görev alan hormonlar Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımları

Travma, kemik enfeksiyonları, konjenital anomaliler ve kas-iskelet sistemi tümör cerrahisi ile spinal cerrahi gibi işlemler sırasında oluşan kemik hasarlarını tedavi etmek amacıyla otolog kemik greftleri, allojenik greftler ile bunlara alternatif olarak kemik yerini tutabilecek metal ya da seramik malzemeler artan sıklıkla kullanılmaktadır [14]. Geleneksel tedavi, otogreft ya da allogreftlerin kullanımını içerir. Aynı bireyde bir bölgeden başka bir bölgeye nakledilen kemik dokuya **otogreft** denir ve biyouyumluluk ile füzyon açısından "altın standart" olarak kabul edilir. **Allogreft** ya da allojenik greft aynı türden fakat genetik olarak farklı iki birey arasında yapılan doku transferidir. **Zenogreft** ise, bir türden farklı bir türe yapılan doku naklidir. Fakat bu yöntemler, ideallikten uzaktır ve her birinin belli sorunları ve kısıtlamaları mevcuttur. Örneğin, allogreft ve zenogreftler, bağışıklık sisteminin tepkisine neden olmakta ve hastalık aktarım riski taşımaktadır. Sentetik malzemeler aşınmakta ve gerçek kemik gibi davranmamaktadır. Metallerin ise korozyona uğrama riski ve metal iyonlarını vücuda salma potansiyeli vardır. Fazladan cerrahi işlem gerektirmesi ve yeteri kadar büyük boyutta kemik elde edilememesi, operasyon sonrası aşırı duyarlılık ve uyuşma ile donör alan morbiditesi gibi nedenlerden dolayı otogreftler de uygulama kısıtlarına sahiptir [15].

Bu gibi sorunlardan dolayı son yıllarda "kemik doku mühendisliği" yaklaşımı ön plana çıkmıştır. Kemik doku mühendisliği, etraftaki dokudan kemik oluşumunu uyaracak sinyaller, hücreler ve diğer ajanlar için taşıyıcı görevi görecek bir iskelenin kullanımı ile kemik rejenerasyonunun sağlanması olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım kemik rejenerasyonu için tanımında yer alan dört bileşene ihtiyaç duyar: Büyüme ve farklılaşma sinyali, sinyale yanıt verecek hücre, sinyali hasarlı

bölgeye ulaştıracak ve daha sonra hücrenin çoğalması için taşıyıcı görevi yapacak uygun bir iskele ve canlı bir mikroçevre [16].

2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Kemik rejenerasyonu ile oluşacak doku yapılarının kalitesinde, kullanılan biyomateryaller temel oluşturmasına rağmen, hücre kaynağı kemik yenilenmesi için anahtar role sahiptir. Kemik doku mühendisliğinin temel elemanlarından olan hücrelerin elde edilmesi için uygun bir hücre kaynağının bulunması gerekmektedir [17]. Elde edilme ve çoğaltılma yönteminin kolaylığı, immünolojik olmaması ve oluşturulması hedeflenen dokuya benzer protein ekspresyonuna sahip olması kullanılacak hücrelerin seçimindeki önemli kriterlerdir.

Kemik dokunun elde edilebilmesi amacıyla osteoblastlar, osteoblast benzeri hücre hatları ve kök hücreler kullanılmaktadır. Son yıllarda, doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda, yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olan kök hücreler sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik rejenerasyonu sırasında bu hücreler osteoblastlara farklılaşmaktadır [17]. Şimdilerde periost, yağ, kas, kordon kanı gibi dokulardan mezemşimal kök hücre eldesi ve embriyonik veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin araştırılması yaygınlaşmıştır. Günümüzde doku mühendisliği çalışmalarında, kemik iliği en yaygın olarak kullanılan hücre kaynağıdır [17].

İzole edilen hücreler, yapılacak olan çalışmaya bağlı olarak farklılaştırılmadan kullanılabilceği gibi istenilen dokuya farklılaştırılarak da kullanılabilir. Farklılaştırılan bu hücreler, istenilen üç boyutlu doku iskelesi üzerinde kültüre edildikten sonra hasarlı bölgede kullanılır.

2.3.1. Kök hücreler

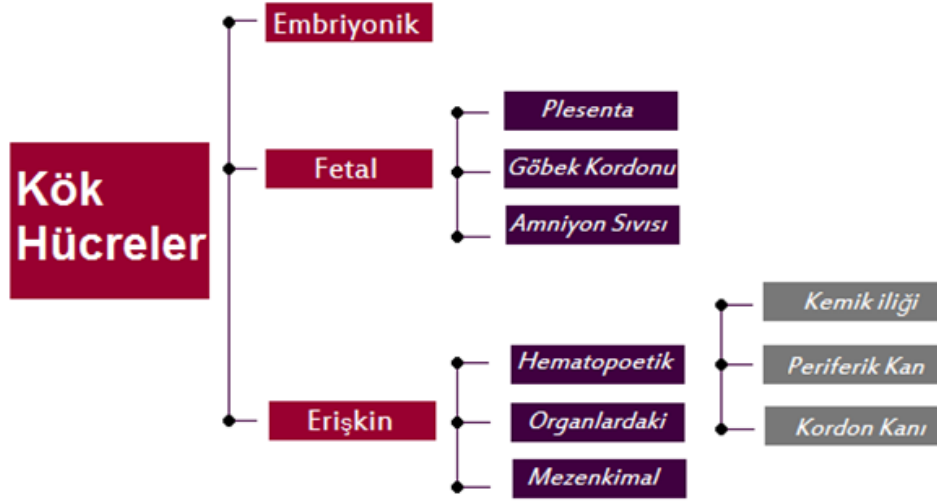
Kök hücre, henüz işlevsel olarak olgunlaşmamış, ancak uygun büyüme ortamına yerleşebilen, çoğalma yeteneği olan, çok sayıda farklılaşmış ve devam niteliğinde hücre üretebilen, yani kendi popülasyonunun devamını sağlayabilen hücrelerdir. Kök hücrenin tanımında da yer alan kendini yenileme özelliği, organizmanın yaşamı boyunca bir hücrenin kendi kopyasını alacak şekilde çoğalması ve gerektiğinde organ/dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilmesi anlamına gelir [19]. İnsanda dört günlük bir blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler **embriyon**

kök hücre olarak isimlendirilir. Çünkü bunlar embriyon gövdesine ait bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alacak olan organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine sahiptir (totipotent; totus: bütün). Bu aşamada embriyon gövdesi dışına çıkarıldıklarında deneysel yolla farklanmaları ve dokulardaki hücelere benzer hücelere dönüşebildikleri birçok kez gösterilmiştir. Ancak yüksek telomeraz enzimi etkinliği sonucunda kontrolsüz çoğalmayla tümör hücrelerine dönüşme olasılığı da yüksektir.

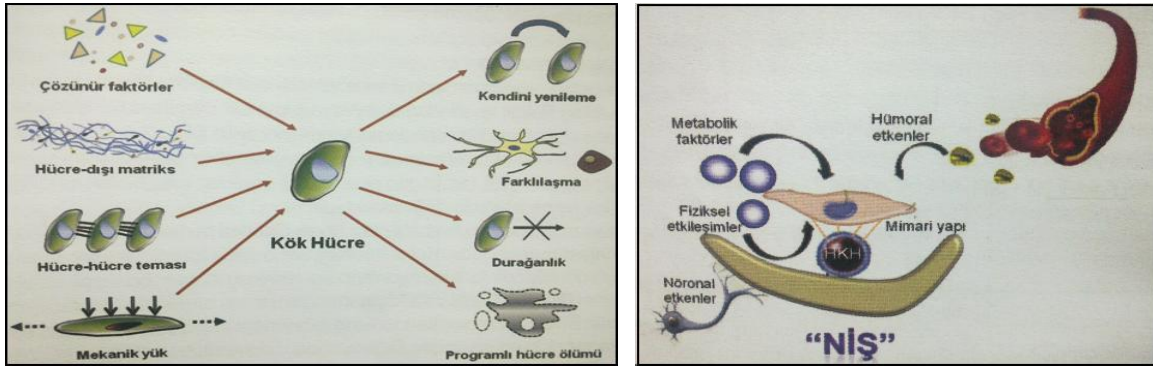
Öte yandan gelişmekte olan organizmada (fötal, prenatal, postnatal, infantil, çocukluk dönemleri) embriyon kök hücrelerinden söz etmek mümkün değildir. Başta kemik iliği olmak üzere çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen ve farklanabilen hücreler varlığını sürdürür. Bunlara **yetişkin kök hücreler** veya dokuya özgü kök hücreler adı verilmektedir. Bu hücreler totipotent özelliğe sahip olmadıkları için daha az sayıda hücre türüne farklılaşırlar, bu özellikleri nedeniyle kimi zaman öncü hücre (prokürsor veya progenitör) olarak da değerlendirilebilirler [20]. Elde edildikleri yere kök hücre çeşitleri şema olarak Şekil 2.3' de gösterilmiştir.

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri, kök hücrelerin bölünmeler esnasında bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini almasıdır. Bu olay asimetrik hücre bölünmesi sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar. Asimetrik hücre bölünmesi, hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesini gerektirir. Hücre içindeki asimetri, bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birisine aktarılmasıyla başarılır.

Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi ise hücrenin dış mikroçevresi (niş) tarafından yerine getirilir. Nişi oluşturan hücre dışı matriks bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri, kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Kök hücrelerin mikroçevresi ve çevreyle etkileşimleri Şekil 2.4'te şematik olarak gösterilmiştir. Kök hücrelerin kaderini temel olarak, çözünür faktörler, hücre dışı matriks bileşenleri, hücrelerarası temas ve biyofiziksel kuvvetler belirlemektedir [20].



Şekil 2.3. Kaynağına göre kök hücre çeşitleri



Şekil 2.4. Kök hücrelerin çevreyle etkileşimlerinin şematik gösterimleri

2.3.2. Mezenşimal kök hücreler (MSC) ve Adiposit kökenli mezenşimal kök hücreler (ADMSC)

Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MSC’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli ve dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözümler, hücreler arası veya hücre dışı matris ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadırlar. MSC tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; Plastik yüzeye

yapışması (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir [20].

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MSC'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Bunun dışında MSH'ler, adipoz doku, periferik kan, kordon kanı, karaciğer, kıkırdak dokusu, kas dokusu, diş pulpası ve fetal dokulardan da izole edilebilirler. Giderek artan sayıda deneysel araştırma ve klinik uygulamalarda bu hücrelerin hematopoetik kök hücre naklinden kardiyak, nöronal, iskelet sistemine ait hasarların onarımı, otoimmünite, solid organ nakline kadar çok geniş bir yelpazede kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir. MSC'ler elde edilme yöntemlerinin kolay olması, farklılaşma ve kendini yenileyebilme kapasitelerinin oldukça yüksek olması, çok farklı dokularda bulunmaları ve elde edildikleri doku dışında plastik kültür kaplarına yapışabilme özelliklerinin bulunmasından dolayı doku mühendisliğinde oldukça yaygın kullanıma sahiptirler [21].

Yağ dokusundan elde edilen mezenseşimal kök hücreler:

Yetişkin kök hücreler arasında son yıllarda giderek artan bir öneme sahiptir. Yağ dokusunun damardan zengin olan stromasından elde edilen bu hücreler günümüzde yetişkin organizmasından alınan MSC'ler arasında kemik iliğinden sonra ikinci sırayı almaktadırlar. Bu hücreler literatürde farklı isimler ve kısaltmalarla anılırlar. Adipoz kökenli kök hücresi (ASC), adipoz kökenli yetişkin kök hücresi (ADAS), adipoz kökenli yetişkin stroma hücresi (ADASC), adipoz kökenli stroma hücresi (ADSC), Adipoz mezenseşimal kök hücresi (ADMSC), lipoblast, pre-adiposit, işlenmiş lipospirat hücresi (PLA) aynı hücreler için kullanılan farklı terimlerdir [22]. Adipoz doku vücutta bol miktarda bulunabilmesi ve erişilebilir erişkin kök hücre kaynaklarına sahip olması nedeniyle doku iyileşmesi ve yenilenmesi için ümit vermektedir. ADMSC'lerin, adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik hatlara ve kardiyomiyositlere farklılaşma potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca çalışmalar, ADMSC'lerin nöron benzeri hücrelere, endotel, epitel hücrelere, hepatositlere, pankreatik hücrelere ve hematopoetik destekli hücrelere de farklılaşabildiğini göstermektedir [23].

Kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanılmaları için birtakım kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bunlar: Bol miktarda bulunmaları (milyon-milyar hücre), minimum

invaziv koşullarda izole edilmeleri, otolog ya da allojenik transplantasyonda etkili ve güvenli olmaları, çoklu hücre hattı boyunca ayarlanabilir ve çoğaltılabilir davranışta farklılaşabilmeleridir. Adipoz dokudan izole edilen mezenşimal kök hücreler bu kıstasların hepsine uymaktadır [24].

2.4. Kemik Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler

Potansiyel olarak doku mühendisliğinde uygulama alanı bulunan çoğu hücre tipi, bağlanma bağımlılığı (anchorage dependency) özelliğine sahiptir. Üç boyutlu biyomalzeme yapı iskeleleri, bu hücreler için bağlanma substratı olarak hizmet etmektedirler. İskelelerin mimari yapısıyla, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin, hücre canlılığının korunmasında, morfogenezinde ve hücresel işlevlerin temin edilmesinde önemi büyüktür. Bu yapılar, vücudun belirli bir bölgesine hücrelerin naklinde bir aktarım aracı olarak tasarlanmakta, ayrıca inşa edilen yeni doku organoidinin, yeterli düzeyde mekanik bütünlüğe ulaşana kadar geçecek süre içerisinde in vivo mekanik etkilere dayanmasını sağlamaktadırlar. Geçici hücre dışı matriks olarak hizmet veren bu yapıların bileşimi, hücre adezyon peptidleri, büyüme faktörleri, vd. işlevsel moleküllerle zenginleştirilebilmektedir.

2.4.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri

İdeal bir doku iskelesi yerleştirildiği alanda gerekli mekanik desteği sağlamalı; oluşturacağı dokunun büyümesine, hücre göçüne, vaskülarizasyona, oksijen ve besin maddelerinin difüzyonuna izin verebilecek seviyede porlu ve üç boyutlu (3D) bir mimariye sahip olmalı [25], iskele içine hücre göçünü indüklemeli; bulunduğu bölgeye özel hücre tipine farklılaşmayı desteklemeli (kodüktif) ve aktiveştirmeli (indüktif); iskele ve ev sahibi doku arasındaki hücre entegrasyonunu artırmalı; kontrollü biçimde parçalanabilmeli; açığa çıkardığı degradasyon ürünleri toksik olmamalı, kronik inflamatuvar yanıt oluşturmamalı ve biyoaktifliğini kaybetmeksizin steril edilebilmelidir [10].

İskele olarak kullanılacak malzeme enjekte edilebilir ya da üç boyutlu katı olabilir. Kullanılan malzemeler hücreli ve hücreli olarak ikiye ayrılabilir. Hücreli malzemeler katı, biyobozunur dolgu malzemeleri ya da kemik hücrelerinin yapı içine girmesini destekleyen gözenekli iskelelerdir. Hücreli malzemeler ise implantasyondan önce hücreli bileşenin eklendiği iskelelerdir [16].

2.4.2. Kemik doku mühendisliğinde doku iskeleleri

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak ideal malzemelerin sahip olması gereken 3 temel özellik vardır: i)Osteointegrasyon; yani malzemenin fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde yerleştirildiği kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesi, ii)Osteokondüksiyon; yani malzemenin yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesi, iii)Osteoindüksiyon; yani pluripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarabilme özelliği [4]. Osteoindüktif malzemeler, tedavi olmaksızın normal iyileşmenin gerçekleşmediği durumlarda, hasarlı bölgeye yerleştirildiğinde iyileşme sağlarken, osteokondüktif malzemeler iyileşmenin gerçekleştiği bölgede onarımı yönlendirir [16].

Hücrelerin doku iskelesinin iç bölgelerine yapışıp, yayılması ve üremesi, besinlerin aktarımı, hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu oluşan atık maddelerin uzaklaştırılması ve ayrıca damarlaşmanın gerçekleşmesi için ise içsel bağlantılı ve kontrol edilebilir gözeneklilik, kemik doku iskelelerinin sahip olması gereken bir diğer özelliğidir [26]. Eğer gözenek boyutları çok küçük olursa, gözenekler hücreler tarafından kapatılır, bu da hücresel penetrasyonuna, hücre dışı matris üretimine ve iskelenin iç kısımlarındaki damarlaşmaya engel olur. Gözeneklilik derecesi, mekanik dayanımı da etkilediğinden, doku iskelesinin gözenekliliği, yerine geçeceği dokunun gerektirdiği yeterli mekanik dayanımı sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır [14]. En az %90 gözeneklilik ve 100 µm civarındaki gözenek boyutları (uygulanacak kemiğin yapısına göre değişir), kemik rejenerasyonunun amaçlandığı doku iskeleleri için önerilen değerlerdir [26].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında, metaller, seramikler, polimerler (doğal ve sentetik) ve bunların birleşiminden oluşan kompozitler gibi çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Ancak metallerin biyolojik çevrede bozunur olmaması ve işlenebilirliklerinin sınırlı olması doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımları için dezavantajdır [27]. Seramikler ise çok düşük gerilme kuvvetine sahip olmalarından ve kırılma yapılarından dolayı eğilme, bükülme ve kayma geriliminin olduğu bölgelerde kullanılamamaktadırlar [25].

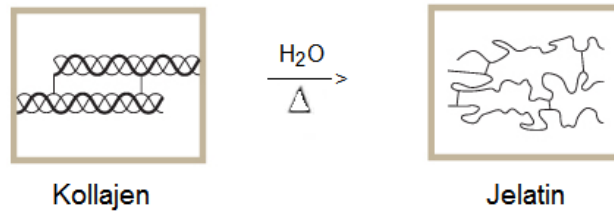
Polimerler ise ihtiyaca göre bileşimleri ve yapıları ayarlanabildiğinden, üstün tasarım esnekliğine sahiplerdir ve bu yüzden de doku iskelesi üretimi için oldukça cazip malzemelerdir [27]. Bu malzemelerin işlenmesi sonucu üretilen doku

iskeleleri, gerek kimyasal bileşim, gerekse fiziksel yapı bakımından doğal hücre dışı matrisin yapısını ve biyolojik işlevini mümkün olduğunca iyi bir şekilde taklit etmelidir [4]. Malzemenin, yerine geçeceği dokuya olan benzerliği oldukça büyük önem taşımaktadır. Deri, tendon, ligament, göz, kan damarları ve kalp kapakçıkları gibi yumuşak dokuyu oluşturacak doku iskeleleri, doğal ve sentetik polimerlerden, kemik gibi sert dokuyu oluşturacak doku iskeleleri ise seramik, polimer veya kompozitlerden oluşur.

Doğal polimerler:

Hayvansal veya bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal polimerler, vücuttaki hücre dışı matrise olan benzerlikleri, doğal çevredeki enzimlerle bozunabilme ve yüksek biyoyoumlulukları nedeniyle doku iskelesi malzemesi olarak sıkça tercih edilmektedir. Bununla birlikte, işlenmelerindeki zorluklar, bağışıklık sisteminde tepkiye neden olma ve hayvansal kökenli patojenleri aktarım riski gibi bazı dezavantajlara sahiptirler. Bunların yanı sıra kolayca denatüre olmalarından dolayı genellikle kimyasal modifikasyon gerektirirler ve bu da toksisiteye neden olabilmektedir [28]. Doğal polimerler, vücut içerisindeki enzimlerle bozunmaktadır. Bu enzimlerin özellikleri bireyden bireye değişiklik gösterdiğinden, doğal polimerlerin bozunma hızı da yine bireyden bireye değişiklik gösterir [14]. Kemik doku mühendisliğinde, kollajen, jelatin, fibrin, aljinat, ipek, hiyalüronik asit ve kitosan gibi doğal polimerler kullanılmaktadır [29].

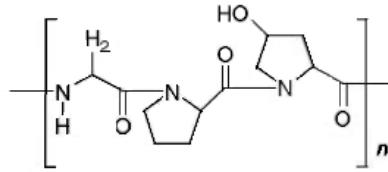
Jelatin: Sığır veya domuzun derisi, kemikleri ya da tendonlarından elde edilen kollajenin, sulu ortamda ısı ile muamelesi ile kısmi hidrolizi sonucu elde edilen doğal bir polimerdir: Şekil.2.5. Seyreltik asit ile muamele sonucu hazırlanan tip A'dır ve izoelektrik noktası 7 ile 9 arasındadır.



Şekil 2.5. Kollajenin denatürasyonu ile jelatin oluşumu

Alkali koşullarda denatürasyon ile hazırlanan tip B jelatinin ise izoelektrik noktası 4.6 ile 5.2 arasındadır. Jelatinin kimyasal yapısı Şekil 2.6'te gösterilmiştir.

Jelatinin tipik aminoasit dizisi alanin -glisin - prolin - arjinin - glisin - glutamik asit - hidroksiprolin - glisin - prolin şeklindedir. Jelatin bir hidrokolloiddir ve kendi ağırlığının 5-10 katı kadar su absorplayabilir. Ayrıca, alkol, kloroform ve eterde çözünmez [30]. Fiziksel koşullarda herhangi bir antijenik etki göstermez. Bunların dışında çeşitli formlarda üretilebilmesi ve düşük maliyetli olması jelatinin biyomedikal uygulamalarda tercih edilmesini kolaylaştırmaktadır. Diğer taraftan, biyomalzeme olarak kullanımını kısıtlayan zayıf mekanik özellikler göstermektedir. Jelatin, doku mühendisliği uygulamalarında genellikle hidrojel formunda kullanılmaktadır. Sulu çözeltilerde çözüdüğünden, uzun süreli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için çapraz bağlanması gerekmektedir. Çapraz bağlanma sonucu yapının termal ve mekanik dayanımı artmaktadır [31].



Şekil 2.6. Jelatinin kimyasal yapısı

Jelatin, biyouyumlu ve biyobozunur bir malzemedir. Vücut içerisinde toksik ve tahriş edici özellik göstermediğinden doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Sert ve yumuşak kapsüllerde, mikrokürelerde, yara örtü malzemelerinde ve vasküler protezlerde dolgu malzemesi olarak, cerrahi uygulamalarda ise emici tampon veya yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda daha geniş bir kullanım alanına sahip olan kollajen ile kıyaslandığında, jelatinin bazı avantajları vardır. Hazırlanması ve ekstrakte edilmesi daha kolaydır, dolayısıyla kollajenden daha ucuzdur ve daha yüksek bir üretim kapasitesine sahiptir. Kollajenin aksine, fiziksel koşullarda herhangi bir antijenik etki göstermez.

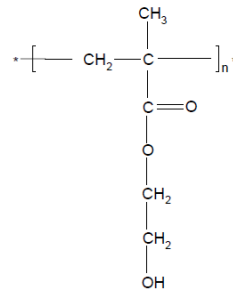
Sentetik polimerler:

Kimyasal ve mekanik özellikleri bakımından doku mühendisliği için mükemmel malzemelerdir. İstenmeyen patojen aktarımı veya bağışıklık sisteminin tepkisi gibi

durumlar açısından doğal polimerlere göre daha az tehlikelidirler. Doğal polimerler yüksek molekül ağırlıklı makromoleküllerdir ve bu yüzden işlenmeleri zordur. Oysa sentetik polimerlerin molekül ağırlığı, konfigürasyonu / konformasyonu, ayrıca fonksiyonel grupların içeriği gibi kimyasal ve fiziksel özellikleri değiştirilebildiğinden istenilen mekanik ve fiziksel özelliklere sahip polimerler üretilebilmektedirler [29].

Sentetik polimerlerin en önemli dezavantajı, bozunmaları sonucunda açığa çıkan, yüksek konsantrasyonlarda lokal asiditeyi arttırarak iltahaplanma veya fibröz enkapsülasyon oluşumu ile bağışıklık sisteminin tepkisine neden olan istenmeyen ürünleridir [33]. İlâveten, sentetik polimerlerin birçoğunun biyouyumlu olduğu söylenemez. Bu özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla, genellikle doğal polimerlerle birleştirilerek kullanılmaktadırlar [34]. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan sentetik polimerlerden bazıları, poli(α -hidroksi asit), poli(ϵ -kaprolakton), poli(propilen fümerat), polikarbonatlar, polifosfazener ve polianhidritlerdir [14].

Poli(2-hidroksietil metakrilat): Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), genellikle hidrojel formunda kullanılan hidrofilik karakterdeki sentetik bir polimerdir. Kimyasal yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir. PHEMA hidrojelieri biyolojik uygulamalar için ilk olarak Wichterle ve Lim tarafından üretilmiştir [35].



Şekil 2.7. PHEMA'nın kimyasal yapısı

Kısaca, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin çapraz bağlayıcı bir ajan varlığındaki çözelti içerisinde polimerleşmesi ile elde edilmektedirler. Üç boyutlu polimerik ağ,

- çapraz bağlayıcı ajan varlığında monomerin yığın polimerizasyonu,
- çözelti içerisindeki polimerin çapraz bağlanması,
- çözelti içerisindeki monomerin çapraz bağlayıcı ajan ile çapraz bağlanması ve polimerizasyonunun eş zamanlı olarak gerçekleşmesi

gibi yöntemlerle hazırlanmaktadır. Polimerizasyonun çok kısa bir sürede gerçekleşmesi ve başlangıç maddeleri sıvı formda olduğundan istenilen şekil ve boyutta ürün üretilmesi gibi avantajlarından dolayı son yöntem daha çok tercih edilmektedir. PHEMA hidrojel, kontakt lenslerin yapımında, implantlarda, doku iskelelerinde ve ilaç salım sistemleri gibi birçok biyomedikal uygulamada biyouyumluluğu, hidrofiliği, yumuşaklığı ve geçirgen olması gibi özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır [36]. Bunlara ilaveten, PHEMA temelli matriksler biyolojik kararlılığı ve minimum düzeyde özgül olmayan protein etkileşimleri göstermesi ile kandan proteinlerin saflaştırılmasında da kullanılmaktadır. PHEMA'nın kan ile olan uyumu sayesinde proteinlerin doğal konformasyonunda saflaştırılması mümkün olmaktadır [37]. Yapısı gereği, canlı dokulardakine benzer şekilde su içermektedir. Normal biyolojik reaksiyonlarda inerttir, biyolojik ortamlarda bozunmaya karşı dirençlidir, vücut tarafından emilmez, otoklavda steril edilebilir ve çok değişik şekil ve formlarda hazırlanabilir. Ayrıca, yüzlerce nanometreden yüzlerce mikrometreye kadar çok çeşitli gözeneklilik derecelerinde sentezlenebilmektedir [38].

Bütün bu olumlu özelliklerine rağmen, zayıf mekanik özellikleri, oldukça yavaş bozunma hızı bu hidrojellerin uygulama alanlarını kısıtlamaktadır. Ayrıca bozunma hızı oldukça yavaştır [39]. Bunun haricinde, hidrofilitésinin yüksek olması nedeniyle hidrojel yüzeyine zayıf hücre yapışması ve düşük protein emilimi, PHEMA-bazlı hidrojel hücre ekimi için elverişsiz hale getirmektedir [40].

Sonuç olarak, PHEMA, biyouyumlu bir malzeme olmasına rağmen, hem bozunma hızı oldukça yavaştır hem de hücrelerle uyumu yeterince iyi değildir Bu nedenle, PHEMA hidrojel çeşitli malzemelerle modifiye ederek doku mühendisliği alanı için daha elverişli bir hale getirilmelidir. Bununla ilgili literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır [40,41].

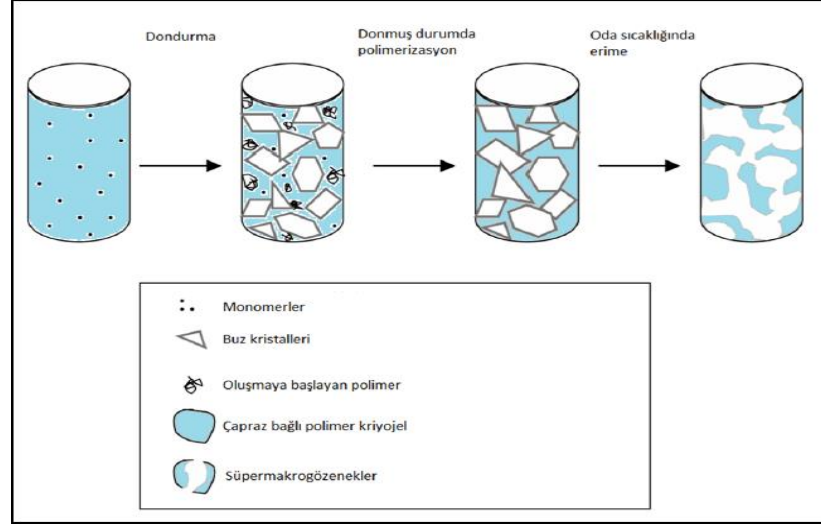
2.5. Kriyojeller

Kriyojel (Yunanca'da kri'os (kryos) anlamı buz ya da donma) monolitler, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan üç boyutlu jel matrikslerdir. Bir dizi sentetik ve doğal polimerler veya bunların birleşiminden üretilir. Bunlar polimer ağlarının hem fiziksel hem de kimyasal çapraz bağlanmasıyla oluşturulabilir [42].

Hidrofilik yapıdaki kriyojeller makrogözeneklere sahiptirler ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen polimerizasyon işlemi ile oluşturulurlar. Kriyojelasyonun temeli çözücünün kristallenmesidir. Bu olay, kriyojelasyonu, soğutmayla tetiklenen jelasyondan ayıran en temel özelliktir. Soğutma ile jelasyonda çözücüde faz geçişi olmaz.

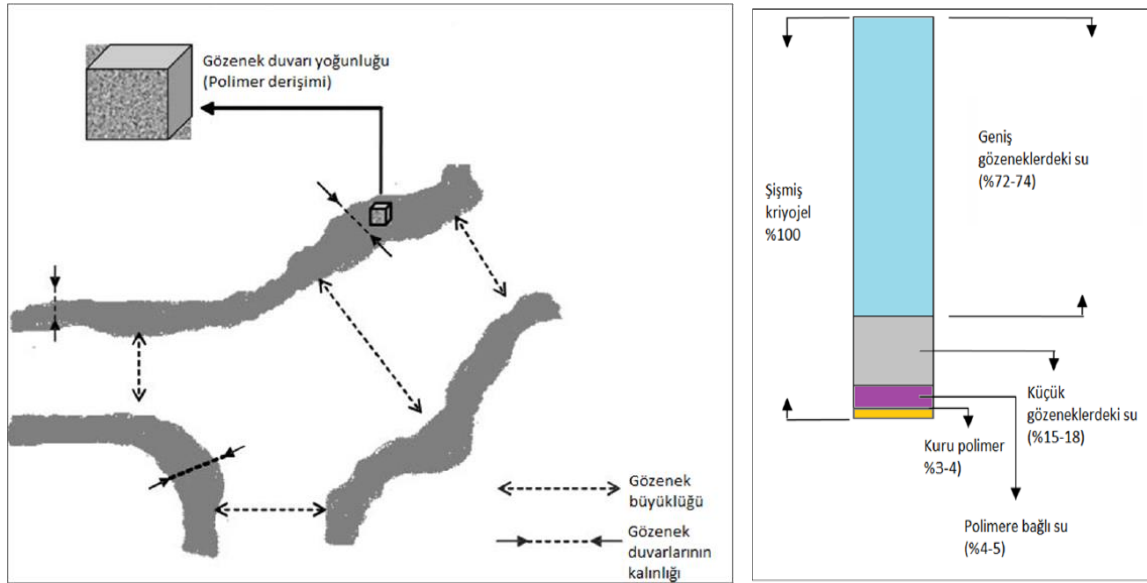
- İlk olarak polimer öncüleri su gibi uygun bir çözücü içerisinde çözünür.
- Daha sonra çözelti -18°C 'de donma aşamasına alınınca, çözücü kısım donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, donmamış kısımda bulunan polimer öncüleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar.
- Polimerizasyon tamamlandıktan sonra donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde, buz kristalleri erir ve "kriyojel" olarak adlandırılan gözenekli polimer ağ yapı elde edilir. Kriyojel oluşumu Şekil 2.8'de verilmektedir.

Ayrıntılı olarak açıklanacak olunursa: Kriyojelasyon sırasında, jel oluşturacak ajanları içeren reaksiyon karışımı çözücünün kristallenme noktasının birkaç derece altındaki sıcaklıklarda dondurulur. Donmuş sistem, tek bir katı blok halinde görünmesine rağmen, aslında heterojendir, donmuş çözücü kristalleri boyunca donmamış sıvı mikro fazı içerir. Jeli oluşturacak ajanlar donmamış sıvı mikrofaz içerisinde konsantre hale gelirler, burada kriyokonsantrasyon oluşur. Donmamış sıvı mikro faz toplam başlangıç hacminin çok küçük bir kısmını oluşturur, jel başlatıcıların konsantrasyonu öylesine çok artar ki, bu durum jel oluşumunu tetikler. Aslında, kriyokonsantrasyona bağlı olarak, bu tip donmuş sistemlerde jel oluşumu, sıvı ortamdakine kıyasla (aynı başlangıç reaksiyon karışımı kullanıldığında) daha hızlı gerçekleşir. Donmuş çözücü kristalleri gözenek yapıcı ajan olarak işlev görmektedir. Eridiğinde, bulunduğu yerde çözücü ile dolu boşluklar, makro gözenekler bırakır. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey gerilimi gözeneklerin şeklini yuvarlar ve gözenek yüzeyini pürüzsüz hale getirir. Donma sırasında, çözücü kristalleri, diğer kristaller ile birleşinceye kadar büyür, böylece, eritmeden sonra jel içinde birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluşan sistem oluşur [46]. Sistem oda sıcaklığına getirildiğinde gözenek duvarının etrafındaki çözücünün yüzey geriliminden dolayı buz kristallerinin erimesi, kriyojellerdeki gözeneklerin dairesel şekle sahip olmalarını sağlar [43].



Şekil 2.8. Kriyojel oluşumunun şematik gösterimi

Kriyojel gözeneklerin şekil ve boyutlarını etkileyen birçok faktör içerisinde, monomerik veya polimerik öncülerin türü ve derişimi ile polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklık en önemli etki eden faktörlerdir. Kriyojel yapısında makrogözeneklerin yanı sıra kriyojellerin polimerik fazındaki oluşumları dolayısıyla mikrogözenekler de bulunmaktadır.



Şekil 2.9. (a) Kriyojellerin performansını etkileyen parametrelerin şematik gösterimi ve (b) Süpermakrogözenekli kriyojelin kompozisyonu.

Gözenek büyüklüğü ile gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu kriyojellerin farklı uygulamalardaki performanslarını etkileyen farklı parametrelerdendir. Doku mühendisliği uygulamaları açısından gözenek büyüklüğü uygulanan dokuya göre

daha önce bahsedilen iskelelerin sahip olması gereken tüm gözenek özelliklerini etkiler. Gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu ise kriyojellerin makroskobik mekanik özelliklerini belirler (Şekil 2.9) [44].

Tamamen su ile şişmiş haldeki bir kriyojelin toplam ağırlığının ortalama olarak yalnızca %3-4'ü kuru polimer ağırlığıdır. Ağırlığın %4-5'i polimere bağlı sudan oluşur. Böylece geriye kalan kriyojel ağırlığının %90'ını gözeneklerdeki su oluşturur. Kriyojellerin elastikiyeti sayesinde geniş gözeneklerdeki suyun %70'i mekanik olarak sıkıştırılarak yapıdan uzaklaştırılabilir. Bu durum, kriyojel hacminin büyük bir kısmının birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluştuğunu gösterir (Şekil 2.9) [45]

2.5.1. Jel-kriyojel farkı

Kriyotropik jelasyon ile üretilen polimerik materyallerin morfolojik yapıları donmamış sistemlerde üretilen jeller ile karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Kriyojeller kimyasal-kovalent, iyonik veya kovalent olmayan bağlarla oluşabilirler. Açık ki, sadece sıcaklıkla (termotropik) başlatılan ve oluşturulan jeller kriyojelasyon ile üretilemezler.

Bazı istisnalar ile birlikte, dondurma-kurutma (freeze-drying) yöntemi ile üretilmiş materyaller çözücüye daldırıldığında (polimer çözünmeden şişer) makro ve mikro yapısı kriyojellere benzer materyaller oluşur. Solventin donması, çözücü kristallerinin süblümleşmesini taklit eder ve polimerik materyal içerisinde birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluşan sistem meydana gelir. Fakat donmamış sıvı mikrofazda jel oluşumu yer almaz. Dondurularak kurutulmuş materyaller, sadece ince objeler olarak üretilirler, örneğin, filmler, plakalar veya küçük boncuklar şeklinde. Teknik açıdan dondurularak kurutulmuş silindirler veya kalın bloklar üretmek hiç de pratik değildir.

Bu durumdan farklı olarak, kriyojeller istenilen herhangi bir şekilde üretilirler, örneğin, bloklar, silindirler, tüpleri franüller veya diskler şeklinde. Buna ek olarak, kriyojellerin üretimi dondurularak kurutulmuş materyallerin üretiminden daha basittir, çünkü düşük basınçta çözücü giderimi prosesi gerekli değildir. Geniş, birbiri ile bağlantılı gözenekler kriyojellerin ana karakterini oluşturmaktadır; bazı kriyojeller de süngerimsi morfolojiye sahiptirler. Bu tip süngerimsi jellerde gözenek yapısı çözünen maddelerin konveksiyonel aktarım ile taşınmasını sağlar. Homo

faz geleneksel jellerde çözünenlerin difüzyonu kriyojellerdeki kadar kolay değildir [46].

2.5.2. Kriyojellerin farklı uygulama alanları

Kriyojellerin eşsiz denebilecek özellikleri hazırlanmalarının çok basit bir yöntemle, polimerin türüne bağlı olarak çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek birbiriyle bağlantılı büyük ve açık gözenek ağına sahip yapıların elde edilmesine izin vermesidir [42]. Kriyojeller, hem bead (boncuk) şeklinde hem de süngerimsi silindirik disk veya monolitik kolonlar şeklinde kullanılabilirler. Sürekli durgun fazlar olarak da adlandırılan monolitler biyolojik moleküllerin ayrılmasında kullanılan önemli araçlardır. Monolitler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin ilk yıllarında yapılmış olmasına rağmen, büyük bir buluş olarak önem kazanmaları 1990'larda gerçekleşmiştir.

Monolitik malzemeler düşük kütle aktarım direnci ile karakterize edilirler. Biyolojik makromoleküllerin yer aldığı tüm çalışmalarda geleneksel kromatografik sistemlere oranla, monolitler, çok daha iyi bir performans göstermektedir. Kriyojel monolitlere farklı ligandların immobilize edilmesi ile birlikte, bu malzemeler afinite kromatografisinde geniş kullanım alanı bulmuştur. Monolitlerin geleneksel dolgu kolonlardan farkı, tek parçalı gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Monolitin yapısındaki birbiriyle bağlantılı gözenekler, kanallar arası bir ağ oluşturmaktadır. Kanal içi kütle aktarımı akışla birlikte olduğundan, hareketli faz ile sabit faz arasındaki aktarım çok hızlı gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, proteinler gibi oldukça büyük moleküller bile çok kısa sürede monolitik kolonlardan ayrılabilirler. Ayrıca kromatografik sistemlerde sıvı akışı sırasında oluşan basıncın düşük olması istenir. Monolitlerin düzgün akış kanallarına sahip olmasından ötürü, yüksek basınç oluşmaz ve böylece kolonda oluşabilecek herhangi bir tıkanma önlenir [48].

Makrogözenekli kriyojeller biyomedikal, biyoteknoloji ve eczacılık alanlarında oldukça fazla ilgi görmektedir [47]. Bu özellikleri onların biyolojik makromoleküllerle çalışılırken herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktadır.

Kriyojeller, hücrelerin üzerinde gelişimi ve üremesi için uygun üç boyutlu yapıya sahiptirler. Özellikle doku mühendisliğinde kullanılan destek malzemelerinin yüzey

özellikleri hücre afinitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Kriyojellerin hidrofilik ve birbiriyle bağlantı halinde gözenekli bir yapıda olması, hücre gelişimi, üremesi ve doku oluşumu için uygun malzemeler olmalarını sağlar [41].

Kriyojeller hücre organellerinin, virüslerin, plazmidlerin, mikroorganizmaların ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kullanılabilir. Literatürde kriyojellerin MSC'lerin ayrılması için uygun malzemeler olduğunu rapor edilmiştir [49].

2.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biosinyal Molekülleri

Genlerin ürünü olan ve vücudun doğal işleyiş mekanizmasında çok önemli roller üstlenen biosinyal moleküller, yapışma, yayılma, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücre fonksiyonları düzenleyen protein/peptit yapılarıdır. İzole edildikten sonra rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde büyük ölçekli üretilmekte, doku mühendisliği çalışmalarında ve klinikte tedavilerde kullanılabilirler.

Doku mühendisliği çalışmalarında, biosinyaller hücre kültür ortamında destekleyici olarak kullanılabilir gibi çeşitli yöntemlerle doku iskelelerine yüklenebilirler. Bu sayede, doku iskeleleri vücuda implante edildiklerinde, hasarlı bölgedeki hücrelere de etki edebilmeleri planlanmaktadır. Biosinyal moleküllerin implante edilecek doku iskelesinin yüzeyine doğrudan enjekte edilmesi durumunda kararsız kimyasal yapıları, yarı ömürlerinin kısa olması ve doku içerisine yeterince alınamamalarından dolayı etkin sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle biosinyallerin taşıyıcılara yerleştirilerek kontrollü ve uzun dönemde salımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla biyobozunur, biyouyumlu, sentetik veya doğal polimerlerden ya da seramiklerden elde edilen taşıyıcılar kullanılmaktadır [4]. Bu taşıyıcılar doku iskelelerine emdirilme veya kimyasal bağlanma şeklinde yüklenmektedirler [50].

Biosinyaller, hücre yapışma faktörleri ve hücre büyüme faktörleri olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Hücre yapışma proteinleri, immüno globulinler, integrin ve selektinlerdir. Hücrenin yüzeyine adsorplanan proteinler, hücreler tarafından üretilen proteinlerle etkileşerek hücrelerin yüzeye yapışmasını yönlendirmektedirler. Hücre büyüme faktörleri; endokrin bezlerden salgılanan hormonlar, bağışıklık sistemi tarafından salgılanan sitokinler ve tüm hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörlerini içermektedir [51].

Kemik oluşumu birçok hormon, sitokin ve büyüme faktörünün rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Kemik oluşumu ve rejenerasyonu gibi olaylar bu biyo-aktif moleküller tarafından kontrol edilmektedir. Osteoblastların fenotipi, diğer kemik hücrelerinin hücre-yüzey bağlanma reseptörleri ve dolayısıyla da hücre üreme ve farklılaştırılması biyosinyaller tarafından yönlendirilmektedir. Örnek olarak kemikte kırık oluştuğunda, yerel üretilen sitokin ve büyüme faktörleri, osteoprogenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini ve osteoblastlara farklılaşmasını sağlayıp, hücre üremesini ve ECM üretimini kontrol etmektedir [29].

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi büyüme faktörleri osteoblast farklılaşmasını düzenleyen faktörleridir. Kalsitonin, parathormon, aktif Vitamin D metabolitleri, leptin ve heparan sülfat ise kemik oluşumunu düzenleyen endokrin faktörlerdir. Bunlara ek olarak kemik morfogenetik proteinler (BMP) gibi sitokinler ve deksametazon gibi glukokortikoidler de kemik oluşumunda ve gelişimde çeşitli roller üstlenmektedir [52]. Çizelge 2.2'de kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyosinyaller ve özellikleri verilmiştir [29,53].

Proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı biyosinyaller, hücre membranında reseptörlerine bağlanarak hücre içine alınırlar. Steroidler gibi hücre membranından geçebilen biyosinyaller ise, hücre içinde reseptörlerine bağlanırlar. Biyosinyalin reseptör ile etkileşmesiyle, biyosinyal-reseptör kompleksi oluşur ve reseptörün sitoplazmik bölgesinde otofosforilasyon gerçekleşir. Fosforilasyon ile hücre içi sinyal iletimi başlatılır. Hücre metabolizmasında veya gen ekspresyonunda hücresel yanıt oluşturulmaya başlar. Daha sonra biyosinyallerin aktiviteleri, hücre içi lizozomlar tarafından sonlandırılır.

2.6.1. Steroid hormonlar: Testosteron ve Östrojen

Steroidler, kimyasal yapı çerçevesinde dört adet sikloalkan halkasının karakteristik düzenlenmesiyle birbirine bağlandığı organik bileşikler olarak tanımlanabilir. Steroid hormonlar, hormon görevi üstlenmiş steroid yapılı biyosinyallerdir ve bağlandıkları reseptörlerinin türüne göre beş grupta incelenebilirler: glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestojenler.

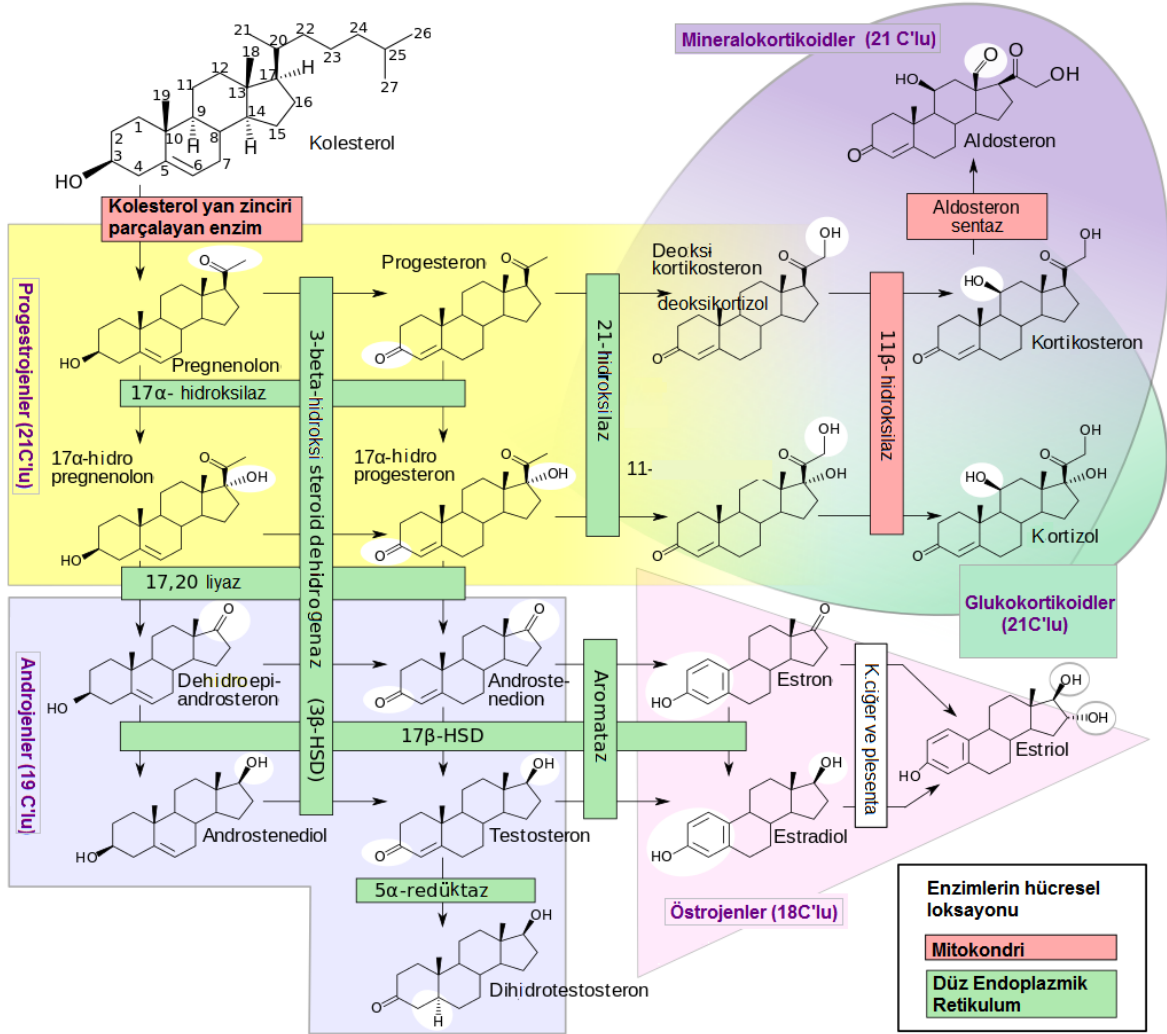
Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyosinyaller ve özellikleri

Biyosinyal molekül	Özellik
TGF-β (Transforme edici büyüme faktörü)	Mezenşimal kök hücrelerin kemik üreten osteoblastlara farklılaşmasında rol oynayan bir büyüme faktörüdür.
BMP (Kemik morfojenetik proteini)	Yapısal özellikleri bakımından TGF- β ailesinde yeralan, kemik doku mühendisliğinde etkileri en çok araştırılan sitokin grubudur. Kondrosit ve osteoblastların üremesini stimüle eder ve matris oluşumunu artırır. Ayrıca mezenşimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar.
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Mezenşimal kök hücrelerin, osteoblastların ve kondrositlerin üremelerini stimüle eden bir büyüme faktörüdür. Özellikle FGF-2'nin (bFGF) kemik iyileşmesindeki rolü araştırılmıştır ve pozitif etkinin doza ve zamana bağımlı olduğu görülmüştür.
IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü)	Osteoblast ve kondrosit hücrelerinin hem üremelerini hem de matris salımlarını artırıcı yönde etkisi olan bir büyüme faktörüdür. Özellikle kırık iyileşmesi sırasında hormonların, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisini ayarlamakla görevlidir.
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)	Kondrositlerin ve osteoblastların üremelerini stimüle eden bir büyüme faktörüdür. Bununla birlikte, farklı konsantrasyonlarda, kemik resorpsiyonunda görev almaktadır.

Şekil 2.10'da kimyasal yapıları, kısa sentez yolları, sentezlendiği hücre içi bölümler ile sentezlerinde görev alan enzimler şematik olarak belirtilmiştir.

Doğal steroid hormonlar gonadlarda ve adrenal bezde genellikle kollesterolden sentezlenmektedirler ve Şekil 2.10'da da görüldüğü gibi benzer kimyasal yapıya sahiptirler. Yağda çözünebilir özelliklerinden dolayı hücre zarından geçerler ve

hormonun çeşidine göre nükleer veya sitosolik olabilen reseptörlerine bağlanarak, hücre içerisinde çeşitli değişiklikler meydana getiren reaksiyonlar oluştururlar.



Şekil 2.10. Steroid hormonların kimyasal yapıları ve başlıca sentez basamakları

Testosteron (TST):

Androjen terimi maskülinizan (erkekleştiren) etkileri olan steroidleri tanımlamak için kullanılır. Kuşkusuz testosteronun kendisi ve testisler dışında vücudun farklı bölgelerinde üretilen erkek seks hormonları da bu tanımın içindedir. TST diğer androjenlere göre daha fazla bulunmasıyla en önemli testis hormonu olarak kabul edilir. Testosteronun kimyasal formülü $C_{19}H_{28}O_2$ olup molekül ağırlığı 288.42 g/mol'dür Sudaki çözünürlüğü $25^{\circ}C$ 'de $27\mu g/mL$ 'dir [54]. Testosteronun temel etkisi hedef hücrelerde protein yapım hızını arttırmaktır. Bu etki testosterondan en çok etkilenen prostat bezinde sayısız incelemelerle araştırılmıştır. Testosteron

salgılandıktan birkaç dakika sonra hücre içine girer ve burada 5 α -redüktaz enziminin etkisiyle dehidrotestosterona dönüşür ve sitoplazmik reseptör proteinine bağlanır. Reseptör hormon kompleksi daha sonra çekirdeğe girer ve çekirdekdeki farklı bir proteinle bağlanarak DNA-RNA transkripsiyon işlemini uyarır.

Testosteron genelde vücudun her yerinde protein yapımını büyük oranda arttırmakta ancak bu artış daha özgül olarak ikincil seks özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir.

Fetal yaşam süresince, testisler placentada oluşan koryonik gonadropinlerle uyarılarak orta düzeyde testosteron salgırlar. Bu hormon fetal gelişim döneminde ve hatta doğumdan sonra on ya da daha çok haftalar süresince vücutta bulunur. Sonra çocukluk çağında yaklaşık 10-13 yaşına kadar testosteron üretilmez. Daha sonra puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarısıyla testosteron yapımı hızla artar ve 50 yaşından sonra hızla düşmeye başlar. 80 yaşında en üst düzeyin %20-50'sine iner (Şekil 2.11) [54].

Testosteron vücutta fetal gelişim süresince testislerin inmesinde, erişkin yaşamda birincil ve ikincil seks özelliklerinin gelişiminde etkilidir. Bunlar seksüel organların gelişimine ek olarak, vücut kıllarının dağılımına etkileri ve kellik, ses gelişimi ve erkekse baz karakteri oluşumu, tüm vücutta deri kalınlığı artışı ve derialtı dokusunun güçlenmesi, kadınlara oranla puberte döneminde %50'ye varan kas artışı, kemik büyümesi ve kalsiyum depolanması ile bazal metabolizmadaki hızlandırıcı etkisi ve dolayısıyla eritrosit yapımındaki artış olarak özetlenebilir.

Östrojen (E):

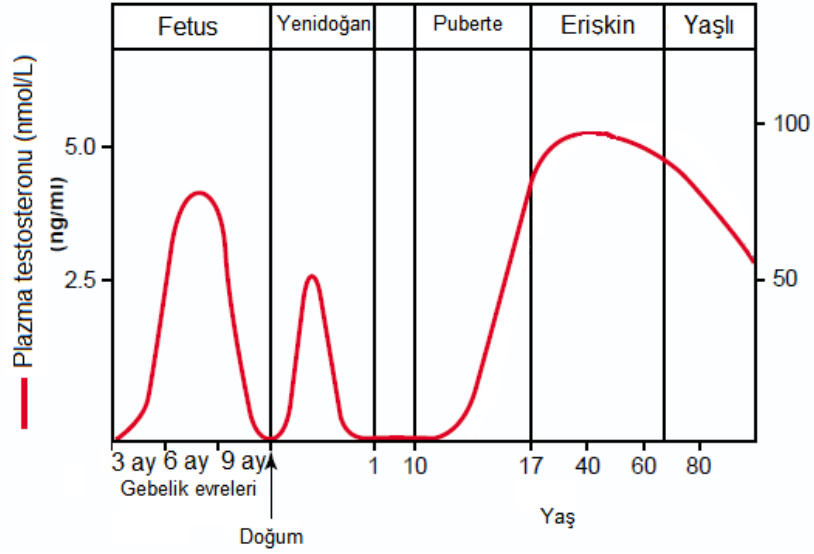
Vücutta büyüme, farklılaşma ve üreme sisteminin fonksiyonları üzerinde etkili olup kolesterol türevi steroid yapıda bir hormondur. Bir kadında östrojen gebelik dışında büyük oranda overlerden, küçük miktarda da adrenal korteksten salgılanır. Gebelikte ise çok büyük miktarlarda plasentadan salgılanır. Kadın plazmasında bulunan üç tip östrojen vardır. Bunlar, 17- β estradiol, estron ve estrioldür (Şekil 2.10). Salgılanan başlıca östrojen olan 17- β estradiol, dolaşımda estron ile denge halindedir. Estron, daha sonra estriole dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir. Bu üç östrojen içinde etkisi en kuvvetli olan 17- β estradiol, en zayıf olanı ise estrioldür. Dolaşımdaki estradiolün %2'si serbesttir. Kalanını ise %60'ı albümine, %38'i ise gonadal steroid-bağlayıcı globuline bağlıdır [54].

Östrojenler, 18 karbonlu steroidlerdir. 17- β estradiol (E2); 2 hidrosil grup içeren bir molekül yapıya sahiptir. Kimyasal gösterimi: estra-1,3,5 (10)-trien-3,17(beta)-diol'dür. Kimyasal formülü $C_{18}H_{24}O_2$ olup molekül ağırlığı 272.39 g/mol'dür. 17- β estradiol, östrojenik kuvvetinin en yüksek olmasından dolayı östrojen kaynağı olarak rejeneratif tıp alanında kullanılmaktadır. E2, hidrofobik yapıda olup, sudaki çözünürlüğü 5 mg/L'dir [54]. Östrojenin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için nano-mikro partiküller, lipozomlar ve siklodekstrinler kullanılmaktadır.

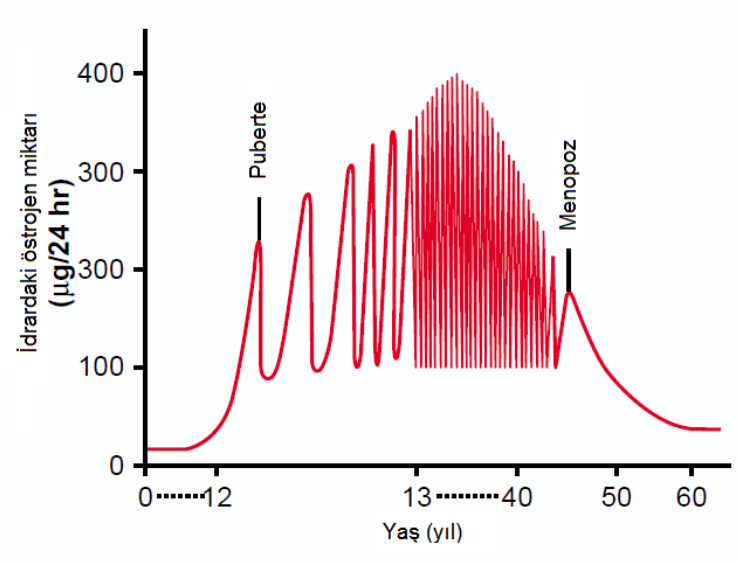
Bir steroid hormonu olan östrojen vücutta pek çok sistem üzerine etki etmektedir. Uterus, vajina, overler, plasenta, meme, beyin, yağ dokusu, karaciğer, böbrek, akciğer ve kemikler üzerinde östrojen reseptörleri varlığı belirlenmiştir [54]. Östrojen, kadın üreme organları üzerinde anabolik etki sağlar. Overlerde yumurta oluşumunu uyarır ve folikül büyümesini başlatır. Metabolizmada protein sentezini ve deri altı yağ dokusunu artırır. Kollajen sentezini arttırarak derinin yumuşak ve düzgün olmasını sağlar. Ayrıca, böbreklerde su ve tuz tutulumunu arttırmaktadır [55].

Östrojen, koroner arter hastalığını önlemektedir. Östrojen reseptörü içeren hepatositler ve karaciğerdeki hormonlar, kolesterol metabolizmasına etki eden enzim üretimini uyarır. İzotopla işaretlenmiş kolesterol, kadında östrojenin kötü huylu kolesterol olarak bilinen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol yıkımını ve iyi huylu kolesterol olarak bilinen yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol üretimini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca östrojen, arteryal duvarlarda platelet agregasyonunu ve lipoprotein oksidasyonunu önler, böylece antioksidan etki ile ateroskleroza engellemiş olur. Östrojen, endotelyumda vazoaktif bir ajan olan endotelyal kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) salımını uyararak vazodilatör (damar gevşetici) etki yapar.

Östrojen, beyinde kan akımını artırır, metabolizmayı hızlandırır ve nöral ağların etkinliğini artırır. Ayrıca, serotonin salgısını artırır [55]. Dişi bireylerde vücuttaki östrojen miktarı puberte zamanı artışa başlarken menopoz sonrası hızlı bir şekilde düşmektedir (Şekil. 2.12).



Şekil 2.11. Erkek bireyde zamana bağlı testosteron seviyeleri



Şekil 2.12. Cinsel yaşam süresince kadında östrojen salgısı

2.6.2. Testosteron ve 17-β Estradiol'ün kemik üzerine etkileri

Testosteron temel olarak kemik büyümesi ve kalsiyum depolanmasını artırır. Puberte dönemi boyunca ya da uzun süreli testosteron enjeksiyonlarından sonra, kemiklerin kalınlıkları artar ve büyümeleri yanında önemli ölçüde kalsiyum tuzları depolanır. Böylece testosteron hem kemik matrisinin toplam miktarını artırır, hem de yoğun kalsiyum depolanmasını sağlar. Kemik matrisindeki artış, testosteronun

prorteinler üzerinde genel anabolik etkisi sonucunda oluşur ve kalsiyum tuzlarının birikimi ise kemik matrisinin artmasına bağlı ikincil bir etki olarak açığa çıkar.

Büyüme dönemindeki çocuklarda testosteronun anormal düzeyde aşırı salgılanması kemiklerin belirgin şekilde hızla büyümesine ve vücudun tümüyle hızlı gelişmesine neden olur. Bunun yanında testosteron aynı zamanda uzun kemiklerde epifizlerin erken kapanmasına neden olur. Böylelikle büyümenin hızlı olmasına rağmen epifizlerin erken kapanması, kişinin hiç testosteron salgısı olmadan erişebileceği uzunlukta boya sahip olmasını engeller. Hatta normal erişkin erkeklerde de boy, puberte öncesi kişinin kastre edilmiş boyundan biraz daha kısadır.

Östrojenin kemik metabolizmasına etkisi de kemik doku üzerinden gerçekleşmektedir. Burada dolaylı ya da doğrudan etkileri söz konusudur. Östrojen kemik doku üzerinde, kemik oluşumunu arttırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır [56].

Östrojen, osteoblastlar üzerinde anabolik etki sağlayarak kemik oluşumunu arttırır [57]. Bu etkinin kanıtı östrojen yokluğunda ve varlığında, fare ve insanlarda yapılan histolojik ve biyokimyasal çalışmalarla ER'lerin ve osteoblastik gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile gösterilmiştir. Östrojenin kemik metabolizmasına etkisi, kemik doku üzerinden gerçekleşmektedir. Burada dolaylı ya da doğrudan etkileri söz konusudur. Östrojen kemik doku üzerinde, kemik oluşumunu arttırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır.

Östrojen, osteoblastlar üzerinde anabolik etki sağlayarak kemik oluşumunu arttırır [57]. Bu etkinin kanıtı östrojen yokluğunda ve varlığında, fare ve insanlarda yapılan histolojik ve biyokimyasal çalışmalarla ER'lerin ve osteoblastik gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile gösterilmiştir. Östrojen ayrıca büyüme hormonu (GH)'nunun salımını arttırarak da kemik oluşumuna katkı sağlamaktadır.

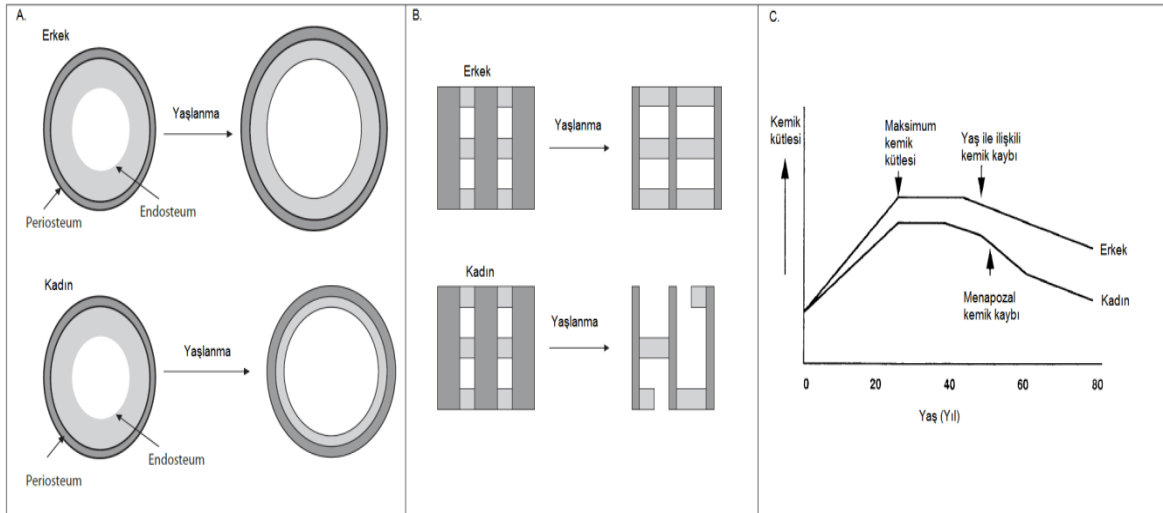
Östrojen, vücutta kalsiyum dengesinin sağlanmasında rol oynayarak kemik metabolizmasına etki etmektedir. Öncelikle böbreklerde vitamin D sentezini hızlandırmaktadır. Dolayısıyla bağırsak emilim yüzeyi artmakta, kalsiyum taşınmasında görevli proteinlerin sentezi hızlanmakta ve dolayısıyla bağırsaktan kalsiyum emilimi artmaktadır. Ayrıca kemik dokuda parathormon (PTH)'a karşı kısmi direnç oluşturmakta ve dolaylı yoldan serum PTH düzeylerini arttırmaktadır.

Artan PTH, böbrekten kalsiyum geri emilimini azaltmakta ve vitamin D biyosentezini hızlandırmaktadır. Böylece bağırsaktan kalsiyum absorpsiyonu artar ve böbrekten kalsiyum atılımı azalmaktadır [56].

E2 ve TST her ikisi de kemik büyümesi ve olgunlaşması için anahtar düzenleyicilerdir ve ayrıca E, GH ve IGF-I ile birlikte iskelet kütlesinin iki kat arttığı, 3-4 yıllık ergenlik büyüme dönemini başlatır. Östrojen her iki cinsten de maksimum doruk kemik kütlesinin ulaşılması için gerekli olmasına rağmen, testosteron, yetişkin erkek iskeletinin daha büyük boyutta ve daha kalın korteksi için ek uyarandır. Yaşlanan erkekler sadece birine maruz kalırken yaşlanan kadınlarda kemik kaybı iki aşamadan geçer. Bu aşamalar, kadınlarda menapoz sonrasındaki 4-8 yıl içerisinde gerçekleşen ağırlıklı olarak süngerimsi kemik kaybının olduğu hızlı faz ve bunu takip edip sürekli devam eden yavaş fazdır. Bahsedilen seks hormonlarının ikisinin de kemik yapımında önemli roller üstlenmeleriyle birlikte, her iki cinsiyette yaşa bağlı kemik kaybının, vücutta düşen östrojen ve testosteron seviyeleriyle yakından ilişkili olduğu farklı kaynaklarca belirtilmiştir [57,58].

Erkeklerde ilerleyen yaşlardaki endosteyal kemik yıkımı, kortikal kabuğu korumaya yardımcı olan ve kemik genişlemesiyle sonuçlanan periost birikimi ile telafi edilir. Kadınlarda ise daha az periosteyal birikim ve daha fazla endosteyal yıkım, daha ince bir korteks ve daha az kemik genişlemesine neden olur. (Şekil 2.13 A) Trabeküler kemiğe baktığımızda ise yaşlanmayla beraber erkeklerde trabekül incelmeleri görülürken kadınlarda trabeküler incelmeye beraber trabeküler bağlantı kaybında artış görülür (Şekil 2.13 B). Kadın ve erkekteki yaşa bağlı kemik kütlesindeki azalış Şekil 2.13 C'de gösterilmiştir. [59]

Günümüzde, kadınlardaki osteoporozun tedavisinde kullanılan östrojen ile beraber testosteron da kemiklerin büyüklüğünü ve dayanıklılığını artırıcı etkisi sayesinde yaşlı erkeklerde osteoporoz tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca menapoz sonrası kemik erimesi yaşayan kadınlara uygulanan östrojen tedavisine ilaveten testosteron uygulaması yapıldığında yalnızca östrojen tedavisi uygulanan hastalara göre, kemik mineral yoğunluğunda daha yüksek değerler elde edilmiştir [57].



Şekil 2.13. İlerleyen yaşla birlikte A) Kortikal kemik değişikliklerin şematik gösterimi. B) Trabular kemik değişikliklerin şematik gösterimi. C) Kemik kütlesindeki azalışı gösteren temsili grafik.

2.6.3. Testosteron ve östrojenin MSC'ler üzerine etkileri

Cinsiyet dimorfizmleri; kardiyovasküler, kardiyopulmoner, nörodejeneratif (Parkinson, Huntington, Alzheimer vb. hastalıklar) ve endokrin bozukluklarının çeşitli patogenezlerinde bulunmaktadır. Bu bozuklukların tedavisi amacıyla kök hücrelerin kullanımından literatürde sıklıkla bahsedilmektedir. Ve cinsiyet dimorfizmlerinde oldukça önemli role sahip seks hormonlarının bu tip hastalıkların tedavisinde etki/farklılık yaratıp yaratmayacağı konusunda araştırmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Kök hücreler üzerinde östrojen ve testosteron reseptörlerinin varlığını bildiren ve bu hormonların, kök hücrelerin fonksiyonlarını modifiye edebileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur [60].

Östrojenlerin, iskemik hasarı takiben gerçekleşen miyokard yenilenmesi üzerinde kemik iliği mezenşimal kök hücreleri (MSC) ve endotel progenitör hücrelerine kısmi parakrin büyüme hormonu üretimi sağlamasıyla muazzam bir etkisi bulunmaktadır. Östrojenler ayrıca iskemik miyokarda, endotelial progenitör hücrelerin harekete geçirilmesini kolaylaştırır ve iskemik sınır bölgesinde neovaskülarizasyonu artırır. Ayrıca östrojenler kardiyak fibroblastlarının proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisiyle de patolojik miyokardiyal yenilenmesini sınırlar. Androjenlerin aynı zamanda kemik iliğinden endotelial progenitör hücre göçünü teşvik

edebildiğine dair çalışmalar mevcut olmakla birlikte, hastalığın patogeneğinde androjenlerin büyük rolü iyi karakterize edilebilmiş değildir.

Seks steroidlerinin belirtilen yararlı etkileri preadipositler lipid metabolizmasının değiştirilmesiyle, kemik metabolizması ve iskelet olgunlaşması modülasyonunun sağlanmasını ve osteojenik kök hücre öncüleri üzerindeki etkileri sayesinde, osteoporozu önlenmesini sağlamalarıdır.

Östrojenin kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşmasına olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, östrojenin mezenşimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasını arttırdığı gözlenmiştir [60]. Ayrıca östrojenin ADMSC'ler üzerindeki osteoblastik farklılaşmasının incelendiği bir *in-vitro* doku mühendisliği çalışmasında ise kemikleşme yönünde olumlu sonuçlar elde edilmiştir [50].

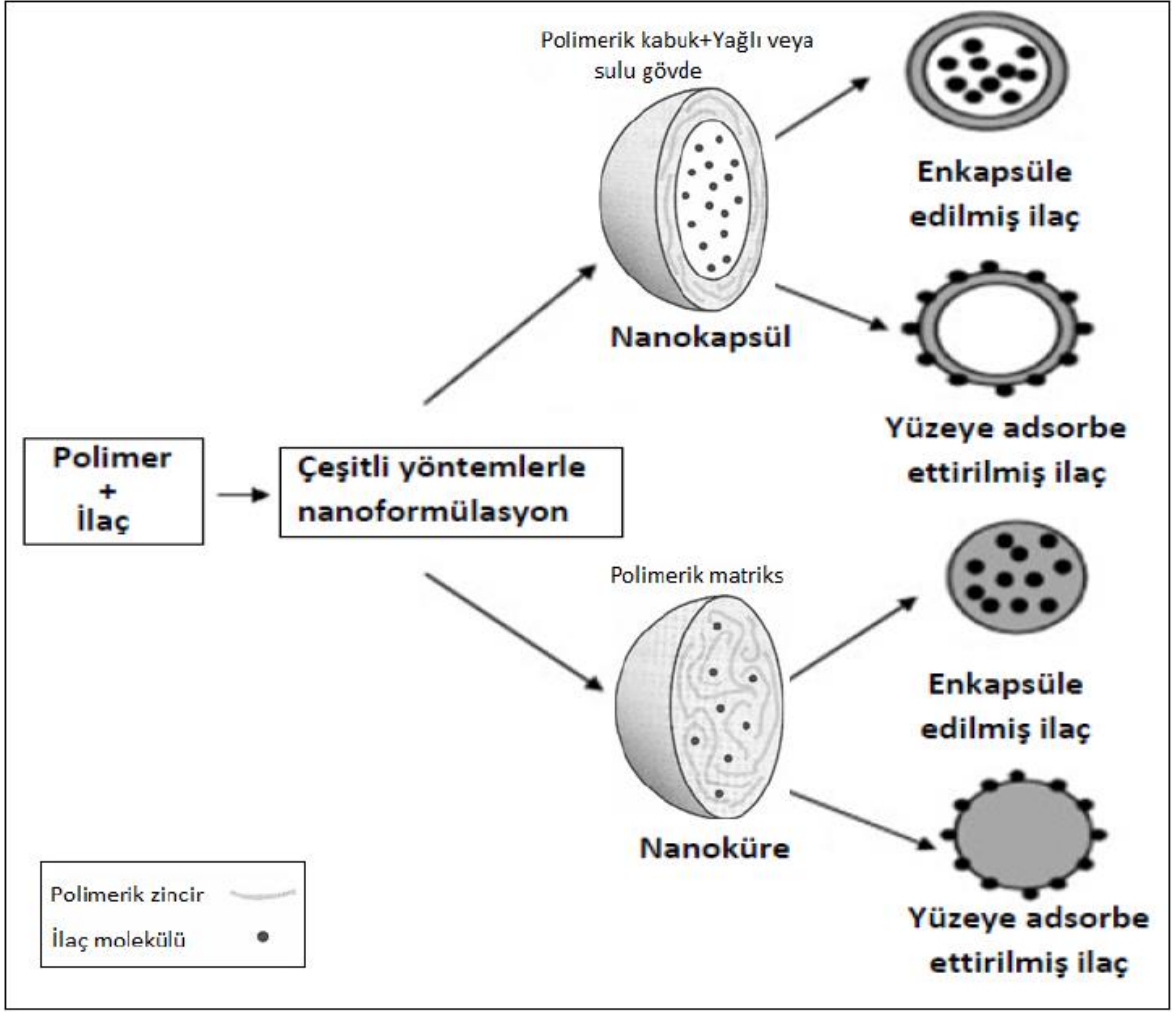
Seks steroidlerinin kök hücreler üzerine bir başka spesifik etkisine örnek olarak östrojen varlığında nöral kök hücrelerin proliferasyonunda artış görüldüğü belirtilmiş fakat testosteronun proliferasyona inhibitörük olarak etki yaptığı gözlemlenmiştir [60].

Kök hücreler, çeşitli kardiyovasküler, nörodejeneratif, endokrin bozuklukları ve kemik metabolizması hastalıklarında önemli terapötik avantajlar sağlamasıyla birlikte, çeşitli kök hücre popülasyonları üzerinde cinsiyet hormonlarının etkisini daha iyi anlayabilmek için yapılacak çalışmalar, nihai klinik etkinliğini artırmak için gerekli görülmektedir.

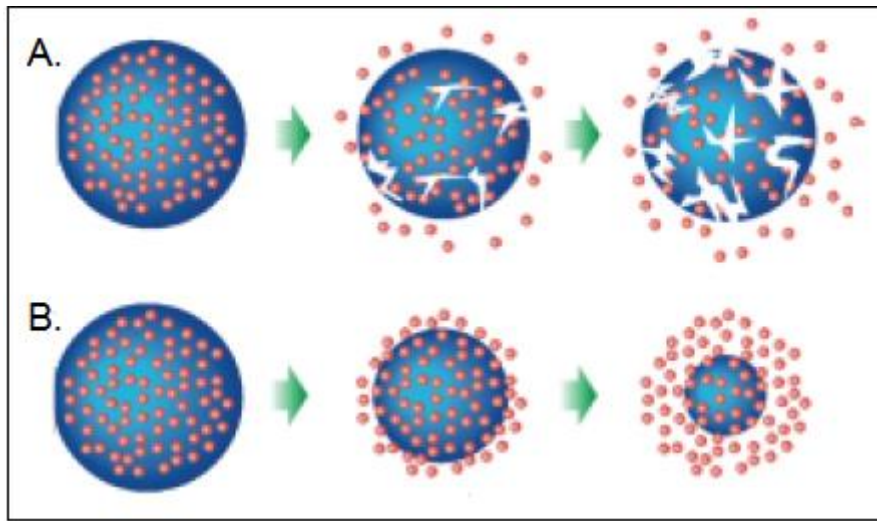
2.7. Nanopartiküller ve Özellikleri

Nanopartiküller (bu tez çalışması için polimerik nanopartiküller); doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin (ilaç/biyojan/biyomolekül) partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı matriks sistemlerdir (Şekil 2.14) [61].

Nanopartiküller ilk defa yaklaşık olarak 40 yıl önce aşuların ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir [62].



Şekil 2.14. Nanokapsül ve nanoküre yapısının şematik gösterimi ile biyobozunur nanopartiküllerin çeşitleri.



Şekil 2.15. Nanopartiküllerin A) Yığın ve B) Yüzey erozyonu sonucu bozunması

Doğal yada sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen; ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı avantajlar iki temel özelliklerinden ileri gelmektedir. Bu özelliklerinden birincisi, nanopartiküllerin küçük partikül boyutlarına sahip olmasıdır. Böylece küçük kapillerlerden geçerek hücrelere alınırlar ve hedef bölgede etkili etkin madde akümülyasyonunu sağlarlar. İkincisi ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır (Yığın (bulk) ve yüzey erozyonu sonucu bozunmalarının şematik gösterimi Şekil 2.15'de verilmiştir). Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadırlar. Tüm bunlara ek olarak nanopartiküller; ilaçların/proteinlerin ya da peptidlerin stabilitesinin artmasını sağlarlar [61]. Çeşitli uygulama alanlarında tercih edilmelerini sağlayan diğer avantajları ise;

- Kolaylıkla sterilize edilebilir olmaları,
- Fizyolojik ortamda parçalanabilir olmaları ve parçalanma ürünlerinin toksik etki oluşturmaması,
- Etkin madde yükleme kapasitelerinin yüksek olması ve bu sayede, etkin maddenin hücre içi dağılımında atışı sağlaması,
- Oral yolla verilen ilaç uygulamalarında, nanopartikül şeklinde verilen ilacın artan salım ve biyoyararlanımını sağlaması,
- Polimerik yapılarının ayarlanabilmesiyle etkin maddenin hedeflendirilmesine, salımının kontrolüne ve sürdürülmesine olanak sağlaması: Hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben, günler hatta haftalar süren etkin madde salımına olanak verirler. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyine hedefleme bölgesindeki özel moleküler yapıları tanıyan özel ligandların tutturulması ile etkin maddenin lokalizasyonu mümkün olmaktadır.
- Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküllerin biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahip olmaları: Polimerik partiküler yapı, katı matriks içine hapsedilmiş aktif maddeyi parçalanmaktan korur. Böylece etkin maddenin istenen bölgeye ulaşma olasılığı artar.

- Küçük partikül boyutları sayesinde küçük kapillerlere penetrasyon imkanı olması ve hücreler tarafından tutulumlarının sağlanması:. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen etkin madde salımı sağlanır. Mikropartiküllere kıyasla hücre içine alımları yüksektir.
- Etkin maddenin hedef bölgede salımını sağladıklarından dolayı, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitelerinin azaltılmış olması.
- Nanopartikül dispersiyonlarının; ilacın, taşıyıcı veya ilave zararlı çözücüler içinde çözünmesine gerek kalmadan, parenteral yolla kolaylıkla uygulanabilmesine olanak vermesi,
- Üretim tekniklerinin genel olarak basit methodlar içermesi ve kolay olması.
- İlacın katı dozaj şekillerinde, uzun süre ve ilave saklama şartlarına gerek kalmaksızın saklanmasına imkan vermeleridir [63-65].

Birçok avantajına rağmen nanopartiküllerin dezavantajları da vardır. Küçük boyut ve geniş yüzey alanı, partikül agregasyonuna neden olarak partikülleri katı veya sıvı formda saklamayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca yine küçük boyut ve geniş yüzey alanı, matrise sınırlı miktarda ilaç yüklenmesine ve hızlı salıma (ani patlama, burst release) neden olmaktadır [64].

2.7.1. Nanopartikül sentezinde kullanılan polimerler ve PLGA

Nanopartikül üretiminde kullanılacak matris malzeme seçiminde; istenen partikül boyutu, yüzey karakteristiği (yükü, geçirgenliği), biyobozunma derecesi, biyoyumluluk, toksisite, istenen ilaç salım profili ve son ürün antijenitesi gibi birçok faktör rol oynamaktadır [64].

Nanopartiküllerin üretiminde doğal (proteinler, polisakkaritler) ve sentetik polimerler (üretim sırasında sentezlenenler, önceden sentezlenenler) kullanılmaktadır. İlk üretilen nanopartiküller, albumin gibi doğal proteinlerden ya da poli(akrilamid), poli(metil metakrilat) gibi biyobozunur olmayan sentetik polimerlerden üretilmiştir. Nanopartikül üretiminde proteinlerin kullanımında antijenik reaksiyonların oluşması gibi olumsuz sonuçlar meydana gelirken, biyobozunur olmayan sentetik polimerlerin kullanımında ise bu polimerlerin toksisiteleri büyük risk oluşturmaktadır. Nanopartikül üretimi sırasında sentezlenen polimerlerin kullanımında ise monomerlerin tamamı ile polimerize olmayıp nanopartikül yapısında artık olarak kalabilme sakıncası bulunmaktadır.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan polimerler Çizelge 2.3'de verilmiştir [61]. Son zamanlarda peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında polisakkaritlerden de yararlanılmaktadır. Bu tez çalışmasındaki nanopartiküller Poli(d,laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak üretildiğinden PLGA polimerine ait genel bilgiler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.3. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler

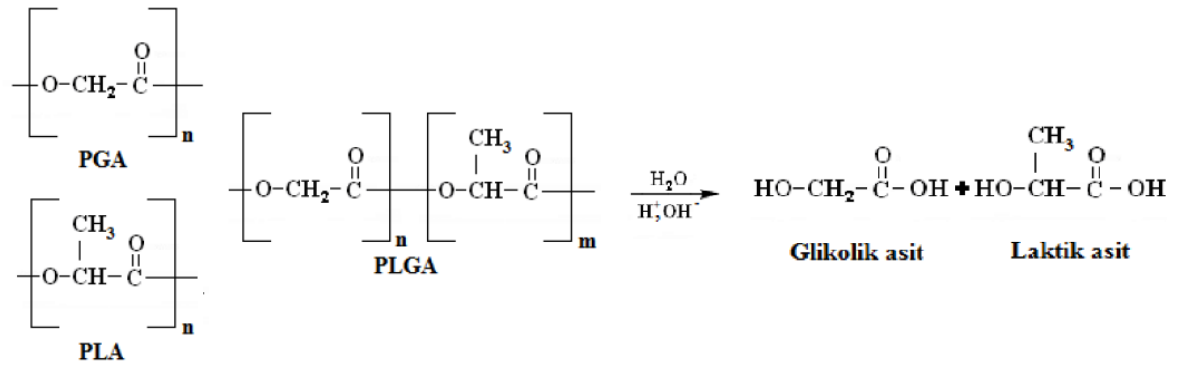
Polimer Tipleri	Polimer İsimleri
Sentetik Polimerler	Poli(laktid) PLA Poli(laktid-ko-glikolid) PLGA Poli(ϵ -kaprolakton) PCL Poli(izobütilyanoakrilat) Poli(n-bütilyanoakrilat) Poli(akrilat) Poli(metakrilat)
Doğal Polimerler	Kitosan Jelatin Aljinat Albumin
Blok kopolimerler	Poli(laktid)-poli(etilen glikol) (PLA-PEG) Poli(ϵ -kaprolakton)-poli(etilen glikol) (PCL-PEG) Poli(heksadesilyanoakrilat)-ko-poli(etilen glikol) (PHDCA-PEG)
Kolloidal stabilizanlar	Dextran Poli(vinil alkol) (PVA) Tween®20 veya Tween ®80

Poli(d,laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Toksik olmayan metabolitlere dönüşen polimerler, uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Sahip olduğu avantajlarından dolayı etkin maddelerin enkapsülasyonu sonucu kontrollü salınımı için nanopartikül üretiminde en yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerler alifatik poliesterler olan polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan poli(d,laktik-ko-glikolik asit)'dir [66]. Poli(d,laktik-ko-glikolik asit), laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin uygun karışımlarının polimerizasyonu

sonucu elde edilmektedir. Kopolimeri oluşturan monomerlerin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlığında, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerde PLGA polimerleri elde edilebilmektedir. Polimerik matris olarak ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan PLGA'ların özelliklerine bağlı olarak, ilaç salımının uzatılması ve kontrolü gerçekleştirilebilmektedir [65].

PLGA'nın kristal yapısı kopolimer zincirindeki iki monomer bileşeninin molar oranına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az PGA içeren kopolimerler amorfudur ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. PGA hidrofilik özellikte olduğundan hücre içi koşullarda kolaylıkla çözünmektedir. PLA ise yan zincirinde PGA'ye göre fazladan bir metil grubu taşıdığından (Şekil 2.16) daha hidrofobik özelliktedir ve biyobozunması PGA'den çok daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Bu nedenle PLGA'nın sudaki bozunma özelliği kopolimerin molekül ağırlığına ve laktik:glidik oranına bağlıdır. Yüksek glidik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı, biyobozunma oranını artırmaktadır [61].

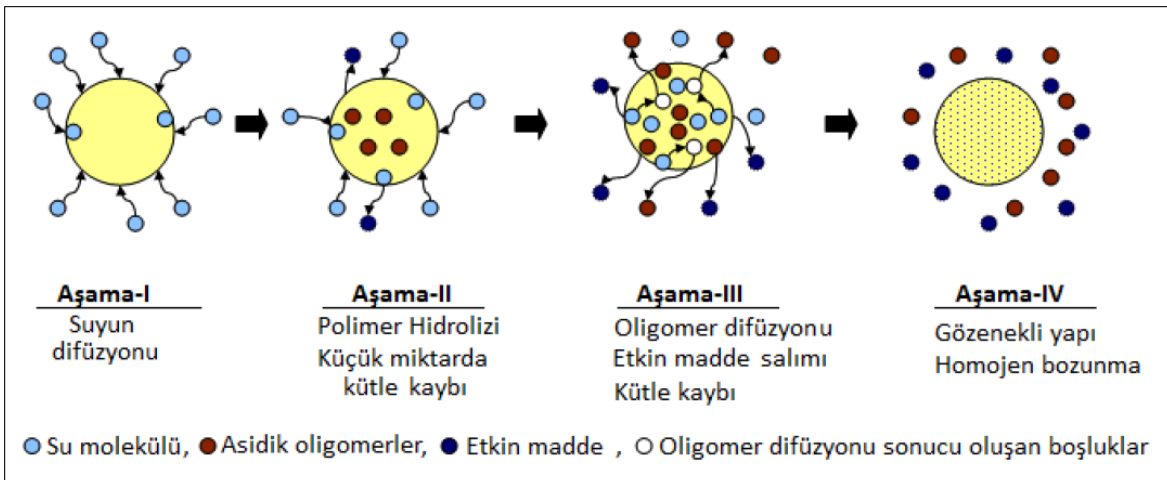


Şekil 2.16. Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları ve PLGA polimerinin hidrolizi

PLGA; fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyopolimerdir. PLGA kopolimerleri gerek yağda, gerekse suda çözünen etkin maddeler ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır [65]. PLGA vücutta laktik asit ve glidik asit monomerlerine parçalanmakta (Şekil 2.16), bunlar da sitrik asit döngüsüne girerek metabolize olarak karbondioksit (CO₂) ve suya (H₂O) parçalanmaktadır [61].

2.7.3. PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması

PLGA nanopartikülleri bulk erzyon (yığın erzyonu) yada yüzey (surface) erzyonu sonucu parçalanmaktadır (Şekil 2.15) ve etkin madde salımı polimerin hidrolizi sonucu bozunmasına bağlı olarak dört aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 2.17). Birinci aşamada suyun difüzyonu gerçekleşmekte bunu takip eden ikinci aşamada ise asidik uç gruplara sahip oligomerlerin hidroliz reaksiyonunu otokatalizlemesi sonucu hidroliz hızlanmaktadır. Üçüncü aşamanın başında kritik molekül ağırlığına ulaşılmakta ve oligomerler partikülden dışarıya difüze olmaktadır. Su molekülleri oluşan boşluklardan difüze olmakta bu da oligomerlerin daha fazla difüzyonunu teşvik etmektedir. Polimerin belirgin kütle kaybı ve etkin madde salımındaki keskin artış üçüncü aşamada meydana gelmektedir. Dördüncü aşamada ise polimerik matriks yüksek oranda gözenekli bir yapıya dönüşmekte, bozunma daha yavaş ve homojen bir şekilde ilerlemektedir [67] .



Şekil 2.17. PLGA nanopartikülün hidrolizi ve etkin madde salım aşamaları [61]

Nanopartiküllerden ilaç salım kinetiği biexponansiyel fonksiyonla tanımlanmaktadır (Eşitlik 2.1).

$$C=Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Eşitlik (2.1)

C = t anında partikülde bulunan ilaç konsantrasyonu, A = Difüzyon kontrol sistemi sabiti, B = Erozyon kontrol sistemi sabiti, α , β = Oran sabitleridir. Genel olarak polimer matristen biyoaktif ajan salım oranı çözünürlüğe, difüzyona ve matris materyalinin biyobozunurluğuna bağlıdır. Biyoaktif ajan salımı aynı zamanda yükleme verimine ve nanopartikül büyüklüğüne de bağlıdır. Küçük partikül boyutu, biyoaktif ajanın ani patlama (hızlı salım) şeklinde salımına neden olmaktadır. Ani

patlama etkisi zayıf bağlanmadan ya da geniş nanopartikül yüzeyine adsorbe olmuş çok miktarda biyoaktif ajandan kaynaklanmaktadır [50].

2.7.2. Nanopartikül üretim yöntemleri

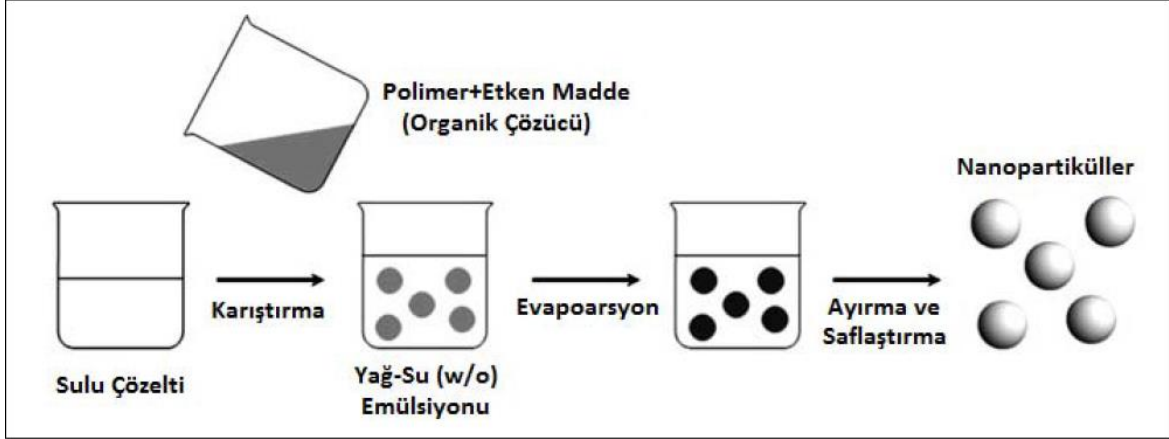
Nanopartiküllerin hazırlanma yönteminin seçimi, kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak önceleri monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler daha fazla kullanılmaktadır. Genel olarak kullanılan yöntemlerinden en çok kullanılan dört tanesi; emülsiyon-çözücü buharlaştırma, monomerin polimerizasyonu, iyonik jelleşme ve süperkritik akışkan yöntemidir [50]. Bu tez çalışmasında da Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır.

Emülsiyon-Çözücü Evaporasyon Yöntemi:

Çözücü Difüzyon/Evaporasyon yöntemi olarak da anlandırılan bu method polimerik nanopartiküllerin oluşturulması için ilk geliştirilen ve polimerik nanopartiküllerin oluşturulmasında en sık çalışılan yöntemdir [61]. Bu yöntemde polimer ve biyoaktif ajan, diklorometan, kloroform, etil asetat gibi hidrofobik biyoaktif ajanları da çözebilen organik çözücü içerisinde çözülmektedir. Önceki çalışmalarda diklorometan ve kloroform daha sık kullanılırken yeni yapılan çalışmalarda bu kimyasalların yerini etil asetat almıştır. Oluşan karışım, surfaktan içeren uçucu sulu çözelti içerisine eklenerek emülsiyon oluşumu sağlanmaktadır. Geleneksel yöntemde tekli emülsiyon (yağ/su) ya da ikili emülsiyon (yağ/su/yağ) olmak üzere iki temel strateji tercih edilmektedir. Kararlı emülsiyon oluşumu yüksek hızda homojenizasyon ya da ultrasonikasyonu ile oluşturulur. Küçük boyutlarda partikül eldesi ve homojen dağılım için yüksek hızlı homojenizatör ile karışma sağlanmaktadır. Nanopartiküllerin üretiminin son aşaması olarak, çözücünün; evaporason, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda devamlı karıştırma ya da düşük basınç altında uçurulması sağlanmaktadır [50,61].

Bu tez çalışması kapsamında tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon yöntemi uygulanarak PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu yöntemde suda çözünmeyen etkin madde ve polimer için ortak olan çözücü seçilir ve her ikisi de ortak organik

çözücüde çözündürülür. Daha sonrasında yüzey aktif madde içeren sulu ortama karıştırılarak nanopartiküller üretilirler (Şekil 2.18) [61].



Şekil 2.18. Tekli emülsiyon w/o çözücü evaporasyon yöntemi ile nanopartiküllerin üretimi

2.7.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları

Son yıllarda, biyobozunur nanopartiküller yüksek biyoyararlanım, iyi enkapsülasyon, kontrollü salım ve düşük toksisite özellikleri gibi sahip oldukları avantajlardan dolayı; nanoteknoloji, tıp, biyoteknoloji ve diğer alanlarda sıklıkla biyoaktif ajan taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Özellikle de suda çözünen/çözünmeyen çeşitli tıbbi ilaçların ve biyoaktif moleküllerin hasta üzerindeki terapatik etkilerini arttırmak amacıyla tercih edilmektedirler [68, 69].

Tıp alanında özellikle antikanser ilaçlar, antienflamatuvar ilaçlar, antiparaziter ilaçlar, peptit ve proteinler için taşıyıcı sistem olarak, ayrıca, aşılarda ve tanı maddeleri olarak kullanılırken; veteriner hekimlikte de hayvanları parazitlere karşı korumak için içme suyu içinde verilen ve bağırsakta parçalanarak ilacı serbestleştiren nanopartiküller ile yaygın uygulama alanı bulmaktadır. Antijenik özellikteki molekülleri taşıyan nanopartiküllerin ise, immünolojide ümit verici sonuçlar oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [70,71].

2.8. Kemik Rejenerasyonunda Hayvan Modelleri

Günümüzde kroniyofasiyal alanda çok değişik kemik greftleri ve implantlar kullanılmaktadır. Rekonstrüktif cerrahide greft ve çeşitleri implantlar gibi değişik osteokondüktif ajanlar kemik yapımı veya defektin doldurulması gereksinim

duyulmaktadır. Her ne kadar farklı tip ve çalışma şekilleriyle bu implant ve greftler deney hayvanlarında denenmiş olsa da henüz uygun bir hayvan modeli tanımlamada bazı farklı görüşler mevcuttur [92,93]. Çalışmalarda kontrol amacıyla seçilen defektler genellikle spontan olarak iyileşebilmektedir. Genç hayvanlarda bu iyileşme yaşlılara oranla daha iyidir ve bu nedenle de tercih nedeni olarak görülmektedirler [94].

Bir kemik defektindeki iyileşmenin miktarı geniş ölçüde yara büyüklüğüne bağlıdır. O nedenle iyileşmenin gözlemlenmek istendiği bir defekt tipi spontan olarak iyileşebileceği boyuttan fazla olmalıdır. Kritik boyutlu defekt, bir hayvanda her hangi bir osteopromotif bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı (dolumu) ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmaktadır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibroz bağ dokusuyla dolumu ve iyileşme eğilimi göstermektedirler [95,96].

Genel olarak kabul edilmiş yaklaşımlar arasında optimum bir deney şartlarında kemik yapımının kalitesi konumunda 5 parametrenin önemi vurgulanmıştır [96];

- Hayvan türü
- Hayvan yaşı
- Defektlerin anatomik lokasyonu
- Defektlerin boyu
- Periost

Tüm bu faktörler seri olarak yapılmış birçok çalışmada hep gündemde kalmıştır. Ayrıca, kemik rejenerasyonunun gözleneceği bir hayvan modelinde şu özellikler bulunmalıdır [96];

- Mevcut defekt kritik boyutlu defekt çapından az olmamalıdır.
- Model değişmez özellikte olmalıdır.
- Hayvanlar kolayca elde edilebilir ve anestezisi kolay olmalıdır.
- İmplantın uygulandığı kısım, hem kortikal hemde kansellöz kemik içermelidir.
- Fraktür riski minimize edilmelidir.
- Modelin takibi histolojik ve radyolojik olanaklara açık olmalıdır.

Ortopedi ve travmatolojide kullanılan deney hayvanları genel olarak: Kobay (Guinea Pig), Fare (Balb/C ya da Swiss Webster) (20-50 g), Sıçan (Wistar ya da Sprague-Dawley) (250-450 gr), Tavşan (Yeni Zelanda Tavşanı) (2.5-3.5 kg), Köpek (melez köpekler-beagle) (10-12 kg), Koyun, Tavuk, Domuz (York-shire, Alman) ve Maymun (primat) olarak sıralanabilir. Çoğu deneysel çalışma için sıçanlar uygun hayvanlardır. Fakat kırıldak ve tendon çalışmalarında yada cerrahi bir tekniğin uygulanacağı çalışmalarda daha büyük oldukları için tavşan, köpek ve koyunlar tercih edilebilir. En ucuz ve kolay ulaşılanı civciv embriyosu olsa da çalışma sonuçları insan patofizyolojisine çok uymamaktadır. İnsan fizyolojisine en yakın sonuçların alındığı hayvanlar maymunlardır. Fakat bu deneklerin bulunması, barındırılması pahalı ve zordur [98].

2.8.1. Kraniun (Kalvaria) Defektleri

Cranium (calvaria) canlılarda vücudun önemli bir parçasını teşkil etmektedir. Çok çeşitli ve genellikle çift ve simetrik olan kemiklerden oluşur. Kalvariya kemiklerinin çok farklı özellikler taşıdığı bilinmektedir. Herşeyden önce, diğer kemiklere göre biyolojik olarak daha inertlik gösterirler. Bu özellik zayıf bir kanlanma ve az miktarda olan (yer almış) kemik iliğiyle bağlantılıdır. Kanlanması da özel bir yapı gösterir. Deney hayvanlarındaki kraniyal defektlerin rejeneratif kapasiteleri insanlarınkinden daha iyi olduğu bilinmektedir. Kalvariya, morfolojik ve embriyolojik açıdan bir membran prosesünden gelişim gösterir ve bu nedenle de yüz bölgesinde yer alan membranöz yolla gelişmiş diğer kemiklerle benzerlik gösterir [95, 96].

Anatomik olarak kalvariya iki kortikal tabaka içerir ve bu açıdan da mandibulaya benzerlik gösterir. Fizyolojik olarak da kanvariya kortikal kemik atrofik bir mandibulaya benzerlik gösterir. Kalvariya bölgesi bu nedenlerle test amacıyla implant uygulanan en önemli bölgelerden biri olarak görülmektedir. Kritik boyutlu kalvarial defekt de sıklıkla 4 tip hayvanda ele alınabilir. Sıçanlar (ratlar) bilindiği gibi deney hayvanı olarak sıklıkla tercih edilen hayvanlar grubundadır. Ratların dışında; köpekte, tavşanda ve maymunda çok farklı kritik boyuttaki kraniyal defekt denemeleri yapılmıştır. Test amacıyla ratlarda çeşitli osteopromotif materyal uygulama fikri yaklaşık kırk yıl öncesine dayanmaktadır [93,96].

2.8.2. Sıçanlarda İskelet Sistemi

Ratlarda iskelet sisteminin gelişimi, diğer memelilere oranla daha yavaştır. İskelet sisteminin gelişiminin yaklaşık yedinci haftada en yüksek noktaya gelerek tamamlanmasıyla ratlar ortalama vücut büyüklüğüne ulaşmış hale gelir. Apendiküler iskelette kemikleşme, merkezden periferik doğru ilerleyerek önce ön ekstremitelerde bunu takiben de arka ekstremitelerde kemiklerinde görülür. Bununla birlikte kemikleşme, ratlar bir yaşını aşınca kadar tamamlanmaz. Ratlarda, iskelet bütünlüğünün devamlılığının sağlanmasında androjenler rol oynamaktadır. Yaşlanmış, büyümesini tamamlamış erkek ratlarda androjen eksikliği, kemik kaybı ve hasarının artmasıyla sonuçlanmaktadır. Her ne kadar androjen eksikliğine bağlı kemik kaybının mekanizması tam olarak bilinmese de bu olay önemli ölçüde osteopeniye neden olmaktadır. Ratlarda gebelik ve laktasyon, kemiğin mekanik özellikleri üzerine önemli derecede etkilidir. Tek bir gebelik, maternal iskeletin süngerimsi bölümünü güçlendirirken sık tekrarlayan gebelikler bu bölümü zayıflatmaktadır. Dişi ratlar ilk reproduktif döngüye ilişkin doku kayıplarını düzenleyebilmek için daha yoğun bir kemik kütlelerine sahiptirler. Böylelikle ilk döngü sonrasında bile optimal iskelet kütlelerini sağlayabilmektedirler. Buna karşın laktasyon döneminde, kemik hacminde ve kemiğin kortikal ile süngerimsi doku ağırlığında azalma oluşacağından eğer üreme sık aralıklarla meydana geliyorsa laktasyon sonrası normal onarım süreci aksamaktadır [97].

2.8.3. Etik İlkeler ve İzin

Deneyisel hayvan çalışmalarında deneyin bilimsel değeri yanı sıra etik yönlerini de düşünmek gerekir. William Russel ve Rex Burch (1959), deneysel hayvan çalışmalarında uyulması önerilen temel ilkeleri "3R" (Replacement, Reduction, Refinement) olarak özetlemişlerdir (2,3). Bu ilkeler deneysel çalışmaların birer hayvan katliamı olmasını engellemek amacıyla tanımlanmıştır.

Yerine Koyma (Replacement)

Hayvan deneyleri yerine konabilecek alternatif araştırma modellerini kullanmak (hücre kültürü, kadavra çalışması, bilgisayar modelleri, invitro infeksiyon modelleri vb) ya da filogenetik sıralamada alt seviyedeki denekleri (omurgasız hayvanlar) seçmek tercih edilmelidir.

Denek sayısını azaltma (Reduction)

Hayvanların farklı deney modellerinde ortaklaşa kullanılmasını tanımlar. Bir ilacın etkilerini ortaya koymak için ötenazi sonrası organların farklı birimler tarafından incelenmesi uygun bir yöntemdir. Ayrıca deney sonunda yeterli derecede güvenilir verileri sağlayacak en az sayıda hayvanın kullanılması için çalışma öncesi istatistiksel planlama yapılmalıdır.

Deney modelinin kalitesini düzenleme (Refinement)

Hayvanların deney süresince çektiği ağrı ve stresi azaltmaya yönelik önlemler alınmalı, gelişmiş teknik ekipman kullanılmalı ve daha az invaziv olan teknikler kullanılmalıdır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların ve kullanılan yöntemlerin özeti verilmiştir. İlk bölümde PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin üretim yöntemi ve karakterizasyon çalışmaları özetlenmiştir. Daha sonrasında ise PLGA nanopartiküllerin hazırlanması ve kriyojel doku iskelelerine yüklenmesiyle birlikte karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Ardından, nanopartiküllerden ve nanopartikül yüklü doku iskelelerinden 17- β estradiol ve testosteronun salımına yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalara yer verilmiştir. En son bölümde ise üretilen sistemin, sıçan adipoz kökenli mezenşimal kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelendiği hücre kültür çalışmaları ile sıçan kraniyumlarında oluşturulan kritik boyutlu defektler üzerindeki etkilerinin incelendiği rejenerasyon çalışmalarının yöntemleri belirtilmiştir.

3.1. Deneysel Malzemeler

Doku iskelesi hammaddesi olarak kullanılan 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çarpaz bağlayıcı ajan olan poli(etilenglikol) diakrilat (PEGDA) Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. Jelatin (domuz derisinden, Tip A) ve çarpaz bağlayıcı ajan gluteraldehit ile polimerleşme ajanları N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından ve amonyum persulfat (APS) Sigma (St Louis, USA) firmasından alınmıştır.

Çalışma kapsamında 17- β estradiol'ün ticari olarak mevcut toz formu kullanılmıştır ve Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimerleri (PLA:PGA, 65:35), ile stabilizatör olarak kullanılan didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alınmıştır. Polimerler Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edilen etil asetat içerisinde çözülmüştür. Partikül üretimi sırasında Heidolph (Almanya) marka yüksek hızlı homojenizatör kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Dubeculos Modified Essential Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin-streptomisin, dexametazon, β -gliserol fosfat, askorbik asit ve Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Hücrelerin metabolik aktivitelerinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT), izopropil alkol, sodyum dodesil sülfat (SDS), SEM

analizi için örnek hazırlamada kullanılan hekzametildisilazan (HMDS), Sigma-Aldrich (Almanya); ALP aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya), 2-amino 2-metil-1,3-propanol Aldrich (Almanya), magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve sodyum hidroksit (NaOH) ise Merck (Almanya) firmalarından satın alınmıştır. RT-qPCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) analizi için RNA izolasyonunda kullanılan Trizol Invitrogen (ABD) firmasından tedarik edilmiştir.

3.2. PHEMA-Jelatin Kriyojel Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

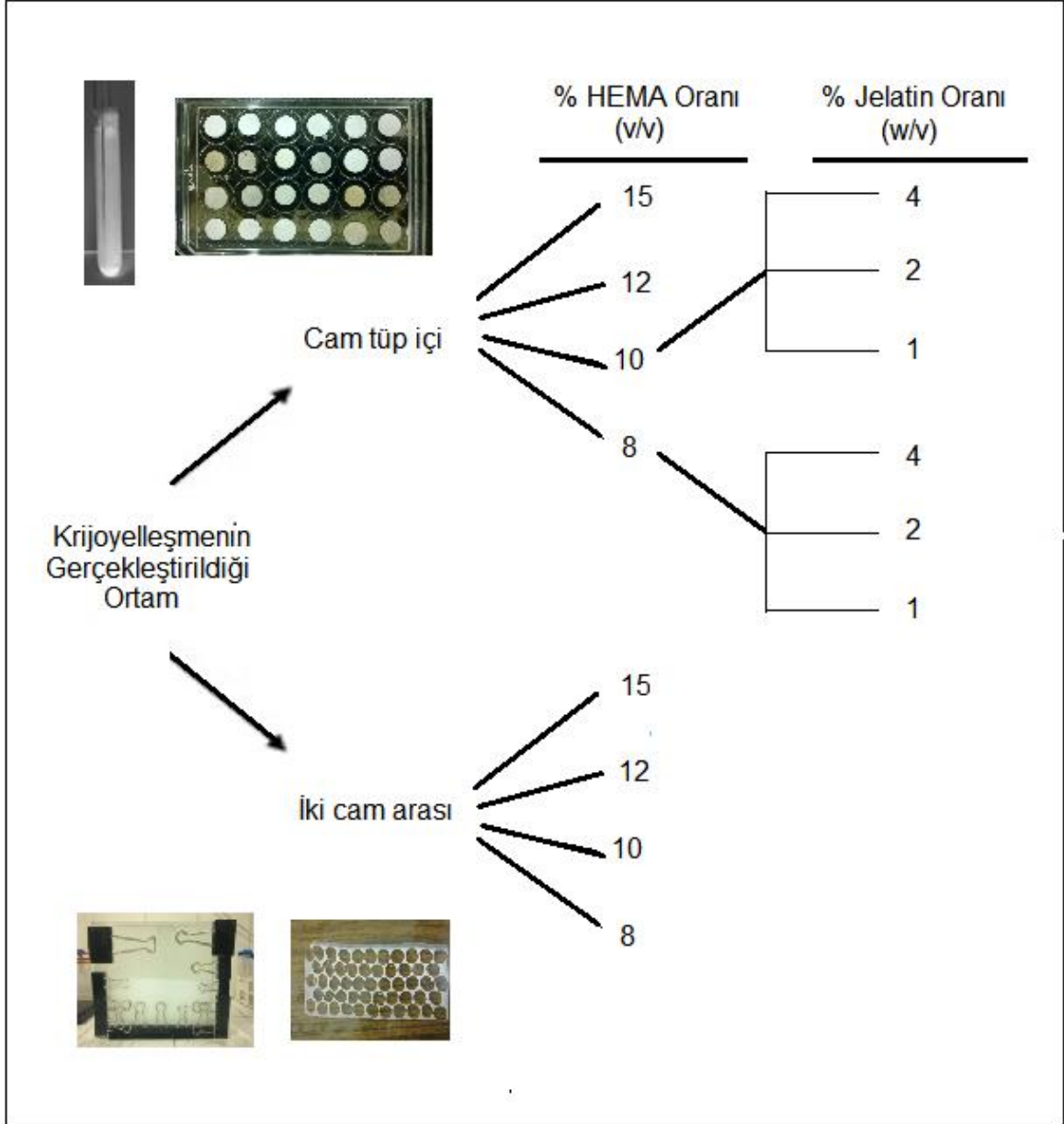
PEGDA çapraz bağlayıcısıyla hazırlanan PHEMA kriyojel doku iskeleleri, nihai monomer konsantrasyonları sırasıyla %8, %10, %12 ve %15 olacak şekillerde hazırlandı ve her gruptaki HEMA monomeri ile PEGDA çapraz bağlayıcısının oranı laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalar [72] baz alınarak 6:1 olarak belirlenmiştir.

Serbest radikal polimerizasyonu TEMED (%1 v/v) ve APS (100mg/mL %10 v/v) ile başlatıldıktan sonra monomer karışımları hızlıca, tez çalışmasında denenen iki farklı hazırlama yöntemi olan 2 cam arasına (camların arasındaki mesafe 2mm olacak şekilde) ve 8 mm çaplı 3 mL'lik kolonlara dökülmüştür. 24 saat boyunca eksi 18°C'de dondurulan jeller sonrasında oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Kriyojelleşmenin 2 cam arasında sağlandığı jeller 10mm çaplı kesici metallere (cutter) kesilerek, kolonlarda sentezlenen kriyojeller ise 20'lik bistüri ucuyla her biri 2mm olacak şekilde kesildi. Sonuçta %8, %10, %12, %15 PHEMA konsantrasyonuna sahip 8 mm çaplı ve 2 mm kalınlıktaki kriyojeller iki farklı sentez yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

Elde edilen bu gruplara uygulanan, tezin ilerleyen aşamalarında açıklanacak olan belirli karakterizasyon işlemlerinden sonra, kriyojelasyon işleminin tüpte sağlandığı hacimce %8'lik ve %10'luk PHEMA monomer konsantrasyonuna sahip kriyojellerin seçimiyle birlikte, bu iki farklı oranlı jelin her biri hacimce %1, %2 ve %4'lük farklı Jelatin içeriğine sahip olacak şekilde gluteraldetit çapraz bağlayıcısının yardımıyla yeniden farklı gruplar hazırlanmıştır. TEMED ve APS'nin eklenmesinden hemen önce PHEMA-PEGDA içerikli distile suya ayrıca jelatin ve gluteraldehitin (hacimce) 20:1 (hacimce) oranında eklenmesiyle hazırlanan bu kriyojellere de çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır.

3.2.1. Sentez çeşitleri: Farklı şekillerde ve bileşim oranlarında kriyojeller

İki cam arasında ve cam tüpte olmak üzere iki farklı çeşitte sentezlenen doku iskeleleri, hem içerdikleri HEMA monomer oranı hem de jelatin oranına göre farklı deney grupları halinde incelenmiş ve bu grupların tanıtımı Şekil 3.1’de şematik ve oransal olarak belirtilmiştir.



Şekil 3.1. PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi deney grupları

PHEMA-Jelatin kriyojellerin hazırlanmasında aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır:

- Çizelge 3.1'de verilen miktarlara göre; HEMA ile PEGDA belirtilen miktardaki saf suyun bir kısmında, buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcıda çözülmüştür.
- Jelatin ise o deney grubuna ait belirlenen miktarda ve yine o deney grubuna ait belirlenen suyun kalan kısmında 30°C'de çözülmüştür ve daha sonra bu iki çözelti birbiri ile buz banyosu içerisinde, yine belirtilen miktardaki gluteraldehit de eklenerek karıştırılmıştır.
- Polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan TEMED ve APS çifti en son olarak eklenmiş ve hızlıca karışmaları sağlanmıştır.
- Polimer şurubu hazırlandıktan sonra iskelenin deney grubuna göre, vakit kaybetmeden ve hızlıca:
 - 1) Alt uçları kapalı ve buz içerisine yerleştirilmiş cam tüplere (8 mm çap ve herbirinde 3.0 mL olacak şekilde) dağıtılmıştır. Ya da,
 - 2) Aralarında 2mm boşluk olacak şekilde (üç yüzeyi kapatılmış, üst tarafı polimer şurubunu dökmek için açık olan ve işlemiden önce hazırlanıp -20°C'de bekletilen) 2 cam blok arasına dökülmüştür.
- Hemen ardından tüpler veya cam bloklar, polimerizasyonun gerçekleşmesi için -18°C'deki dondurucuya kaldırılmış ve burada 24 saat bekletilmiştir.
- 24 saat sonunda dondurucudan çıkarılan kriyojellerin oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. (Oda sıcaklığında kriyojellerin içerisinde donmuş olarak bulunan su erir ve böylece kriyojellerin yapısında birbiriyle bağlantılı gözenekler oluşur.)
- Kriyojeller oda sıcaklığına getirildikten sonra yapıya girmeyen monomerlerin ortamdan uzaklaştırılması için saf su karışımı saf su ile defalarca yıkanmıştır.
- Yapıya girmeyen monomerlerin tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için yıkama çözeltisinin 595 nm'de verdiği absorbans sıfır olana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir.
- Kriyojeller kullanılmadıkları zaman +4°C'de %0.02 sodyum azidli PBS çözeltisi içerisinde saklanmıştır.

3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları

3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri, Carl-Zeiss EVO 506P (Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile Hacettepe Üniversitesi, Jeoloji Bölümü, Elektron Mikroskopisi Laboratuvarı'nda incelenmiştir. SEM ile görüntüleme öncesi, kriyojel iskeleler ilk olarak -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) kurutulmuştur. Sonrasında kuru kriyojel iskele örnekleri altın-paladyum ile kaplanmıştır. İskele gözenek çapı, SEM görüntüleri üzerinden Wayne Rasband tarafından geliştirilen Image J programı (Ulusal Sağlık Enstitüsü, Bethesda, M.D., ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrofotometre analizi

Jelatinin PHEMA kriyojelle katılıp katılmadığını belirleyebilmek için PHEMA kriyojel, PHEMA-Jelatin kriyojel ve ligand olarak kullanılan Jelatinin yapısı Infrared Spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar birbiri ile karşılaştırılmıştır. Analiz öncesi örnekler 55°C'deki etüvde kurutulmuştur ve örneklerin 4000-650 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır.

3.2.2.3. Şişme çalışmaları

Çalışma kapsamında hazırlanan PHEMA-Jelatin kriyojellerin dinamik şişme deneyleri fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) ve 37°C'deki etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) gerçekleştirilmiştir.

Şişme testleri için önce kuru ağırlıkları belirlenen 8 mm çap ve 2 mm kalınlığındaki kriyojel diskleri, PBS tamponuna alındıktan sonra belirli zaman aralıklarında ortamdan uzaklaştırılıp yüzey nemi alınarak hassas terazide (Precisa 205 A SCS ± 0.0001 g duyarlılık, İsviçre) tartılmıştır.

Dinamik şişme denemeleri 3 paralel örnek kullanılarak gravimetrik tayin yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Polimerlerin şişme oranları (Q), kuru ağırlıkları W₀, ve t zamanındaki ağırlığı, W_t ile Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır.

$$Q=(W_t- W_0) / W_0$$

Eşitlik (3.1)

3.2.2.4. Bradford yöntemi ile jelatin tutma analizleri

PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri hazırlandıktan sonra yapıya girmeyen monomerlerin uzaklaşmasını sağlamak amacıyla yapılan her yıkamanın ardından yıkama suyu atılmayıp +4°C'de saklanmıştır.

Her bir yıkama suyundan 0.3 mL alınmış ve 3 mL Bradford çözeltisi içerisine eklendikten sonra ve 5 saniye vortexlenmiştir. 10 dakika boyunca beklemeye alındıktan sonra çözeltinin 595 nm'de verdiği absorbans değerleri çift ışık yollu UV görünür spektrofotometre (Labomed, Inc. ABD) ile ölçülmüştür.

Absorbans değerlerinin karşılık geldiği jelatin miktarlarını belirleyebilmek için farklı jelatin konsantrasyonlarında çözelti hazırlayıp bu çözeltilerin 595 nm verdiği değerle ölçülmüş ve bir kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır.

Yıkama sularından elde edilen Optik Yoğunluk (O.D) değerleri, hazırlanan kalibrasyon grafiği aracılığıyla her bir yıkama suyundan elde edilen (yani doku iskelelerinin içerisinde tutamadığı) Jelatin miktarlarının bulunmasını sağlamıştır. Bulunan jelatin miktarları, her bir örneğin kendine ait olan yıkama suyu miktarıyla (50 mL) çarpılarak kaybedilen toplam gerçek jelatin miktarı hesaplanmıştır

Her grubun içerisine sentezleme sırasında konulan Jelatin miktarının da bilinmesiyle, doku iskelelerin içerisinde bulundurdıkları jelatin miktarları ilk konulan jelatin miktarından kaybedilen toplam jelatin miktarının çıkarılmasıyla bulunmuştur.

3.2.2.5. Mekanik analiz

Kitosan-jelatin hidrojellerin mekanik dayanım testleri için 9 mm çap ve 4 mm kalınlıktaki örnekler, 37°C'de PBS (pH=7.4) içerisinde şişirilerek, kullanılmıştır.

Sıkıştırma testleri, 2 mm/dk sabit çapraz başlık hızında, 0.05 N yük ile gerçekleştirilmiştir (Zwick/Roell Z010, Almanya). Her bir doku iskelesi için başlangıç sıkıştırma modülü, gerilim-gerinim eğrilerinin doğrusal bölgesinin eğimi alınarak hesaplanmıştır.

3.3. Testosteron ve/veya 17-β Estradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bu tez çalışması kapsamında PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasını ve hormon ile yüklenip salım sistemlerinin oluşturulmasını içeren deney kısımları Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyomühendislik Anabilimdalı içerisinde yer alan Hücre ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.3.1. PLGA nanopartiküllerin sentezi ve partiküllere hormon yüklenmesi

PLA/PGA 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküller emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Kısaca, PLGA kopolimeri etil asetat içerisinde çözülerek oluşturulan % 2'lik (w/v) organik faz, içerisinde % 1 oranında (w/v) didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) bulunan sulu faza ilave edilmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de karıştırılmıştır. Sonrasında karışıma sıcak su eklenerek organik fazın buharlaşması beklenmiştir. Ardından, sulu fazda süspanse halde elde edilen PLGA nanopartiküllerin yıkama işlemi yüksek hızdaki (13,000 rpm) santrifüj (Heraeus, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PLGA nanopartiküllere testosteron ve/veya 17- β estradiol yüklenmesi aşamasında 17- β estradiol/PLGA oranı 10 (w/w) olacak şekilde hazırlanan karışım etil asetat içerisinde çözülmüş ve boş PLGA nanopartikül üretimindeki işlemler aynen uygulanarak hormon yüklü PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır.

3.3.2. PLGA nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

3.3.2.1. PLGA nanopartiküllerin boyut ölçümü

Üretildikten sonra sulu faz içerisinde muhafaza edilen PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarının belirlenebilmesi için, nanopartiküllerin bulunduğu çözelti 1:10 oranında seyreltilmiş ve Zetasizer (Nano series, İngiltere) ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.2. Hormonların enkapsülasyon verimlerinin belirlenmesi

PLGA nanopartiküllerin, deney gruplarına göre üretim sırasında ortamda bulunan 17- β estradiol'ün veya testosteronun ne kadarını enkapsüle edebildiğini belirlemek amacıyla, nanopartikül üretiminin son aşaması olan yıkama/santrifügasyon aşamasında hormon yüklü nanopartiküllerin süpernatant ve yıkama suları toplanmıştır. Yıkama suları verim belirleninceye kadar 4°C'de tutulmuştur. Asıl olarak yıkama sularının içerisindeki hormon miktarının tayini öncesinde oluşturulan kalibrasyon grafiği aracılığıyla yapılmıştır. Sentez sırasında yükleme çözeltisindeki bilinen hormon miktarından, kapsüle olmayan (yıkama sularındaki) hormon miktarı çıkarılarak ve aradaki fark kapsüllenen estradiol miktarını vermiştir.

Öncelikle 2 mg testosteron ve 17- β estradiol ayrı ayrı 2'şer mL asetonitril içerisinde çözülmüş ve böylece 1 mg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti ard arda

asetonitril (ACE) ile seyreltilerek E2 ve TST'nin farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltileri elde edilmiştir.

Elde edilen karışımlar iyice vortekslelendikten sonra alınan 20 µL numune, HPLC (Dionex Ultimate 3000) C18 kolonuna beslenmiştir. HPLC sisteminde, mobil faz olarak su/asetonitril (35:65) kullanılmıştır ve akış hızı 0.7 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolona beslenen estradiollü standart çözeltilerin 280 nm'de alıkonma süresi olan 4.2 dk.'da çıkan pikin alanlarından ve testosteronlu standart çözeltilerin ise 240 nm'de alıkonma süresi olan 5 dk'da çıkan pikin alanlarından faydalanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Farklı hormon içerikli yıkama sularının hormon çeşidine göre aynı HPLC analiz prosedüründen geçirilmesinden sonra piklerin oluşturduğu alanlar belirlenmiş ve hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak konsantrasyona geçilerek kapsüllenmeyen testosteron ve estradiol miktarı belirlenmiştir. Yükleme çözeltilisinde kullanılan hormon miktarlarından, kapsüle olmayan hormon miktarları çıkartılmış ve aradaki fark kapsüllenen testosteron ile estradiol miktarını vermiştir. Son olarak bu miktarlardan % enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

3.4. Salım Sistemlerinin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında testosteronun PLGA Nanopartiküllerden ve PLGA nanopartiküllerin yüklendiği PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinden salım çalışması ile 17-β estradiolün PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinden salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. PHEMA-Jelatin doku iskelelerine hormonla yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin yüklenmesi

Distile suda sonikatör (Bandelin, Almanya) kullanılarak dağıtılan ve süspansiyon haline getirilen testosteron ve 17-β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller önceden hazırlanmış PHEMA-Jelatin doku iskelelerine emdirilerek yüklenmiştir. Bu işlem için, süspansiyon haldeki karışımdan doku iskelelerine 25 µl üstten ve 25 µl alttan şırınga yardımıyla emdirilmek üzere toplam 50 µl çekilmiştir.

3.4.2 SEM analizleri

PHEMA-Jelatin doku iskelelerine yüklenen Hormon içerikli nanopartiküllerin iskelelerin yüzey ve gözeneklerinde nasıl dağıldığının gözlemlenmesi için, Carl-Zeiss EVO 506P (Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile Hacettepe

Üniversitesi, Jeoloji Bölümü, Elektron Mikroskopisi Laboratuvarı'nda incelemeler gerçekleştirilmiştir. SEM ile görüntüleme öncesi, PLGA nanopartikül emdirilmiş kriyojel iskeleler ilk olarak -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) kurutulmuştur. Sonrasında kuru kriyojel iskele örnekleri altın-paladyum ile kaplanmış ve Mikroskopta incelemeye alınmıştır.

3.4.3. Salım çalışmaları

Tez kapsamı boyunca üç farklı salım sistemi hazırlanmıştır. Bunlar:

- %10PHEMA-%4Jelatin Kriyojel doku iskelesinden testosteron salımını inceleyen sistem (PHEMA/Jelatin İskele+TST)
- %10PHEMA-%4Jelatin Kriyojel doku iskelesinden 17-β estradiol salımını inceleyen sistem. (PHEMA/Jelatin İskele+E2)
- PLGA nanopartiküllerden testosteron salımını inceleyen sistem (PLGA/TST)

1mg testosteron içeren 2 mg toz haldeki partikül, 10 mL fosfat tampon çözeltisine (PBS, pH: 7.4) eklenmiştir.

Doku iskelelerinden salım çalışmalarında her biri 63 µg TST ve/veya 50 µg E2 hormon bulunduracak şekilde 1 mg PLGA nanopartikül içeren (Hormonların farklı enkapsilasyon verimlerine ve günlük salması gereken miktarların hormonlara göre homojen olması sağlanacak şekilde miktar hesabı yapılmıştır.) 8 x 2 mm boyutlarındaki iki adet iskele 10 mL PBS (pH: 7.4) ile %0.2 sodyum azid içeren cam şişelere eklenerek salım çalışması yürütülmüştür (Şekil 3.2.A).

Nanopartikülden testosteron salım çalışmasında ise yüklü nanopartiküller liyofilize edilerek kurutulduktan sonra 6mg testosteronlu PLGA nanopartikül tartılmıştır ve 30 mL PBS ile %0.2 (w/v) Sodyum azid içeren santrifüj tüplerinin içersine alınmıştır (Şekil 3.2.B)

İn-vitro salım çalışmaları 37°C'de ve 70 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde yürütülmüştür. Nanopartiküllerden salım çalışmasında, belirlenen zamanlarda salım ortamından numune alınmadan önce 15000rpm'de 15 dk boyunca santrifüj işlemi yapılmış ve partiküllerin çökmesi sağlanmıştır.

Salınan hormon miktarlarını belirlemek için, hazırlanan salım ortamlarından ilk gün 2., 4., 8. ve 24. saatlerde, salım süresi sonuna kadar ise gittikçe artan belirli gün aralıklarında 900 µL numune alınmış ve yerine alınan miktar kadar taze

Sodyum azidli PBS eklenmiştir. Alınan numuneler üzerine 100 µL metanol eklenerek salınan hormon miktarları Bölüm 3.3.2.3'de anlatıldığı gibi HPLC ile tayin edilmiştir. Analiz için alınan örneklerdeki hormon konsantrasyonları ölçülmüş ve kümülatif salım verileri elde edilerek salım profilleri oluşturulmuştur. Salım çalışmaları tüm sistemler için üç paralel örnek ile yürütülmüştür.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasında,

- 1) PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesinin (Hormonsuz kontrol grubu)
- 2) Testosteron yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sisteminin (TST grubu)
- 3) 17-β estradiol yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sisteminin (E2 grubu)
- 4) Hem testosteron hem 17-β estradiol yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sisteminin (TST+E2 grubu) kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla *in-vitro* koşullarda adipoz kökenli sıçan mezenşimal kök hücreler (ADMSC) kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. ADMSC'lerin eldesi ve karakterizasyon çalışmaları

Bu tez kapsamında yürütülen *in-vitro* kemik dokuya farklılaşma çalışmalarının hücrelerin izolasyonunu, *in-vitro* kemik dokuya farklılaşma süresince kültürasyonunu ve farklı karakterizasyon çalışmalarını içeren kısımlara ait deneyler Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.5.1.1. ADMSC'lerin izolasyonu

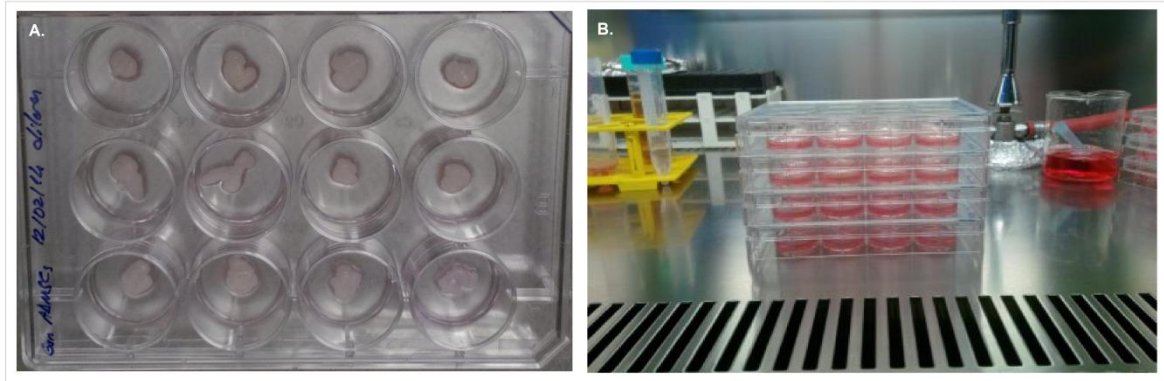
Bu çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurul iznini takiben, aynı koloni içinde yetiştirilmiş rastgele seçilen ve ortalama ağırlıkları 100-150 gram olan genç 4-6 haftalık erkek sıçanlar (Sprague dawley) kullanılmıştır. İzolasyon öncesi kullanılacak tüm cerrahi malzemeler sterillemiş ve İzolasyonun yapılacağı laboratuvar temizlenerek ultraviyole ışığı ile bir saat süreyle steril edilmiştir.

Alınan etik kurul iznine göre sıçanlara steril koşullar altında Ksilazin (10 mg/kg) ve Ketamin (50 mg/kg) anestezisi uygulanıp, anestizi altına alınan hayvanların opere edilecek bölgeleri tıraşlandıktan sonra antiseptik solüsyon ile dezenfekte edilmiştir. Hayvanlardan steril koşullar altında hem flank adipoz hem de gonadal adipoz dokuları toplanmıştır. İzole edilen adipoz dokular; içinde yüksek oranda antibiyotik-

antimikotik içeren taşıma besiyeri (%10 FBS ve %0.4 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) olan santrifüj tüpü içinde hücre kültürüne alınıp, tüm doku parçaları laminar kabin içinde taşıma besiyeri içeren petri kaplarında bistüri yardımıyla 4-5 mm olacak şekilde parçalara bölünmüştür [73].



Şekil 3.2. A. Doku iskelelerinden testosteron ve 17-β estradiol ile B. Nanopartiküllerden testosteron salım çalışması için hazırlanan salım sistemleri



Şekil 3.3. Sıçanlardan alınan yağ dokularının ADMSC izolasyonu için kültüre edilmesi.

Elde edilen doku parçaları 12 kuyucuklu kültür kaplarına Şekil 3.3.A'da görüldüğü gibi yerleştirilmiştir. Kaplarının yüzeyine yapışmaları için öncelikle üzerlerine bir damla primer besiyeri (%20 FBS ve %0.2 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) eklenmiş ve etüvde 15 dak inkübasyona bırakılmışlardır. 15 dakikanın bitiminde doku kurumayacak şekilde doku çevresini kaplayacak kadar primer besiyeri eklenmiş (Şekil 3.3.A) ve dokular 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir. 24 saatin sonunda her kuyucuğa 1 mL primer besiyeri eklenerek 37°C'de ve %5 CO₂ - %95 O₂'de standart kültür koşullarında inkübasyona devam edilmiştir. Mezenşimal kök hücrelerden salgılanma ihtimali olan çeşitli sitokinlerin farklılaştırma etkisini ortadan kaldırmak

için besiyeri hergün aynı miktardaki taze besiyeri ile bir hafta boyunca değiştirilmiş ve birinci haftanın sonunda dokular kültür kaplarından uzaklaştırılmışlardır [73]. İnkübasyon süresince hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler mikroskopik olarak incelenmiştir (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan).

Adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücreler, kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayarak yaygın hale geldikten sonra, tripsinizasyon yöntemi ile pasajlama işlemi yapılmıştır. Her bir 12 kuyucuklu kültür kabından üç adet 75 cm² kültür kabına pasajlama gerçekleştirildi. Pasajlama sırasında kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve serumun tripsin üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmak için kabın yüzeyi 0.1 mL tripsin/EDTA ile bir kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında yaklaşık 0.5 mL tripsin/EDTA (%0.05 / 0.02; w/v) solüsyonu ile kültür kabının yüzeyi kaplanarak hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalkması için 37 °C'de 5 dakika süreyle beklenilmiştir. Bu sürenin sonunda süspansen hale gelen tüm kuyucuklardaki hücreler primer besiyeri ile bir adet santrifüj tüpe toplamış ve 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp elde edilen pelet normal kültür besiyeri (%10 FBS ve %0.2 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) ile süspansen hale getirildikten sonra 75 cm² kültür kabında inkübasyona devam edilmiştir. Kök hücreler üç kez pasajlanmış ve her pasaj basamağında ileriki çalışmalar için tüm pasajlardan bir adet kryotüp dondurularak -197°C' deki sıvı azot tankında saklanıp, hücrelerin morfolojisi inverted mikroskopunda (IX70, Olympus, Japan) incelenmiştir.

3.5.1.2. Akış sitometri analizi

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki Fizyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda uygulanan akış sitometrik hücre karakterizasyon sonuçlarına ek olarak bu tez kapsamında elde edilen kök hücrelere de akış sitometri analizi yapılmıştır. Uygulanan protokolde ADMSC'ler yüzeyden kaldırılarak süspansen edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspansen edilen hücrelere 300 µL floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikolar eklenerek oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ADMSC'lerin immüno-fenotiplemesinde pozitif ve negatif işaretleyiciler olan CD29, CD90, CD54, CD45, CD106, MHC sınıf 1 ve MHC sınıf 2 antijenlerine uygun sıçan antikoları ve antikolar için önerilen izotip kontrolleri kullanılmıştır.

Flow sitometrik analiz Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Terapisi Araştırma ve Geliştirme Merkezinde (KOGEM) FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır ve Analizler BD CellQuest Pro programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.3. Farklılaştırma Çalışmaları

Normal kültür besiyerinde (%10 FBS ve %0.2 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) 12 gözlü plastik hücre kültür kaplarına ekimleri yapılan ADMSC'lerin %80 konfluensiye ulaşmalarının ardından besiyerleri içerisine osteojenik yönde farklılaşma uyarımı için: 10^{-8} M Dexamethason, 10mM β -Gliserofosfat ve 250 μ M L-Askorbik Asit ilavesi yapılmıştır; kondrojenik yönde farklılaşma uyarımı için: 10^{-7} M Dexamethason, 10ng/mL Transforming growth factor β , 37,5 μ g/mL L-Askorbik Asit, %1 ITS eklenmiştir; adipojenik yönde farklılaşma uyarımı için ise: 10^{-7} M Dexamethason, 5 μ g/mL İnsülin, 60 μ M Indomethacyn, 500 μ M 3-izobütil-1-metilksantin ilavesi yapılmıştır [22].

Farklılaştırma besiyerleri 28 gün boyunca osteojenik ve adipojenik farklılaştırma için 2 günde bir, kondrojenik farklılaştırma için 3 günde bir değiştirilmiştir. Farklılaştırma kontrolü için osteojenik hücre kültürüne Alizarin Red-S, kondrojenik hücre kültürüne Safranin O, adipojenik hücre kültürüne ise Oil Red O boyamaları yapılmıştır.

3.5.2. *In-vitro* kemik doku incelemesi için hücre kültürü koşulları

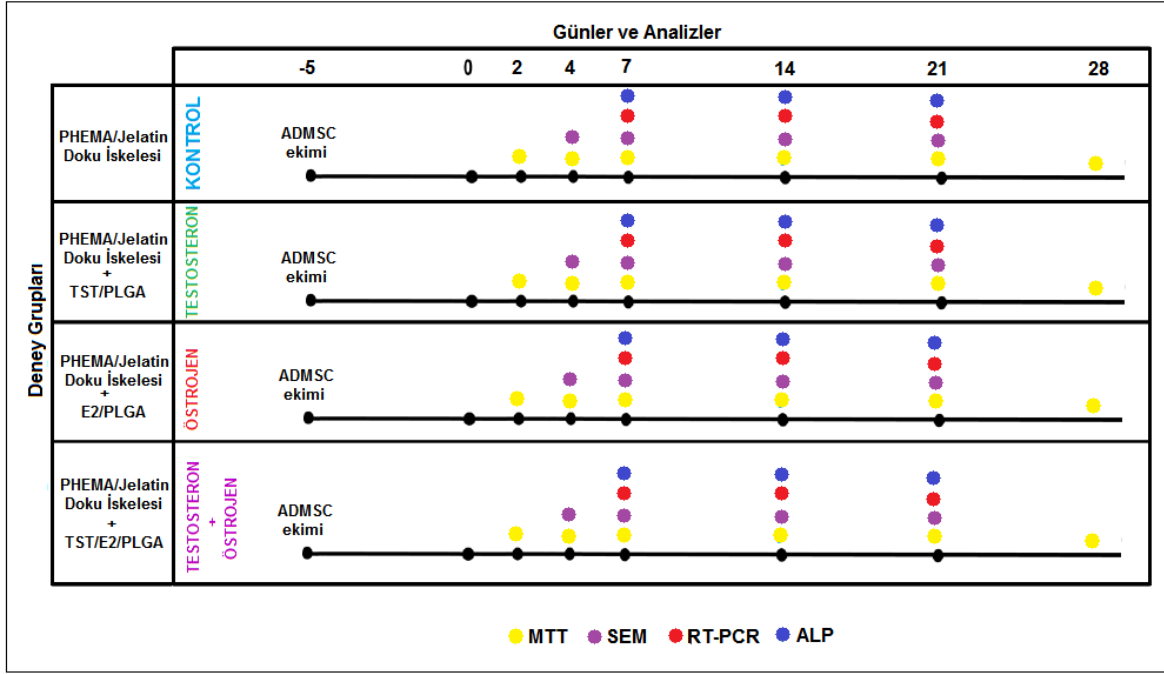
In-vitro çalışma kapsamında dört grup oluşturulmuştur. Yapılan tüm hücre kültür çalışmalarını ve analizlerini içeren tablo Şekil 3.4'te şematik olarak verilmiştir.

Bunlardan ilki kontrol grubu olarak belirlenen, nanopartikül ve dolayısıyla hiç hormon içermeyen PHEMA-Jelatin doku iskeleleridir (PHEMA/Jelatin = Kontrol Grubu).

İkincisi, testosteron yüklü nanopartiküllerin PHEMA-Jelatin doku iskelesine emdirilmesiyle oluşturulan sistemdir (PHEMA/Jelatin+TST/PLGA = Testosteron Grubu).

Üçüncüsü, 17- β estradiol yüklü nanopartiküllerin PHEMA-Jelatin doku iskelesine emdirilmesiyle oluşturulan sistemdir (PHEMA/Jelatin+E2/PLGA = Östrojen Grubu).

Dördüncüsü ise hem testosteron hem de yüklü nanopartiküllerin PHEMA-Jelatin doku iskelesine aynı miktarlarda emdirilmesiyle oluşturulan sistemdir (PHEMA/Jelatin+TST/E2/PLGA = Testosteron+Östrojen Grubu) (Şekil.3.4).



Şekil 3.4. İn-vitro hücre kültür çalışmasında incelenen deney grupları, yapılan analizler ve günlerini gösteren şema.

Hücre kültürü çalışması için, 8 x 2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelesine gruplarına göre 50µg 17-β estradiol ve 63 µg testosteron olacak şekilde nanopartikül (hormonlar için belirlenen enkapsülasyon veriminden faydalanarak gerekli PLGA partikül miktarı hesaplandıktan sonra) yüklenmiştir. Deneyi yapılacak her analiz üçer paralelle gerçekleştirilmiş ve yedekler ile beraber toplamda 250 adet doku iskelesi kullanılmıştır.

Yüklemelerden sonra dondurulup liyofilize edilen doku iskeleleri 24 gözlü hücre kültür kaplarına (TCPS, Orange Scientific, Belçika) her göze bir iskele gelecek şekilde yerleştirilmiş ve etilen oksit ile steril edilmiştir. Sonrasındaki hücre kültür çalışmaları boyunca steril ortam gerektiren tüm işlemler Tip II laminar akış kabininde yürütülmüştür.

Kültüre edilen ADMSC hücreleri 2.pasajlarındayken kültür kaplarında doyumluğa (confluency) ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmışlardır. Elde edilen hücre süspansiyonu 800 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonrasında süpernatant dökülmüş ve taze besi ortamı ile tekrar süspansiyon edilen hücreler, hemositometrik sayım sonrasında, hücre yoğunluğu 2×10^5 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine 50 µL hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, üzerine 1'er mL ortam eklenerek hücre kültür kaplarında, 37°C sıcaklığa, %95 nem ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde kültüre edilmiştir. Kültür ortamı beşinci gününde osteojenik farklılaşma ortamıyla değiştirilmiştir. Daha sonra ise 3 günde bir ½ oranında taze farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Farklılaşma ortamı, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0.1 amfoterisin B içeren DMEM ortamına 10⁻⁸ M dekzametazon, 10 nM β-gliserofosfat, 50 mg/mL askorbik asit eklenmesiyle oluşturulmuştur.

3.5.3. MTT analizi

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri 4., 7., 14. ve 21. günlerde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Ardından, her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 37°C'deki etüvde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikroparka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçüm ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

3.5.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin, doku iskelelerindeki morfolojileri ve iskele içerisindeki yapışma ve yayılma potansiyellerinin görüntülenmesi için

kültürün 4., 7., 14. ve 21. günlerinde alınan örneklerle SEM (Zeiss Evo 4750, Almanya) incelemesi yapılmıştır. Öncelikle, doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve ardından iskeleler ikişer kez PBS (pH: 7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL %2.5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile karanlıkta ve 4°C'de 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve örnekler analiz yapılana kadar PBS içinde yine 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve ardından sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilmesiyle gerçekleştirilen dehidrasyon işleminden sonra, iskeleler heksametildisilazan (HMDS) içerisinde de 5 dk bekletilmişlerdir. Örnekler, oda sıcaklığında kurutulup altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5.5. ALP aktivitesinin tayini

Hücrelerin osteojenik farklılaşması alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin tayini ile belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmasının 7, 14 ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler bir kez 1'er mL PBS ile yıkanmıştır. İskeleler, başka bir kültür kabına aktarılarak test yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. İskeleler liyofilizatörde kurutulduktan sonra parçalanarak Ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekler 250 µL Triton X-100 çözeltisi (% 1'lik (v/v) çözelti, PBS içinde) eklenmiş ve 4°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 4°C'de, 12000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde elde edilen Triton lizatından 50 µL alınarak, 125 µL ALP çözeltisine (56 mM 2-amino 2-metil-1,3-propanol ve 1 mM magnezyum klorür içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat (pNPP) eklenmiş ve 37°C'de 30 dk boyunca inkübasyon yapılmıştır. Oluşan tepkime, her bir örneğe 50 µL 2.5 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenerek sonlandırılmıştır. Mikroplaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) kullanılarak, 405 nm dalga boyunda p-nitrofenolün absorbansı ölçülmüştür.

3.5.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri

RT-PCR, DNA'nın spesifik bir parçasının *in-vitro* ortamda hızlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. PCR'in çalışma prensibi izole edilen hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımıyla sayısal olarak çoğaltılmasıdır (amplifikasyon).

Çift zincirli DNA'ya bağlandıkları zaman floresan veren Cyber green gibi boyalar kullanılarak çoğalmaya bağlı DNA artışı floresan miktarı ile ölçülmektedir. RNA molekülü ile gerçekleştirilen PCR çalışmalarında, öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile mRNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA doğrudan PCR işleminde kullanılmaktadır. PCR'in gerçekleşmesi için; kalıp olarak kullanılacak DNA örneği, çoğaltılacak bölgeye uygun şekilde tasarlanmış primer dizisi, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), yüksek sıcaklığa dayanıklı AVM polimeraz enzimi, uygun pH ve tampon çözelti gerekmektedir.

Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekleşir: İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek sıcaklık (çoğunlukla 94°C-97°C arasında) yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında gerçekleşir. Son aşamada sıcaklık 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.

Tez çalışması kapsamında, doku iskeleleri üzerinde testosteron ve/veya östrojen varlığında/yokluğunda üreyen ve farklılaşan, adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerinin Kollajen I, Osteokalsin, Osteopontin ve RunX2 ekspresyon seviyeleri, RT-PCR (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) ile belirlenmiştir.

Analiz için, kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde kültür kaplarından alınan doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve örnekler -80°C'de saklanmıştır. Ardından RNA izolasyonu yapılmıştır.

RNA izolasyonu:

Bunun için örnekler, DNAase ve RNAase içermeyen Ependorflara alınarak steril iğne ile parçalanmıştır. Her bir örneğin üzerine 500 µL Trizol eklenerek 25-30 s vortekslenmiş ve örnekler 2 sa 4°C'de bekletilmiştir. Hücrelerden RNA izole etmek amacıyla, örneklerin üzerlerine 125 µL kloroform eklenerek çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 11,300 rpm'de santrifüjlenmiştir. Oluşan sıvı süpernatant fazı yeni bir RNase içermeyen

Ependorf tüpe aktarılmıştır. Daha sonra sıvı faza 300 µL %70'lik (v/v) etanol eklenerek ve hafifçe vortekslenmiştir. Ardından kitin içerisinde bulunan RNAeasy spin kolona %70 alkollü ve sulu RNA karışımı konularak 13,000 rpm'de 15 sn santrifüjlendikten sonra kolonun altından ependorfa geçen sıvı kısım atılmış ve kolon ependorfa geri yerleştirilmiştir.

Bu aşamada elde edilecek RNA'daki, DNA kontaminasyonunu azaltmak için Qiagen RNase Free DNase Kit kullanılarak kolon üzerinde DNaz uygulaması yapılmıştır. Kit içerisindeki RNA yıkama tamponundan kolonlara 700 µl konulmuş ve tekrar 13000 rpm'de 15 sn santrifüj işlemi yapılmıştır. Kit içerisinde tarif edildiği gibi RPE buffer hazırlanıp (11ml'lik içeriği belirtilmeyen ticari bileşimin içerisine 44 mL saf etanol eklenerek hazırlanır) her örnek için 500 µl olacak şekilde spin kolona eklenmiştir. Ardından örnekler tekrar 13,000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiş ve kolonun altından ependorfa geçen sıvı dökülerek kolon yeniden ependorfa yerleştirilmiştir. RPE buffer ile yıkama bir kez daha gerçekleştirilip bu sefer santrifüjden sonra altta toplanan çözelti ependorfla birlikte kolona değdirilmeden çıkarılıp kolon yeni DNA-RNA'sız ependorfa alınmıştır. Hiç bir şey eklenmeden yeni ependorfta 13,000 rpm'de 1dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen kolon alınıp alttaki ependorf tekrar atılmıştır. Kolon yeni ependorfa koyulduktan sonra üzerine yine kitin içerisinde mevcut olan RNA-DNA'sız sudan 30 µl koyulmuş ve 13, 000rpm'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası kolonun içerisindeki RNA suyla birlikte ependorfa geçmiştir ve bu yüzden kolon artık atılarak, ependorflardaki RNA örnekleri -20°C'de cDNA sentezi yapılmaya dek bekletilmiştir.

cDNA sentezi ve RT-PCR analizi:

İki basamaklı olarak önce BM cDNA sentez kiti daha sonra FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada RNaz içermeyen su ve BM cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 5 dk 65°C, 60 dk 50°C ve 5 dk 85°C'de gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kiti kullanılarak forward-reverse primerler ve ilk aşamada elde edilen cDNA örneği kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından RT-PCR'in ilk aktivasyon basamağı 95°C 10 dk, 45 döngüde denatürasyon ile

çoğalma basamağı 95°C'de 20 sn, primerlerin ortamda bulunan hedef cDNA bileşeni ile birleşip ayrılma basamağı 60°C'de 20 sn ve uzatma basamağı 72°C'de 20 sn'de gerçekleştirilmektedir.

“Housekeeping gen” olarak kullanılan β -aktin ile RunX2, kollajen I, osteopontin ve osteokalsin genlerinin primer dizileri (Qiagen, BK, Türkiye) Çizelge 3.1'de verilmiştir. Analiz sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Alınan veriler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR'da kullanılan primer dizileri; F:Forward, R:Reverse.

Sembol	Gen	Primer dizisi (5'→3')
β -Actin	Beta aktin	F: 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' R: 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
COL1	Kollojen 1	F: 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3' R: 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
RunX2	RunX2	F: 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC-3' R: 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC-3'
OPN	Osteopontin	F: 5'-CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3' R: 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'
OCN	Osteokalsin	F: 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3' R: 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG -3'

3.5.7. İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçları GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama \pm standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.6. Hayvan Deneyi Çalışmaları

Deneysel ve klinik çalışmalar için çalışmanın amaç ve hipotezi ile uyuşan uygun model bir üzerinde çalışmak büyük önem taşımaktadır. Uygun bir hayvan modeli temel özellikleri (3R) sağlıyor olmalı; yapılacak çalışma + ve – kontrol grupları ile otolog grup içermeli ve ayrıca deney standart ve tekrar edilebilir olmalıdır.

Doku mühendisliği çalışmaları için dokulara özgün hayvan modelleri arasından 'Kraniyal Kemik Defekti Modeli' seçilmesi planlanmıştır, çünkü bu model standart çapta yaratılan kraniyal kemik defekti sayesinde objektif kriterlerde aynı çap ve kalınlıktaki materyal ile (otogreft/allogreft/implant) karşılaştırmalı çalışma olanağı sağlamaktadır. Ayrıca üstte periost altta duramaterin sağladığı osteojenik potansiyelin etkisi test edilebilmektedir ve yassı kemik çalışmaları için deney hayvanının boyutuna göre yeterli boyutta kemik ve çalışma alanı sağlamaktadır. Küçük ve dirençli hayvanlar olmaları nedeniyle denek olarak sıçan (Sprague-Dawley Rat) seçimiyle belirli sayıda denek kullanma şansı sağlamaktadır. Bu deneklerin maliyeti düşük ve deneyde kullanılacak gerekli madde miktarı da nispeten azdır.

Tez çalışması kapsamındaki kraniyal kemik defekti rejenerasyon çalışmaları için deney hayvanı olarak toplamda 60 adet Sprague Dawley Rat kullanılmıştır. Deney gruplarını ve her bir grup başına düşen sıçan adetleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Her gruptaki sıçan sayısı İstatistiksel Analiz yöntemlerinden biri olan ANOVA test tekniğine göre hesaplanmıştır. Test tekniğine göre %95 güven aralığında deney sonuçlarının anlamlı bir değer ifade edebilmesi için grup başına kullanılması gereken minimum hayvan sayısı 5 olarak bulunmuştur. 6 haftalık ve 12 haftalık olmak üzere iki farklı zaman diliminde araştırılan 6 grup olması dolayısıyla, kullanılacak toplam deney hayvanı sayısı 60 olarak hesaplanmıştır.

Tüm ratlar suya ve besine sınırsız ulaşabilmişlerdir. Ratlara, nem ve sıcaklığı kontrol edilen bir ortamda bakılmıştır. Bu tez kapsamındaki hayvan deneyi çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Hayvan deneyi rejenerasyon çalışmaları için kullanılan deney grupları ve miktarları

Deney Grupları	Grup Başına Hayvan Adedi (A)	6 ve 12 Haftalık İnceleme Süresi (B)	Toplam Hayvan Adedi (AxB)
Boş Doku İskelesi	5	2	10
Testosteron Yüklü Nanopartikül İçeren Doku İskelesi	5	2	10
Östrojen Yüklü Nanopartikül İçeren Doku İskelesi	5	2	10
Testosteron ve Östrojen Yüklü Nanopartikül İçeren Doku İskelesi	5	2	10
SHAM Kontrol*	5	2	10
Kontrol**	5	2	10

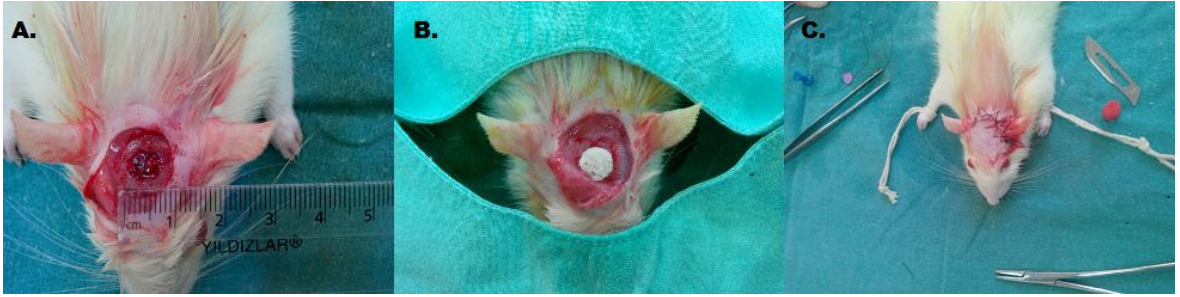
*SHAM: Kraniyal defektin oluşturulup yerine hiçbir sistemin yerleştirilmediği, kendiliğinden iyileşmemeyi gösteren kontrol grubunu; **Kontrol: Üzerinde hiçbir kimyasal veya cerrahi işlemin yapılmadığı kontrol gurubunu ifade etmektedir.

3.6.1. Cerrahi prosedür

In vivo deneyler yapılmak üzere, aynı *in vitro* hücre kültür çalışmalarında olduğu gibi hacimce %10 HEMA ve %4 Jelatin içerikli 8mm çaplı ve 2mm kalınlığındaki PHEMA kriyojel seçilmiştir. Kriyojeller, etilen oksit sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir.

Çalışma boyunca, steril bir cerrahi teknik kullanılmıştır: Ağırlıkları 240-300g arasında değişen 50 adet sıçan ağırlığına uygun dozda Alyfazin (%2'lik, 1ml'de 20 mg Ksilazin, kas gevşetici) ve Ketalar (%5'lik 1' ml de 50 mg ketamin baz, genel anestezi) karışımı intramuskular olarak enjekte edilerek hayvan anesteziye alınmıştır. İmplantasyon alanı olan kafatasının üst bölümü traşlanıp batikon solüsyonuyla dezenfekte edildikten sonra 8mm çaplı kritik boyuttaki defekt oluşturulmuştur. Periyost kraniyal yüzeyden kaldırıldıktan sonra 8mm çapındaki kraniyal kemik dairesel testere yardımıyla kafatasından çıkarılmış ve test edilecek

steroid hormonu içeren PLGA nanopartikül emdirilmiş/veya emdirilmemiş, 8mm çaplı kriyojel bazlı doku iskelesi yerleştirilmiştir. Hemen ardından beklemeden kriyojel başına yaklaşık 250.000 adet olacak şekilde AdMSC'li DMEM F-12 kriyojel doku iskelesine homojen bir şekilde emdirilerek yüklenmiştir. Açılan yaranın kendiliğinden iyileşmediğini göstermek amacıyla kullanılan 5 adet SHAM kontrol grubu sıçanlar için defekt oluşturulduktan sonra hiçbir ekleme yapılmamıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra açılan insizyon 3.0 ipek dikiş ile kapatılmıştır. İzleyen on gün içerisinde sıçanların dikişleri kendiliğinden çıkarması beklenmiş olup on gün içerisinde kalan herhangi bir dikiş araştırmacı tarafından çıkarılmıştır. Defekt oluşturulmasını ve malzemelerin yerleştirilmesi Şekil 3.5' te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. A. 8mm çaplı kritik boyutlu kranial kemik defekti açılması B.Malzemenin oluşturulan defekte yerleştirilmesi C. Kafa derisinin kapatılması

3.6.2. Mikro bilgisayarlı tomografi (Micro CT) çalışmaları

Farklı deney gruplarındaki sıçanların 6 ve 12 haftalık inceleme süreleri dolduğunda, hayvanlar yüksek dozda CO₂'ye maruz bırakılarak sakrifiye edilmiştir. Malzemelerin yerleştirildiği kafatası bölümü malzemenin bulunduğu kısma zarar verilmeyecek bir biçimde kibarca ve bütün halde kafatasının diğer sturlarından ayrılmıştır (Şekil 3.6). Alınan kemik doku örnekleri %10'luk formalin içerisinde muhafaza edilerek Micro CT incelemesine alınmıştır.



Şekil 3.6. Histoloji ve Micro CT incelemeleri için malzemelerin kafataslarından çıkarılması işlemi görüntüleri A. Kafatası derisinin kaldırılması B. Malzemeyle birlikte çıkarılan kafatası parçasının üstten görünüşü C. Malzemeyle birlikte çıkarılan kafatası parçasının alttan görünüşü.

3.6.3. Histolojik yöntem

Şekil 3.6'da fotoğraflandığı şekilde çıkarılan kemik dokuların histolojik analizler için ayrılanları %10'luk formalin çözeltisi içerisinde bir hafta boyunca fikse edilmiştir. Örnekler, hacimce %3 konsantre Nitrik asit, %30 Absol alkol ve 0.05g/ml Kloral hidrat içeren distile su çözeltisi (De Castro Solüsyonu) içerisine alınarak 20 gün boyunca dekalsifikasyon sürecine tabi tutulmuştur. İstenen yumuşaklığa ulaşan kemik dokuları dört saat boyunca akan su altında yıkamaya tabi tutulmuştur. Daha sonra konsantrasyonu %50'den %100'e kadar artan alkol serisinden birer saat geçirilen dokular, ardından 30 dakika boyunca Xylolde bekletilerek su içeriklerinden arındırılmışlardır. Son olarak, 1 gece boyunca sedir yağı içerisinde bekletilmişlerdir. Gece boyunca sedir yağında bekleyen kemik dokuları sırasıyla parafine gömme, -20°C'de soğutma, mikrotomda (Leica, Almanya) kesit alma, deparafinasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilerek Hematoksilen Eozin ve Masson's Trichrome boyamaları ile boyanarak mikroskop (Olympus IX70, Japonya) altında incelenmiş ve tüm malzeme alanın fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardaki farklı boyanan alanlar Image J programı kullanılarak sayısal alan verilerine dönüştürülmüştür.

3.6.4. İstatistiksel analiz

Nicel verilerin normal dağılımını değerlendirmek üzere Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Tanımsal istatistiksel değerler, ortalama (M) ± çeyrek değer genişliği (IQR) şeklinde ifade edilmiştir. Histolojik skorlar (kemik defekt iyileşmesi, doku cevabı) ve mikro CT analizi sonuçları (mineralize matriks formasyonu yüzdesi) parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiştir. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda farklılık anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmesi kullanılarak çoklu aralık testlerinden (post-hoc) Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Bağımsız değişkenler gruplarken; bağımlı değişkenler histoloji verileri olarak kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için p değeri 0.005'ten küçük olduğunda farklılık anlamlı kabul edilmiştir [99].

Çizelge 3.3. Histolojik skorum sistemi özeti

Kategoriler	Parametreler	Skorlar				
		4	3	2	1	0
Kemik Defekti iyileşmesi	Defekt içinde yeni kemik oluşumu	Defekt içinde tüm kemik oluşumu	Yoğun kemik oluşumu (> %65)	Orta kemik oluşumu (< %65, > %35)	Hafif kemik oluşumu (< %35)	Yeni kemik oluşumu yok
		Fibröz bağ dokusu oluşumu	Doku bütünlüğünün bozulması ve orta yoğun fibröz bağ dokusunun varlığı	Orta bağ dokusunun varlığı	Zayıf çubuk şeklinde hücrelerin veya hafif fibroblasias varlığı	Normal kontrol dokudan hiçbir farkı yok, implantta veya etrafında bağ dokusu varlığı yok.
Doku Cevabı	İnflamasyonel hücresel infiltrasyon	İmplant etrafında yoğun kolajen bağ dokusunun şiddetli birikimi	Yoğun miktarda inflamasyonel hücre lenfosit, makrofaj veya yabancı cisim giant hücreleri varlığı, az aynı zamanda önemli miktarda eosinofil ve nötrofil varlığı	Orta yoğunlukta lenfosit, makrofaj veya yabancı cisim giant hücreleri varlığı, az miktarda nötrofil ve eosinofil varlığı	Az miktarda inflamasyonel hücre varlığı	Normal kontrol dokusundan hiçbir farkı yok, implantta veya etrafında inflamasyonel hücre varlığı yok.
		İmplantta şiddetli hücresel infiltrate cevabı veya implant ve etrafında şiddetli doku nekrozu				

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE YORUMLAR

Çalışmanın bu bölümünde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak doku iskelesinin seçimi ve hazırlanmasına yer verilmiş ardından karakterizasyon çalışmaları tartışılmıştır. Ardından PLGA nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyon çalışmalarıyla birlikte, seçilen doku iskelelerine emdirilmelerinin ardından yürütülen salım çalışmalarına ve sonuçlarına yer verilmiştir. Bir sonraki aşamada ise çalışma kapsamında elde edilen ADMSC'lerin karakterizasyon çalışmasına ve bu hücrelerin hazırlanan doku iskelesi-nanopartikül sistemine ekimi ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiş ve yorumlar yapılmıştır. Son olarak farklı hormon içerikli kriyojellerin 6 ve 12 haftalık rejenerasyon incelemeleri sonrasında morfolojik ve histolojik incelemeler yapıp istatistiksel sonuçlar yorumlanmıştır.

4.1. PHEMA-Jelatin Doku İskelelerinin Seçimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Malzeme bilimi ve mühendislik prensipleriyle yaklaşık kemik doku, hücre ve hücre dışı matrisin (ECM) bir arada bulunduğu kompozit bir yapı olarak görülmektedir. Proteinler, glikoproteinler ve glukozaminoglukanlardan (GAG) meydana gelen bir ağ oluşturan ECM, doku mühendisliği uygulamalarında yerini iskelele bırakılmaktadırlar. Temelde iskelenin amacı, hücre tutunmasına olanak veren bir yapı olarak hücre çoğalmasını engellemeden farklılaşmaya izin vererek yeni dokunun şekillenmesine rehberlik etmektir.

Bu nedenle, farklı hormon salımlarının incelendiği bu tez çalışmasında, hücre dışı matris materyallerini taklit eden polimerler kullanılarak kemik doku oluşumu incelenmiştir. PHEMA'nın seçilmesindeki en temel neden tezin 2.4.2 bölümünde de bahsedildiği gibi, son derece biyouyumlu bir yapıya sahip olması ve kriyojelleşme methoduyla sentezlenmesi sonucu doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin sahip olması gereken birbiriyle bağlantılı süpermakro gözenekleri barındırmasıdır [41]. PHEMA'nın üzerindeki hidroksil grupları nedeniyle sahip olduğu yüksek hidrofilitésinin hücre yapışmasını engelleyici bir şekilde üzerinde tutmasına neden olduğu bilinmektedir [40]. Bu olumsuzluğu gidermek adına PHEMA yapısına, hücrelerin yapışmasına olanak sağlayan aminoasit dizilimlerini barındıran ve doğal bir biyomalzeme olan jelatin eklenmesine karar verilmiştir.

Ayrıca literatürde, jelatinin çapraz bağlanması sonucu termal ve mekanik dayanımının artırıldığı, bunun da biyolojik sıcaklık 37°C'de ve mekanik dayanımın önemli olduğu kemik doku oluşumunda kullanılabilir olmasına olanak sağladığı belirtilmektedir.

Farklı monomer bileşimine sahip kriyojellerin doku iskelesi amacıyla sentezlenmesinde kriyojel yapısına etki eden farklı faktörler göz önünde bulundurulmuştur. Bunlardan ilki, gözenek boyutunun kriyojenik rejime bağlı olarak değişimidir: Dondurma sıcaklığı ne kadar düşük olursa, daha fazla küçük boyutlu çözücü kristalleri oluşur ve böylece daha küçük boyutlu gözenekler oluşur [78].

Daha küçük boyutlu kristaller oluşmasının nedeni, nükleasyonun artması ve birçok küçük kristal oluşumunun birçok yerden başlamasıdır. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda, donmamış sıvı mikrofazın hacmi azalır ve böylece daha ince ve fakat daha yoğun gözenek duvarları oluşur. Bunun nedeni, jel başlatıcının kriyokonsantrasyonun donmamış mikrofazda artması ve hacminin azalmasıdır.

Dondurma sıcaklığı ne kadar yüksek ise, büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyümekte ve bunun sonucu olarak, daha geniş gözenekli kriyojeller hazırlanabilmektedir. Fakat yüksek dondurma sıcaklığı uygulanan kriyojelasyon rejimlerinde, çözeltinin donmama süper soğuk duruma gelme riski vardır [44]. Bu yüzden, sıcaklık reaksiyon karışımını donduracak şekilde -18°C olarak ayarlanmıştır.

Yapıya etki eden bir diğer faktör ise çapraz bağlanma oranıdır. Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmış ise, yani yapıdaki çapraz bağ oranı ne kadar az ise, suda şişme o kadar fazla olmaktadır [72]. Literatürde bulunan yapılmış çalışmalardan yola çıkılarak farklı çapraz bağlayıcı oranları arasından monomere göre 1/6 (v/v) olanı seçilmiştir.

Diğer bir önemli faktör olan monomer konsantrasyonunun etkisini belirlemek ve kemik doku mühendisliği için elverişli olabilecek iskeleler üretmek amacıyla farklı başlangıç konsantrasyonlarında PHEMA-Jelatin kriyojeller üretilmiştir. Başlangıç reaksiyonunun konsantrasyonu ne kadar yüksek ise daha yoğun ve kırılğan matriksler elde edileceği, başlangıç konsantrasyonu azaldıkça matrikslerin daha elastik ve süngerimsi bir yapı göstermeye başlayacakları göz önünde bulundurulmuştur [79].

PEGDA çapraz bağlayıcısıyla, Bölüm 3.2'de bahsedildiği gibi hazırlanan PHEMA kriyojel doku iskeleleri, öncelikle nihai monomer konsantrasyonları sırasıyla %8, %10, %12 ve %15 (v/v) olacak şekilde iki cam arasında ve cam tüp içerisinde sentezlenmiştir.

Elde edilen bu doku iskelelerinden Sem analizi sonuçlarına, gözenek boyutlarının oranlarına ve şişme analizleri sonuçlarına göre çalışmaların ilerleyen aşamaları için daha olumlu olacağı düşünülen %8'lik ve %10'luk (v/v) HEMA monomer içeriğine sahip doku iskelelerinin seçimi yapılmıştır. Bu seçim sonrasında iki farklı oranda HEMA içeren bu kriyojellere üç farklı oranda (%4, %2, %1 (v/v)) Jelatin ilavesi denenmiştir.

Son olarak hazırlanan bu altı çeşit kriyojel doku iskelelere şişme oranı belirlenmesi, gözenek boyutu analizi, yapıya katılan jelatin miktarının tespiti, FTIR, TGA ve mekanik analizler ile karakterizasyon çalışmaları yapılmış olup, *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları için en uygun olacağı düşünülen yapı seçilmiştir.

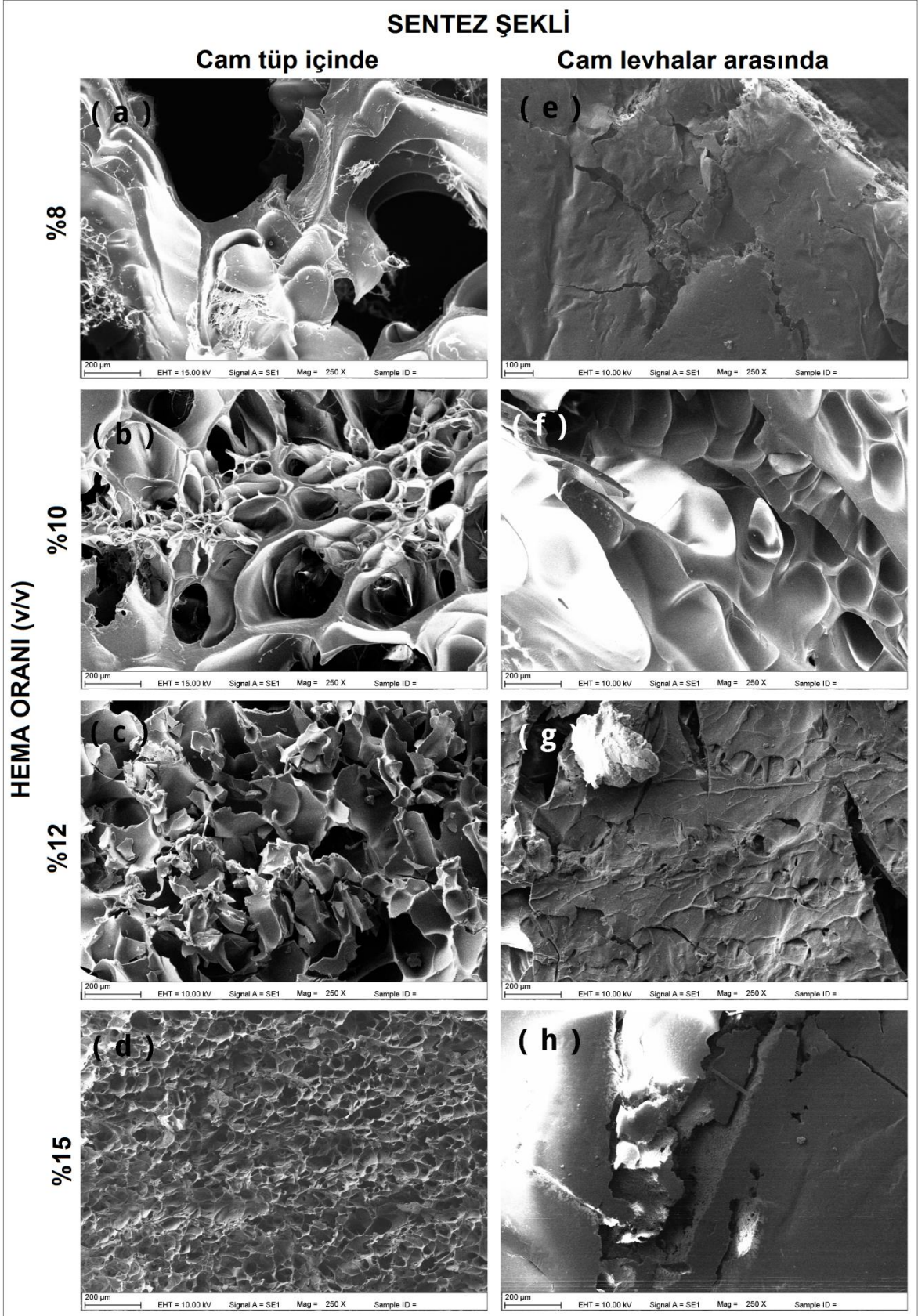
4.1.1. SEM görüntülerinin alınması

İki farklı şekilde (cam levha arası ve cam tüp içi) sentezlenen ve dört farklı monomer konsantrasyonunda (%8, %10, %12 ve %15 (v/v)) sentezlenen PHEMA kriyojellerden, iskele yapısının gösterilmesi ve gözenek boyutlarının belirlenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. (Şekil 4.1)

Şekil 4.1'deki (a), (b), (c) ve (d) cam tüp içerisinde sentezlenen; (e), (f), (g), ve (h) ise iki cam levha arasında sentezlenen kriyojel doku iskelelerini göstermektedir. Bu gruplar ise kendi içlerinde HEMA monomer oranı (v/v) bakımından (a) ile (e) %8'i, (b) ile (f) %10'u, (c) ile (g) %12'yi, (d) ile (h) ise %15'i temsil etmektedirler.

Deney çalışmaları aşamasında önce iki cam arasında sentezlenen doku iskelelerinden gözenek boyutunun belirlenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. Bu örneklerde, literatürde deri katmanı (skin layer) olarak bahsedilen, kriyojelin alt ve üst kısımlardaki, yani cam levhalarla temas halinde bulunan gözeneklerin kapalı olması durumu meydana gelmiştir (Şekil 4.1 e, f, g, h).

Cam yüzeylerinin HEMA'nın cama yapışmasını önleyici Repel silan maddesi ile kaplandıktan sonra kriyojelin tekrar sentezlenmesinde de deri katmanı problemi efektif olarak aşılammıştır.



Şekil 4.1. Farklı monomer oranlarına ve sentez şekillerine göre çeşitli kriyojel doku iskelelerinin 250x büyütmedeki SEM görüntüleri

Gerek salım çalışmaları için hazırlanan nanopartiküllerin iskelelere emdirilmesi açısından, gerekse *in-vitro* hücre kültür çalışmaları için hücrelerin ekimi sırasında özellikle alt ve üst yüzeyin gözenekli olması büyük önem arzettiğinden, sentezleme yöntemi değiştirilerek cam tüplerin kullanımına karar verilmiştir.

Bu sayede yine monolitik yapıda sentezlenen kriyojeldeki cam ile temas eden kısımlar sadece yanal yüzey ile sınırlı kalmıştır. Kriyojelleşme tamamlanmasıyla, oda sıcaklığında çözüldükten sonra elde edilen 8 mm çapa sahip monolitik kolonun 2'şer mm'lik parçalara bölünmesi ile alt ve üst yüzeyi gözenekli ve birbiriyle bağlantılı iç gözeneklere sahip olan doku iskeleleri elde edilmiştir (Şekil 4.1 a, b, c, d).

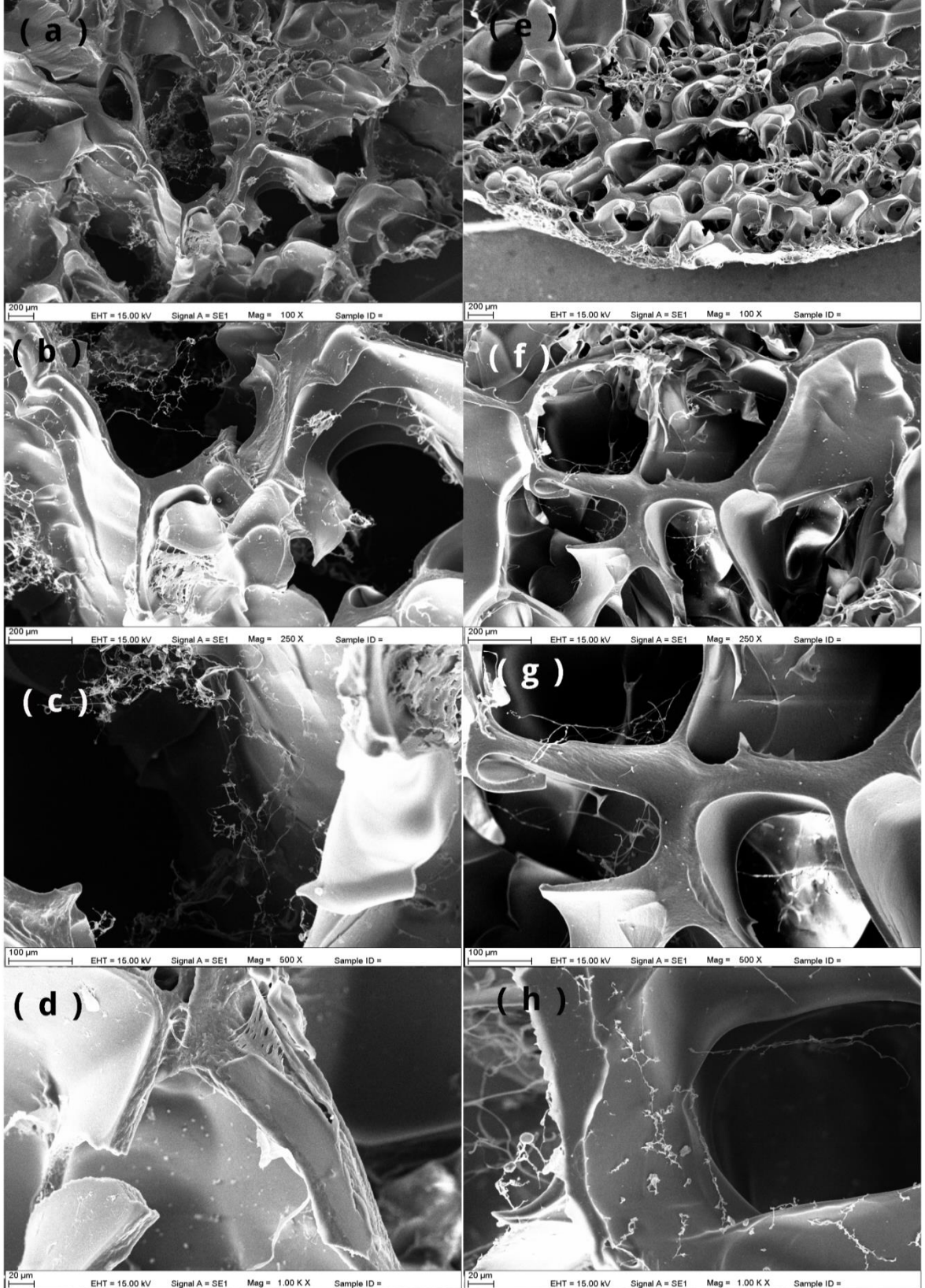
SEM analizi görüntülerinden cam levha arasında sentezlenenlere nazaran tüpte sentezlenen kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanımının daha elverişli olduğuna karar verilmiştir ve diğer karakterizasyon çalışmalarının yapılmasına tüpte sentezlenen kriyojeller kullanılarak devam edilmiştir. Tüpte sentezlenen kriyojellerden ilerideki bölümlerde açıklanacak olan karakterizasyon sonuçlarına göre %8 ve %10 oranında HEMA içeren kriyojellerin %4 oranında Jelatin eklenerek sentezlendiği grupların SEM fotoğrafları da Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Gözenek duvarlarında ve içlerinde açıkça belli olan ipliksi yapılar, PHEMA kriyojelin yapısına başarıyla katılmış olan Jelatinleri göstermektedir.

4.1.2. Gözenek oranlarının belirlenmesi

En az %90 gözeneklilik ve 100-400 μm 'lik gözenek boyutları kemik rejenerasyonun amaçlandığı doku iskeleleri için önerilen değerlerdir [74]. Cam tüp içinde sentezlenen belirtilen dört farklı HEMA monomer oranı bileşimine sahip kriyojel doku iskelelerinin gözenek boyutları Image J programı ile 100x büyütmedeki örneklerden 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı oranda (v/v) HEMA içeren doku iskelelerinin gözenek boyutları

Farklı monomer oranlarına göre PHEMA kriyojel doku iskeleler	Ortalama gözenek boyutu
%8 HEMA	401 $\mu\text{m} \pm 69 \mu\text{m}$
%10 HEMA	317 $\mu\text{m} \pm 110 \mu\text{m}$
%12 HEMA	253 $\mu\text{m} \pm 56 \mu\text{m}$
%15 HEMA	92 $\mu\text{m} \pm 34 \mu\text{m}$

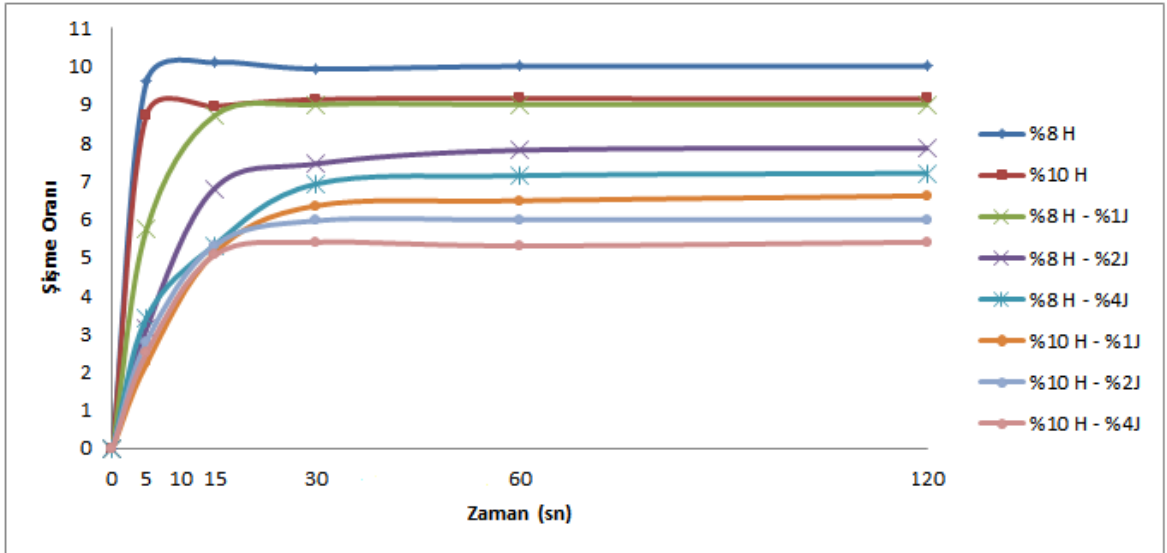


Şekil 4.2. %4 jelatin içerikli, %8 HEMA (a,b,c,d) ve %10 HEMA (e,f,g,h) içeren PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. (a ile e x100, b ile f x250, c ile g x500, d ile h x1000 büyütme oranlarındadır)

SEM görüntülerine ve ortalama gözenek boyutlarına göre %8 ve %10 oranında HEMA bileşimine sahip kriyojel doku iskelelerinin, her ikisi için ayrı ayrı %4, %2 ve %1 (v/v) farklı jelatin oranlarında yeniden sentezi gerçekleştirilerek karakterizasyonların diğer aşamalarında kullanılmasına karar verilmiştir. %4 oranında jelatin içeren örneklerin SEM görüntüleri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.

4.1.3. Şişme oranlarının belirlenmesi

PHEMA kriyojel çapraz bağlı ve hidrofilik yapıda bir matrikstir. Sulu ortamda çözünmez fakat çapraz bağlı olmasından dolayı yapısına su alarak şişer. Kuru kriyojeller, sıvı bir ortama yerleştirildiklerinde gözle bile gözlemlenebilecek şekilde çok hızlı şişmekte ve bir kaç dakika içinde en son şişmiş hallerine ulaşmaktadırlar. Bu uygulamalar açısından son derece elverişli bir durumdur. Örneğin, canlı vücuduna kuru halde implante edildiğinde hızlı bir şekilde vücut sıvılarını emerek boşluğu dolduracaklardır. Belirtilen HEMA ve Jelatin monomer oranlarında (v/v) ve cam tüp içerisinde sentezlenen PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin şişme oranları Eşitlik 3.1'de belirtilen ve daha önce bölüm 3.2.2.3' de açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir. Şişme çalışmalarının sonuçları Şekil 4.3'de yer alan grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Doku iskelelerinin zamana bağlı ortalama şişme oranlarını gösteren grafik (H:Hema, J:Jelatin)

Sonuçlara göre hazırlanan tüm kriyojel doku iskeleleri 37°C'de PBS içerisinde bırakıldıktan 30 sn içerisinde şişme davranışlarında temel farklılıkları göstermekte

ve 60 sn içerisinde maksimum şişme oranlarının neredeyse %100'üne erişmektedirler. Gruplar arasında en fazla şişme miktarına yapısında Jelatin bulunmayan doku iskelelerinin sahip olduğu ve genel olarak tüm gruplarda HEMA monomer oranı arttıkça şişme oranının düştüğü gözlemlenmektedir. %8 HEMA içerikli ve jelatin içermeyen bu kriyojel daha geniş gözeneklere ve daha ince gözenek duvarlarına sahiptir ve bu durum muhtemelen şişme yeteneğini artırmıştır. Literatürde başlangıç reaksiyonu karışımındaki monomer konsantrasyonunun artırılması ile gözenek duvarı kalınlığının arttığı, bunun da şişme derecesini azalttığı belirtilmiştir [44]. Bu durum, HEMA monomer oranı arttıkça Şekil 4.1'de gözlenen ve Çizelge 4.1'de hesaplanan gözenek boyutunun azalışıyla ve daha kalın ve yoğun olan gözenek duvarlarıyla ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde iki farklı HEMA oranına sahip grupların tümünde Jelatin miktarı artışına bağlı olarak şişme oranında azalma gözlemlenmiştir.

4.1.4. Kaybedilen jelatin miktarı tayini

İçerisine yüklenen jelatini etkin olarak tutabilmesi, son derece hidrofilik olan PHEMA doku iskelelerine hücre yapışmasının sağlanabilmesi açısından önem arz etmektedir. Kriyojel doku iskeleleri hazırlandıktan sonra yapılan yıkamalar sonucu Bölüm 3.2.2.4 ve Ek.1'de anlatıldığı gibi Bradford yöntemini kullanarak kaybedilen jelatin miktarları hesaplanmıştır. Farklı örnek gruplarına göre kaybedilen jelatin miktarının, o grup içerisine koyulan toplam jelatin miktarına göre yüzdeleri Şekil 4.4'de sayısal olarak belirtilmiş ve grupların birbirlerine göre ne kadar oranda jelatin kaybettikleri ise renkli barlarla belirtilmiştir.

Gruplar	Yüzde Jelatin Kaybı					Toplam
	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	4. Yıkama	5. Yıkama	
%8 Hema %1 Jelatin	0,73	0,61	0,20	0,03	0	1,57
%8 Hema %2 Jelatin	0,46	0,36	0,27	0,06	0	1,15
%8 Hema %4 Jelatin	0,82	0,42	0,21	0,09	0,01	1,55
%10 Hema %1 Jelatin	0,15	0,06	0,01	0	0	0,22
%10 Hema %2 Jelatin	0,09	0,06	0,02	0	0	0,17
%10 Hema %4 Jelatin	0,02	0,01	0,01	0	0	0,04

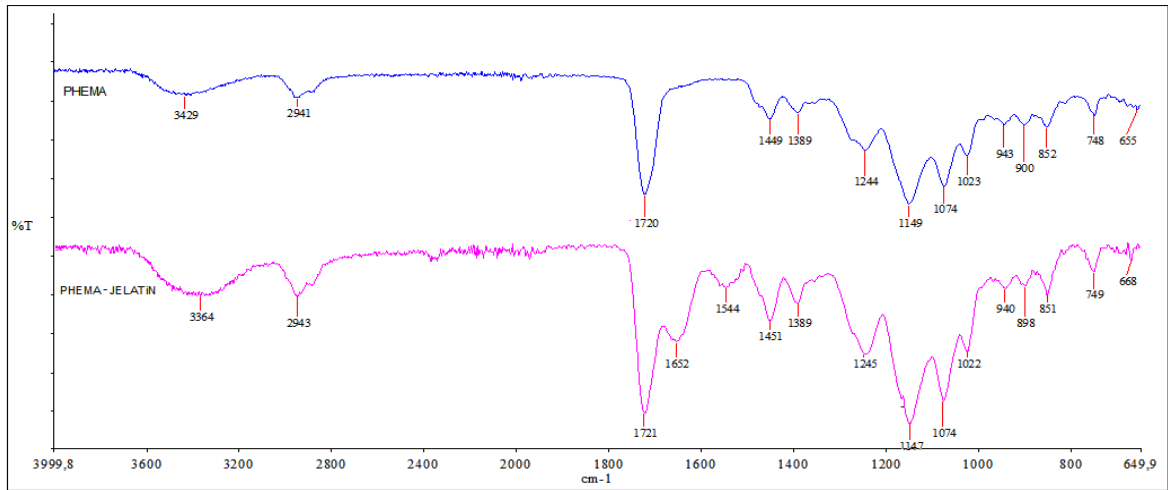
Şekil 4.4. İskelelerin kaybettikleri jelatin miktarının yüzde değerlerini (sayısal ifadeler) ve birbirlerine göre kayıp oranlarını (renkli barlar) gösteren şema

Şekil 4.4' deki sonuçlardan da anlaşıldığı gibi %8 HEMA içeren iskeleler, %10 HEMA içerenlere göre yapılan yıkamalar sonucu içlerine katılan jelatinin daha büyük bir kısmını kaybetmiştir. Eklenen jelatin miktarının artışı %8 HEMA içeren gruplar arasında anlamlı bir farka yol açmasa da %10 HEMA içeren gruplar

arasında, kontrol grubu %10 HEMA %4 Jelatin içerikli doku iskelesi iken $n=3$ ve $p<0.05$ ' de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. En az jelatin kaybının ve dolayısıyla en fazla jelatin tutma kapasitesinin olduğu grubun %10 HEMA ve %4 Jelatin içerikli doku iskelesi olduğu saptanmıştır.

4.1.4. FTIR analizi sonuçları

Jelatinin PHEMA kriyojel yapısına katılıp katılmadığının belirlenmesi amacıyla PHEMA kriyojelin ve PHEMA-Jelatin kriyojelin infrared spektrumları alınmıştır (Şekil 4.4). PHEMA'ya ait karakteristik bantlar 3429 cm^{-1} 'de (-OH gerilme), 1720 cm^{-1} 'de (C=O gerilme) ve $1149\text{-}852\text{ cm}^{-1}$ (C-O ve C-O-C gerilme frekansı) aralığında görülmektedir. PHEMA yapısında amid grubu içermemektedir. Bununla beraber literatürde Jelatinin infrared spektrumu incelendiğinde amid bandı bölgesinin karakteristik özellik gösterdiği görülmektedir [75]. Buna göre, jelatinle beraber hazırlanan PHEMA'ya ait karakteristik gruplar 3364 cm^{-1} 'de (-OH gerilme), 1721 cm^{-1} 'de (C=O gerilme), $1245\text{-}851\text{ cm}^{-1}$ (C-O ve C-O-C gerilme frekansı) aralığında, jelatine ait keskin amid I bandı (C=O gerilme) 1652 cm^{-1} 'de, amid II bantları (C-N gerilme ile çift N-H eğilme ve CH₂ eğilme) 1544 ve 1451 cm^{-1} 'de ve Amid III bantları (N-H eğilme ve C-O gerilme) 1245 ve 1074 cm^{-1} 'de belirgin olarak görülmektedir [76]. Elde edilen sonuçlar jelatinin PHEMA kriyojel yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.5. PHEMA kriyojel ve PHEMA-Jelatin kriyojelin infrared spektrumları.

4.1.5. Mekanik dayanım testi sonuçları

Termal ve mekanik özellikler, biyomalzemelerin kullanım performansını doğrudan etkileyen özelliklerdir. Bu doğrultuda, doku mühendisliği uygulamaları için kullanılacak olan biyomalzeme, doku iskelesinin tüm karakteristik özelliklerini belirleyen bir faktördür. Elastikiyet, belli ölçüde sıkıştırma ve basınca dayanıklılık gibi biyomekanik özellikler doku iskelesinin kolay implante edilebilmesi ve uzun dönem uygulamalarda başarı sağlanabilmesi için taşınması gereken kritik özelliklerdir. Doku iskeleleri onların kullanılacağı dokuya göre, hücreleri ve ECM'yi taşıyacak mekanik dayanıma sahip olmalıdır.

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak iskelelerin mekanik dayanım özellikleri iskele seçiminde önemli bir parametredir. Literatürde sıkıştırma dayanımları, kanselöz kemik için 2-12 MPa, vertebral kemik için 24-43 MPa ve femoral kemik için ise 48-80 MPa olarak belirtilmiştir [77].

Çizelge 4.2. PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin elastik modül (E) değerleri

Örnekler	8H 1J	8H 2J	8H 4J	10H 1J	10H 2J	10H 4J
E (KPa)	13,4442	18,0637	20,5786	25,1796	26,2540	65,6572
Std. Sp.	±2,14	±1,69	±1,81	±2,59	±2,86	±4,68

Tez kapsamında hazırlanan PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının belirlenmesi için sıkıştırma testi uygulanmıştır. Analiz sonucu elde edilen elastik modül (E) değerleri standart sapmaları ile birlikte Çizelge 4.2'de verilmiştir. Sıkıştırma testi sonucunda elde edilen elastik modül değerleri (E) literatürdeki polimerik kriyojel doku iskelesi değerleri ile uyumlu çıkmıştır [46]. Yapıya jelatin ilave edilmesi iskelenin mekanik dayanımını arttırdığı gözlemlenmiştir.

4.1.6. Doku iskelesinin seçimi

Sentezlenen farklı kriyojel doku iskeleleri üzerine yapılan farklı karakterizasyon çalışmalarından sonra, tez çalışması kapsamındaki hormonların kontrollü salımının kemik doku mühendisliğinde kullanılabilirliğinin incelenmesi amacıyla yürütülen tüm salım ve hücre kültürü çalışmalarında tüp içerisinde sentezlenen %10 PHEMA %4 Jelatin (v/v) içerikli kriyojel doku iskelesinin kullanımına karar verilmiştir. Bu kararın verilmesinde, kemik doku iskelesi olarak en uygun boyut ve şekildeki gözenek yapısına sahip olması, yıkamalar sonucu kaybedilen jelatin

miktarının düşük olması ve mekanik dayanımının diğer gruplara göre daha yüksek olması etkili olmuştur.

4.2. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Salım Çalışmaları

Kemik doku mühendisliği yaklaşımıyla kemik rejenerasyonunun sağlanmasında doku iskelesi ile hücrelerin yanında hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen biyosinyallere ihtiyaç duyulmaktadır. Steroid yapılı hormonlardan olan testosteron ve östrojen, kemik metabolizmasının düzenlenmesine kemik oluşumu/kemik yıkımı ve kemik döngü (turnover) hızı ile mineralizasyon etkileri ile büyük oranda katılmaktadır [54]. Kemik oluşumunu arttırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır [56, 57] Ayrıca, literatürde östrojenin ve özellikle testosteronun mezenşimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerinde az sayıda çalışma yer almaktadır [60]. Bu nedenlerle tez çalışması kapsamında, testosteron ve östrojen, kemik doku mühendisliğinde rejeneratif etki sağlayacağı düşünülerek seçilmiş biyosinyal molekülleridir.

Testosteron vücutta en çok sentezlenen androjen olup sudaki çözünürlüğünün son derece hidrofobik yapısı nedeniyle, birçok kaynakta neredeyse olmadığı belirtilmektedir. 17- β estradiol (E2), östrojenik kuvvetinin en yüksek olmasından dolayı östrojen kaynağı olarak rejeneratif tıp alanında kullanılmaktadır. E2 de yüksek hidrofobik yapıda olup, suda çözünürlüğü 5 mg/L'dir. Bu hidrofobik moleküllerin biyoyararlanımını ve sudaki çözünürlüğünü arttırmak için nano-mikro partiküller, lipozomlar ve siklodekstrinler kullanılmaktadır. Sunulan tez kapsamında da PLGA nanopartiküle yüklenmiş testosteron ve 17- β estradiol'ün PHEMA-Jelatin doku iskelesinden kontrollü ve uzun süreli salımlarının incelenmesi ve bunu takiben adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasına olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

PLGA, FDA tarafından onaylı polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) polimerlerinin birleşmesiyle oluşan poliester bir kopolimerdir. PLGA, oldukça yavaş bir biçimde bozunarak vücutta şeker metabolizmasının bir ara ürünü olan laktik asite dönüştüğü için normal hücre fonksiyonlarını etkilememektedir. Çalışmada uygun özelliklerinden ve önceki çalışmalarda elde edilen salım sonuçlarından dolayı PLGA'nın (PLA: PGA) 65:35 bileşimlerine sahip kopolimeri kullanılmıştır

[80]. Emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği hem kolay olması, hem farklı birçok maddeye uygulanabilir olması, hem de yüksek verimli sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [80]. Bu nedenle tez çalışmasında da emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile PLGA nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Küçük boyutlarda partikül eldesi ve homojen dağılım için yüksek hızlı homojenizatör ile karışım sağlanmaktadır [63]. Homojenizatörün hızı arttırıldıkça birim zamanda daha çok kayma gerilimine maruz kalan partiküllerin boyutları küçülmekte, dolayısıyla oldukça küçük boyda nanopartiküller elde edilebilmektedir. Ayrıca, yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak biyoaktif ajanın nanopartiküle enkapsülasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasında yüksek hızlı homojenizatör kullanılmış ve 15,000 rpm'de 8 dk karıştırma yapılarak nanometre boyutunda partiküller üretilmiştir [80].

Nanopartikül üretiminde homojen partikül boyutu eldesi için stabilizatörler kullanılmaktadır, ancak kullanılan stabilizatörlerin oluşan partikül yüzeyinden uzaklaştırılması oldukça zordur. Yüzeyden uzaklaştırılmayan stabilizatörün, biyolojik sistemlerde toksik etkiye neden olmakta ve polimerin bozunma rejimini etkilemektedir. Didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB), partikül hazırlanmasında sık kullanılan yüzey aktif bir maddedir. Yapılan çalışmalar, DMAB'nin, partiküllerin boy dağılımlarını dar bir aralıkta tuttuğunu belirtmiştir.

Tez çalışması kapsamında çalışılan farklı laboratuvardan birinde daha önce, emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA nanopartiküllere, PLGA/ilaç oranı (w/w;10) olacak şekilde, hidrofobik bir ilaç (5-Fluorouracil) yüklenmiş ve ortamda bulunan ilacın miktarı ile partiküllerce kapsüle edilen ilaç miktarı arasında bir doğru orantı kurulamadığı, aynı zamanda ortamda bulunan ilaç miktarı ile ortama salınan ilaç miktarı arasında da doğrusal bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır [81]. Literatür incelemesi yapıldığında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır [82]. Bu nedenle yapılan çalışmada PLGA/Testosteron ve PLGA/17- β estradiol oranının (w/w; 10) olmasına karar verilmiştir. Zetasizer ile boyut ölçümü sonrası boş nanopartiküllerin ortalama 200 nm, hormon yüklü nanopartiküllerin ise ortalama 250nm olduğu saptanmıştır.

4.2.1. PLGA Nanopartiküllerin TST ve E2 Enkapsülasyon verimleri

Bölüm 3.3.2.2'de ayrıntılı olarak anlatılan ve Ek.2' de belirtildiği şekilde yapılan hesaplamalar sonucu PLGA Nanopartiküllerin TST enkapsülasyon verimi %63, E2 enkapsülasyon verimi ise %53 bulunmuştur. Verimler arasındaki fark, testosteronun 17- β estradiol'e göre daha hidrofobik olmasıyla açıklanmaktadır.

4.2.1. Nanopartiküllerin doku iskelesine yüklenmesi

PLGA nanopartiküllerin PHEMA-Jelatin doku iskelelerine yükleme şeklinin ve yükleme miktarının belirlenebilmesi için literatür bilgileri ışığında denemeler yapılmıştır [80]. Bu denemelerde iki yöntem kullanılmıştır. Birincisi nanopartiküllerin iskele üretimi sırasında eş zamanlı olarak yapıya kayımlarıyla yüklenmesi ikincisi ise iskeleler üretildikten sonra emdirilerek yüklenmesi.

Literatürde, ilk yöntemin daha uzun süreler boyunca kontrollü salım yaptığı belirtilmesine rağmen tez çalışması kapsamında ikinci yöntem seçilmiştir. Bunun nedeni yapıya katma sırasında PLGA nanopartiküllerin PHEMA-PEGDA sulu çözeltisi içerisinde aglomere olduğunun gözlemlenmesidir. Ayrıca gerekli hormon miktarlarının ayarlanması bakımından iskeleler oluşturulduktan sonra emdirilerek yükleme yapmanın daha kolay ve farklı hormon gruplarını içerecek olan kriyojel iskeleler için daha homojen bir dağıtım elverişli olmasıdır.

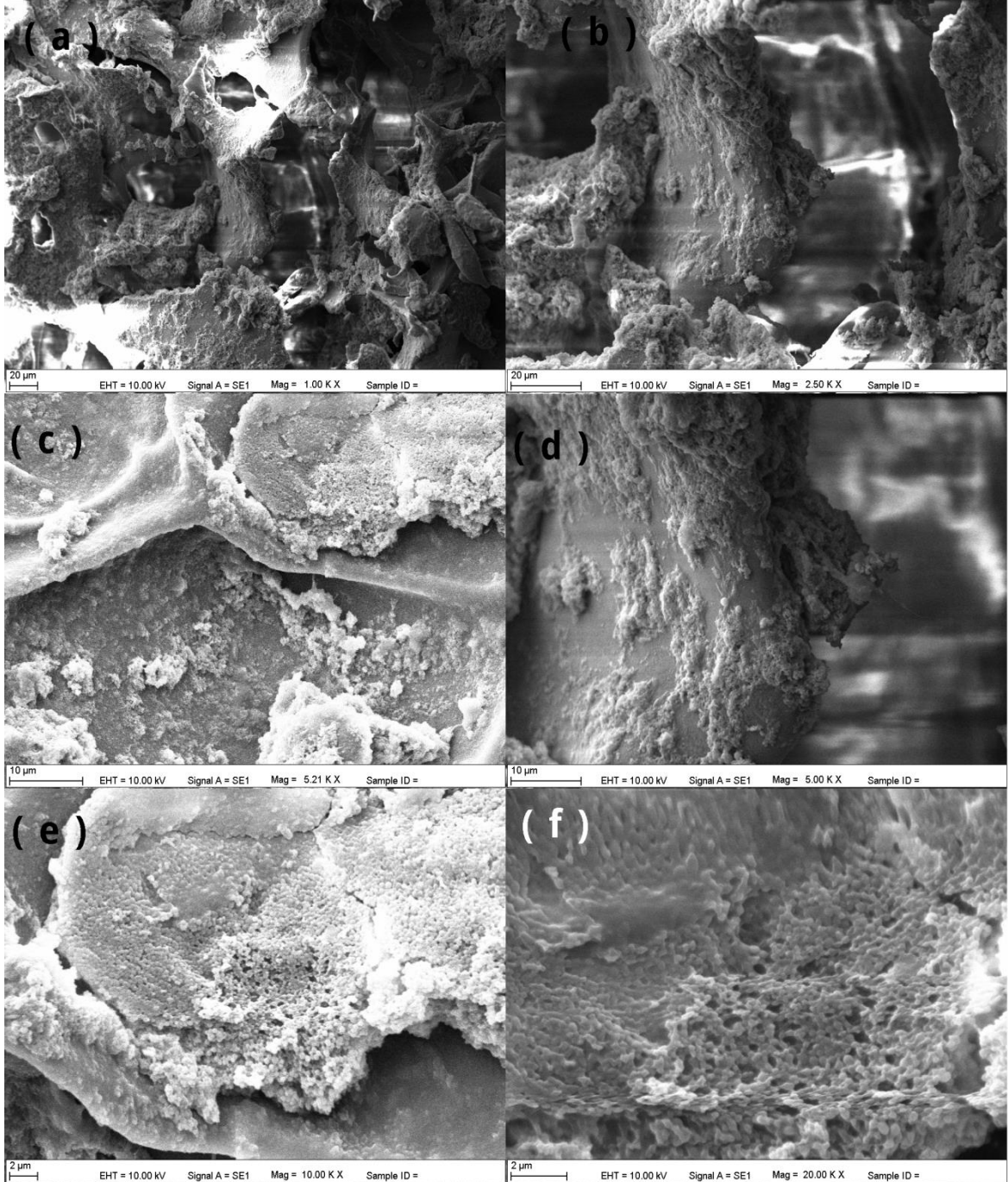
Sonuç olarak sulu fazda bulunan testosteron ve/ veya 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, önceden hazırlanmış doku iskelelerine emdirilerek yüklenmiş ve salım çalışmaları ile hücre kültürü çalışmaları için PLGA nanopartikül yüklü doku iskeleleri üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi görüntüleri

PLGA nanopartiküllerin, PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri içerisinde nasıl bir dağılım gösterdiklerini ve yapıdaki morfolojilerini belirlemek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. SEM fotoğraflarından, doku iskelesine emdirilerek yüklenen partiküllerin yapıya başarıyla katıldıkları ve yapı içerisinde homojen bir dağılım gösterdikleri anlaşılmaktadır. Ayrıca, partiküllerin morfolojilerinin ve boyutlarının beklenen şekilde olduğu gözlenmektedir.

Nanopartiküllerin iskeledeki dağılım potansiyelleri incelendiğinde daha çok jelatinler üzerinde ve gözenek duvarlarında yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Bu durum göz önüne alındığında jelatinin yapısında bulunan OH- ile PLGA yapısında

bulunan COOH- gruplarının elektrostatik etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.6.'den anlaşılacağı gibi önceden hazırlanmış doku iskelelerine PLGA nanopartiküllerin iskelenin iki yüzeyinden emdirilmesiyle daha homojen bir dağılım elde edilmeye çalışılmıştır.

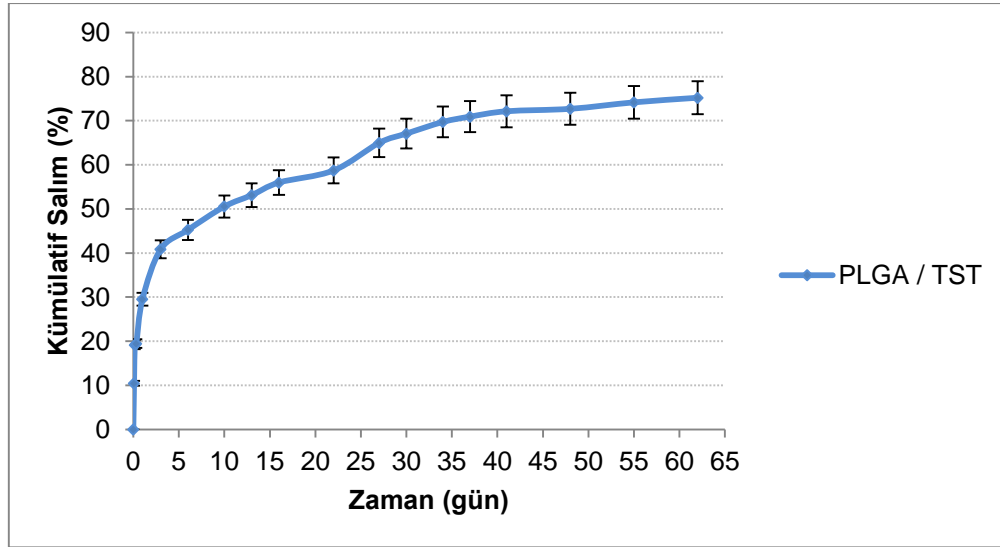


Şekil 4.6. 17- β estradiol ve testosteron içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) x1000 (b)x2500, (c) ve (d) ~ x5000 (e) x10,000 (f) x20,000

4.2.3. *In-vitro* salım çalışmaları

4.2.3.1. PLGA nanopartiküllerden testosteron salımı sonuçları

PLGA nanopartiküllerden salınan TST miktarının belirlenebilmesi için, nanopartiküllerin yer aldığı rezervuarlardan belirli aralıklarla örnekler alınmış (900 µL) ve eksilen hacim kadar ortama taze PBS eklenmiştir. Alınan örnekler üzerine metanol (100 µL) eklenerek, PBS içerisinde bulunan testosteronun çözünmesi sağlanmıştır. 20 µL örnek HPLC kolonuna beslenerek TST'nin alıkonma zamanında çıkan pikin alanı bulunmuş ve testosteron için HPLC kromatogramı ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen verilerden kümülatif salım grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6). PLGA Nanopartiküllerden E2 salımı tez çalışması kapsamında incelenmemiş olup, E2 salımı ile ilgili genel sonuçların yorumlanmasında çalışılan laboratuvar kapsamında daha önceki elde edilen PLGA nanopartiküllerden E2 salımı verilerinden yararlanılmıştır [80].



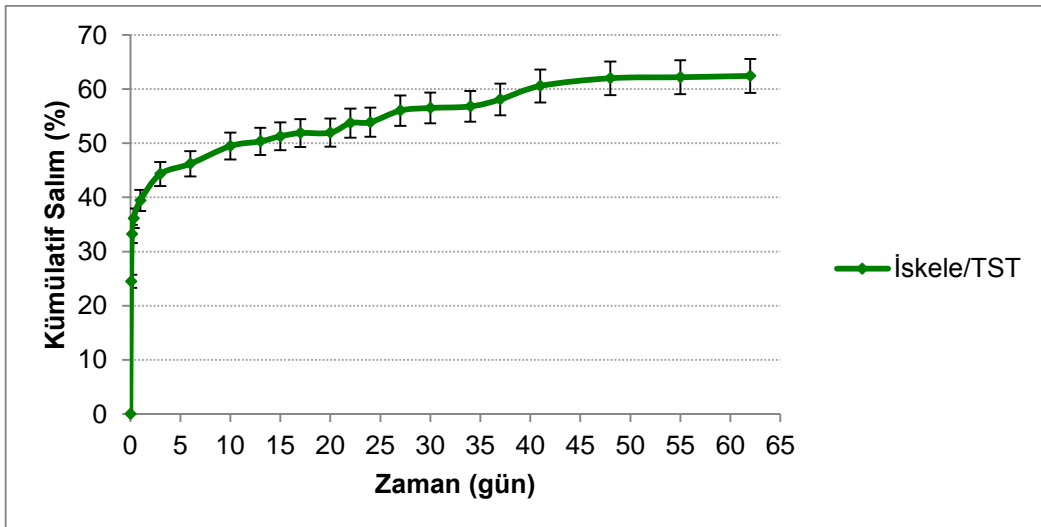
Şekil 4.7. PLGA nanopartiküllerden testosteron salım grafiği

TST yüklü nanopartiküllerin *in-vitro* salım çalışması PBS ortamında 62 gün boyunca sürdürülmüştür. Şekil 4.6.'de verilen kümülatif salım (%) grafiğinden de anlaşıldığı gibi ilk 24 saatte testosteron salımı ani patlama (burst effect) etkisi göstermiştir ve nanopartiküllerce kapsüllenen TST miktarının %19'u salınmıştır. İlk 13 gün boyunca salım, hızlanan bir şekilde artmıştır. Daha sonra ise, doğrusala daha yakın bir profil sergilemiştir. 62 günlük salım süresinin sonunda nanopartiküllere %63 verimle yüklenen testosteronun % 75'inin difüzyon mekanizması ile salındığı belirlenmiştir.

PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması Bölüm 2.7.3'de açıklandığı gibi difüzyon mekanizması ve matris bozunması şeklinde gerçekleşmektedir ve polimer degradasyonu salım profilini etkileyen önemli bir parametredir. Kullanılan PLGA kopolimerinin laktik asit içeriğinin yüksek olması, dolayısıyla polimer matrisin hidrofobik olması dolayısıyla bozunma süresi uzamaktadır. Böylece bozunma tam olarak gerçekleşmediğinden salım büyük oranda difüzyon mekanizması ile olmaktadır. Ayrıca, nanopartiküllerin salım ortamında birleşerek topaklandıkları gözlenmiştir. Bu aglömeryasyon yapının iç kısımlarında bulunan estradiolün difüzyon yolunu uzamakta ve böylece salınan E2 miktarının sınırlı olmasına yol açmaktadır. Enkapsüle olan TST miktarının %100'nün değil de %75'inin salınması bu şekilde açıklanabilmektedir. Yapılan değerlendirmeler sonucu elde edilen salım profilinin literatürde yer alan salım profilleri ile benzer olduğu gözlenmiştir [83].

4.2.3.2. PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinden testosteron ve 17- β estradiol salımı sonuçları

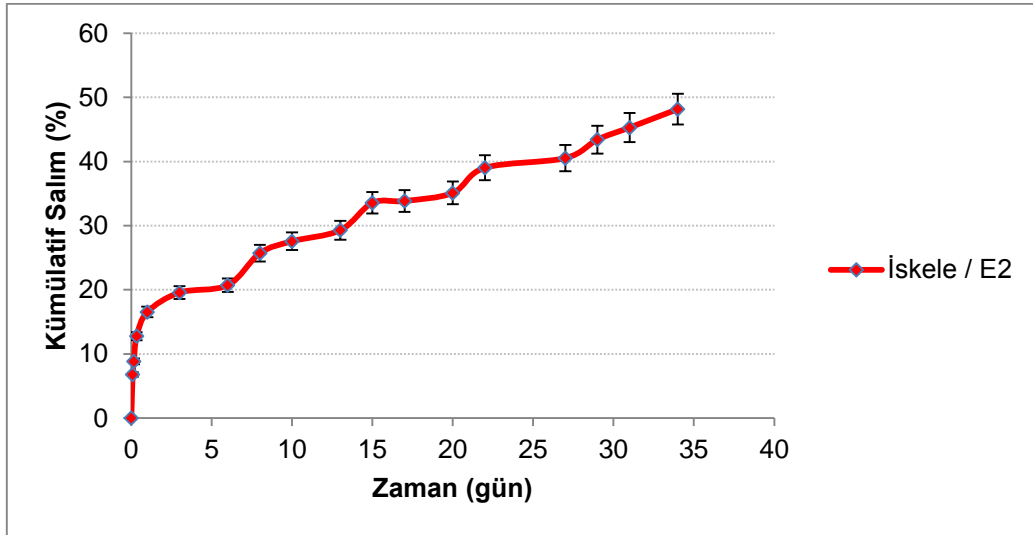
PLGA/TST oranı 10 (w/w) olacak şekilde nanopartiküllere enkapsüle edilen testosteronun, nanopartiküller PHEMA-Jelatin doku iskelelerine yüklendikten sonraki salım profilini belirlemek amacıyla da salım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için nanopartikül yüklü 8x2 mm boyutlarında kesilen doku iskeleleri ile 10 mL PBS (pH: 7.4) içeren rezervuarlarda salım çalışmaları yürütülmüştür.



Şekil 4.8. Testosteron (TST) içeren PLGA nanopartiküllerin yüklendiği PHEMA-Jelatin kriyojel iskelelerden testosteron salım grafiği

PLGA Nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklenmesiyle TST ve E2'nin difüzyon mesafesinde bir artış meydana gelmiştir. Ayrıca, doku iskelesinin gözenekleri, hormonların partikülden çıkıp ortama salımı sırasında bariyer vazifesi görmüştür. Bu nedenle doku iskelelerine yüklenen PLGA nanopartiküllerden gerçekleşen 17- β estradiol [80] ve testosteron salımının, doğrudan partiküllerden gerçekleşen salıma oranla daha kontrollü ve daha uzun sürede olması beklenildiği gibi gözlemlenmiştir.

Hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküllerin emdirilmesiyle oluşturulan doku iskelelerinden salım çalışması TST yüklü grup için 62 ve E2 yüklü grup için 35 gün sürdürülmüştür. Bölüm 3.4.3.'de anlatılan yöntemle salınan miktar analizleri yapılmıştır. Analizler sonucu elde edilen verilerden oluşturulan kümülatif salım profilinden 62 günde testosteronun %62'sinin salındığı belirlenmiştir. Şekil 4.8'de verilen kümülatif salım (%) grafiğinden anlaşıldığı gibi ilk 24 saatte TST salımı ani patlama (burst effect) etkisi göstermiş ve nanopartiküllerce kapsüllenen TST miktarının %36'sı salınmıştır. Östrojen için ise kümülatif salım profiline göre 35 günde doku iskelelerinden E2'nin %48'inin salındığı ve ilk 24 saatte yine ani patlama etkisiyle %16'sının salındığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 17- β estradiol (E2) içeren PLGA nanopartiküllerin yüklendiği PHEMA-Jelatin kriyojel iskelelerden östrojen salım grafiği

Salınan miktarlar ilerleyen günlerde kontrollü bir şekilde artmıştır. TST'nin 62 gün boyunca salınan toplam miktarı 39.35, E2'nin ise 35 gün boyunca toplam salım miktarı 24.08/mg partikül'dür. Bir doku iskelesine ayrıldıkları hormon deneyi

gruplarına göre 1mg partikül yüklenmesinden dolayı, iskele başına günlük hormon salım miktarları TST için 0.63 µg, E2 için ise 0.68 µg olarak bulunmuştur. Bu sayede *in-vitro* çalışmaları başlatmak için gerekli olan iskele başına günlük homojen hormon salım miktarlarına erişilebildiği gözlemiştir.

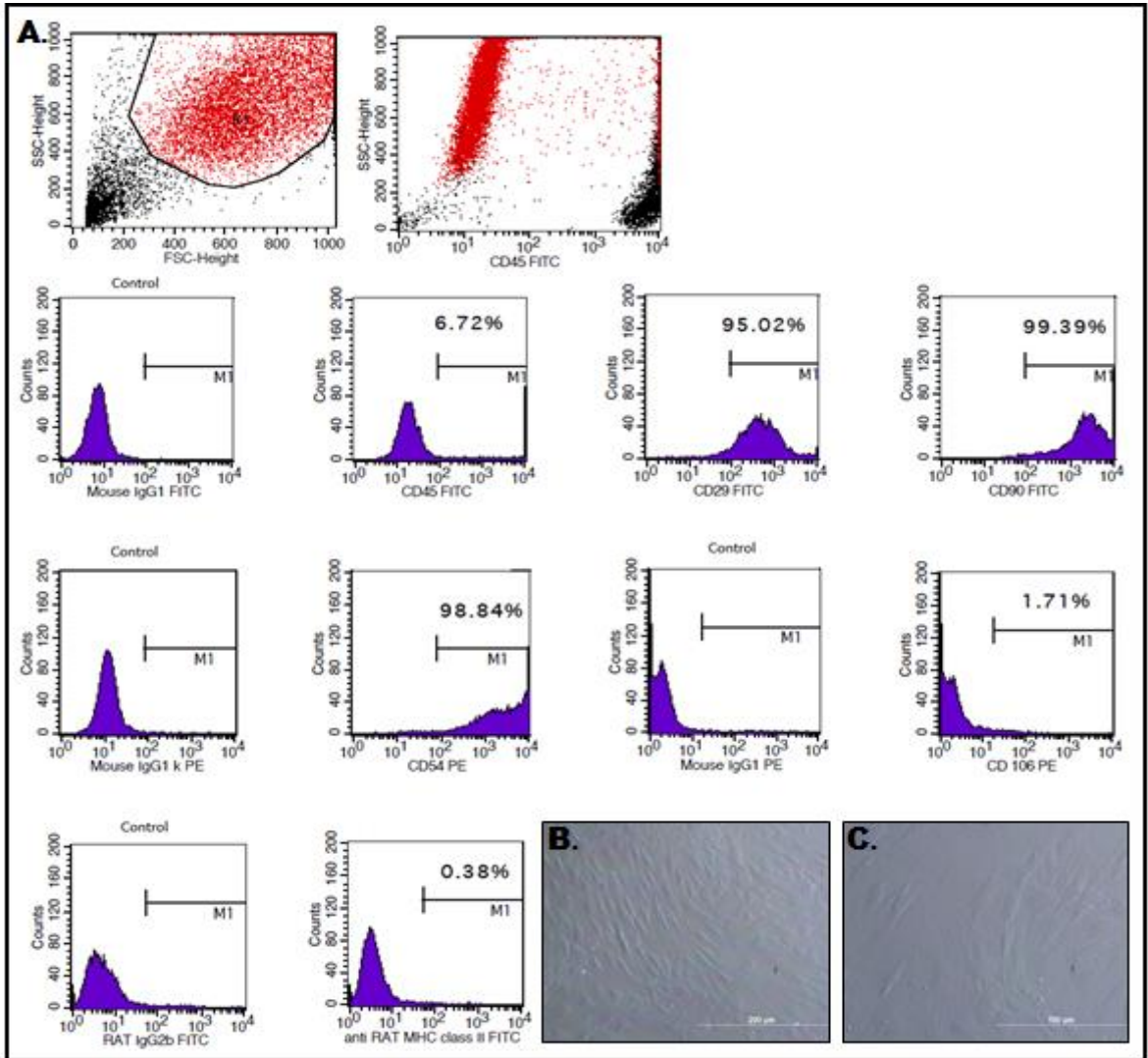
4.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları Bölüm 3.5te ayrıntılı olarak açıklandığı gibi: 1) Hormonsuz Kontrol İskele Grubu: PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi, 2) Testosteron grubu: testosteron yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sistemi, 3) Östrojen (17-β estradiol) grubu: 17-β estradiol yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sistemi, 4) Testosteron+Östrojen Grubu: Hem testosteron hem 17-β estradiol yüklü nanopartikül-kriyojel doku iskelesi sistemi şeklinde oluşturulan dört farklı grup ile yürütülmüştür. Hücre kültür çalışmalarında ADMSC'lerin mitokondriyal aktiviteleri, hücre morfolojileri ve osteojenik farklılaşmaları incelenerek farklı steroid hormonların, ayrı ayrı ve bir arada bulunmalarının ADMSC'lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için doku iskelelerinde olması istenen hormon miktarının belirlenmesi için literatür bilgileri [83-85] ve yapılan salım çalışmaları sonucu esas alınmıştır. Çalışma kapsamında, 8x2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelelerinde her biri 63 µg TST ve/veya 50 µg E2 hormon bulunduracak şekilde 1mg PLGA nanopartikül yüklenerek hücre kültür çalışmaları bölüm 3.5.2'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin karakteristikleri

Akış sitometri analizi, hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesi işlemidir. Bu analiz ile süspansiyon halindeki hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilmekte ve hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilmektedir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi, hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanması sağlanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan sıçan kökenli pasaj 2 ADMSC'lere ait akış sitometri analizi sonuçları Şekil 4.10.A'daki grafikler incelendiğinde hücrelerin CD29 (%95.02), CD90 (%99.39) ve CD54 (%98.84) işaretleyicileri için pozitif olduğu görülmüştür. CD29 (integrin-β1) MSC yüzeyinde varlığı kanıtlanmış hücre-matris reseptörlerindedir.

CD90 (Thy-1) immüoglobulin ailesine aittir ve MSC'ler için en iyi bilinen yüzey antijenlerindedir. Hücre-hücre etkileşimlerinde görev alan CD54 antijeni (ICAM-1) ise diğer pozitif antijenler gibi %98'in üzerinde bir oran ile işaretlenmiştir. CD45, CD106 ve MHC sınıf 2 antijenleri için oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur (Şekil 4.10). CD45 (protein tirozin fosfataz, reseptör, C) hematopoetik ve endotel hücrelere özgü bir antijendir, bu nedenle MSC'lerin bu antijeni eksprese etmemesi beklenir. CD106 (VCAM-1) hücre-hücre etkileşimlerinde görev alan bir reseptördür ve bazı çalışmalarda MSC'ler için pozitif antijen olduğu belirtilmiştir. MHC sınıf 1 ve 2, bağışıklık düzenleyici reseptörlerdir ve literatürle uyumlu bir şekilde, hücreler MHC sınıf 2 için negatif bulunmuştur.

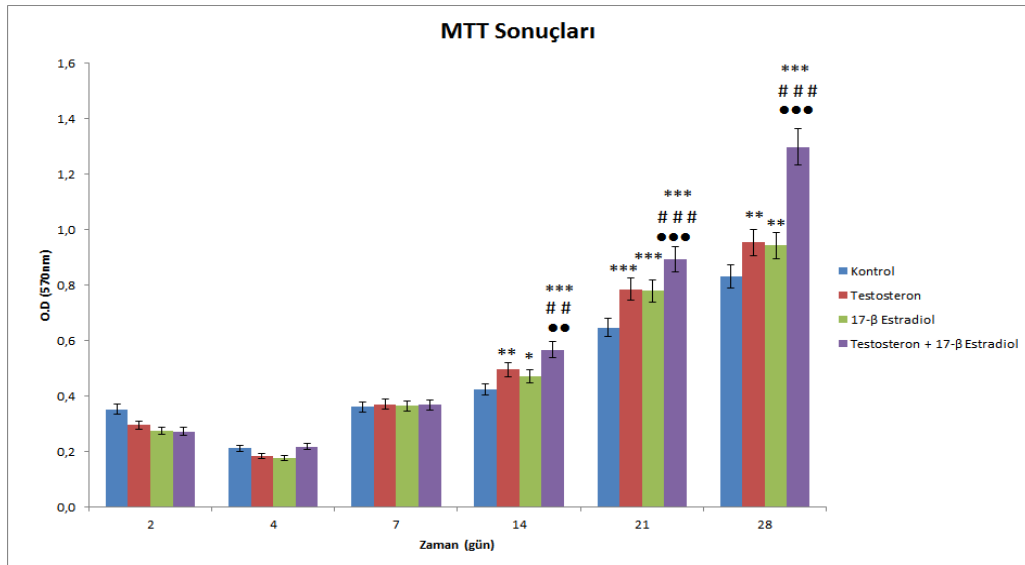


Şekil 4.10. A) Sıçan kökenli ADMSC'lere ait akış sitometri analizi sonuçları. B. ve C. ADMSC'lerin pasaj 2'de alınan ters (inverted) mikroskop görüntüleri

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde izole edilen kök hücrelerin (pasaj 2 deki farklı büyütmelere ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.10 B ve C' de belirtilmiştir) yüksek saflıkta olduğunu söylenebilmektedir.

4.3.2. MTT analizi sonuçları

ADMSC'lerin, doku iskelelerindeki mitokondriyal aktiviteleri kültürün belirli günlerinde yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenmiştir. Elde edilen bu absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm'de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Boş PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri (Kontrol) , testosteron grubu doku iskeleleri, östrojen grubu doku iskeleleri ve TST+E2 grubu doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC'lere ait MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2'li iskele iken ●● p<0.01, ●●● p<0.001).

Yapılan MTT analizi sonucunda kültürün ikinci haftasına kadar ADMSC'lerin mitokondriyal aktivitelerinin pek değişmediği, daha sonrasında ise artan bir şekilde devam ettiği anlaşılmaktadır. Literatür araştırması yapıldığında elde edilen sonuçların yapılan çalışmalarla ve verilen bilgilerle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklılaşma yönüne giden kök hücrelerin üremelerinin durduğu bilindiğinden

4. günde 2. güne göre daha az mitokondriyal aktivite ile birlikte 7. günde de önemli oranda artamayan hücre sayısı, kök hücrelerin kemiğe farklılaşma yolağına girdiklerini göstermektedir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 2, 4 ve 7. günlerde deney grupları arasında mitokondriyal aktivite açısından anlamlı bir fark gözükmemektedir.

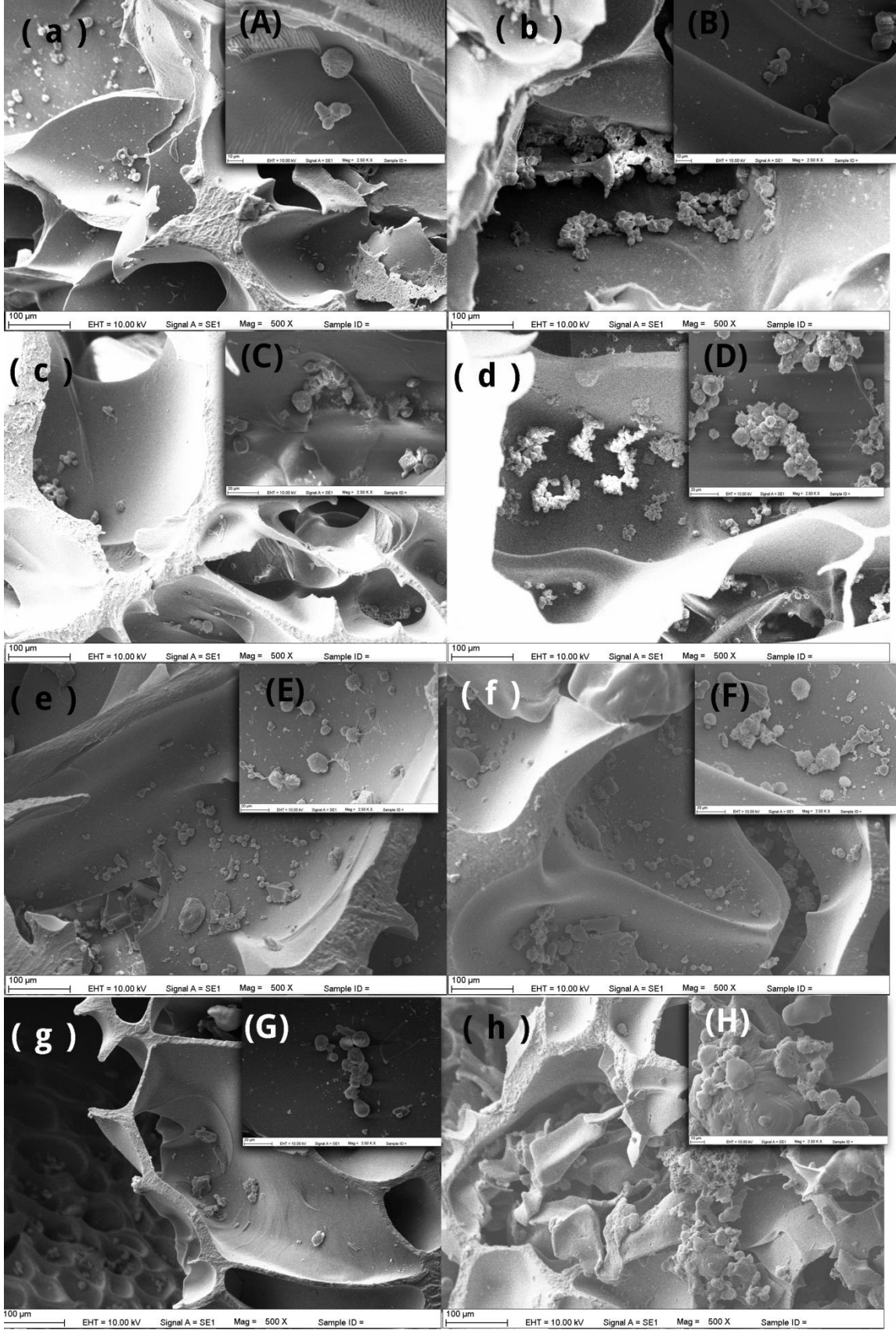
14., 21. ve 28. günlerde ise artan mitokondriyal aktiviteyle beraber gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar ortaya çıkmıştır. 14. 21. ve 28. günde hormonsuz kriyojel iskele kontrol grubu iken diğer üç grubun istatistiksel anlamlı farka sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yine bu aynı üç analiz günü için testosteron ve östrojen grupları birbirlerine göre anlamlı fark gösterememişlerdir. Her iki hormonun birden yer aldığı iskele grubunda ise diğer üç grubun hepsi ayrı ayrı kontrolken yüksek değerlerde anlamlı farklılık elde edilmiştir.

Sonuç olarak, adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesine yapıştığı ve çoğaldığı ancak, hücrelerin aktivitelerinin en yüksek olduğu örneklerin, testosteron ve 17- β estradiol'ü bir arada içeren örnekler olduğu görülmektedir. Bu durum 17- β estradiol'ün ve testosteronun adipoz kökenli MSC üremesini arttırdığını kanıtlamaktadır.

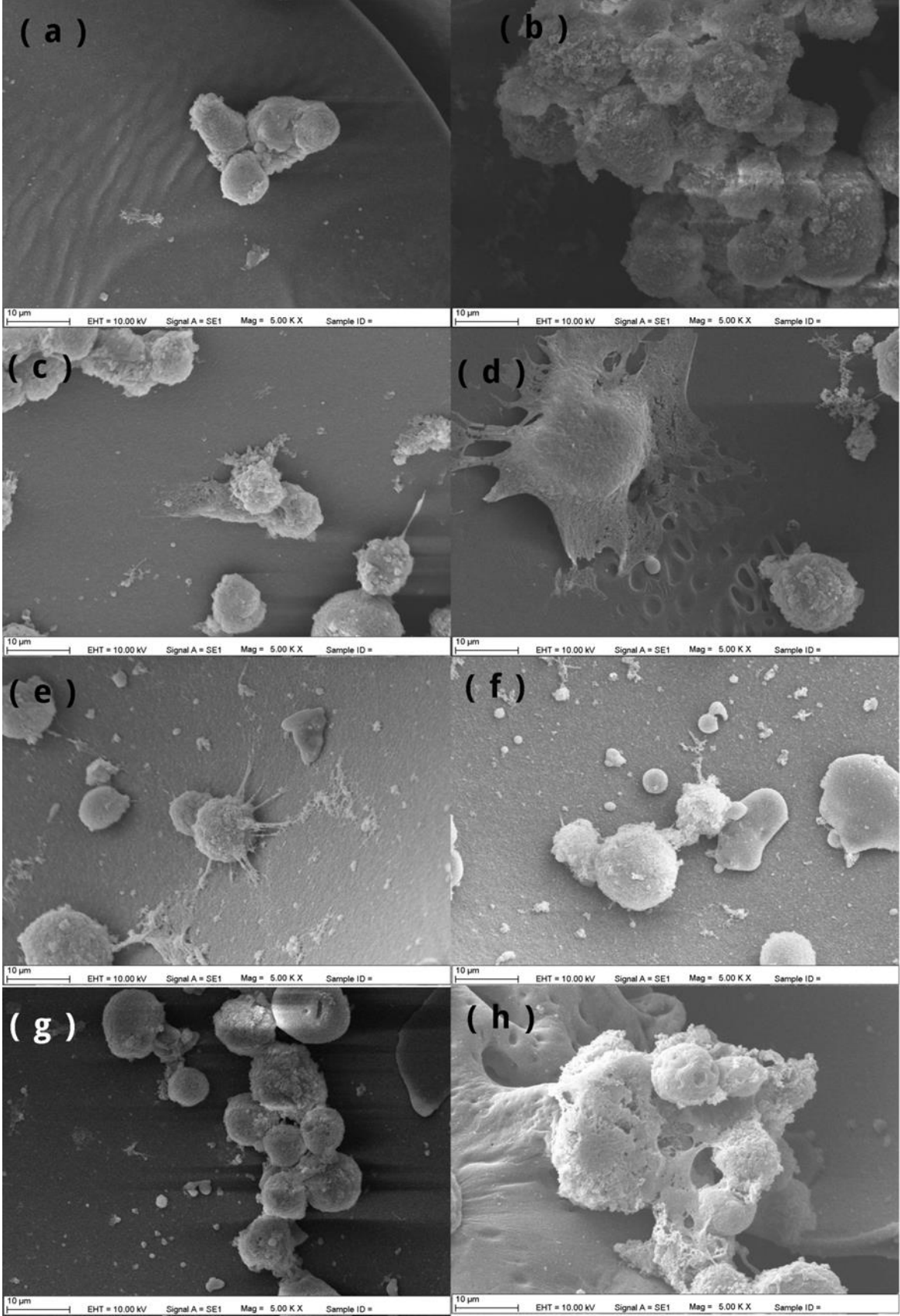
4.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi görüntüleri

Hücrelerin doku iskeleleri üzerine yapışıp yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Bu nedenle adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin testosteron ve östrojen varlığında ve yokluğunda PHEMA-Jelatin doku iskelelerine yapışma ve yayılmaları SEM ile görüntülenmiştir. Alınan görüntüler gün bazlı olarak şemalar halinde Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir.

Şekil 4.12'de ve Şekil 4.13'de 4. ve 7. Günlere ait SEM fotoğrafları verilmiştir. Sol kolon sırasında yer alan a ile A, c ile C, e ile E ve g ile G sırasıyla boş iskele, testosteronlu iskele, östrojenli iskele ve TST+E2'li iskele'nin 4. Günlerine aittir. B ile b,d ile D, f ile F, ve h ile H ise yine sırasıyla aynı deney gruplarının 7. Günlerine aittir. Şekil 4.12'de büyük harflerle temsil edilen görüntüler buldukları küçük harfli gruba ait olan daha büyük yakınlaştırmadaki çekimleri ifade etmektedir. Şekil 4.12 'deki A,B,C,D,E,F,G,H 2500x büyütmede, a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede alınan görüntülerdir. Şekil 4.13'de ise tüm görüntüler 5000x büyütmede verilmiştir.



Şekil 4.12. Dört farklı deney grubunun, kültürün 4. Ve 7. Günlerinde alınan SEM görüntüleri: A,B,C,D,E,F,G,H 2500x; a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede

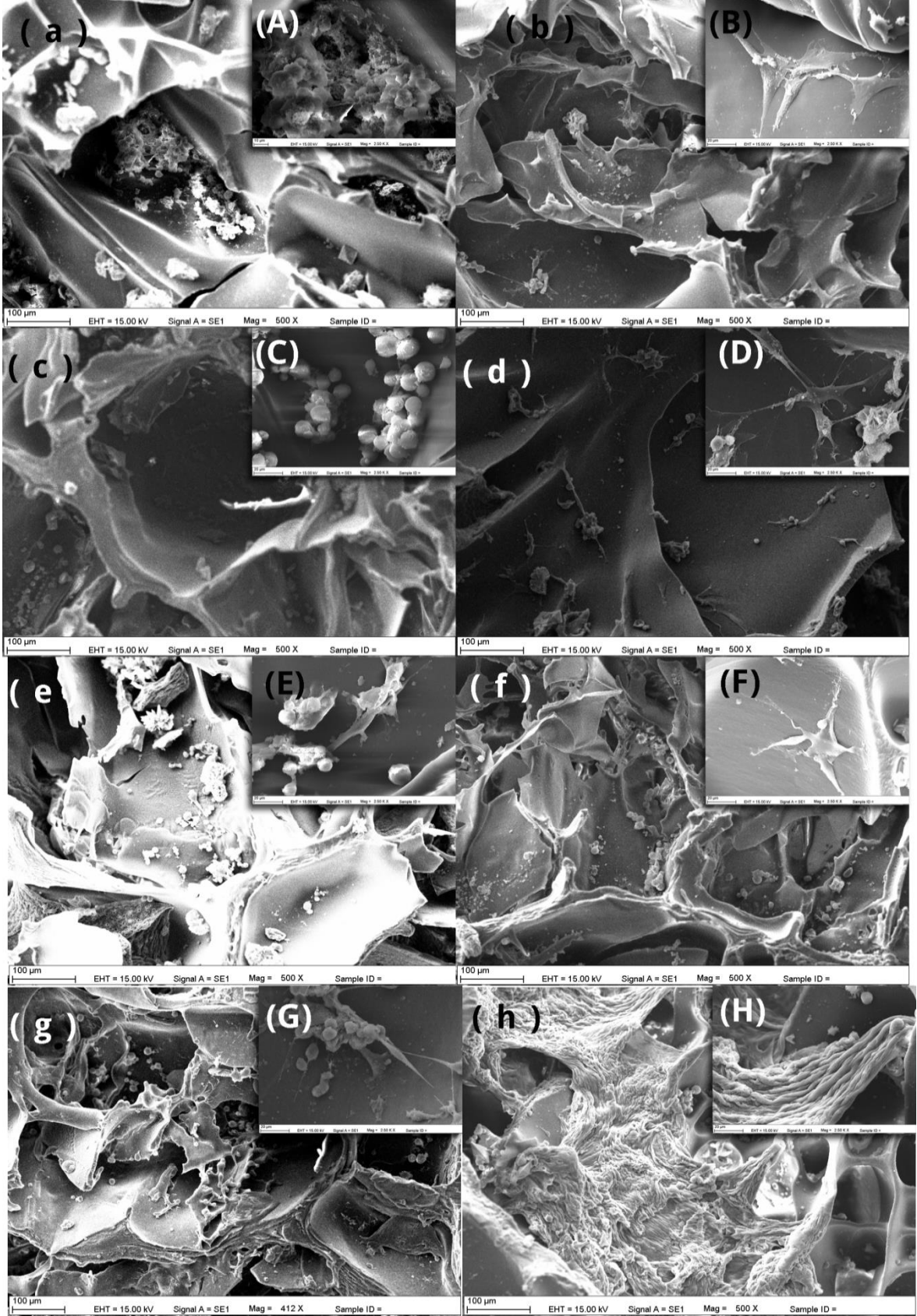


Şekil 4.13. Dört farklı deney grubunun kültürün 4. ve 7. günlerinde alınan, farklı morfolojideki hücreleri göstermeyi amaçlayan 5000x büyütmedeki SEM görüntüleri

Kültürasyonun 4. gün ve 7. günlerine ait Şekil 4.12 ve Şekil 4.13' deki SEM görüntülerinden de anlaşıldığı üzere hücreler iskeleye başarılı bir şekilde yapışmışlar fakat çok fazla yayılım göstermemişlerdir. Yayılan hücreler hiç bulunmuyor değildir fakat miktarları küresel formda olanlara göre çok azdır. Bu incelenen dört farklı grup için de aynı şekilde geçerlidir. Bunun nedeni olarak hücre kültür çalışmalarına iskele başına 2×10^5 hücre sayısı ile başlanmış olması düşünülmektedir. Başlanan az hücre sayısı nedeniyle hücreler birbirleri ile yeterince temas edememiş ve bu nedenle çoğalmaları ve yayılımları daha yavaş bir şekilde gerçekleşmiştir. Literatürde doku mühendisliği çalışmalarına başlarken kullanılması önerilen minimum miktar 1×10^6 'dır ve bu tez çalışmasına incelenecek çok fazla grup ve analiz olması dolayısıyla ve her grubun her analizinin 3 paralel ile gerçekleştirilmesi nedeniyle daha az sayıda hücre ile başlanılmak zorunda kalınmıştır. Bu zorunluluğun temel nedeni gruplar arasındaki farkın daha güvenilir olması açısından, tüm hücre kültür çalışmalarının tüm analiz grupları ve paralelleriyle beraber aynı anda başlatılmasıdır. Şekil 4.12'deki küçük harflerle gösterilen 500x büyütmedeki görüntülerden anlaşılacağı gibi genel hücre yoğunluğu açısından 7. Günde çok az bir artış görülmekle beraber bu artış MTT değerleriyle de uyum içerisindedir.

Şekil 4.13'de ki Sem görüntülerinden de anlaşılacağı üzere hücreler genellikle jelatin ve nanopartiküllerin bulunduğu alanlarda yapışma göstermekte ve bu da yüksek hidrofilitateye sahip PHEMA iskelelere eklenen Jelatin miktarının ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca yine Şekil 4.13'deki 5000x büyütmede alınan dört farklı gruba ait 4. ve 7. Gün görüntülerinde açıkça görülen farklı yüzey morfolojilerine (pürüzlü-pürüzsüz) ve farklı büyüklüklere sahip (yaklaşık 8 μ m ile 20 μ m arası) hücrelerin varlığı, onların mezenşimal kök hücre yapılarından, koyulan kemik farklılaşma ortamı etkisi ile morfolojik farklılaşma yönünde değiştiklerini düşündürmektedir fakat bu şekilde bir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Şekil 4.14'e gelindiğinde; kültürasyonun 14. ve 21. günlerine ait SEM görüntülerine yer verilmiştir. Sol kolon sırasında yer alan a ile A, c ile C, e ile E ve g ile G sırasıyla boş iskele, testosteronlu iskele, östrojenli iskele ve TST+E2'li iskele'nin 14. Günlerine aittir. B ile b,d ile D, f ile F, ve h ile H ise yine sırasıyla aynı deney



Şekil.4.14. Dört farklı deney grubunun, kültürün 14. ve 21. günlerinde alınan SEM görüntüleri: A,B,C,D,E,F,G,H 2500x; a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede

gruplarının 21. Günlerine aittir. Şekil 4.14'de büyük harflerle temsil edilen görüntüler buldukları küçük harfli gruba ait olan ve daha büyük yakınlaştırmadaki çekimleri ifade etmektedir. Şekil 4.14'deki A,B,C,D,E,F,G,H 2500x büyütmede, a,b,c,d,e,f,g,h ise 500x büyütmede alınan görüntülerdir. (Şekil 2.12 ile Şekil 2.14'e ait SEM fotoğraflarının yerleşimi kültürasyon günleri dışında birbirinin aynısıdır.)

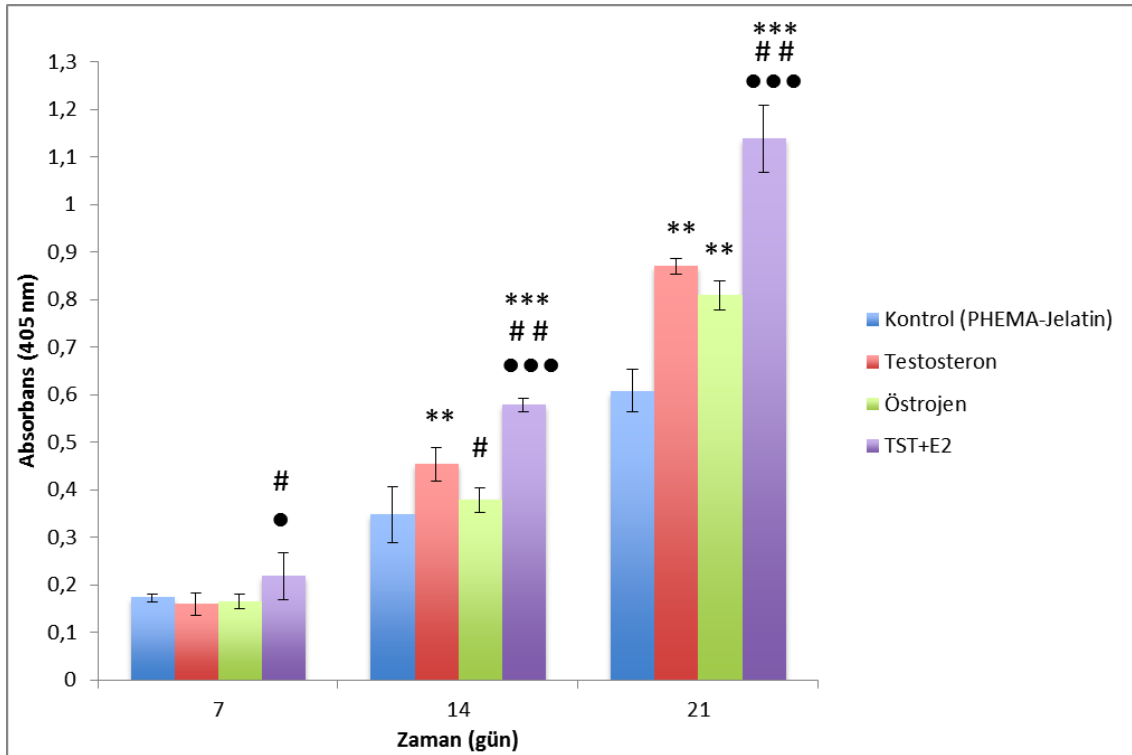
MTT sonuçlarını destekler şekilde Şekil 4.14'deki 14. günü temsil eden a,c,e ve g'de görülen hücre yoğunluğundaki artış ile birlikte yayılan hücre miktarında da artış gözlemlenmiştir. Hücre yoğunluğu bakımından testosteronlu (Şekil 14.c) ve östrojenli (Şekil 14.e) grup arasında gözle görülür bir fark olmadığı fakat bu iki grubun hücre yoğunluğunun hormon içermeyen kontrol grubundan (Şekil 14.a) fazla olduğu gözlemlenmektedir. Her iki hormonu ayrı ayrı içeren nanopartikülleri yapısında bulduran 4. grup olan TST+E2 ise diğer tüm gruplardan daha yoğun hücreye sahiptir. Bu yoğunluk durumu kültürasyonun 21. gününde de tüm gruplar için aynı şekildedir (Şekil 4.14. b. d. f ve h). Buradan testosteron ve östrojenin sinerjik bir etki ile hücre çoğalmasını diğer gruplara oranla daha fazla arttırdığı görülmektedir. Ayrıca kültürasyonun 21. gününde tüm gruplarda yayılan hücre sayısının arttığı gözlemlenmiş ve morfolojik özellikleri dolayısıyla kemik farklılaşma yoluna gittikleri söylenebilir.

Şekil 4.14'de h ve H görüntülerinin temsil ettiği kültürasyonun 21. günündeki TST+E2 grubunun diğer gruplardan farklı olarak fibroblastik morfolojiye belirgin şekilde sahip ve birbirleriyle ürettikleri ECM ile etkileşim halinde olduğu gözlemlenmiştir. *In-vitro* hücre kültür çalışmalarının yapıldığı dört grup içerisinde bir tek, her iki hormonun birden kontrollü salındığı grup olan TST+E2' de yoğun ECM salgısı ile farklılaşma gözlemlenmiştir. Bu durum, daha yoğun hücre miktarı içermesiyle birlikte elde edilen MTT değeriyle uyum içerisinde.

4.3.4 ALP aktivitesi tayini sonuçları

Alkalen fosfataz (ALP) kemik metabolizmasıyla ve osteoblastların farklılaşmasıyla bağlantılı olan kemik matris enzimidir. Fosfatazlar kalsiyumun organik matris içerisine yerleştirilmesinde görevlidirler, ayrıca kollajen fiberlerinin oluşmasında da bir işlevinin olduğu belirtilmiştir. Bunlar C vitaminiyle aktive olan enzimlerdir. Kemik oluşum sürecinde kalsiyum, osteoblastların oluşturduğu osteoid yapısının içerisine

çökerek organik matrisi sertleştirir. Bu çökme olmadan önce osteoblastlar sitoplazmaları içinde bol miktarda alkalin fosfataz enzimi üretir ve sitoplazmalarının dışına salgırlar. Biriken alkalin fosfataz enzimi doku sıvılarıyla taşınan fosforik asit esterlerinden hidroliz yoluyla fosfat gruplarını ayırırlar. Böylece kalsiyum iyonları bu fosfat gruplarıyla birleşir ve matris mineralizasyonu sağlanmış olur [87]. Kemik oluşum sürecinde belirteç olarak kullanılan ALP, kemik sialoproteini II, osteonektin ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) öncü olarak sentezlenirken, osteopontin ve osteokalsin sonraki evrelerde sentezlenmektedir [86]. Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast farklılaşması ve osteojenik özelliklerinin belirlenmesinde en sık incelenen parametredir [11]. Literatür bilgileri incelendiğinde ADMSC'lerin osteojenik farklılaşma potansiyellerinin araştırıldığı çalışmalarda ALP aktivitelerinin 14. günde en yüksek değere ulaştığı, daha sonra ise bir miktar azaldığı gözlenmektedir.



Şekil 4.15. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde çoğalan hücrelere ait ALP aktivitesi analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken *

p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ## p<0.01; kontrol grubu TST+E2'li iskele iken ● p<0.05, ●●● p<0.001).

Fakat bu tez çalışmasındaki ALP sonuçlarında en yüksek değerlere 21. günde ulaşıldığı Şekil 4.15' de görülmektedir. Bunun nedeni olarak da başlangıç hücre sayısının az olması gösterilebilir. Çünkü hücreler ekildikten sonra miktarların az olması dolayısıyla öncelikle etkin nişin sağlanabilmesi açısından yapışma ve çoğalma yönünde ilerlemek istemektedirler. Fakat farklılaşma ortamının etkisiyle kemiğe farklılaşma sinyalleri alan kök hücrelerin üremeleri oldukça yavaşlamıştır. 14. Güne kadar yavaş bir şekilde üreyen hücrelerde, az hücre sayısından dolayı kemiğe farklılaşan hücre sayısı da azdır. Fakat MTT değerleri ve SEM görüntüleriyle de desteklenen 21. gündeki yayılmış ve sayıları oldukça artmış olan hücrelerin erken farklılaşma aşamasının tam olarak bu zamanlar olduğu söylenebilmektedir. Literatürde yeni kemik oluşumu aşamasında alkalin fosfataz aktivitesi başta düşük olduğu, farklılaşma ve matris oluşumu ilerledikçe artış gösterdiği, osteoblastlar osteositlere dönüştüklerinde ise aktivitesinin tamamen kaybolduğu belirtilmektedir [88]. MTT sonuçlarında görüldüğü şekilde 14. günden itibaren hücre sayısındaki artıştan (Şekil 4.11) sonra farklılaşma yolağına giren hücre sayısı da arttığından ve 21. Günde gözlenen ECM oluşumlarıyla (Şekil 4.14. h) paralel olarak 21. Gündeki ALP değerleri daha yüksek çıkmıştır.

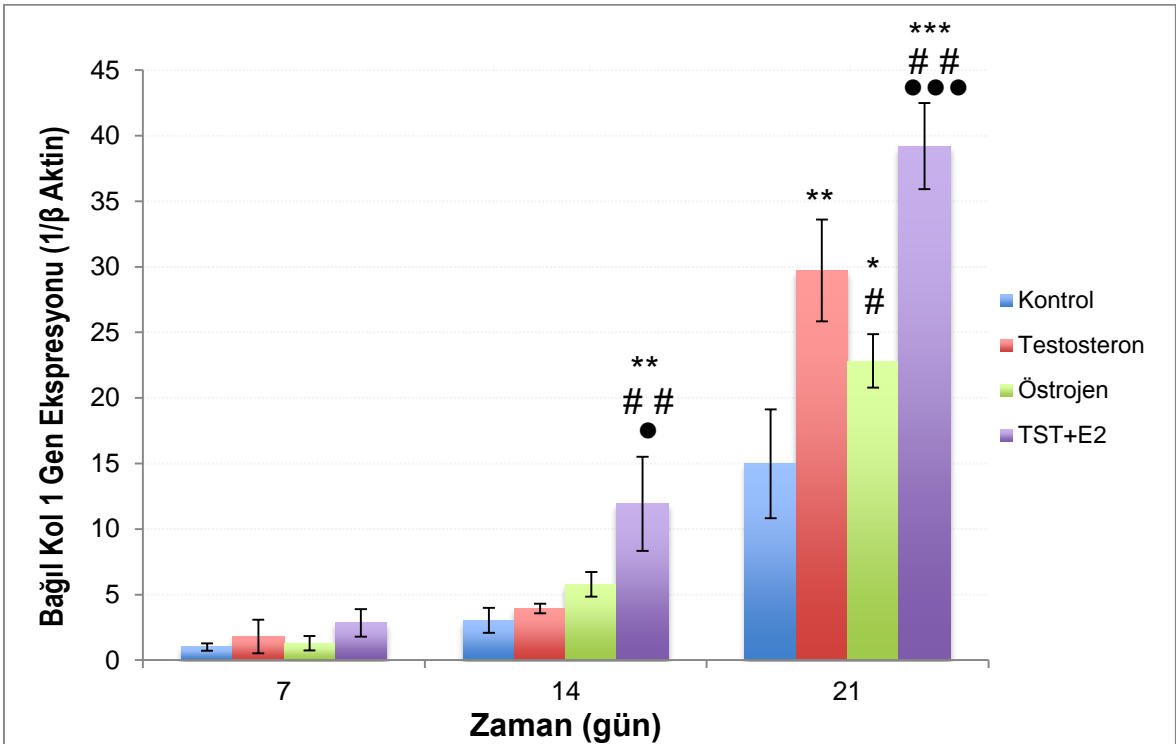
Gruplar arasındaki farklara bakılacak olursa iki hormonun bir arada bulunduğu TST+E2 grubundaki hücrelerin 7. günde TST ve E2 grubundan %5 yanılma payı ile anlamlı olarak pozitif yönde farklı olduğu görülmektedir. Ayrıca 14. ve 21. günlerde ise TST grubundan %1 yanılma payı ile E2 ve kontrol grubundan ise %0.1 yanılma payı ile pozitif yönde anlamlı fark göstermektedir.

14. günde TST grubu E2 ye göre %5 yanılma payında pozitif yönde anlamlı fark göstermekte fakat 21.günde TST ile E2 grubu arasında anlamlı fark gözükmemektedir. Böylece ALP sonuçlarının MTT ve SEM analizleri sonuçlarıyla uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir ve buradan her iki hormonun birden etkide bulunduğu hücrelerin üreme hızlarının ve dolayısıyla farklılaşma oranlarının diğer gruplara nazaran daha fazla olduğu söylenebilmektedir. Aynı şekilde analizler sonucunda TST ve E2 hormonlarının tek başlarına uygulandığı PHEMA-Jelatin doku iskelelerinin, kontrol grubu olan boş PHEMA-Jelatin doku iskelesine göre, hücrelerin üreme ve farklılaşmaları açısından daha üstün özellik sergiledikleri fakat birbirleri arasında anlamlı farklar gözükmediği açıktır.

4.3.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçları

Osteojenik farklılaşma sırasında pek çok genin ekspresyonunda değişiklik meydana gelir. Özellikle alkalen fosfataz, RunX2, osteopontin, osteokalsin ve kollajen Tip I ekspresyonları artmaktadır. Tez çalışmasında osteoblast belirteci olan, kollajen I (KOL I), RunX2, osteopontin (OPN) ve osteokalsin (OCN) için RT-PCR sonuçları mRNA ekspresyonunda PHEMA-Jelatin iskeledeki değerlerin kat artışı olarak gösterilmiştir (Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19).

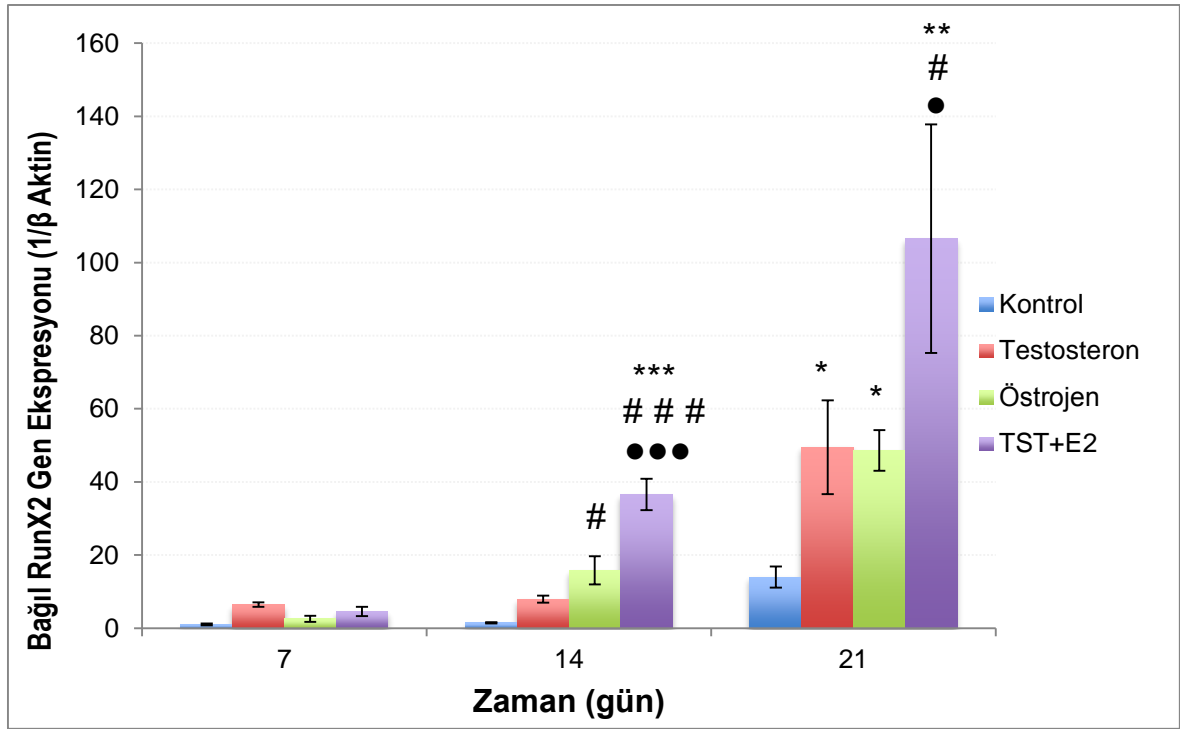
Kollajen sentezi farklılaşan osteoblastların ilk fonksiyonlarından biridir. Kollajen kemiğin temel yapılarından, mekanik dayanımını sağlar ve literatürde osteoblast hücrelerin çoğaldıkça kollajenin sentezinin de arttığı belirtilmektedir [89]. Kollajenin organizmada en fazla bulunan çeşidi kollajen tip-I'dir ve bağ dokusunda geniş bir alan teşkil etmektedir.



Şekil 4.16. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC'lere ait bağıl tip I kolajen gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2'li iskele iken • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001).

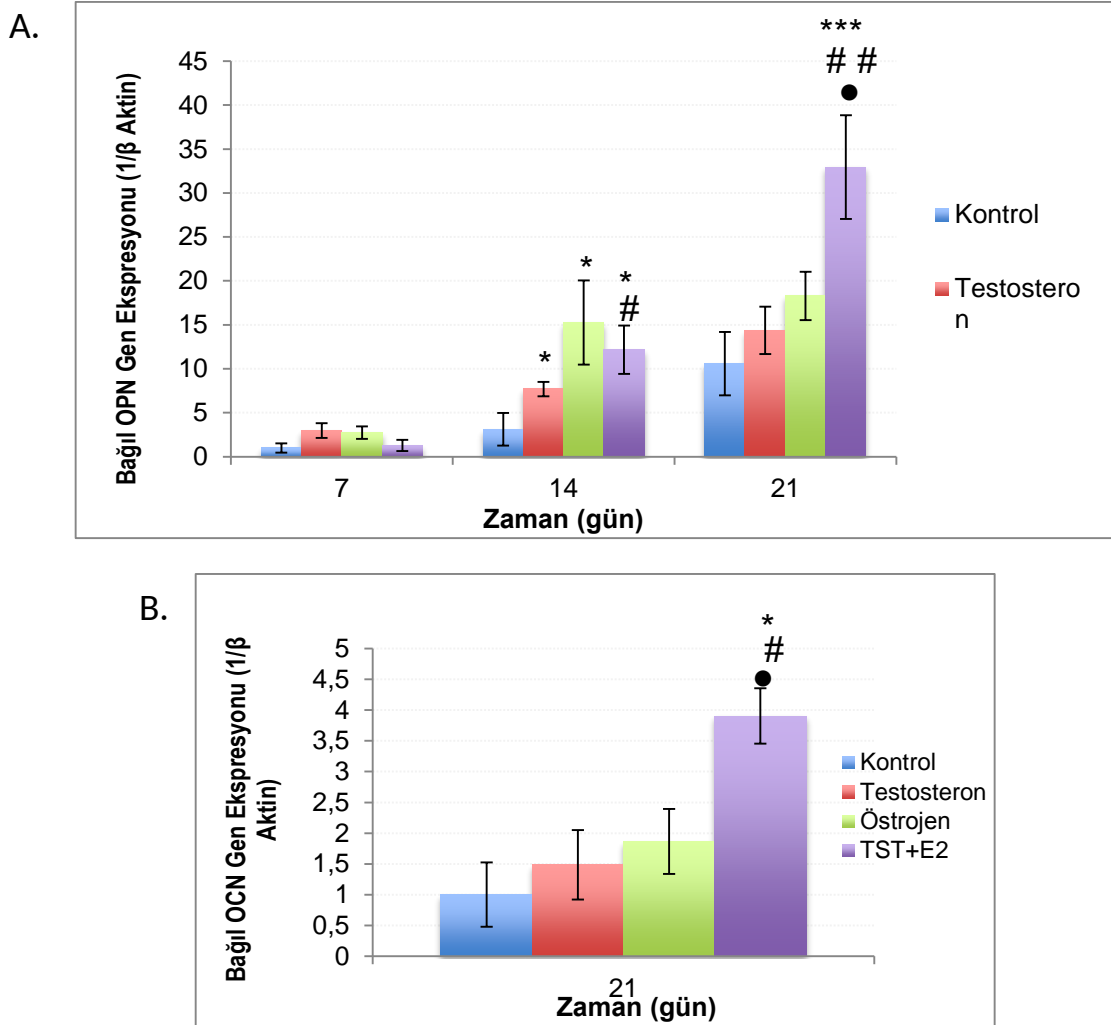
Bir transkripsiyon faktörü olan RunX2 osteoblast farklılaşması için kritik bir düzenleyicidir. Osteopontin, kollajen Tip I, kemik sialoproteini ve osteokalsin gibi pek çok osteoblastik gen ekspresyonunu düzenlemekle görevlidir. Nükleer RunX2'nin osteoblast spesifik elemente bağlanması kemiğe özgü genlerin ekspresyonunun artmasına ve osteoblast fenotipinin ortaya çıkmasına neden olur.

Literatürde RunX2 genlerinin çift allelinde mutasyon oluşturularak doğmuş olan farelerin tamamen kıkırdak iskelet ile doğduğu belirtilmiş, bu çalışma ile embriyogenez sırasında osteoblast farklılaşması için RunX2'nin varlığının çok önemli olduğu vurgulanmıştır [90]. RunX2'nin osteoblast farklılaşmasının erken dönemlerinde kemik matris proteinlerinin ekspresyonlarını başlatırken, osteoblast olgunlaşması sırasında bulunması gerekli olmadığı için ekspresyon seviyesi azalığı belirtilmiştir [91].



Şekil 4.17. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC'lere ait bağıl RunX2 gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ### p<0.001; kontrol grubu TST+E2'li iskele iken • p<0.05, ●●● p<0.001).

Osteopontin çok fonksiyonlu bir ECM proteindir ve hücre göçü ve adezyonu ile mineral depolanma regülasyonlarından sorumludur [11]. Osteokalsin ise kemik dokusunda mineralizasyon ve kalsiyum iyon dengesini sağlamada görevlidir. Serumda yüksek oranda bulunan osteokalsin ve osteopontin kemik mineral yoğunluğunun artışına işarettir [86]. Osteokalsin ve osteopontin olgun osteoblast oluşumunun bir göstergesi olduğundan farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkmaktadırlar. *In vitro* ortamda da durum *in vivo* ortamda olduğu gibidir, hücre çoğalması azalmaya başladığında ALP artmaya başlar ve osteokalsin ile osteopontin son aşamada üretilir [88].



Şekil 4.18. Hormon içermeyen, TST içeren, E2 içeren ve TST+E2 içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ADMSC'lere ait bağıl (A) OPN, (B) OCN gen ekspresyonu. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu boş PHEMA-Jelatin iken * p<0.05, *** p<0.001; kontrol grubu Testosteronlu iskele iken # p<0.05, ## p<0.01, kontrol grubu TST+E2'li iskele iken • p<0.05)

Şekil 4.16 incelendiğinde doku iskeleleri üzerindeki kollajen tip I gen ekspresyonu 14. günde PHEMA/Jelatin kontrol grubuna göre TST+E2 grubunda 13 kat; 21. günde ise TST grubunda 30 kat, E2 grubunda 23 kat, TST+E2 grubunda ise 39 kat artmıştır. En yüksek kollajen tip I sentezinin TST+E2 grubunda olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar SEM fotoğraflarında 21. günde gözlenen ECM artışını desteklemektedir.

Şekil 4.17' de ADMSC' lerin RunX2 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde kültürün 7. gününde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadığı, 14. günde ekspresyon PHEMA-Jelatin kontrol iskeleye göre E2 grubunda 15 kat, TST+E2 grubunda ise 36 kat arttığı gözlenmektedir. Kültürün 21. gününde ise PHEMA-Jelatin kontrol iskeleye göre E2 ve TST gruplarında yaklaşık 49 kat, TST+E2 grubunda ise 106 kat artış görülmüştür. Ekspresyon artışlarının gruplara göre oranları yine MTT ve SEM analizlerini destekler nitelikte çıkmıştır.

Şekil 4.18.A'da ADMSC' lerin OPN ekspresyon seviyeleri incelendiğinde kültürün 7. gününde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadığı, 14. günde ekspresyon PHEMA-Jelatin kontrol iskeleye göre TST grubunda 7 kat, E2 grubunda 15 kat, TST+E2 grubunda ise 12 kat arttığı gözlenmektedir. Kültürün 21. gününde ise PHEMA-Jelatin kontrol iskeleye göre E2 ve TST gruplarında anlamlı sonuç bulunamazken, TST+E2 grubunda ise 33 kat artış görülmüştür.

Şekil 4.18. B'de ise bağıl OCN gen ekspresyonunun kültürün sadece 21. günündeki gruplara göre değerleri verilmiştir. Bunun nedeni kültürasyonun önceki günlerine ait olan örneklerin analiz sonucu vermemesidir. OCN ekspresyonu PHEMA-Jelatin kontrol iskeleye göre yalnızca TST+E2 grubunda anlamlı artış (4 kat) göstermiştir.

RT-PCR sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde gen ekspresyonlarının kat artışları literatürde yer alanlara kıyasla daha fazladır. İlaven, MTT ve SEM analizleriyle uyumlu çıkan PCR sonuçları, iki hormonun üzerlerinde aynı anda etkili olduğu grup olan TST+E2 grubunda, ADMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını hormonların ayrı arı etkili olduğu diğer gruplara oranla daha fazla arttırmıştır.

4.4. Rejenerasyon Çalışmaları Sonuçları

4.4.1. Makroskopik bulgular

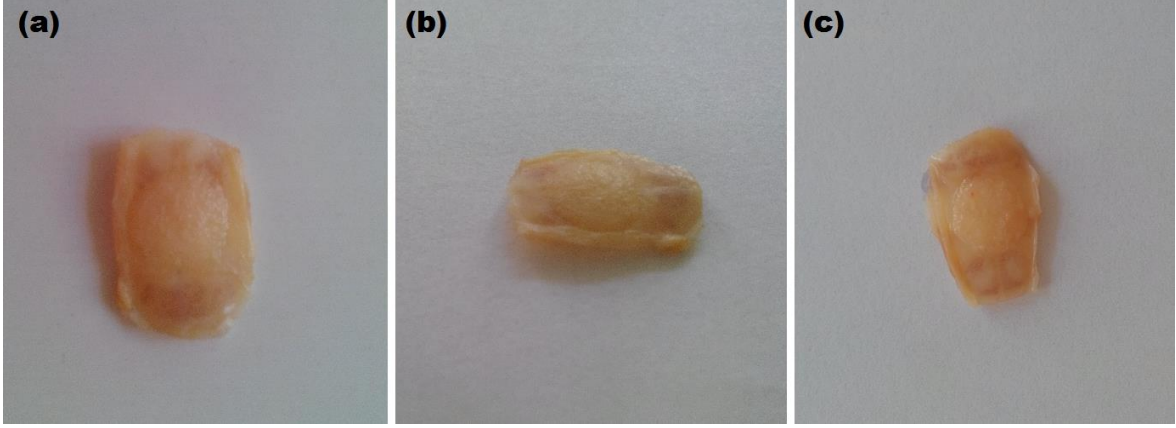
Kuru haldeki PHEMA-Jelatin kriyojeller sıvı ortama konulduğunda çok hızlı bir şekilde şişerek denge haline yaklaşık bir dakika içerisinde ulaşmaktadır. Deney hayvanında oluşturulan defektin içerisine kuru olarak yerleştirilen boş veya farklı hormon içerikli kriyojeller, hızlıca etraftaki doku sıvılarını emerek boşluğu doldurmuştur. Bu da kriyojellerin implante edilirken, AdMSC'lerin emrilme işlemi yapılırken ve tüm implantasyon işlemlerinden sonra stabil olarak defekt bölgesinde kalmasını sağlamıştır.

Dört farklı deney grubuna kritik boyutlu kraniyal defekt hayvan modelinde implante edilmiş kriyojelin, operasyondan sonra 6 veya 12 haftalık dönemlerde çekilmiş görüntüleri Şekil 4.19' da sunulmuştur. Makroskopik değerlendirilmelere göre, operasyondan 6 ve 12 hafta sonraki dönemlerde kriyojeller intakt yapılarını korumuşlardır. Etrafdaki dokularla entegrasyonları gözlenmiştir. Kriyojel çeperlerinde ve iç kısımlarına doğru kan damarları görülmüştür. Polimerik kriyojel komşu dokularla bir bütünlük içerisine girmiştir (Şekil 4.19).

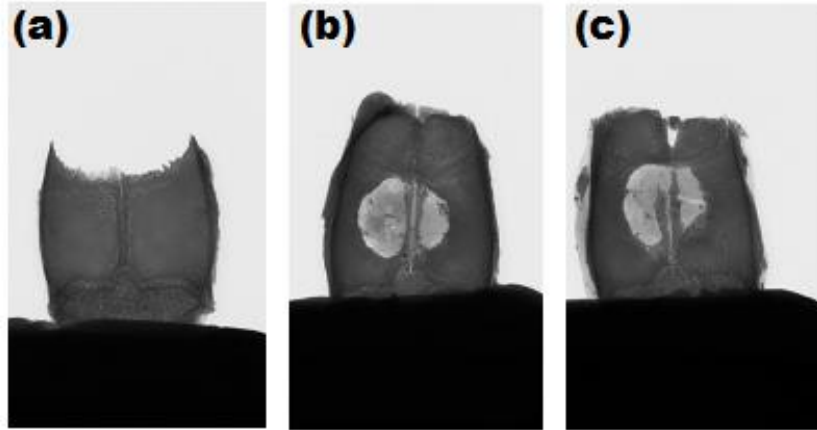
4.4.2. Mikro bilgisayarlı tomografi (Micro CT) sonuçları

8mm çap ve 2mm kalınlıkta oluşturulan defektlerin kritik boyutta olduğu (kendiliğinden iyileşemediği) Şekil 4.20'de bulunan Micro CT görüntüleri ile kanıtlanmıştır. Oluşturulan kritik boyutlu defektin hiçbir malzeme konulmadan üzeri kafa derisi ile kapatıldığında 6 ve 12 hafta sürelerince iyileşemediği Şekil 4.20 (b) ve (c)'de görülmektedir. Rejenerasyon incelemelerinde içerisinde hormon içermeyen boş doku iskelesi grubunun (PHEMA) 6 ve 12 haftalık süre zarflarının her ikisinde diğer gruplara nazaran geride kaldığı gözlemlenmektedir. Bir hormon içeren iki gruptan yalnızca Testosteron içerikli doku iskelesi (PHEMA + TST) defekt oluşturulmasının ilk 6 haftası boyunca defektin neredeyse tamamını kapatmayı başarmış ve 12 hafta sonunda ise defekti tamamen kapatmıştır. PHEMA grubu ile birlikte Östrojen içerikli doku iskelesinin (PHEMA + E2) defekt oluşturulmasından sonraki geçen 12 hafta boyunca defek içerisini tam olarak dolduramadığı gözlemlenmiştir. Her iki hormonu birden içeren doku iskelesinin (PHEMA+TST+E2) ise incelemenin henüz 6 haftasında tüm defekti kapattığı ve ilk

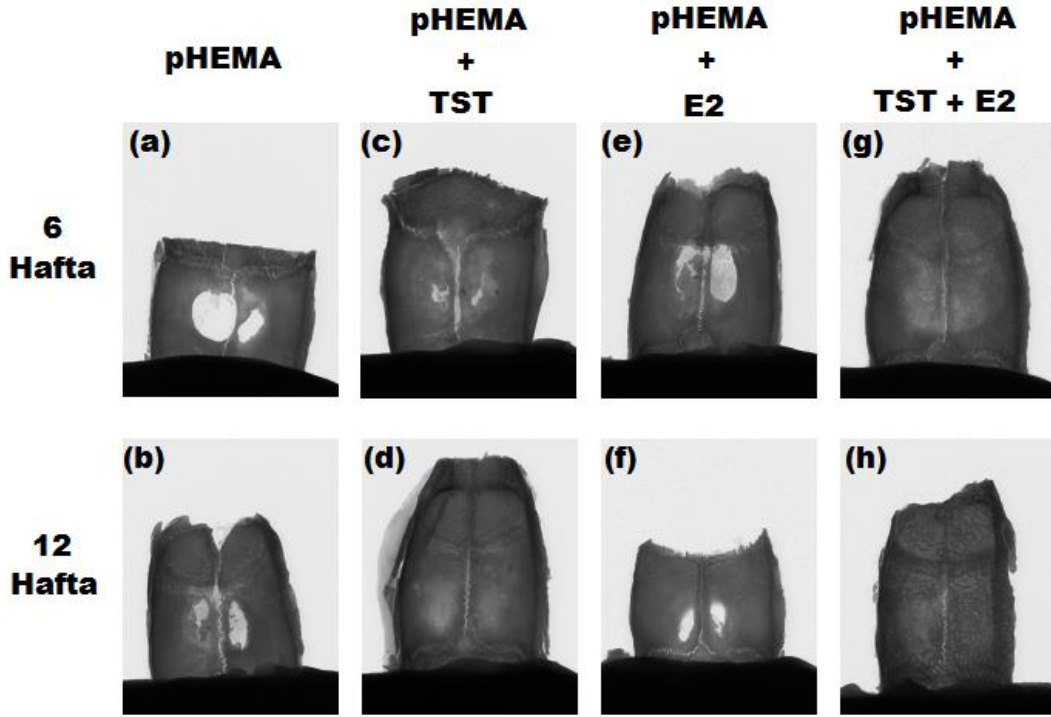
6 haftalık rejenerasyon aşamasında diğer grupların hepsinden daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. İzleyen ikinci 6 haftalık sürecin sonunda da iki hormonu içeren deney grubunun oluşturulan defekti etkin bir biçimde doldurduğu ve Kontrol gruptaki mineralize matris formasyonuna hem morfolojik (Şekil 4.20.a ve Şekil. 21.h) hem de değersel olarak benzerlik göstermektedir. Mikro bilgisayarlı tomografi çekimlerinden elde edilen farklı deney gruplarına ait mineralize kemik formasyonlarının yüzde değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. (a) ve (b) 6 haftalık, (c) 12 haftalık inceleme için çıkarılan kriyojel implantların kemik doku ile entegrasyonlarının makroskobik görüntüsü.



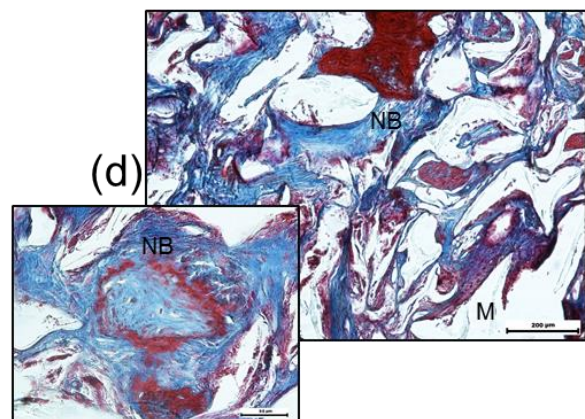
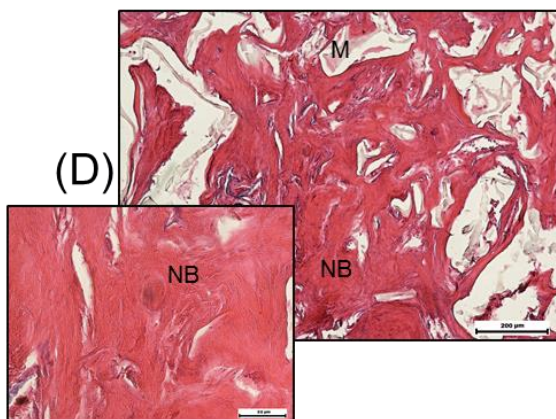
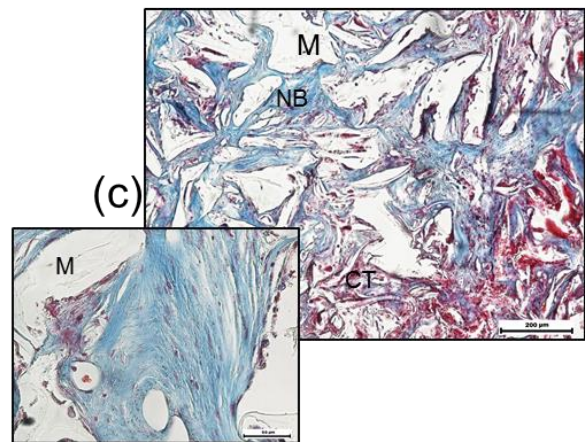
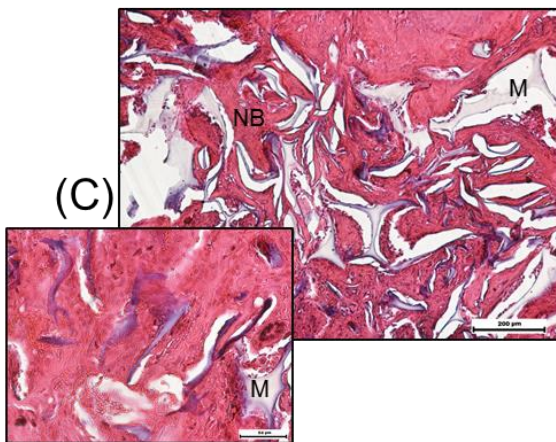
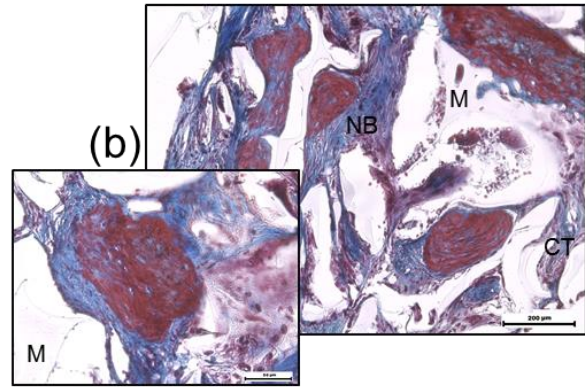
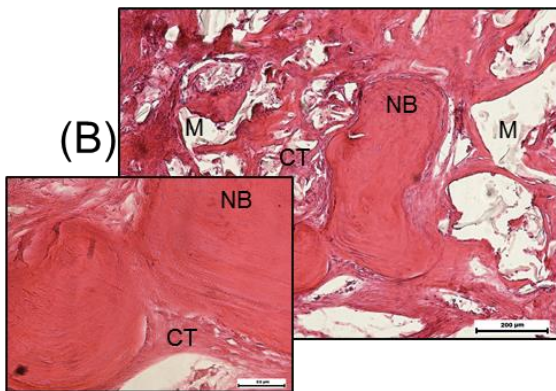
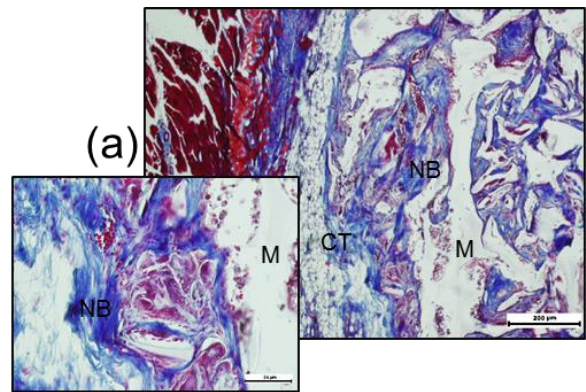
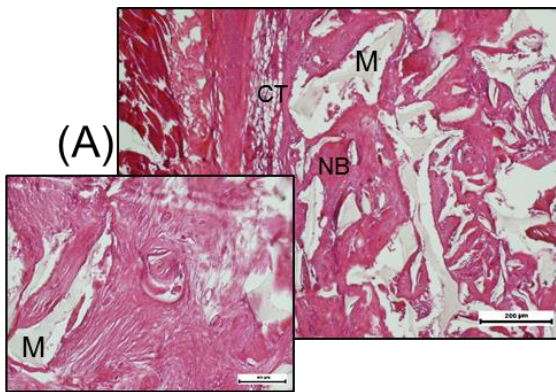
Şekil 4.20. Mikro CT görüntüleri (a) Üzerinde hiçbir işlem yapılmamış sıçan kraniyumu (KONTROL) ve kritik boyutta oluşturulmuş kraniyal kemik defektinin (SHAM) (b) 6 haftalık görüntüsü, (c) 12 haftalık görüntüsü.



Şekil 4.21. Mikro bilgisayarlı tomografi incelemesine alınan kraniyumların fotoğraf görüntüleri. (a ve b) Hormon içermeyen boş PHEMA doku iskelesi, (c ve d) Testosteron içerikli PHEMA doku iskelesi, (e ve f) Östrojen içerikli PHEMA doku iskelesi, (g ve h) her iki hormonu birden içeren doku iskelesi. (a,c,e,g) 6 haftalık incelemeye alınan deney gruplarına, (b,d,f,h) 12 haftalık incelemeye alınan deney gruplarına ait fotoğraflar.

Mikro CT analiz sonuçlarına göre 6 haftalık inceleme gruplarından TST içerikli iskele grubu ile TST+E2 içerikli iskele grubu sırasıyla %67.84 ve %71.98 mineralize kemik formasyon değerleri ile SHAM gurundan ve sadece doku iskelesi içeren (PHEMA) gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. İlk altı haftalık inceleme süresince hiçbir grup KONTROL grubunda olduğu gibi tam olaram mineralize bir kemik formasyonu (%91.55) oluşturamamıştır. 12 hafta sonunda ise inceleme gruplarından hormon içerikli olanların hepsi PHEMA ve SHAM gruplarına göre anlamlı farklılık göstermiş olup, en yüksek mineralizasyonu ilk 6 haftada olduğu gibi her iki hormonu da içeren kriyojel doku iskelesi elde etmiştir (Çizelge 4.3).

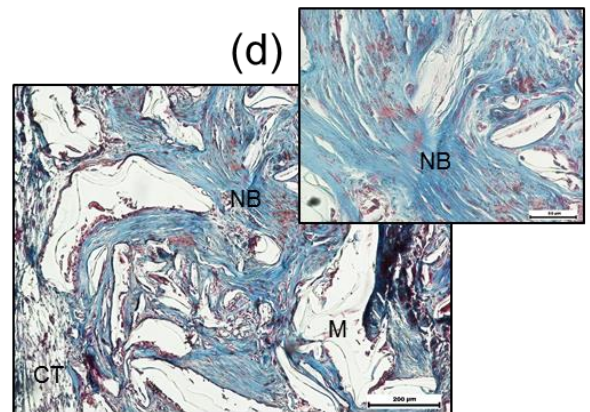
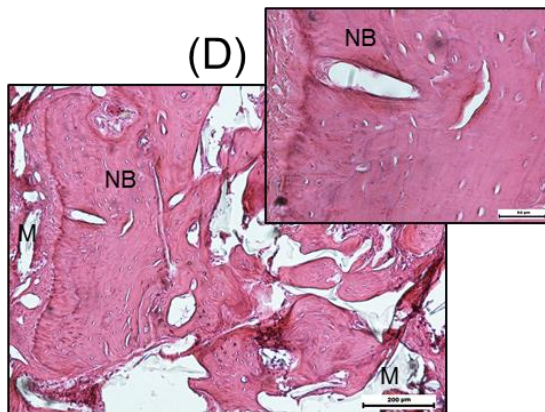
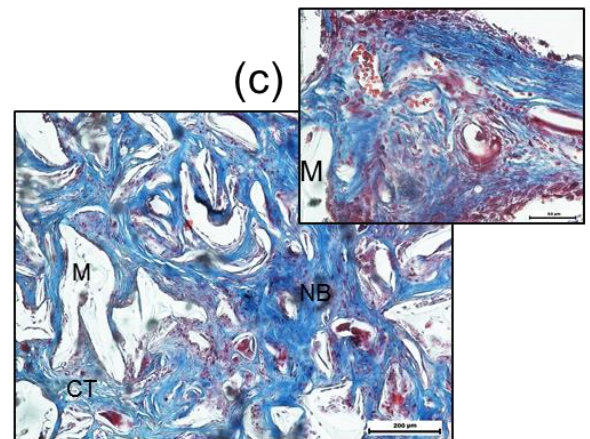
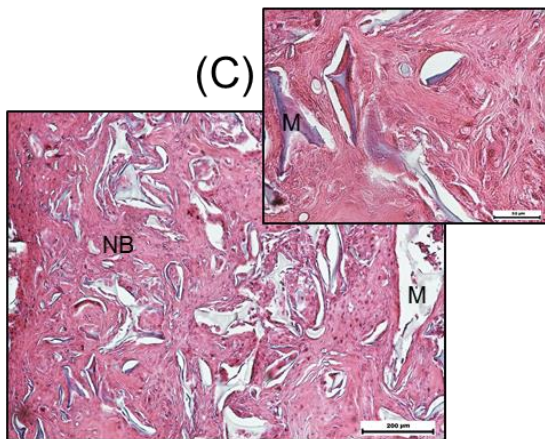
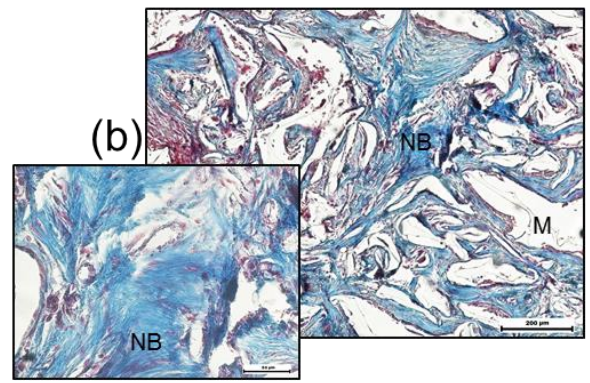
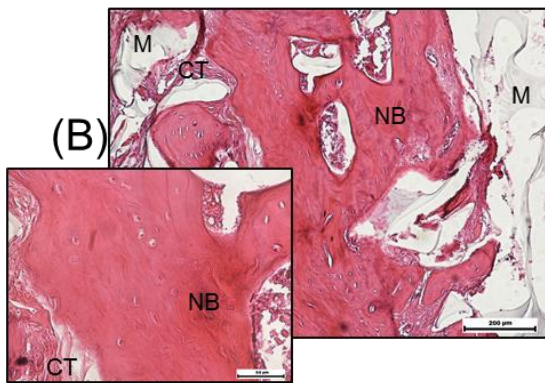
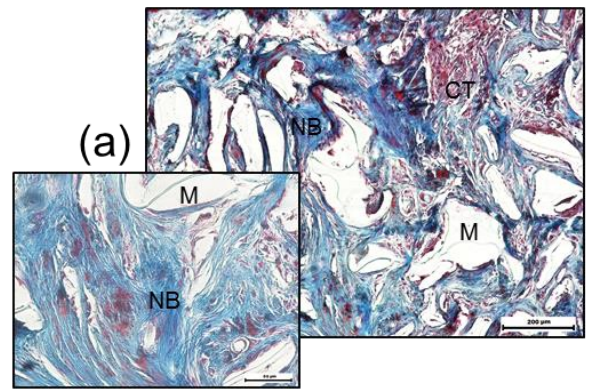
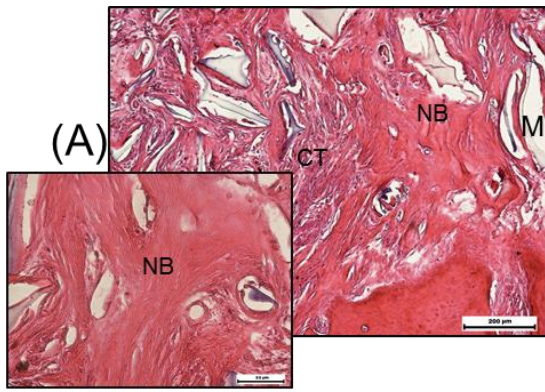
4.4.3. Histolojik analiz sonuçları



Şekil 4.22. 6 haftalık implantasyonların Hematoksilen Eozin (A,B,C,D) ve Masson's Trichrome (a,b,c,d) boyamalarına ait görüntüler: (A) ve (a) yalnız doku iskelesi grubuna (PHEMA); (B) ve (b) Testosteron içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST); (C) ve (c) Östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+E2); (D) ve (d) Testosteron ve östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST+E2) ait mikrograftlardır. M: İmplant edilen malzeme (PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi), CT: Bağ dokusu, NB: Yeni trabeküler kemik.

İmplantasyondan 6 hafta sonra incelenen örneklerde kollajen fibriller (HE boyaması ile pembe; MT boyaması ile mavi) ve kan damarlarının implant ile yakın ilişkisi gözlenmiştir. İskelelerin birbiriyle bağlı makro gözenekli yapısının yeni kan damarları oluşumuna izin verdiği görülmüştür. Bağ dokusu hücrelerinin ve yeni kan damarlarının önemli ölçüde kriyojel içine doğru gelişmesi, kriyojel ve incelenen hormonların intramembranöz ve/veya endokondral osifikasyona rehberlik ettiğini ortaya koymuştur. Orta-yoğun densitede inflamatuvar hücrelerin varlığı saptanmıştır. Fibröz bağ dokusu oluşumu ve inflamatuvar hücre yoğunluğu ile karakterize doku cevabı PHEMA ve PHEMA+E2 gruplarında diğer gruplara nazaran daha yüksek olarak görülmüştür. Dört grubun her birinde yeni trabeküler kemik dokularının adacıklar halinde kan damarları ve kriyogel ile etkileşim içerisinde halinde oldukları saptanmıştır. PHEMA+TST ve PHEMA+TST+E2 gruplarında kriyojelin çevresinde ve içlerinde yoğun yeni kemik oluşumları tespit edilmiştir.

İmplantasyondan 12 hafta sonra incelenen örneklerde benzer şekilde kollajen fibriller ve kan damarlarının implant ile yakın ilişkisi gözlenmiştir. 6 haftalık inceleme sonuçlarına göre kan damarlarının miktarında artış görülmüştür. İnflamatuvar cevabın ise 6 haftalık inceleme gruplarındakine kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Kortikal kemik plakaları üzerinde ve bazen kıkırdak adalarının sınırında aktif osteoblast sentezleyen yeni kemik matriksi tespit edilmiştir. Hiçbir deney grubunda nekroz veya yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Sağlıklı osifikasyon prosedürü kortikal kemiğin kenarlarından başlayarak implantın içlerine doğru ilerlemiştir, buna bağlı olarak defekt iyileşme skorları zamanla artış göstermiştir.



Şekil 4.23. 12 haftalık implantasyonların Hematoksilen Eozin (A,B,C,D) ve Masson's Trichrome (a,b,c,d) boyamalarına ait görüntüler: (A) ve (a) yalnız doku iskelesi grubuna (PHEMA); (B) ve (b) Testosteron içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST); (C) ve (c) Östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+E2); (D) ve (d) Testosteron ve östrojen içerikli doku iskelesi grubuna (PHEMA+TST+E2) ait mikrograftlardır. M: İmplant edilen malzeme (PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi), CT: Bağ dokusu, NB: Yeni trabeküler kemik.

Çizelge 4.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi ve Histolojik Analizlerin Tanımlayıcı İstatistik Bilgileri

Gruplar	Mineralize Kemik Formasyonu (%)		Doku cevabı		Kemik defekti iyileşmesi	
	M (± IQR)	p	M (± IQR)	p	M (± IQR)	p
6. Hafta						
SHAM	19.95 (±4.12)	0.001	2 (±0)	0.005	0 (±0)	0.001
PHEMA	27.63 (±4.49)		3 (±0)		1 (±0)	
PHEMA + TST	67.84 (±8.06)		2 (±1)		2.5 (±1)	
PHEMA + E2	32.37 (±5.53)		2.5 (±1)		1.5 (±0)	
PHEMA + TST+ E2	71.98 (±12.27)		2 (±1)		3 (±1)	
Kontrol	91.55 (±3.43)		0 (±0)		4 (±0)	
12. Hafta						
SHAM	24.87 (±4.45)	0.001	1.5 (±0)	0.010	0 (±0)	0.005
PHEMA	36.45 (±7.62)		2 (±1)		1 (±1)	
PHEMA + TST	79.02 (±10.34)		1.5 (±1)		3.5 (±0)	
PHEMA + E2	50.16 (±12.85)		2 (±1)		2.5 (±1)	
PHEMA + TST+ E2	87.53 (±9.09)		1 (±0)		4 (±0)	
Kontrol	90.25 (±6.71)		0 (±0)		4 (±0)	

SHAM: Yalnızca defekt oluşturulup hiçbir implant yerleştirilmemiş deney grubu, PHEMA: yalnızca doku iskelesinin implante edildiği deney grubu. PHEMA+TST: Testosteron içerikli nanopartiküllerin yüklendiği doku iskelesinin implante edildiği deney grubu. PHEMA+E2: Östrojen içerikli nanopartiküllerin yüklendiği doku iskelesinin implante edildiği deney grubu. PHEMA+TST+E2: Testosteron ve östrojen içerikli nanopartiküllerin yüklendiği doku iskelesinin implante edildiği deney grubu. Kontrol: Hiçbir işleme maruz bırakılmamış deney grubu. M: Ortalama, IQR: Çeyrek Değerler Genişliği

Çizelge 4.4. Deneysel grupların Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan çoklu karşılaştırma analizi

		Gruplar						
		SHAM (A)	PHEMA (B)	PHEMA+TST (C)	PHEMA+E2 (D)	PHEMA+TST+E2 (E)	KONTROL (F)	P
Kemik Defekti İyileşmesi								
6. Hafta								
	M	0.0	1.0	2.5	1.5	3.0	4.0	0.001
	IQR	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	
	Post hoc		(A-B) $p = 0.005$; (A-C) $p = 0.050$; (A-D) $p = 0.036$; (A-E) $p = 0.060$; (A-F) $p = 0.001$; (B-C) $p = 0.050$; (B-D) $p = 0.236$; (B-E) $p = 0.020$; (C-D) $p = 0.164$; (C-E) $p = 0.058$; (D-E) $p = 0.530$					
12. Hafta								
	M	0.0	1.0	3.5	2.5	4.0	4.0	0.001
	IQR	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	
	Post hoc		(A-B) $p = 0.003$; (A-C) $p = 0.001$; (A-D) $p = 0.002$; (A-E) $p = 0.002$; (A-F) $p = 0.00$; (B-C) $p = 0.005$; (B-D) $p = 0.025$; (B-E) $p = 0.010$; (C-D) $p = 0.505$; (C-E) $p = 0.003$; (D-E) $p = 0.042$					
Doku Cevabı								
6. Hafta								
	M	2.0	3.0	2.0	2.5	2.0	0.0	0.010
	IQR	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	
	Post hoc		(A-B) $p = 0.001$; (A-C) $p = 0.086$; (A-D) $p = 0.175$; (A-E) $p = 0.003$; (A-F) $p = 0.001$; (B-C) $p = 0.143$; (B-D) $p = 0.287$; (B-E) $p = 0.002$; (C-D) $p = 0.074$; (C-E) $p = 0.108$; (D-E) $p = 0.035$					
12. Hafta								
	M	1.5	2.0	1.5	2.0	1.0	0.0	0.005
	IQR	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	
	Post hoc		(A-B) $p = 0.052$; (A-C) $p = 0.024$; (A-D) $p = 0.175$; (A-E) $p = 0.099$; (A-F) $p = 0.00$; (B-C) $p = 0.267$; (B-D) $p = 0.131$; (B-E) $p = 0.088$; (C-D) $p = 0.157$; (C-E) $p = 0.187$; (D-E) $p = 0.213$					

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasının amacı; kemik rejenerasyonuna yönelik olarak, en uygun monomer oranlarına sahip olabilecek kriyojel doku iskelesini belirlemek, testosteron ve östrojenin PLGA nanopartiküller yardımıyla kontrollü ve uzun dönem salımını gerçekleştirebilmek, hazırlanan iskeleler ile hormon yüklü nanopartiküllerin kullanımıyla TST ve E2'nin ADMSC'ler üzerindeki kemik farklılaşmasına olan etkilerini belirleyebilmektir. Bu amaç doğrultusunda; önce farklı bileşim oranlarına sahip PHEMA-Jelatin doku iskeleleri sentezlenmiş ve karakterizasyonları doğrultusunda en uygun olduğu düşünülen yapı seçilmiştir. Sonrasında TST yüklü ve E2 yüklü nanopartiküller sentezlenmiş ve hormonların kriyojel doku iskelelerinden salım profilleri incelenmiştir. Hormon yüklü nanopartiküllerin doku iskelelerine emdirilmesiyle oluşturulan sistemlerin ADMSC (adipoz kökenli mezenşimal kök hücre)'ler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oluşturulan nanopartikül-hormon-doku iskelesi sisteminin *in-vivo* etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 60 adet *Sprague Dawley* sıçan kullanılarak kritik boyutlu kraniyal defekt uygulaması ile rejenerasyon çalışmaları yürülmüştür. Tez kapsamı boyunca yapılan çalışmalardan elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Dondurma sıcaklığı, monomer konsantrasyonu ve çapraz bağlanma oranı kriyojellerin fiziksel özelliklerini belirleyen temel değişkenlerdir. Tez kapsamında incelenecek olan salım ve hücre kültür çalışmaları için uygulanmasına karar verilen PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinin içeriğine: monomer-çapraz bağlayıcı HEMA:PEGDA oranı 6:1, Jelatin:Gluteraldehit oranı 20:1, %10 oranında (v/v) HEMA ve %4 oranında (v/v) Jelatin olarak karar verilmiştir. Ayrıca kriyojelleşme cam tüpler içerisinde -18°C'de, 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.
- 65:35; PLA/PGA bileşimlerine sahip Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak boş ve hormon yüklü nanopartiküller sentezlenmiştir. PLGA/17- β estradiol ile PLGA/Testosteron ağırlıkça oranı 10 olacak şekilde hazırlanan nanopartiküller, emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemiyle sentezlenerek ortalama 200 nm çaplarında ve küresel formda nanopartiküller üretilmiştir. PLGA nanopartiküller tarafından kapsüllenen 17- β estradiol ve testosteron miktarı HPLC ve UV spektrofotometre kullanılarak

belirlenmiş ve testosteronun enkapsülasyon verimi %63, 17- β estradiol'ün enkapsülasyon verimi ise %53 olarak bulunmuştur.

- PLGA nanopartiküllerden testosteron salımı, PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinden ise ayrı olarak testosteron ve 17- β estradiol salım çalışmaları yapılmış ve genel olarak testosteronun daha yüksek ani patlama (burst effect) salım oranına sahip olduğu fakat iskelelerden iki hormonun günlük salım miktarlarının eş olduğu bulunmuştur.
- Hesaplanan enkapsülasyon verimleri, literatürden araştırılan hormonların serum seviyeleri ve yapılan salım çalışmaları sonucunda *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları için bir PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelesi başına her iki hormon için de 1mg partikül emdirme yöntemiyle yüklenerek çalışmalar başlatılmıştır.
- Salım ve hücre kültürü çalışmaları'nın tüm deney ve analizleri için 8mm çapına ve 2mm kalınlığına sahip PHEMA-Jelatin doku iskekeri kullanılmıştır.
- CD29 (%95.02), CD90 (%99.39) ve CD54 (%98.84) işaretleyicileri için pozitif, CD45 (%6.72), CD106 (1.71) ve MHC sınıf 2 (0.38) negatif edile değerler ile birlikte primer kültürasyon ile elde edilen ADMSC'lerin hücrelerin yüksek saflıkta olduğu kanıtlanmıştır.
- Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerle (ADMSC) yürütülen hücre kültürü çalışmaları kapsamında yapılan MTT, SEM, ALP ve PCR analizleri sonucunda testosteron ve 17- β estradiol içeren nanopartikül yüklü PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskeleleri grubunun, hormonların etkisiyle hücre yapışmasını ve üremesini arttırdığı görülmüştür. Hücrelerin yapışması, üremesi ve farklılaşmaları üzerinde ayrı ayrı testosteron ve 17- β estradiol yüklü doku iskelelerinin, nanopartikülsüz kontrol doku iskelelerine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca iki hormonun birden yüklü olduğu doku iskelelerindeki ADMSC'lerin yapışma, üreme ve farklılaşma özelliklerinin diğer gruplardan daha üstün olduğu belirtilmiştir.
- Oluşturulan 8mm çaplı ve 2mm kalınlığındaki kraniyal defektlerin kritik boyutta oldukları (kendiliğinden iyileşemedikleri) kanıtlanmıştır.

- Histolojik çalışmalar doku iskelelerinin dokuda nekroz veya yabancı cisim reaksiyonuna sebep olmadığını ve zaman ilerledikçe inflamasyonel doku cevabının azaldığını ortaya koymuştur.
- Makroskopik değerlendirilmelere göre, implantasyondan 6 ve 12 hafta sonraki dönemlerde kriyojeller intakt yapılarını korumuşlardır. Etraf dokularla entegre olmuşlardır. Kriyojel çeperlerinde ve kriyojelin iç kısımlarında kan damarları görülmüştür. Polimerik kriyojel komşu dokularla bir bütünlük içerisine girmiştir.
- Farklı hormon içerikli veya boş doku iskelelerinin içlerine doğru bağ dokusu hücreleri ve yeni kan damarlarının ilerlediği ve yeni dokunun oluştuğu gözlenmiştir, zamanla birlikte oluşan yeni kemik dokusunda artışında görülmüştür.
- 6 ve 12 haftalık inceleme sürelerinin her ikisinde de, Testosteron hormonunu içeren doku iskeleleri, Östrojen hormon içerikli ve hiç içermeyen doku iskelesine oranla kemik defekti iyileşmesi ve mineralize matriks formasyonu bakımından daha başarılı bulunmuştur.
- 6 ve 12 haftalık inceleme sürelerinin her ikisinde de Östrojen ve Testosteron hormonunu bir arada içeren doku iskeleleri, hormonları teker teker içeren ya da hiç içermeyen doku iskelelerine oranla kemik defekti iyileşmesi ve mineralize matriks formasyonu oluşumu bakımından daha başarılı bulunmuştur.
- Hiç kullanılmamalarına kıyasla, Östrojen ve Testosteron hormonlarının ayrı ayrı veya birlikte kullanımının adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin kemik farklılaşmasına olumlu yönde etki ettiği bulunmuştur.
- Testosteron ve Östrojen yüklü nanopartikül içeren PHEMA-Jelatin kriyojel doku iskelelerinin, şişme davranışları, mekanik özellikleri, birbiri ile bağlantılı makro gözenekli yapılarına ek olarak *in-vitro* koşullarda ADMSC'leri farklılaştırma potansiyelleri ve *in-vivo* koşullardaki kemik doku rejenerasyonunu destekleyici özellikleri sayesinde kemik doku mühendisliğindeki klinik uygulamalarda kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Langer, R., Vacanti, J.P., Tissue engineering, *Science*, 260, 920–927, **1993**.
- [2] Shin, H., Jo, S., Mikos, A.G., Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4353–4364, **2003**.
- [3] Nomi, M., Atala, A., Coppi, P.D., Soker, S., Principals of neovascularization for tissue engineering, *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 463–483, **2002**.
- [4] Gümüşderelioğlu, M., Maviş, B., Karakeçili, A., Kahraman, A.S., Çakmak, S., Tıǧlı, S., Demirtaş, T.T., Aday, S., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik Dergisi Yeni Ufuklara Eki*. **2007**.
- [5] Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S., Langer, R., Nanotechnological strategies for engineering complex tissue, *Nature Nanotechnology*, 6, 13-22, **2011**.
- [6] Salgado, A., Cauntinho, O., Reis, R., Bone tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765, **2004**.
- [7] Sağlam, M., *Genel Histoloji*, 6. Baskı, Emel Matbaa, Ankara, **1987**.
- [8] Robling, A.G., Alesha, B.C., Charles, H.T., Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 455-98, **2006**.
- [9] Drosse, I., Elias, V., Rodolfo, C., Pietro, D.B., Wolf, M., Matthias, S., Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach, *International Journal of the Care of the Injured*, 39, 2-20, **2008**.
- [10] Porter, J.R., Timothy, T.R., Bone tissue engineering: A review in boneiomimetics and drug delivery strategies, *Biotechnology*, 25, **2009**.
- [11] Bul, Ö., *Kemik İliği Kökenli Osteoblastik Liyofilizatın Kemik Hasarlarında Kullanılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [12] Karaplis, A.C., PTHrP: Novel roles in skeletal biology, *Current Pharmaceutical Design*, 7, 655-670, **2001**.
- [13] Hill, P.A., Bone remodelling, *British Journal of Orthodontics*, 25, 101-107, **1998**.
- [14] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: State of art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765, **2004**.
- [15] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliği ve ürünleri, *Bilim ve Teknik*, 516, 70-75, **2010**.
- [16] Burg K.J. L., Porter S., Kellam J. K., Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 2347-2359, **2000**.

- [17] Colnot, C., Cell sources for bone tissue engineering: Insights from basic science, *Tissue Engineering: Part B*, 17, 449-457, **2011**.
- [18] Seong, J.M., Kim, B.C., Park, J.H., Kwon, K., Mantalaris, A., Hwang, Y.S., Stem cells in bone tissue engineering, *Biomedical Materials*, 5, 1-15, **2010**.
- [19] Can, A., Karahuseyinoglu, S., Concise Review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells, *Stem Cells*, 2, 288-28, **2007**.
- [20] TÜBA, *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik uygulamalar*, Yalçın Matbaacılık, Ankara, **2009**.
- [21] Barry, F., Murphy, J., Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *The International Biochemistry & Cell Biology*, 36, 568-584, **2004**.
- [22] Can, A., *Kök hücre biyolojisi türleri ve tedavide kullanımları*, 1. Baskı, Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara, **2014**.
- [23] Mizuno, H., Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review, *Journal of Nippon Medical School*, 76, 56-66, **2009**.
- [24] Rada, T., Reis, R., Gomes, M., Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering, *Tissue Engineering: Part B*, 15, 113-125, **2009**.
- [25] Salgado, A.J., Gomes, M.E., Chou, A., Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds, *Material Science and Engineering*, 20, 27-33, **2002**.
- [26] Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3413-3443, **2006**.
- [27] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486, **2004**.
- [28] Vats, A., Tolley, N.S., Polak, J.M., Gough, J.E., Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, *Clinical Otolaryngology*, 28, 165-172, **2002**.
- [29] Lee, S.H., Shin, H., Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 339-359, **2007**.
- [30] Raja, M., Hafidz, R.N., Yaakob, C.M., Amin, I., Noorfaizan, A., Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin, *International Food Research Journal*, 18, 813-817, **2011**.
- [31] Rohanizadeh, R., Swain, M.V., Mason, R.S., Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 1173-1182, **2008**.

- [32] Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking, *Biomaterials*, 22, 763-768, **2001**.
- [33] Blitterswijk, C.V., Scaffolds for tissue engineering via thermally induced phase separation tissue engineering, *Advances in Regenerative Medicine*, 4, 275-294, **2008**.
- [34] Bajpai, A.K., Kankane, S., Preparation and characterization of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based biomaterials: water sorption property and in vitro blood compatibility, *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 1559-1571, **2007**.
- [35] Wichterle, O., Lim D., Hydrophilic gels for biological use, *Nature*, 185, 117-118, **1960**.
- [36] Horak, D., Jayakrishnan, A., Arshady, R., Preparation and properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate), *Polymers in Medicine and Biology*, 1, 80-107, **2003**.
- [37] Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 272-279, **2009**.
- [38] Çetin, D., Kahraman, A. S., Gümüşderelioğlu, M., Novel Scaffolds Based on (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Superporous Hydrogels for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Science*, 22, 1157-1178, **2011**.
- [39] Cretu, A., Gattin, R., Brachais, L., Barbier-Baudry, D., Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly(E-caprolactone) copolymers, *Polymer Degradation and Stability*, 83, 399-404, **2004**.
- [40] Brynda, E., Houska, M., Kysilka, J., Pradny, M., Lesny, P., Jendelova, P., Michalek, J., Sykova, E., Surface modification of hydrogels based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) with extracellular matrix proteins, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 909-915, **2009**.
- [41] Bölgen, N., Yang, Y., Korkusuz, P., Güzel, E., El Haj, A.J., Pişkin, E., Three-dimensional ingrowth of bone cells within biodegradable cryogel scaffolds in bioreactors at different regimes, *Journal of Tissue Engineering*, 14, 1743-1750, **2008**.
- [42] Denizli, A., Biyoayırma ve Polimerik Taşıyıcılar, 1. Baskı, Tüba Akademik Forumu 64, Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara, **2011**.
- [43] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*, 21, 445-451, **2003**.
- [44] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I.Y., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Journal of Soft Matter*, 1, 303-309, **2005**.
- [45] Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Characterization of supermacroporous monolithic

- polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography*, 807, 129-137, **2004**.
- [46] Bölgen, N., *Hema-Laktat-Dekstran Kriyojellerin Üretimi ve Doku Mühendisliğinde Uygulamaları*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [47] Lozinsky, V. I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russian Chemical Reviews*, 71, 489-511, **2002**.
- [48] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, 1. Baskı, Pozitif Matbaacılık, Ankara, **2011**.
- [49] Kumar, A., Srivastava, A., Cell separation using cryogel-based affinity chromatography, *Nature Protocols*, 5, 1737-1747, **2010**.
- [50] Irmak, G., *β -Estradiol Yüklü Doku İskeleleri ile İn-Vitro Kemik Doku Mühendisliği*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [51] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliği ders notları, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2011**.
- [52] Bosetti, M., Boccafoschi, F., Leigheb, M., Cannas, M.F., Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering, *Biomolecular Engineering*, 24, 613-618, **2007**.
- [53] Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G., Biomaterials and bone mechanotransduction, *Biomaterials*, 22, 2581-2593, **2001**.
- [54] Guyton, A.C., Hall, J.E., *Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition, Saunders/Elsevier Publishers, Boston, **2005**.
- [55] Philip, M.S., Edward, G.L., Oursler, M., David, K., Estrogen actions in arteries, bone, and brain, *Science & Medicine*, 19, 44-54, **1996**.
- [56] Seyisoğlu, H., Postmenopozal osteoporoz ve östrojen replasman tedavisi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimleri Osteopoz Sempozyumu, İstanbul, 73-81, **2007**.
- [57] Compston, J.E., Sex steroids and bone, *Physiological Reviews*, 81, 420-437, **2001**.
- [58] Riggs, B. L., Khosla, S., Melton, L.J., Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton, *Endocrine Reviews* 23, 279-302, **2002**.
- [59] Tuck S. P., Francis, R.M., Testosterone, Bone and Osteoporosis, *Advances in the Management of Testosterone Deficiency*, 37, 123-132 **2009**.
- [60] Ray, R., Sex steroids and stem cell function. *Molecular Medicine*, 14, 493-501, **2008**.
- [61] Derman, S., Kızılbey, K., Mustafaeva, Z., Polymeric Nanoparticles, *Journal of Engineering and Natural Sciences Sigma* 31, 109-122, **2013**.

- [62] Kumar, M., "Nano and microparticles as controlled drug delivery devices", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 234-258, **2000**.
- [63] Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., and Rudzinski, W.E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20, **2001**.
- [64] Mohanraj, V. J., Chen Y., Nanoparticles-A review, *Tropical Journal Of Pharmacy Research*, 5 , 563-573, **2006**
- [65] Çırpanlı, Y., *Kamptotesin İçeren Polimerik ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi ve İn vitro - İn vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2009**.
- [66] Kumari, A., Yadav, S.K., and Yadav, S.C., "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, **2010**.
- [67] Engineer, C., Parikh, J., and Raval, A., "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System", *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25, 79-85, **2011**.
- [68] Roco, M.C., "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine", *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 337-346, **2003**.
- [69] Panyam, J., and Labhasetwar, V., "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55,3,329-347, **2003**
- [70] Alonso, M.J., "Nanoparticulate drug carrier technology", *Drugs and The Pharmaceutical Sciences* 77, 203-242, **1996**.
- [71] Parveen, S., Misra, R., and Sahoo, S.K., "Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging", *Nanomedicine: Nanotechnology*, 8, 147-166, **2012**.
- [72] Andac, M.,, Plieva, F. M., Denizli, A., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Poly(hydroxyethyl methacrylate)-based macroporous hydrogels with disulfide cross-linker, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209, 577-584, **2008**.
- [73] Gürpınar, A.Ö., Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a simple technique, *Turkish Journal of Biology*, 36, 658-664, **2012**.
- [74] Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z., Role of materials surfaces in regulating bone and cartilage cell response, *Biomaterials*, 17, 137-146, **1996**.
- [75] Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86, 325-332, **2004**.

- [76] Wang, J., Wan, Y.Z., Luo, H.L., Gao, C., Huang, Y., Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique, *Materials Science and Engineering: C*, 32, 536-54, **2012**.
- [77] Kailasanathan, C., Selvakumar, N., Comparative study of hydroxyapatite/gelatin composites reinforced with bio-inert ceramic particles, *Ceramics International*, 38, 3569-3582, **2012**.
- [78] Lozinsky, V.I., Domotenko, L.V., Vainerman, E.S., Mamtsis, A.M., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V., Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions, *Colloid and Polymer Science*, 264, 19-24, **1986**.
- [79] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhailovsky, S., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Pore structure of macroporous monolithic cryogels prepared from poly(vinyl alcohol), *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 1057-1066, **2006**.
- [80] Irmak, G., Demirtaş, T.T., Altındal, D.Ç., Gümüşderelioğlu, M., Sustained release of 17 β -estradiol stimulates osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on chitosan-hydroxyapatite scaffolds, *Cells Tissues Organs*, In Press, **2014**.
- [81] Kutlu, C., *Beyin Tümörlerinin Tedavisi İçin Çift Etkili Doku İskelesi-Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**,
- [82] Birnbaum D., Kosmala J., Henthorn D., Peppas L., Controlled release of β -estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release, *Journal of Controlled Release*, 65, 375-387, **2000**.
- [83] Chen, S., Singh, J., Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: In vitro evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 295, 183-190, **2005**.
- [84] Hong, L., Colpan, A., Peptan, I., Daw, J., George, A., Evans, C., 17-b estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells, *Tissue Engineering*, 13, 1197-1203, **2007**.
- [85] Hong, L., Krishnamachari, Y., Seabold, D., Joshi, V., Schneider, G., Salem, A., Intracellular release of 17- β estradiol from cationic polyamidoamine dendrimer surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles improves osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells, *Tissue Engineering Part C*, 17, 319-325, **2011**.
- [86] Koç, A., *Mezenşimal Kök Hücrelerin ve Kompozit İskelelerin Kullanımıyla Kemik Doku Mühendisliği*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [87] Tansel H., *Çene Yüz Bölgesi Ameliyatları ile Serum Alkalın Fosfataz Arasındaki İlişkinin Klinik Olarak Araştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.

- [88] Kaveh, K., Ibrahim, R., Bakar, M. Z. A., Ibrahim, T. A., Mesenchymal stem cells, osteogenic lineage and bone tissue engineering: A review, *Journal of Animal and Veterinary Advances.*, 10, 2317-2330, **2011**.
- [89] George, J., Kuboki, Y., Miyata, T., Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds, *Biotechnology and Bioengineering.*, 95,404-411, **2006**.
- [90] Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, G. S., Nanes, M. S., Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP2 α) is inhibited by tumor necrosis factor- α , *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 2695-2701, **2002**.
- [91] Komori T., Regulation of osteoblast differentiation by Runx2, *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 658, 43- 49, **2010**.
- [92] Cutting CB., McCarthy JG., Berenstein A., Blood supply of the upper craniofacial skeleton: The search for composite calvarial blood flaps, *Plastic Reconstructive Surgery*, 603, 74, **1984**.
- [93] Schmitz JP., Schwartz Z., Hollinger JO., Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anatomica*, 138(3), 185-92, **1990**.
- [94] Prolo DJ. Pedrotti PW, Burres KP, Oklund S: Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 108, 230, **1982**.
- [95] Frame JW.: A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 38, 176, **1980**.
- [96] Develiođlu H., Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD., Kritik Boyutlu Ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Cilt:6 Sayı:1*, **2003**.
- [97] Emre B., Sargılı Y., Deneklerin Fizyolojik Özellikleri ve Deneysel Çalışmalarda Model Oluşturmadaki Zorlukları, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 1, 26-32, **2010**.
- [98] Öztuna V., Ortopedi ve Travmatolojide Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri: Temel ilkeler, Etik unsurlar ve Modeller, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 6 (1-2), 47-55, **2007**.
- [99] Calis M., Demirtaş T.T. ve ark. Estrogen as a Novel Agent for Induction of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Osteogenic Differentiation: In Vivo Bone Tissue-Engineering Study. *Plastic and Reconstructive Surgery*,133-4, 499e-510e, **2014**.
- [100] Perver, D., Phema-Jelatin Kriyojel Kemik Doku İskelelerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivite Kazandırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Dilara PERVER
Doğum Yeri : İstanbul
Medeni Hali : Bekar
E-posta : dilaraperver@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Öğrenci Evleri N Blok 317, 06800
Beytepe, Çankaya, ANKARA

Eğitim

Lise : Pertevniyal Anadolu Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Anadal) ve Kimya
Bölümü (Yandal)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü
Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, Çok iyi

İş Deneyimi

Hücre Biyolojisi ve Biyoteknoloji Bölümü, Kök Hücre Laboratuvarı, CADB (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo) Pablo de Olavide Üniversitesi, Sevilla, İSPANYA' da araştırmacı olarak çalışılmıştır.

Deneyim Alanları

Hücre kültürü, kök hücreler, biyomateryaller, nanopartiküller, doku mühendisliği

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi BAB Proje No: 014 D01601 012, Bütçesi: 18456.75 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Poster Sunumu: 'Bone regeneration by pHEMA/gelatin Cryogel based scaffolds, AdMSCs and controlled release of steroid hormones: in vitro and in vivo studies'
10-13 Haziran 2014, TERMIS-EU 2014, Magazzini del Cotone Conference Center, Porto Antico, Via al Porto Antico, Mod. 9, Genova, İTALYA