

**Poli(3-hidroksi bütirat)/Poli(bütülen adipat-ko-  
tereftalat)/İpek- Bazlı Tendon Doku İskeleleri:  
Karakterizasyon ve Tenojenik Aktivite**

**Poly(3-hydroxy butyrate)/Poly(butylene adipate-co-  
terephthalate)/Silk-Based Tendon Scaffolds:  
Characterization and Tenogenic Activity**

**BURCU SARIKAYA**

**PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022



## ÖZET

### **Poli(3-hidroksi bütirat)/Poli(bütülen adipat-ko-tereftalat)/İpek- Bazlı Tendon Doku İskeleleri: Karakterizasyon ve Tenojenik Aktivite**

**Burcu SARIKAYA**

**Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı**  
**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**  
**Şubat 2022, 145 sayfa**

*Sunulan tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FBA-2018-17043 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.*

Tendonlarda, mekanik stres birikimi, yaşlanma, genetik yatkınlık ve travma gibi etkenler sonucunda oluşan inflamasyon ve lezyonlara bağlı olarak tendon rüptürleri (kopma) sıklıkla görülmektedir. Tendon dokusunun düşük miktarlarda hücre içermesi, zayıf vaskülarizasyon ve düşük yenilenme potansiyeli nedeniyle hasarlı bölgede sağlıklı rejenerasyon gerçekleşmesi için **tendon doku mühendisliği** yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan tez çalışmasında tendon rejenerasyonunda yama olarak kullanılacak ipek fibroin/poli(3-hidroksibütirat) (SF/P3HB) ve ipek fibroin/poli(bütülen adipat-ko-tereftalat) (SF/PBAT) hizalı nanofibröz matrikslerin geliştirilmesi ve bu matrikslerde sıçan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (rAdMSC), büyüme faktörü ve dinamik kültür koşulları varlığında *in vitro* tenojenik aktivitenin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında klasik elektroçirme yöntemi kullanılarak SF/P3HB ve SF/PBAT nanofiberlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Her 2 malzeme için de optimum elektroçirme koşulları “response surface methodology” (RSM) yaklaşımı ile belirlenmiş ve hedeflenen şekilde hizalı ve ortalama 700 nm çap değerine sahip SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler elde edilmiştir.

İkinci aşamada ise, hizalı nanofibröz matrikslere uygulanan stabilizasyon işlemi sonrası ipek fibroine ait  $\alpha$ -heliks yapısının  $\beta$ -tabaka yapısına geçişinin indüklendiği ve her iki nanofibröz matriksin mekanik dayanım açısından tendon dokuda kullanıma uygun olduğu, ancak SF/PBAT nanofibröz matriksin tendon dokuya benzerlik açısından daha üstün mekanik özellikler sergilediği belirlenmiştir. Stabilizasyon ve sterilizasyon işlemlerinin matrikslerin yüzey ıslatılabilirlik ve kristalinite özelliklerini etkilemediği, ancak otoklavda sterilizasyonu yapılan SF/P3HB nanofibröz matrikslerde hücre canlılığının etilen oksit yöntemine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. SF/PBAT nanofibröz matrikslerin ise ısıtma işlemleri için uygun olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca, SF/P3HB nanofibröz matrikslerin bakteriyostatik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında, hizalı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerde rAdMSC'ler ile büyüme/farklılaşma faktörü-5 (GDF-5) varlığında/yokluğunda 21 günlük statik kültür çalışması yapılmış ve tenojenik farklılaşma karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Hücrelerin kültür boyunca yüksek canlılıkta olduğu ve hizalanmaya uygun olarak matriksler üzerinde organize olduğu görülmüştür. Kültür sonunda bozunmaya bağlı olarak her iki doku iskelesinde de mekanik özelliklerde azalma tespit edilmiştir. SF/PBAT doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rAdMSC hücrelerinin SF/P3HB'e oranla daha yüksek COL1A1, COL3A1, SCX, TNC ve düşük PPAR $\gamma$  gen ifadeleri nedeniyle tenojenik aktivite açısından daha uygun oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, GDF-5 büyüme faktörü, gen ifadelerinde artışa yol açarak hücre iskeletinin düzenlenmesini ve farklılaşmayı indüklemiştir. Hizalı topografya rAdMSC hücrelerinin tenojenik farklılaşmasında oldukça etkin olmasına rağmen gen ekspresyonları açısından yeterli bulunmamıştır. Mekanik uyum biyoreaktöründe yapılan çalışmalarda SF/P3HB doku iskelelerinin dinamik kültür çalışmaları için yeterli mekanik özelliklere sahip olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışması sonunda, hizalı SF/PBAT nanofibröz matrikslerin tenojenik aktivite açısından SF/P3HB nanofibröz matrikslere göre daha üstün özellikler gösterdiği ve tendon rejenerasyonunda yama materyali olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Tendon doku mühendisliği, ipek fibroin, poli(3-hidroksibütirat), poli(bütillen adipat-ko-tereftalat), adipoz kökenli mezenkimal kök hücre, büyüme/farklılaşma faktörü-5

# ABSTRACT

## **Poly(3-hydroxy butyrate)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate)/Silk-Based Tendon Scaffolds: Characterization and Tenogenic Activity**

**Burcu SARIKAYA**

**Doctor of Philosophy, Bioengineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**

**February 2022, 145 pages**

*This thesis study has been financially supported by Hacettepe University Research Fund (Project No: FBA-2018-17043).*

Tendon ruptures are frequently seen in tendons due to inflammation and lesions caused by factors such as mechanical stress accumulation, aging, genetic predisposition, and trauma. Tendon tissue engineering approaches are required for healthy regeneration in the damaged area due to the low number of cells in the tendon tissue, poor vascularization, and low regeneration potential. In the presented thesis, the development of silk fibroin/poly(3-hydroxybutyrate) (SF/P3HB) and silk fibroin/poly(butylene adipate-co terephthalate) (SF/PBAT) aligned nanofibrous matrices that can be used as a patch for tendon regeneration were aimed. The investigation of the *in vitro* tenogenic activity of rat adipose-derived mesenchymal stem cells (rAdMSC) in these matrices in the presence of growth factor and dynamic culture conditions were also performed.

In the first part of the thesis study, SF/P3HB and SF/PBAT nanofibers were produced using the conventional electrospinning method. Optimum electrospinning conditions were determined by the "response surface methodology" (RSM) approach for both materials. Aligned SF/P3HB and SF/PBAT nanofibrous matrices were obtained with an average diameter of 700 nm.

In the second part, it was found that the transition of the  $\alpha$ -helix structure of silk fibroin to the  $\beta$ -sheet structure was induced after the stabilization process applied to the aligned nanofibrous matrices, and both nanofibrous matrices were suitable for use in tendon tissue in terms of mechanical strength, but SF/PBAT nanofibrous matrix was superior in terms of similarity to tendon tissue as mechanically. It was obtained that stabilization and sterilization processes did not affect the surface wettability and crystallinity of the matrices, but cell viability was higher in autoclave sterilized SF/P3HB nanofibrous matrices compared to the ethylene oxide method. It has been determined that SF/PBAT nanofibrous matrices are not suitable for heat treatment. In addition, SF/P3HB nanofibrous matrices were found to have a bacteriostatic effect.

In the third part of the thesis study, a 21-day static culture study was performed with rAdMSCs in aligned SF/P3HB and SF/PBAT nanofibrous matrices in the presence/absence of growth/differentiation factor-5 (GDF-5), and tenogenic differentiation was comparatively examined. Cells were found to be highly viable throughout the culture and organized on the matrices because of alignment. A decrease in mechanical properties was detected in both scaffolds due to the matrix degradation at the end of the culture. It was determined that rAdMSCs cultured on SF/PBAT scaffolds were more suitable for tenogenic activity compared to SF/P3HB due to higher COL1A1, COL3A1, SCX, TNC, and low PPAR $\gamma$  gene expressions. In addition, the GDF-5, growth factor that is induced cytoskeletal regulation and differentiation, leading to increased gene expressions. Although the aligned topography is highly effective in the tenogenic differentiation of rAdMSC cells, it was not found to be sufficient in terms of gene expression. In the studies performed with mechanical stimulation bioreactor, it was determined that the SF/P3HB scaffolds did not have sufficient mechanical properties for dynamic culture studies.

It was concluded that aligned SF/PBAT nanofibrous matrices showed superior properties in terms of tenogenic activity compared to SF/P3HB nanofibrous matrices and could be used as patch material in tendon regeneration.

**Keywords:** Tendon tissue engineering, silk fibroin, poly(3-hydroxybutyrate), poly(butylene adipate-co-terephthalate), adipose-derived mesenchymal stem cell, growth/differentiation factor-5

## TEŞEKKÜR

Beni laboratuvarına kabul edip doktora çalışmamı yapmama olanak sağlayan ve benim için oldukça önemli bu süreçte hem akademik hem de insani yönüyle ufku genişleten ve kendisiyle çalışmaktan minnettarlık duyduğum, çalışma aşkına her zaman gıpta ettiğim kıymetli danışman hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmasının yürütülmesinde FBA-2018-17043 numaralı Kapsamlı araştırma Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca değerli görüş ve önerilerini sunan ve tez izleme komitemde yer alan değerli hocalarım **Prof. Dr. İbrahim Vargel, Doç. Dr. Berna Topuz ve Prof. Dr. Ayşe Karakeçili**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında malzeme temininde gösterdiği özveriden dolayı BASF firmasından **Evrım Yüzbaşı**'na, analizlerin gerçekleştirilmesinden sorumlu **HÜNİTEK ve ODTÜ Merlab personeline** emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca deneylerin yürütülmesinde sık sık danıştığım, tüm içtenliğiyle fikrini ve desteğini aldığım ve hepsinden öte arkadaşlığıyla hep mutluluk duyduğum canım **Ekin Özge Akdere**'ye; birbirinden ayıramadığım, doktora çalışmasının bana kattığı en güzel şey olarak nitelendirdiğim dostluklarından ötürü canım izomerlerim **Tuğçe Gültan ve Elvan Konuk**'a tek tek sayamacağım her anlardaki desteklerinden ötürü sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sevgili **Dr. Damla Çetin Altındal ve Dr. Murat Şimşek**'e, görünce içimi huzur kaplayan canım **Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e, her zaman fikir danışabildiğim ve çalışmaktan mutlu olduğum sevgili arkadaşlarım **Dr. Anıl Sera Çakmak ve Dr. Soner Çakmak**'a, sevgili üst dönemim ve kader yoldaşım **Dr. Gökçe Kaynak Bayrak**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda bana karşılıksız yardım eden, çok sevdiğim hem arkadaşım hem de küçük kardeşlerim **Demet Çakır, Tülay Selin Erkut ve Sena Koç**'a; ve tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'ndaki değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her an sevgi ve katlanan özlemle varlıklarına şükrettiğim, tüm hayatım boyunca bana olan güven, destek ve sevgilerini eksik etmeyen ve belki de çoğu zaman canımdan çok sevdiğim **annem Semiha Sarıkaya, babam Orhan Sarıkaya ve ablam İlkay Bıcakcı**'ya bu günlere gelene kadar gösterdikleri sevgi ve emeklerinden dolayı minnettarım, iyi ki size sahibim. Bana daha küçük bir çocukken yol gösteren ve akademik hayata yönlendiren, bu doktora çalışmasının mimarı sayılabilecek ve her zaman bana destek olan abim **Dr. Sabri Bıcakcı**'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince hayatıma her zaman ve sadece mutluluk katan ilk göz ağrım **Bilge**'m, küçük prensesim **Zeynep Ece**'m ve miyavlayan meleklerim **Appa ve Momo**'ya varlıklarından dolayı minnettarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	ix
ÇİZELGELER.....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Tendon .....	4
2.1.1. Yapısal Özellikler .....	4
2.1.2. Biyolojik Özellikler .....	6
2.1.3. Mekanik Özellikler.....	7
2.2. Tendon Hasarları ve Klinik Tedavi Yaklaşımları .....	8
2.3. Tendon Rejenerasyonu.....	9
2.4. Tendon Doku Mühendisliği .....	11
2.4.1. Doku İskeleleri .....	13
2.4.1.1. İpek Fibroin (SF).....	17
2.4.1.2. Poli(3-hidroksi bütirat) (P3HB).....	19
2.4.1.3. Poli(bütillen adipat-ko-tereftalat) (PBAT) .....	21
2.4.2. Hücreler .....	22
2.4.2.1. Adipoz kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (AdMSC) .....	23
2.4.3. Büyüme Faktörleri.....	27
2.4.3.1. Büyüme/farklılaşma Faktörü (GDF) .....	28
2.4.4. Biyoreaktörler.....	30
2.4.5. Diğer Yaklaşımlar .....	34



<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>36</b>
3.1. Malzemeler.....	36
<b>3.2. SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin üretimi .....</b>	<b>37</b>
3.2.1. SF İzolasyonu .....	37
3.2.2. Elektroçizme Çözeltilerinin Hazırlanması.....	39
3.2.3. RSM ile Elektroçizme Prosesinin Optimizasyonu .....	39
3.2.3.1. SF/P3HB Nanofiber Optimizasyonu .....	41
3.2.3.2. SF/PBAT Nanofiber Optimizasyonu .....	42
<b>3.3. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Stabilizasyonu ve Sterilizasyonu .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Karakterizasyonu</b>	<b>43</b>
3.4.1. Yüzey Karakterizasyonu.....	44
3.4.2. Kimyasal Karakterizasyon .....	45
3.4.3. Termal Karakterizasyon .....	45
3.4.4. Kristalografik Karakterizasyon .....	45
3.4.5. Mekanik Karakterizasyon .....	45
3.4.6. Steril SF/P3HB Nanofibröz Matrikslerde Hücre Canlılık Analizi .....	45
3.4.7. Antibakteriyal Özelliklerin Belirlenmesi.....	46
3.4.8. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi.....	47
<b>3.5. Hücre Kültür Çalışmaları .....</b>	<b>47</b>
3.5.1. AdMSC İzolasyonu ve Karakterizasyonu .....	47
3.5.2. Statik Kültür Çalışmaları.....	50
3.5.3. Dinamik Kültür Çalışmaları .....	50
<b>3.6. Hücre Kültürü Sonrası Analizler .....</b>	<b>53</b>
3.6.1. MTT Analizi .....	53
3.6.2. SEM Analizi .....	53
3.6.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama.....	54
3.6.4. İmmünofloresan Boyama .....	54
3.6.5. Hidroksiprolin Analizi .....	55
3.6.6. RT-PCR Analizi .....	56
3.6.7. Mekanik Analiz .....	58
<b>3.7. İstatistiksel Analiz.....</b>	<b>59</b>

<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrislerin Üretimi</b> .....	<b>60</b>
4.1.1. SF/P3HB Nanofiber Optimizasyonu.....	61
4.1.2. SF/PBAT Nanofiber Optimizasyonu.....	65
<b>4.2. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrislerin Karakterizasyonu</b>	<b>70</b>
4.2.1. Yüzey Karakterizasyonu .....	71
4.2.2. Kimyasal Karakterizasyon .....	74
4.2.3. Termal Karakterizasyon .....	76
4.2.4. Kristalografik Karakterizasyon .....	78
4.2.5. Mekanik Karakterizasyon.....	80
4.2.6. Steril SF/P3HB Nanofibröz Matrislerde Hücre Canlılık Analizi .....	82
4.2.7. Antibakteriyal Özelliklerin Belirlenmesi .....	84
4.2.8. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi .....	86
<b>4.3. Hücre Kültür Çalışmaları</b> .....	<b>90</b>
4.3.1. rAdMSC İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	90
4.3.2. Statik Kültür Çalışması Sonuçları .....	92
4.3.2.1. MTT Analizi.....	93
4.3.2.2. SEM Analizi .....	95
4.3.2.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama .....	98
4.3.2.4. İmmünfloresan Boyama.....	100
4.3.2.5. Hidroksiprolin Analizi .....	102
4.3.2.6. RT-PCR Analizi .....	103
4.3.2.7. Mekanik Analiz .....	112
4.3.3. Dinamik Kültür Çalışmaları .....	114
<b>5. GENEL SONUÇLAR</b> .....	<b>119</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>123</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>139</b>
<b>Ek-1: Etik kurul izni</b> .....	<b>139</b>
<b>Ek-2: Hidroksiprolin analizi kalibrasyon grafiği</b> .....	<b>140</b>
<b>Ek-3: Tezden Türetilmiş Yayınlar</b> .....	<b>141</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

## ŞEKİLLER

Şekil 2. 1.	Tendonun hiyerarşik yapısı ([14]'ten değiştirilerek).....	6
Şekil 2. 2.	Tendona ait gerilim-gerinim eğrisi ve tendon yapısında oluşan deformasyonlar ([18]'den değiştirilerek). ....	7
Şekil 2. 3.	Tendon rejenerasyonunun farklı aşamalarında hasar bölgesinde meydana gelen moleküler, hücrel ve ECM yapısındaki değişiklikler. ....	11
Şekil 2. 4.	Tendon doku mühendisliği yaklaşımının ve aşamalarda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2. 5.	Tendon doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler.....	14
Şekil 2. 6.	Hızlı fibröz matrikslerin eldesinde kullanılan tipik döner toplayıcı elektroçirme sistemi. ....	16
Şekil 3. 1.	Mekanik uyarım biyoreaktörünün (a) genel görüntüsü (b) üstten şematik görünümü ve (c) kültür haznesi ekipmanları .....	52
Şekil 3. 2.	Mekanik özelliklerin belirlendiği çekme analizinde farklı gerinim değerlerindeki nanofibröz matriksler. ....	58
Şekil 4. 1.	SF/P3HB nanofiber optimizasyon modeline ait (a) pertürbasyon, (b) kontur ve (c) 3B yüzey grafikleri .....	65
Şekil 4. 2.	SF/PBAT nanofiber optimizasyon modeline ait (a) pertürbasyon, (b, c) kontur ve (d, e) 3B yüzey grafikleri.....	69
Şekil 4. 3.	Optimize edilmiş SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait (a, d) SEM görüntüleri (10 kX büyütme), (b, e) nanofiber çap dağılım grafikleri ve (c, f) nanofiber hizalanma grafikleri. ....	72
Şekil 4. 4.	P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait ATR-FTIR spektrumu.....	75
Şekil 4. 5.	P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait DSC termogramı. ....	76

- Şekil 4. 6. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait XRD spektrumu ve % kristalinite değerleri. .... 79
- Şekil 4. 7. Hizalı A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB nanofibröz matriksler üzerinde kültüre edilen L929 fare fibroblast hücrelerinin (a) kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerindeki MTT analiz sonuçları, (b) kültürün 7. günündeki farklı büyütmelelerdeki SEM analiz görüntüleri. (istatistiksel anlamlılık:  $n = 3$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). .... 83
- Şekil 4. 8. *E.coli* ve *S.aureus* bakteri suşlarına karşı (a) A-SF/P3HB ve (b) S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin antibakteriyal aktivite grafikleri ( $n=3$ ). .... 85
- Şekil 4. 9. A-SF/P3HB nanofibröz matrikslerin PBS, kolajenaz ve lizozim içeren ortamlarda 7., 14. ve 21. günde bozunma davranışlarına ait SEM analiz görüntüleri (20 kX büyütme, ölçek çubuğu 2  $\mu\text{m}$ , kırmızı oklar aşınma gerçekleşen alanları göstermektedir). .... 87
- Şekil 4. 10. S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin PBS, kolajenaz ve lizozim içeren ortamlarda 7., 14. ve 21. günde bozunma davranışlarına ait SEM analiz görüntüleri (10 kX büyütme, ölçek çubuğu 5  $\mu\text{m}$ ). .... 89
- Şekil 4. 11. Sıçanlardan izole edilen rAdMSC hücrelerine ait (a) P0, (b) P3 optik mikroskop görüntüleri (10X) ve (c) P5'teki sırasıyla hemositometrik sayım ve MTT analizi sonucu elde edilen üreme grafikleri ( $n=3$ ). .... 91
- Şekil 4. 12. rAdMSC'lerin farklı yüzey antijenleri için akış sitometri analiz sonuçları. .... 92
- Şekil 4. 13. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında 21 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları ( $n=3$ , istatistiksel anlamlı farklılık: aynı grup farklı günler arasında \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; aynı gün farklı gruplar arasında  $\square p < 0.05$ ,  $\square\square p < 0.01$ ). .... 94
- Şekil 4. 14. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında

- kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde SEM analiz görüntüleri (10 kX büyütme, ölçek barı 50  $\mu\text{m}$ 'yi göstermektedir). ..... 96
- Şekil 4. 15. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır, 20X büyütme, ölçek barı 100  $\mu\text{m}$ 'yi göstermektedir). ..... 99
- Şekil 4. 16. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde hücre iskeleti/çekirdeği boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi renkle boyanmıştır, 40X büyütme, ölçek barı 20  $\mu\text{m}$ 'yi göstermektedir). ..... 101
- Şekil 4. 17. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde kuru ağırlığa göre hidroksiprolin analizi sonuçları (n = 3). ..... 102
- Şekil 4. 18. Hizalı A-SF/P3HB doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde RT-PCR analizi ile yapılan COL1A1, COL3A1, SCX, TNMD, TNC ve PPAR $\gamma$  kantitatif gen ekspresyon analiz grafikleri. (y-ekseni,  $\beta$ -aktine normalize edilen gen ekspresyonunu ifade etmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=5, kontrol grubu normal besi ortamındaki A-SF/P3HB'nin 7. günü olduğunda \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; aynı gün farklı gruplar arasında  $\square p < 0.05$ ; aynı grup farklı günler arasında  $\blacktriangle p < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p < 0.001$ ). ..... 104
- Şekil 4. 19. Hizalı S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. Gününde RT-PCR analizi ile yapılan COL1A1, COL3A1, SCX, TNC ve PPAR $\gamma$  kantitatif gen ekspresyon analiz grafikleri. (y-ekseni,  $\beta$ -aktine normalize edilen gen ekspresyonunu

ifade etmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, kontrol grubu normal besi ortamındaki S-SF/PBAT'ın 7. Günü olduğunda \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ; aynı gün farklı gruplar arasında □ $p<0.05$ , □□□ $p<0.001$ ; aynı grup farklı günler arasında ▲ $p<0.05$ , ▲▲ $p<0.01$ , ▲▲▲ $p<0.001$ ). ..... 109

## ÇİZELGELER

Çizelge 2. 1. Doku iskelelerinde kullanılan doğal ve sentetik biyomalzemelerin karakteristik özellikleri .....	15
Çizelge 2. 2. Tendon doku mühendisliğinde AdMSC'ler ile yapılan çalışmalar.	25
Çizelge 2. 3. Tendon rejenerasyonunda mekanik uyarım biyoreaktörleri ile yapılan çalışmalar. ....	32
Çizelge 3. 1. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan malzemeler ve açıklamaları .....	44
Çizelge 3. 2. Gerçek zamanlı-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri .....	57
Çizelge 4. 1. RSM ile SF/P3HB nanofiber optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve her bir değişkene ait sınır değerleri .....	62
Çizelge 4. 2. SF/P3HB nanofiber optimizasyonu için oluşturulan deneme seti ve üç faktöre karşı sistem yanıtları. ....	62
Çizelge 4. 3. SF/P3HB nanofiber çapının optimizasyonu için oluşturulan modele ait ANOVA analiz sonuçları. ....	64
Çizelge 4. 4. RSM ile SF/PBAT nanofiber optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve her bir değişkene ait sınır değerleri. ....	66
Çizelge 4. 5. SF/PBAT nanofiber optimizasyonu için oluşturulan deneme seti ve üç faktöre karşı sistem yanıtları. ....	67
Çizelge 4. 6. SF/PBAT nanofiber çapının optimizasyonu için oluşturulan modele ait ANOVA analiz sonuçları. ....	68
Çizelge 4. 7. Farklı işlemlerin uygulandığı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait su temas açısı ölçümleri. ....	73
Çizelge 4. 8. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait termal geçiş sıcaklıkları. ....	78
Çizelge 4. 9. Stabilizasyon öncesi ve sonrası hizalı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait mekanik özellikler. ....	81

Çizelge 4. 10. Statik kültürün 21. gününde farklı ortamlarda rAdMSC'lerle kültüre edilen hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerine ait mekanik analiz sonuçları (n=3).....	113
Çizelge 4. 11. Dinamik kültür koşullarında yapılan ön çalışmalar ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3) .....	115
Çizelge 4. 12. Dinamik kültür çalışmalarında revize edilen kültür koşulları ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3).....	116
Çizelge 4. 13. Dinamik kültür çalışmalarında farklı ekim protokolü kullanılarak revize edilen kültür koşulları ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3).....	117



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

$C^+$	Karbon iyonu
$CO_2$	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik asit
kob	Koloni oluşturan birim
LiBr	Lityum bromür
$M_w$	Moleküler ağırlık
MWCO	Moleküler ağırlık kesmesi
$Na_2CO_3$	Sodyum karbonat
$NaN_3$	Sodyum azid
NaOH	Sodyum hidroksit
$O_2$	Oksijen
2B	2 boyutlu
3B	3 boyutlu
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Kütle/hacim oranı
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

## **Kısaltmalar**

$\alpha$ -MEM	Minimum Essential Eagle ortamı $\alpha$ modifikasyonu
ACL	Anterior krusiat ligament (ön çapraz bağ)
AdMSC	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre
AM	Asetoksimetil
ANOVA	Varyans analizi
BBD	Box – Behnken Design
BMMSC	Kemik iliği mezenkimal kök hücre
BMP	Kemik morfojenik proteini
BSA	Sığır serum albumin
cDNA	Komplementer DNA
DAPI	4',6-Diamidino- 2-Phenylindole
DF	Dermal fibroblast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
D-PBS	Dulbecco PBS
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
ECM	Ekstraselüler matriks
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilKarbodiimid Hidroklorür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EthD-1	Etidyum homodimer-1
FBS	Fötal sığır serumu
FT-IR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometre
GAG	Glikozaminoglikan
GDF	Growth/differentiation factor

GeIMA	Metakrilatlanmış jelatin
HAp	Hidroksiapatit
HFIP	1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol
HIF	Hipoksiyle uyarılabilen transkripsiyon faktörleri
HMDS	Hekzametildisilazan
HUVEC	İnsan umblikal damar endotel hücreleri
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
MES	2-(N-Morfolin)ethansülfonik Asit Hemisodyum
MMP	Matriks metalloproteinaz
MSC	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür
mRNA	Mesajcı RNA
NHS	N-Hidroksi Süksinimid
PA6	Poliamid-6
PBAT	Poli(bütillen adipat- <i>ko</i> -teraftalat)
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCL	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PEG	Poli(etilen glikol)
PGA	Poli(glikolik asit)
PHA	Poli(hidroksi alkonoat)
P3HB	Poli(3-hidroksibütirat)
PLA	Poli(laktik asit)

PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PPAR $\gamma$	Peroksizom $\text{Çoğaltıcı-Aktive Edici Reseptör } \gamma$
PPDO	Poli(p-dioksanon)
PRP	Plateletçe zengin plazma
PTFE	Politetrafloroetilen
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik asit
RNA	Ribonükleik asit
RSM	Tepki yüzey metodolojisi
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Scx	Skleraksis
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SF	İpek fibroin
TdMSC	Tendon kökenli mezenkimal kök hücre
Tnc	Tenascin-C
Tnmd	Tenomodulin
TG	Termogravimetrik
UV	Mor ötesi ışık
XRD	X-ışını kırınımı

## 1. GİRİŞ

Tendonlarda mekanik stres birikimi, yaşlanma, genetik yatkınlık ve travma gibi etkenler sonucunda oluşan enflamasyon ve lezyonlara bağlı olarak tendon rüptürleri (kopma) sıklıkla görülmektedir [1]. Günümüzde tendon rüptürlerinin tedavisinde ilaç tedavisi, plateletçe zengin plazma (PRP) enjeksiyonu gibi medikal destekle birlikte hasarlı bölgedeki iltihaplı ve nekrotik dokunun uzaklaştırılması gibi cerrahi girişimler uygulanmaktadır [2]. Büyük tendon kayıplarında ise hasarlı kısım otogreft, allogreft veya zenogreft implantasyonu ile iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Günümüze kadar bu uygulamalar donör alan morbiditesi, immün yanıt oluşturma, bölgede tekrar kopma meydana gelme riski ve uzun dönemde kısıtlı fonksiyon geri kazanımı gibi klinik sonuçlar doğurmuştur. Söz konusu kısıtlamalar; hücrelerin, doku iskelelerinin, biyoaktif moleküllerin ve mekanik uyarımın kombine bir şekilde kullanıldığı tendon doku mühendisliği yaklaşımlarının geliştirilmesini gerekli hale getirmiştir [3]. Tendon onarımı için doğal tendon yapısını en iyi şekilde taklit etmek şarttır ve geliştirilecek olan fonksiyonel doku iskelesi doğal tendon dokusunun fizyolojik ihtiyacını karşılayabilecek mekanik özelliklere ve hücre merkezli iyileşmeyi artıracak nanoyapıya sahip olmalıdır. Aynı zamanda doku iskelesi, yeni tendon dokusu oluşumuyla aynı hızla parçalanarak, yeni oluşacak dokuya yer sağlamalıdır. Bir diğer husus ise dokuyu en iyi şekilde taklit edebilmek için hizalı yapıların kullanılması gerekliliğidir. Hizalı yapıların, hücre davranışlarını etkilediği, tamirden ziyade iyileşme mekanizmasına yönlendirme olduğu ve iyileşme sürecini hızlandırarak skar doku oluşumunu önlemede kritik bir role sahip olduğu belirtilmiştir [4]. Doğal tendon dokusuna en yakın şekilde, istenilen çapta ve hizalanmada nanofiber yapısının kolaylıkla elde edilebileceği, ucuz bir yöntem olarak sıklıkla elektroçizme yöntemi kullanılmaktadır. Günümüze kadar kolajen, ipek fibroin, PLA, PGA, PCL, PEG, kitosan, PHBHHx ve P4HB gibi polimerler ile çalışılmıştır fakat tendon rejenerasyonu için ideal bir polimer belirlenememiştir [5].

Genellikle *Bombyx mori* ipek böceği kozalarından izole edilen ipek fibroin (SF), biyobozunur ve kolay işlenebilen yapısıyla yüksek biyoyumluluk göstermesi ve ekstraselüler matriksin (ECM) ana bileşenlerinden kolajene benzerlik göstermesi nedeniyle kolajene alternatif doğal bir biyopolimer olarak nitelendirilmektedir [6]. SF, polimere elastik yapı kazandırıp suda çözünmesini sağlayan hidrofilik ve içerdiği  $\beta$ -tabaka yapılardan dolayı çözünmeme ve yüksek dayanım sağlayan kristalin hidrofobik kısımlardan oluşmaktadır [7]. SF'in mekanik özellikler bakımından tendon doku mühendisliğinde tek başına kullanımı yetersiz olmasına rağmen diğer polimerlerle kolaylıkla karışım oluşturabildiğinden tercih edilmektedir. Poli(3-hidroksibutirat) (P3HB), birçok mikroorganizma tarafından üretilen polihidroksialkonat ailesine ait doğal bir poliesterdir. Mikrobiyal P3HB biyoyumlu, biyobozunur ve mekanik özellikler açısından tendon dokuya benzemesine rağmen yüksek kristaliniteye sahiptir ve bu nedenle doku mühendisliğinde başka polimerlerle karıştırılarak kullanılmaktadır [8]. Poli(bütülen adipat-ko-tereftalat) (PBAT), alifatik-aromatik bir kopolimer olup yapıya üstün mekanik özellikler katan bütülen tereftalat (aromatik kısım) ve yapının biyobozunur olmasını sağlayan bütülen adipat (alifatik kısım) zincirlerinden oluşmaktadır [9]. Bunun yanında PBAT, yapısındaki aromatik tereftalat ile tendon rejenerasyonuna izin verecek sürede bir bozunma hızına ve yapısındaki alifatik bütülen adipat sayesinde de hücre tutunmasına ve çoğalmasına izin verecek bir bileşime sahiptir.

Tendon rejenerasyonunda doğal dokunun biyolojik özelliklerini en iyi şekilde taklit edebilmek ve doku iskelelerine fonksiyonellik kazandırılmak için uygun tipte hücre kullanılması ve bu hücrelerin doku iskelesi içerisinde çoğalarak kendi ekstraselüler matrikslerini üretmesi gerekmektedir. Mezenkimal kök hücreler kemik, kas, tendon, ligament ve adipoz gibi dokulara farklılaşabilen, doku rejenerasyonunda görev alan ve immün yanıt oluşumunu baskılayan stromal kök hücrelerdir [10]. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AdMSC), tendon dahil birçok farklı dokuya farklılaşabilmekte, insanlarda ve hayvanlarda çok miktarda bulunmakta ve morbidite oluşturmadan kolaylıkla izole edilebilmektedir. Literatür incelendiğinde AdMSC'lerin fiber çapına ve hizalanmasına bağlı olarak uygun koşullarda tendon dokusuna farklılaştığı bildirilmiştir [11-14].

Tendonun en önemli özelliği mekanik fonksiyonudur ve kısa süreli (koşma, yürüme) ya da uzun süreli (kilo alımı) yüklerle maruz kaldığında bunu ECM sentezi ve bozunmasında yaptığı değişiklikler sayesinde tolere etmektedir. Bu nedenle vücut dışında tendon homeostazisinin sağlanması için mekanik uyarım uygulamak oldukça önemlidir. Mekanik stres uygulaması dokunun iyileşme sürecinde ECM sentezinin hızlanması, hücre proliferasyonu ve farklılaşması için gerekli biyokimyasal sinyallerin artışı gibi etkilerde bulunmaktadır ve özellikle kök hücre kullanılan çalışmalarda kök hücrelerin tenojenik farklılaşmasında kilit rol oynamaktadır [15, 16].

Özetlenen bilgiler ışığında sunulan bu tez çalışmasında tendon doku mühendisliğinde kullanılabilecek işlevsel bir doku iskelesinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda geliştirilen SF/P3HB ve SF/PBAT doku iskeleleri ve bu doku iskelelerinin rAdMSC'lerle uyumluluğu ve tenojenik farklılaşma üzerine etkilerinin incelenmesi tez çalışmasının özgün yönüdür. Tez çalışması 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, SF izolasyonu yapılmış ve polimer reçineleriyle karıştırılarak elektroğirme çalışmalarına başlanmıştır. Tepki yüzey metodolojisi (RSM) ile elektroğirme çalışmaları optimize edilmiş ve ortalama 700 nm fiber çapına ve hizalı topografyaya sahip SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler üretilmiştir. Tezin ikinci aşamasında ise, hizalı nanofibröz matriksler uygulanan stabilizasyon ve sterilizasyon işlemleri öncesinde sonrasında morfolojik, kimyasal, mekanik, termal ve kristalin özellikler açısından karakterize edilmiştir. Tezin üçüncü aşamasında ise, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere rAdMSC izolasyonu gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Statik kültür koşullarında SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler, sıçan AdMSC hücreleri ile 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. Kültür sonunda doku iskeleleri malzeme-hücre etkileşimi ve tenojenik farklılaşma açısından çeşitli karakterizasyon testleriyle değerlendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel verilerle, literatürle karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır. Bunun yanında, hizalı SF/P3HB nanofibröz matriksler mekanik uyarım biyoreaktörü ile dinamik kültür koşullarında rAdMSC hücreleri ile kültüre edilmiş, sonuçlar tendon onarımında kullanım açısından değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışması kapsamında incelenen konular güncel literatür bilgisiyle açıklanmıştır. İlk kısımda tendon dokusu ve özellikleri özetlenmiş, ikinci kısımda ise tendon hasarları ve tedavi yaklaşımlarına yer verilmiştir. Üçüncü kısımda tendon rejenerasyonundan bahsedilmiştir. Dördüncü kısımda çalışmanın temelini oluşturan tendon doku mühendisliği ürünlerinin gerekliliği anlatılmış ve tendon doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılan hücreler, biyoaktif moleküller, biyomalzemeler, biyoreaktörler ve diğer kültür koşulları açıklanmıştır. Ayrıca, tez çalışması kapsamında kullanılan hücre çeşidi olarak adipoz mezankimal kök hücreler; biyomalzeme olarak ipek fibroin (SF), poli(3-hidroksibütirat) (P3HB) ve poli(bütillen adipat-ko-teraftalat) (PBAT); biyoaktif molekül olarak büyüme/farklılaşma faktörü (GDF) ve biyoreaktör olarak mekanik uyarım biyoreaktörü hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

### 2.1. Tendon

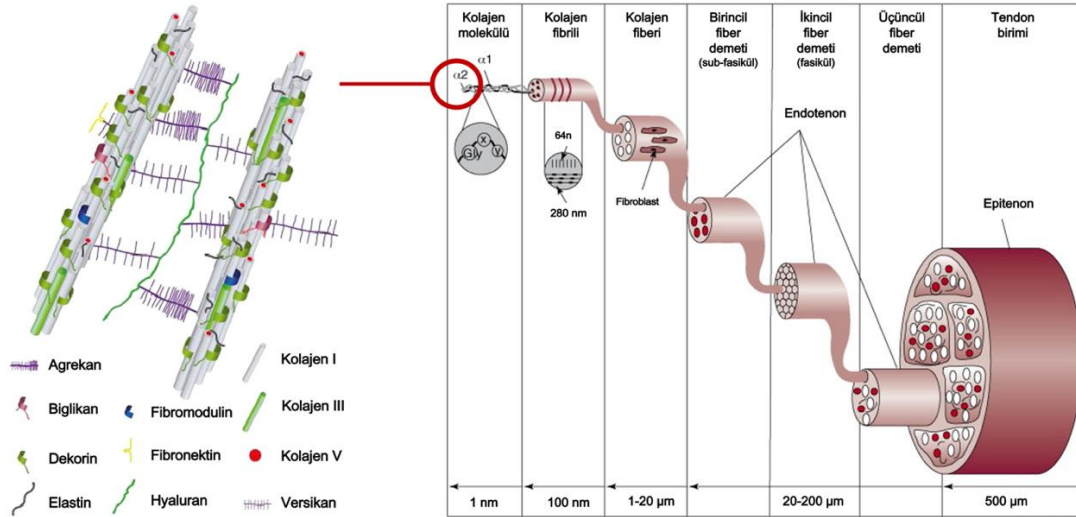
#### 2.1.1. Yapısal Özellikler

Tendon, kemik ile kas arasına yerleşmiş, kasta oluşan kuvveti kemiğe ileten ve böylece eklem hareketini sağlayan bağ doku elemanıdır. Tendonlar, parlak, beyaz renkli ve buldukları bölgeye göre silindirik, düz, yelpaze, kurdele gibi farklı şekillerde ve farklı uzunluklarda olabilmektedirler. Birçok farklı şekilde sınıflandırılabilen tendonlar anatomilerine göre kılıflı, kılıfsız, paratenon kaplı (Aşil tendonu) ve sinoviyal kaplı (parmak fleksör tendonları) olarak gruplandırılabilir. Yerleşim yerlerine göre, eklem içi ve eklem dışı olarak gruplandırılan tendonların büyük çoğunluğu eklem dışı olsa da popliteus (menisküs) tendonu gibi eklem içi yerleşime sahip tendonlar bulunmaktadır. Bunun yanında tendonlar genelde kasta kemiğe doğru yapışma sergileyip insersiyon oluştururken, bazı durumlarda tendonlar kas için origo oluşturur. Fonksiyonlarına göre tendonlar enerji depolayan ve pozisyonel tendonlar olarak sınıflandırılırken, enerji depolayan tendonlar esnek ve esnekliği nedeniyle daha çok enerji depolama ve iletme yeteneğine sahiptir. Ayak bileğinde bulunan tibialis anterior tendonu gibi pozisyonel tendonlar ise neredeyse hiç uzamazlar [17].



Temel olarak kolajen fiberlerinden oluşan tendon dokuda, fibriller sadece uzunlamasına değil aynı zamanda enine ve yatay olarak da yönlendirilmiştir. Uzunlamasına fiberler sadece paralel değil, aynı zamanda spiraller oluşturarak da birbirini kesmektedir. Hareketlerin çeşitli aşamalarında, tendonlar sadece kuvvet aksına paralel değil, aynı zamanda enine ve rotasyonel kuvvetlere de maruz kalmaktadır. Kolajen fiberlerin üç boyutlu iç yapısı, çeşitli yönlerdeki kuvvetlere karşı bir tampon ortam oluşturarak tendonun hasar görmesini ve kopmasını önlemektedir.

Tendon dokuda kolajen fibriller hizalanarak ve çapraz bağlanarak kolajen fiberleri, oluşan kolajen fiberler ise birleşerek fasikülleri oluşturmakta ve her bir fasikülün etrafını **endotenon** adı verilen ince bir bağ dokusu kılıfı sarmaktadır (Şekil 2.1.). Endotenonun üzerinde bulunan ve tüm tendonu saran yapı ise epitenon olarak isimlendirilmektedir. Temel olarak vaskülarizasyon bu yapılar üzerinden sağlanmaktadır. Bunun yanında, tendonun etrafını saran ve tendona intrasinoviyal ya da ekstrasinoviyal özellik kazandıran 3 farklı yapı bulunmaktadır. Fibröz kılıf veya retinakula (1), genellikle el ve ayaklarda bulunan uzun tendonların kemik doku ile temas ettiği bölgeler olan bileklerdeki tüm tendonların etrafını sararak anatomik konumlandırma sağlamaktadır. Sinoviyal kılıflar (2), sıklıkla el ve ayak tendonlarında görülmekte ve tendonun kemik yüzeyine yapışmasını ve sürtünmeyi engelleyen kanal görevi görmektedir. Parietal ve viseral iki ince seröz tabakanın içinde bulunan peritendinöz sıvı ile kayma işlevi gerçekleştirilmektedir. Kılıf bulunmayan bazı tendonlarda ise paratenon (3), sürtünmeyi azaltmak için tendonun etrafını saran gevşek fibriler doku olarak serbest harekete izin vermektedir. Aşil tendonu paratenon yapısına tipik bir örnektir. Bahsedilen fibröz yapılar damarlanma ve gerekli besin transferini sağlamada etkin rol oynadıklarından tendon iyileşmesinde önemli bir kriter olmaktadır [18].



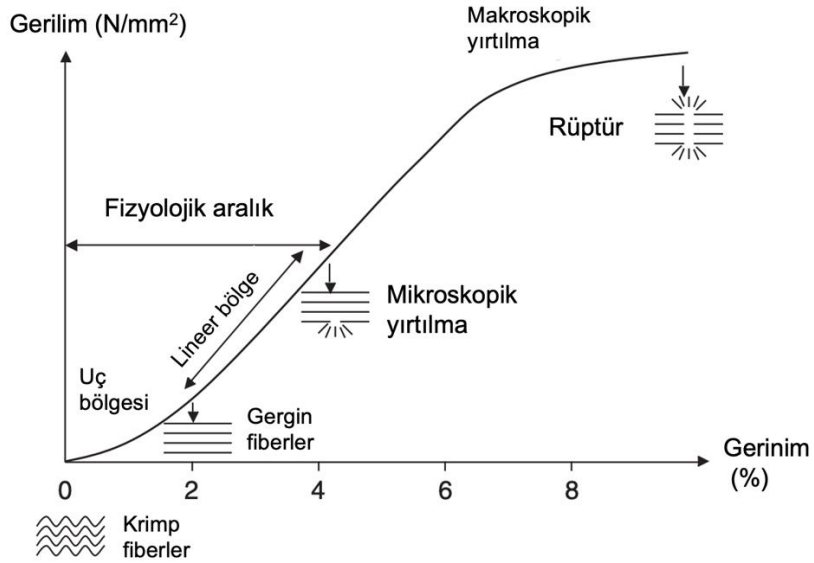
Şekil 2. 1. Tendonun hiyerarşik yapısı ([19]'ten değiştirilerek).

### 2.1.2. Biyolojik Özellikler

Tendon, kemik ile kas arasında mekanik kuvvetlerin aktarımını sağlama görevi olan özelleşmiş fibröz dokudur. Bu nedenle, sürekli ve tekrarlayan yük uygulamasına dayanabilen esneklikte ve sertlikte olacak şekilde evrilmiştir. Tendonun üstün biyomekanik özellikleri oldukça organize ECM bileşenlerinden ileri gelmektedir. ECM ağı özellikle hizalı kolajen tip I fiberlerden ve bunun yanı sıra kolajen tip III ve V, proteoglikanlar, elastin ve fibronektin gibi moleküllerden oluşmaktadır. Tendon dokuya ait özelleşmiş tenosit hücreleri ise bu matriks ağı içine gömülüdür [2]. Tendonun hücresel bileşeninin %90-95'ini tenoblast ve tenositler; %10'unu ise tendonun kemiğe bağlantı noktasındaki kondrositler, tendon kılıfındaki fibroblastlar, arteriyollerin duvarını oluşturan endotel ve düz kas hücreleri meydana getirmektedir [20]. Tendonun yaklaşık olarak %70'i su iken geriye kalan %30'luk kuru ağırlığın da %65-80'ini kolajen tip I proteini oluşturmaktadır [21]. Tendon matriksinde kolajen tip III az miktarda bulunmasına rağmen dokunun esnekliğini sağlamakta ve fibrilojenezde önem taşımaktadır. Bunun dışında tendon ECM'i, su tutmayı ve basma hareketine dayanımı sağlayan **aggrekan**; kolajen fibrillerinin sıralanmasını ve çapraz bağlanmasını etkileyen, aynı zamanda fibrillerin kayma hareketini kolaylaştıran **dekorin**; kolajen fasikülleri arasında lubrikasyon sağlayan ve kaymayı kolaylaştıran **lubrikin**; tendon gelişiminde ve olgunlaşmasında etkili olan **tenascin-C** (Tnc) gibi proteoglikanlar ve glikoproteinleri içermektedir [22].

### 2.1.3. Mekanik Özellikler

Tendon dokular *in vivo* koşullarda maruz kaldıkları mekanik etkilerden dolayı benzersiz fiber morfolojisine ve viskoelastik özelliklere sahiptir. Tendon fiberlerine ait tipik bir gerilim-gerinim grafiğinde, tendonun %2'e kadar gerilebildiği, doğrusal olmayan uç bölgesi bulunmakta ve bu bölge tendonun doğal duruşunu ifade eden kıvrımlı, 'krimp' modelini temsil etmektedir (Şekil 2.2.). Bu bölgenin eğimi ve gerinim miktarı tendonun tipine ve bulunduğu yere bağlı olmak üzere farklılık göstermektedir. Doğrusal bölge olan %4 gerinime kadar olan bölgede ise kolajen fiberleri krimp modelini kaybetmekte ve gergin forma geçmektedir. Doğrusal bölgenin eğimi elastik modül olarak ifade edilmektedir. Gerinimin %4'ten fazla olduğu durumda ise mikroskopik yırtılmalar oluşmaya başlamaktadır. Gerinimin artması durumunda ise tendonda kopmalar yani rüptürler oluşmaktadır [23].



Şekil 2. 2. Tendona ait gerilim-gerinim eğrisi ve tendon yapısında oluşan deformasyonlar ([23]'den değiştirilerek).

Tendonlar fonksiyonlarına göre **pozisyonel** ve **enerji depolayan** tendonlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Tüm tendonlar pozisyonel role sahipken, bazı tendonlar hareket esnasında enerji tüketimini azaltmak için enerji depoları olarak da çalışmaktadır ve bu farklılık tendonun mekanik gereksinimlerini de etkilemektedir.

Kolajen fiber çapı ve fiberlerin çapraz bağlanması ile mekanik gereksinimler karşılanmaktadır. Kastan gelen kuvvetin transferini mümkün kılmak için pozisyonel tendonların gerinimin doğrudan ve hızlı şekilde aktarılabilmesi için nispeten sert olması gerekirken, enerji depolayan tendonların enerji depolamasını en üst düzeye çıkarmak için bir dereceye kadar sertliğe sahip olması ve sisteme enerjiyi geri döndürmek için de hızla geri tepki verebilmeleri gerekmektedir. Ayrıca, Aşil tendonu gibi enerji depolayan tendonlar yüksek gerilime dayanırken (%11-16), anterior tibial tendon gibi pozisyonel tendonlarda uzama kapasitesinin yüksek olmasına gerek duyulmamaktadır (%2-3) [24]. Elastik modül değerleri açısından incelendiğinde, enerji depolayan tendonlardan Aşil tendonu için 800 MPa, patellar tendon için 300-600 MPa olarak ve pozisyonel tendonlardan olan fleksör digitorum profundus için 1,000 MPa ve ekstensör digitorum longus için 1,600 MPa olarak belirlenmiştir [15].

## 2.2. Tendon Hasarları ve Klinik Tedavi Yaklaşımları

Tendon dokuda yaş, cinsiyet, obezite, spor yaralanmaları, otoimmün rahatsızlıklar, travma vb. bağlı olarak çeşitli hasarlar gelişebilmekte ve oluşan morbidite hastalarda aylar boyunca süren hareket kısıtlılığı ve yaşam kalitesinin düşmesi gibi sonuçlara yol açmaktadır. Genel olarak oluşan bu hasarlar **tendinopati** veya **rüptür** olarak adlandırılmaktadır [25]. Tendinopati genel bir tanım olup hem tendinit hem de tendinoz durumları için kullanılmakta ve tendona aşırı yük binmesi ya da aşırı kullanım gibi durumlarda tendonda oluşan patolojik değişimleri ifade etmektedir. **Tendinit**, tendona fazla ve/veya birden ağır yük binmesi sonucunda mikro-yırtılmaların oluşumuna bağlı olarak gelişen akut enflamatuvar dejenerasyonlardır. **Tendinoz**, dokunun dinlenme/iyileşme için zaman olmaksızın sürekli ve aşırı kullanımına bağlı olarak, kolajen liflerinin bozulması ve enflamatuvar olmayan doku rejenerasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Klinik olarak semptomlar farkedilememekte ve tendonda kopmalar oluşabilmektedir. **Rüptürler** ise travma, ısınma hareketleri yapmadan spor yapma, aşırı yük binmesi gibi durumlarda tendonda aniden oluşan kopmaları ifade etmektedir. Ayrıca, tendinopati rahatsızlıkları da tendonda oluşturduğu enflamatuvar yanıt, kısıtlanmış vaskülarizasyon ve kolajen yıkımı gibi etkilerle rüptürlere zemin hazırlamaktadır [26].

Enflamasyon ve mikrohasarlarda kortikosteroid uygulaması, PRP enjeksiyonu, ultrason, skleroterapi, şok dalgası tedavisi ve fiziksel terapi tekniklerinden yararlanılırken, makrohasarlarda cerrahi yöntemlere ve ek tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [27]. Birçok tedavi yaklaşımına rağmen, tendonun zayıf damarlanma ağına sahip olması dolayısıyla iyileşme mekanizmasının sınırlı olması, uzun tedavi süreçleri, kısmi fonksiyon kayıpları ve yeniden hasar oluşması tedavileri yetersiz kılmaktadır. Bu yaklaşımların sonuç vermediği durumlarda ise oluşan rüptürlerin tedavisinde tendon uçlarının anastomozu veya tendonun kemiğe sabitlenmesi gibi cerrahi girişimler uygulanmaktadır. Fakat bu yöntem de yine aynı nedenlerden başarısız olabilmekte ya da dokuda performans kaybı, rüptürün tekrarlanması gibi sonuçlara yol açmaktadır. Hasar oluşan bölgede skar doku oluşumu ve fibröz peritendinöz yapışmalar tedavi sürecinde en önemli kısıtlayıcı faktörlerdendir. Çevre dokulardan fibroblast ve granüler dokunun migrasyonu tenosit hücrelerini baskılayarak fizyolojik boşluğu doldurmaktadır. Ayrıca, iyileşme fazında doku immobilize edildiği için mekanik yüklenme oluşmamakta ve zaten sayıca azalmış tenosit hücreleri kendi ECM yapılarını ve kolajen fiberlerini oluşturamamaktadır.

Klinikte büyük tendon kayıplarında birçok dezavantajına rağmen biyolojik doku iskeleleri kullanılabilir. Ototograft kullanımı sınırlı miktarda bulunma, morbidite ve laksiteye neden olma, zayıf doku integrasyonu ve donör alanda fonksiyon kaybı gibi riskler barındırmaktadır. Allograft ve zenograftlar ise doku reddi ve kontaminasyon gibi nedenlerden dolayı önerilmemektedir. Bu nedenle, tedavi kısıtlarının önüne geçmek amacıyla doku rejenerasyonunu indükleyecek uygun doku iskelelerinin geliştirilmesi ve hatta doku iskelelerinin hücre ve büyüme faktörleri ile fonksiyonelliği artırılarak tendon doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesi gerekmektedir [26].

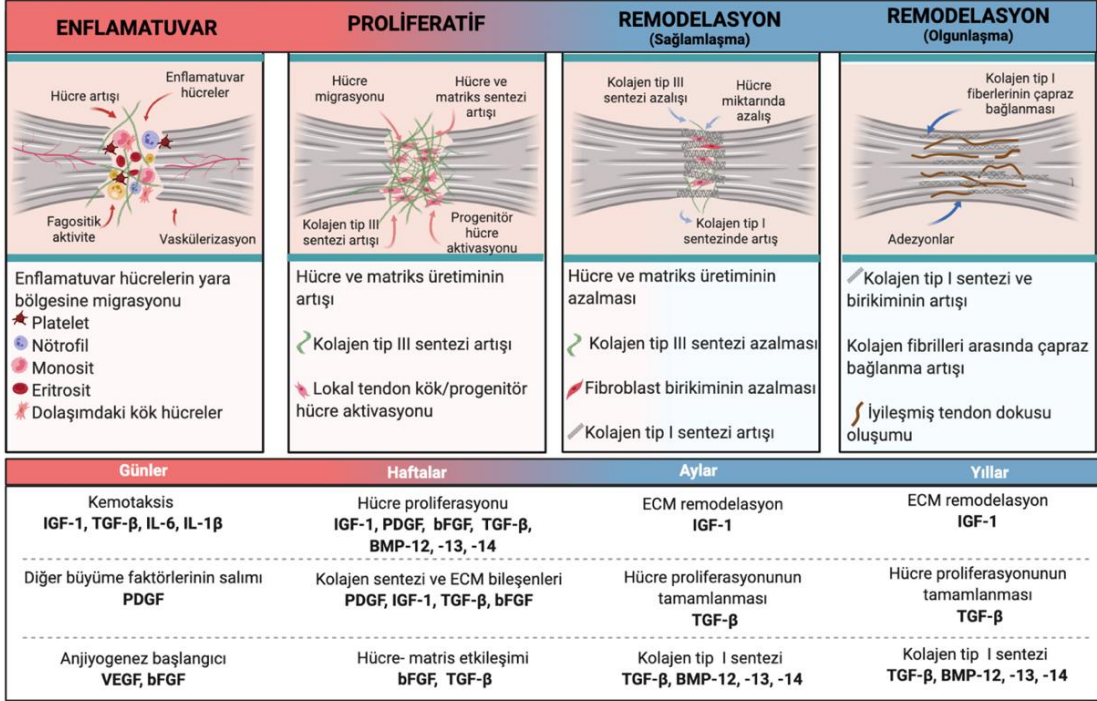
### **2.3. Tendon Rejenerasyonu**

Tendinopati sonucu gelişen tendon hasarlarında doğal tendon rejenerasyonu enflamatuvar, proliferatif ve remodelasyon olmak üzere 3 ana aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.3.). Enflamasyon aşaması; tendon hasarından hemen sonra başlamakta ve 3-7 gün arası sürmektedir.

Bu ilk fazda, hasarlı bölgede hematoma ve pıhtı oluşumuna bağlı olarak, fibroblast ve tenosit proliferasyonunu uyaran ve anjiyogenez sürecini başlatıp enflamatuvar yanıtı aracılık eden farklı kemotaktik faktörler serbest bırakılmaktadır. Kemotaktik faktörler sayesinde hasarlı bölgeye gelen enflamatuvar hücreler (makrofaj ve mast hücreleri) hücre artıkları ve yabancı cisimleri fagosite etmektedir. Aynı zamanda, kolajen tip III sentezi bu aşamada başlamaktadır.

İkinci aşama olan ve yaklaşık 3. veya 4. haftaya kadar süren proliferatif aşamada ise başta fibroblast ve kolajen tip III olmak üzere hücre içeriği ve ECM bileşenlerinin hasarlı bölgede düzensiz bir şekilde sentezinde ve birikiminde artış olmaktadır. Hasarlı bölgedeki yoğun fibroblast varlığı, proteoglikan ve kolajen tip III sentezinde artış ve çevre dokunun hasarlı bölgeye adezyonu ile istenmeyen yapışmalarla sonuçlanmaktadır. Bu aşamada dokuda su içeriği oldukça fazladır.

Son aşama olan remodelasyon ise sağlamlaşma (konsolidasyon) ve olgunlaşma (maturasyon) olmak üzere 2 kısma ayrılmaktadır. Sağlamlaşma periyodu sırasında, kolajen tip III ve glikozaminoglikan (GAG) sentezi azalmakta ve tenositlerle birlikte kolajen tip I fiberleri tendonun stres eksenine boyunca hizalanarak oluşan yükü destekleyebilir hale gelmektedir. Bu aşamada hücre proliferasyonu azalmakta fakat proliferatif fazda artan hücre miktarına bağlı olarak kolajen tip I sentezi artmaktadır. Yılları bulan olgunlaşma periyodu sırasında ise, hasar bölgesinde oluşan skar doku sağlıklı tendona daha çok benzeyen histolojik görünüm kazanmaya başlamıştır. Bununla birlikte, iyileşmiş tendonun düşük çapta ve daha az çapraz bağlanmış kolajen fiberlerine bağlı olarak biyomekanik özellikleri doğal tendon dokusuna göre daha zayıf olmakta ve bu durum tendonu tekrar yaralanmaya karşı daha duyarlı hale getirmektedir [5, 26].

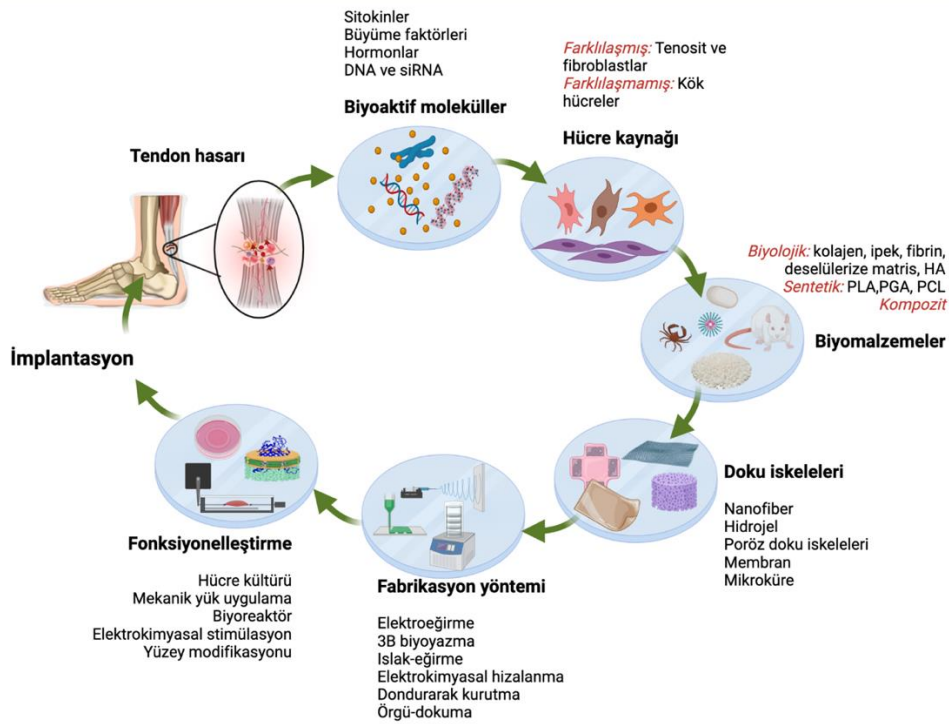


Şekil 2. 3. Tendon rejenerasyonunun farklı aşamalarında hasar bölgesinde meydana gelen moleküler, hüresel ve ECM yapıdaki değişiklikler.

#### 2.4. Tendon Doku Mühendisliği

Günümüzde, tendon hasarlarının tedavisi için kullanılan geleneksel yöntemler sağlıklı tendon dokusunun rejenerasyonunda tam olarak etkili olmamaktadır. Ayrıca, uygulanan tedavilerin çoğunda tekrar yaralanma, yırtılma ve kopma gibi başarısızlık ihtimali yüksektir. Bu nedenle, oluşan hasar sonrası tendonun doğal yapısını ve işlevselliğini kazandırabilecek tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu anlamda doku mühendisliği yaklaşımları bütünsel bir tedaviyi amaçlayarak umut sağlamaktadır. Doku mühendisliği, dokuları onarmak veya yenilemek için biyomateryaller, biyomühendislik ve hücre biyolojisi alanlarını birleştiren bir disiplindir. Tendon doku mühendisliği yaklaşımıyla, değiştirilecek veya iyileştirilecek dokunun tipi, konumu, yapısı, fizikokimyasal özellikleri, mevcut hücre tipleri, işlevleri ve moleküler bileşimi gibi birçok yönünün dikkate alınarak orijinal dokuya benzer özelliklere sahip, biyomimetik yapıların oluşturulması mümkün hale getirilmiştir [5].

Tendon doku mühendisliği temel olarak (i) orijinal tendona mümkün olduğunca yakın fizikokimyasal ve biyomekanik özelliklere sahip uygun bir doku iskelesinin oluşturulması, (ii) tendon hücreliliğini taklit etmek için farklı hücre tiplerinin (tenositler, fibroblast ve farklılaşmamış hücreler) kullanılması, (iii) doku iskelesi içinde tenositlerin hayatta kalmasına ve ECM sentezi yapabilmesine yardımcı olan bir ortam oluşturulması üzerine kurulmaktadır. Tendonun biyomekanik işlevini sürdürmeye yardımcı ve yeni oluşacak tendon doku için iskelet görevi gören yapılara, klinik tedavilerde kullanılan hücre ve biyoaktif moleküller entegre edilerek kontrollü ve hedef odaklı tedavi geliştirilmektedir. Ayrıca, kullanılan biyomalzemelere bağlı olarak fonksiyonel doku iskelesinin vücut içerisinde kalacağı biyobozunurluk süresi ve rezorbe edilen bozunma ürünlerinin toksik olmamasını gerektiren biyouyumluluk özellikleri ayarlanabilmektedir [28]. Hedeflenen dokunun özelliklerine uygun olacak şekilde işlevsel bir tendon greftinin oluşturulması prosesinde aşama aşama kullanılacak biyoaktif moleküllerin, hücrelerin ve biyomalzemelerin belirlenmesi, uygun fabrikasyon yönteminin seçilmesi ve doku iskelelerine fonksiyonellik kazandırılması Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.



Şekil 2. 4. Tendon doku mühendisliği yaklaşımının ve aşamalarda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.



### 2.4.1. Doku İskeleleri

Doku iskeleleri, doğal dokunun ECM yapısının şeklini ve işlevini taklit etmek ve yeni fonksiyonel doku oluşumuna katkıda bulunan hücrel etkileşimleri (yapışma, çoğalma ve farklılaşma) sağlamak üzere tasarlanmış ve üretilmiş 3 boyutlu (3B) yapılardır. Doku iskelelerinin, hücrelerin tutunmasına ve göç etmesine izin vermek, biyolojik aktiviteye sahip hücre ve molekülleri iletmek ve tutmak, besin ve atık ürünlerin difüzyonunu kolaylaştırmak ve mekanik ve/veya biyolojik olarak hücre davranışını değiştirmek gibi işlevleri bulunmaktadır [29]. Doku mühendisliği yaklaşımları için genel olarak ideal doku iskelesinin bazı gereksinimleri karşılaması gerekmektedir: (1) bozunma ürünlerinin toksik olmaması ve biyoyumlu olmak, (2) hücrelere ve biyoaktif moleküllere destek sağlayabilmek, (3) iyi yapısal ve boyutsal özelliklere sahip ve yüksek gözenekli olmak, (4) biyolojik aktiviteye sahip moleküllerin difüzyonunu kolaylaştırmak için uygun gözenek boyutuna sahip olmak, (5) immün yanıt oluşumunu en aza indirmek, (6) yeni doku oluşuma izin verecek sürede biyobozunurluk hızına sahip olmak ve görevini yerine getirdikten sonra cerrahi müdahale gerektirmeden rezorbe olabilmek, (7) klinik olarak kullanımı kolay olmak ve (8) ham madde ve fabrikasyon maliyetlerinin düşük olması. Tendon doku mühendisliği özelinde, en önemli kriterlerden biri olarak, doku iskelelerinin iyi mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Yüksek ve sürekli kuvvetlere maruz kalma, esneme ve biyobozunmaya bağlı olarak yeniden rüptür oluşumuna neden olmamak için mekanik dayanımı doğal dokuya yakın olmalıdır [30]. Tendon doku mühendisliğinde kullanılacak biyomalzemelerde istenen özellikler Şekil 2.5.'te özetlenmiştir.

Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler orijinlerine göre biyolojik, sentetik ve kompozit olarak 3'e ayrılmaktadır. Doğal biyomalzemeler hücreleştirilmiş doğal tendon matriksleri veya doğada bulunan malzemelerden izole edilen yapılardır ve genellikle toksik olmayan bozunma ürünlerine sahip olmaları, immünojenite oluşturmamaları ve hücre-matriks etkileşiminin fazla olması, doğal ECM yapısını taklit edebilmeleri açısından avantaj oluşturmaktadır. Bununla birlikte, elde edildikleri kaynakların sınırlı ve tekrar üretilebilirliklerinin sınırlı olması kullanımlarını kısıtlamaktadır [31].



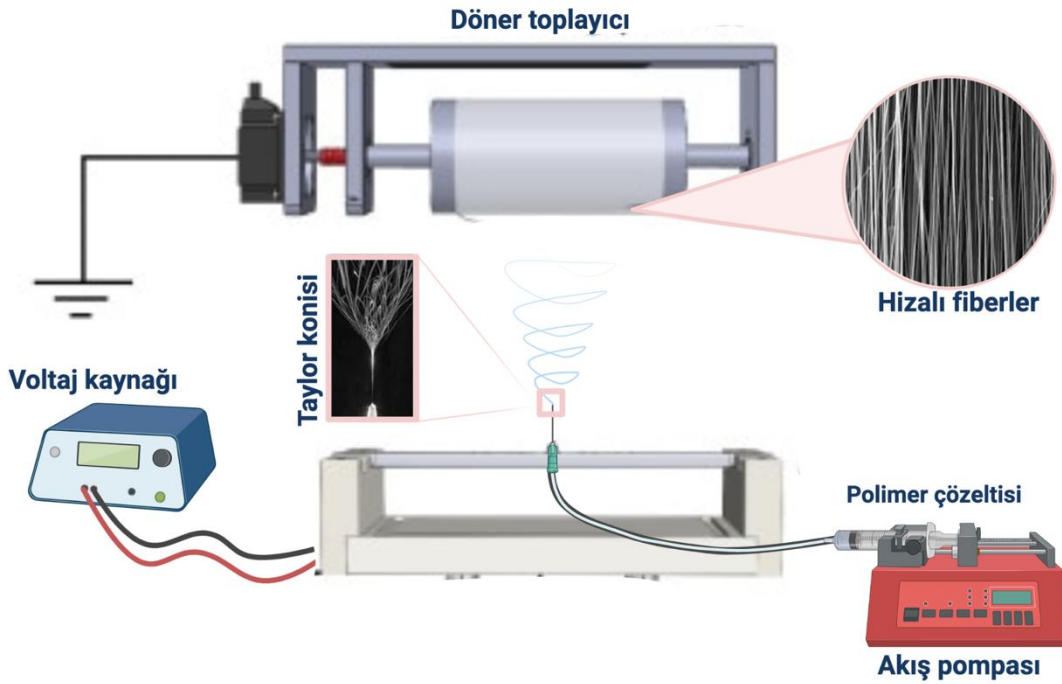
Şekil 2. 5. Tendon doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler.

Sentetik biyomalzemeler ise istenilen özelliklere göre tasarlanıp, sentezlenebilen polimerlerdir. Fabrikasyonu kolay, istenilen boyut ve şekillerde üretime imkan verme, rijit ve kararlı yapıda olma ve istenilen özelliklere (mekanik özellik, bozunma vb.) göre ayarlanabilir özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler. En büyük dezavantajları ise polimerlerin ya da bozunma ürünlerinin immün yanıt oluşturma riskidir [32]. Doğal ve sentetik biyomalzemelerin temel özellikleri Çizelge 2.1.'de özetlenmiştir. Kompozit biyomalzemeler ise sentetik ve doğal biyopolimerlerin birlikte kullanımı esasına dayanmaktadır. Böylece, her bir malzemenin de sunduğu avantajlar birleştirilip, doğal tendona benzer karmaşık yapıda doku iskeleleri geliştirilebilmektedir [33]. Kompozit doku iskelelerinin özellikleri kullanılan biyolojik ve sentetik biyomalzemelere göre değişmekte ve istenildiği şekilde ayarlanabilmektedir. Tendon doku mühendisliği çalışmalarında genellikle yüksek mekanik dayanıma sahip oldukları için sentetik, hücre tutunması, infiltrasyonu ve proliferasyonu içinse biyolojik malzemelerin kullanıldığı kompozitler tercih edilmektedir. Literatürde kolajen/PCL, metakrilatlanmış jelatin (GelMA)/PCL, SF/PLGA, kolajen/fibrin/PLGA vb. birçok malzemenin tendon doku mühendisliğinde kullanıldığı görülmektedir [32].

Çizelge 2. 1. Doku iskelelerinde kullanılan doğal ve sentetik biyomalzemelerin karakteristik özellikleri

<b>Özellikler</b>	<b>Doğal</b>	<b>Sentetik</b>	
<i>Ulaşılabilirlik</i>	Zor	Kolay	
<i>Yapı</i>	Homojen değil – istenen şeklin elde edilmesi zor	Ayarlanabilir ve homojen yapı	
<i>Mekanik özellikler</i>	Zayıf	İyi ve ayarlanabilir	
<i>Tekrar üretilebilirlik</i>	Zor	Kolay	
<i>İmmünojenite</i>	İmmün yanıtı neden olabilecek antijen içerebilirler	Doğal olmadıkları için immün yanıtı neden olabilirler	
<i>Biyoaktivite</i>	Yüksek hücre etkileşimi. Hücre tutunma ve proliferasyonunu artırma	Zayıf hücre etkileşimi	
<i>Biyoyumluluk</i>	Malzeme kaynağına göre değişkenlik	Zayıf. Reddedilme riski	
<i>Biyobozunurluk</i>	Yüksek. Hücrelerin kendi ECM'ini oluşturmaya izin verme	Zayıf. Normal hidrolize göre enzimatik hidrolize daha az duyarlı	
<i>Bozunma hızı</i>	Geniş aralık	Düşük bozunma hızı, modifikasyonlarla iyileştirme	
<i>Örnek</i>	<u>Proteinler</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolajen</li> <li>• Jelatin</li> <li>• İpek</li> <li>• Fibrinojen</li> </ul>	<u>Polisakkaritler</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agaroz</li> <li>• Aljinat</li> <li>• Selüloz</li> <li>• Kitosan</li> <li>• HA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poli(<math>\alpha</math>-hidroksi ester)</li> <li>• Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)</li> <li>• Poli(laktik asit) (PLA)</li> <li>• Poli(<math>\epsilon</math>-kaprolakton) (PCL)</li> <li>• Poliüretan</li> <li>• Poli(vinil alkol)</li> </ul>

Tendon doku iskelelerinin fabrikasyonunda, günümüze kadar farklı elektroğirme teknikleri, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi, süper kritik akışkan, ekstrüzyon ve dondurarak-kurutma gibi geleneksel tekniklerle de üretim yapılmıştır [32]. Son yıllarda 3B biyoyazma tekniğiyle daha kontrollü gözenek çapına ve geometrisine sahip tendon doku iskeleleri üretilebilmektedir [34, 35]. Günümüze kadar, doğal dokudaki morfoloji ve hizalı kolajen fibril yapısını taklit etmek amacıyla nano ve mikro boyutlarda değişen çapa sahip fiber yapılar elde etmeye imkan vermesi nedeniyle en çok **elektroğirme** tekniği kullanılmıştır. Elektroğirme tekniğinde temel olarak akış pompası yardımıyla iğne ucuna gönderilen polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulandığında iğne ucunda Taylor konisi adı verilen asılı bir damla oluşmaktadır. Taylor konisine etkiyen kuvvetlerden olan ve elektrik alan tarafından oluşan elektrostatik itme kuvveti yüzey gerilimini aştığında elektrik alan yönünde (toplayıcı) fiber jet oluşmaya başlamaktadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2. 6. Hizalı fibröz matrislerin eldesinde kullanılan tipik döner toplayıcı elektroğirme sistemi.

Elektroeğirme yönteminde polimere (konsantrasyon, iletkenlik, çözücü) ve prosese (akış hızı, voltaj, toplayıcı, iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe) ait parametreler değiştirilerek farklı boyutlarda, şekillerde ve geometride fiberler elde edilebilmektedir [36]. Hizalı olmayan fiber matrisler için düz bir toplayıcı kullanılırken, hizalı fiberler için döner toplayıcı ya da paralel bakır elektrotlar kullanılabilir. Böylece doğal tendon ECM'ini oluşturan kolajen fiber morfolojisini taklit edebilecek nano/mikro gözenekli, hizalı/hizasız, nano/mikro boyutta çapa sahip, geniş yüzey alanına sahip fiber matrisler üretilmektedir. Tendon doku mühendisliği uygulamalarında, hizalı fiberlerden oluşan matrisler [12, 32, 37], demet halinde hizalı fiberler [38], çok katmanlı fibröz matrisler [39] ve istiflenmiş/örülmüş fiber demetleri [40, 41] gibi birçok farklı şekillerde elektroegirme ile üretilmiş doku iskeleleri ile çalışılmıştır.

#### **2.4.1.1. İpek Fibroin (SF)**

Doğada ipek; ipek böceği ve örümcekler tarafından özel epitel hücreleri içinde sentezlenen doğal bir biyopolimerdir. En yaygın olarak *Bombyx mori* ipek böceğinden elde edilen fibroin lifleri yaklaşık 10-25 mm çapında ve molekül ağırlığı 26 kDa olan hafif ve 390 kDa olan ağır zincirlerin 1:1 oranında disülfid bağları ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bu proteinler hidrofilik polimer ailesinden olan serisin ile (20-310 kDa) örtülmüştür. İpek liflerinin yapısal proteini olan fibroini bir arada tutan serisin proteini yüksek alkali çözeltilerde çözünmekte ve ipek kozasının kütlesine %25-30'unu serisin oluşturmaktadır. İpek; fibroin ve serisinin yanında yağ, wax (mum) boya ve inorganik tuzlar gibi çeşitli artıklar da içermektedir. Fibroin proteini ise apolar hidrofobik ve polar hidrofilik alifatik hidrokarbon içeren aminoasitlerden oluşmaktadır. Hidrofilik kısımlar suda çözünmeyi ve fibroine esneklik ve tokluk kazandırmayı sağlarken; hidrofobik kısımlar ise moleküller arasında  $\beta$ -tabakaları oluşturur ve böylelikle polimerin çözünürlüğünü düşürüp sertlik kazandırır [42]. SF, yapısındaki alanin sekansları sayesinde yüzeyde pozitif yük oluşturarak hücrelerin tutunmasını sağlamaktadır. Bunun yanında ıslatılabilirlik sağlaması ve düşük toksisite oluşturması gibi özellikleri de yine kök hücrelerin tutunması için elverişli bir ortam oluşturmaktadır [43].

SF protein yapıda olduğundan enzimatik bozunmaya uğramaktadır. Bozunma derecesi ve hızı yapısal içeriğine, polimerin morfolojik yapısına (fiber, film vs.), üretim koşullarına ve biyolojik ortama bağlı olarak değişmektedir. Fiber şeklinde üretilmiş ipek doku iskeleleri ile yapılan enzimatik biyobozunma testlerinde bozunma davranışı mekanik dayanımda azalma şeklinde belirlenebilmiştir. Çalışmada kolajenaz enzimi kullanıldığında 17. günün sonunda mekanik dayanımın %24 azaldığı belirtilmiştir [44]. Bunun yanında yapılan başka bir çalışmada sıçan subkutan modelinde SF doku iskelelerinin implantasyondan 6 hafta sonra çekme dayanımının %55, elastik modülünün ise %16 azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca SF'in *in vivo* modellerde 4 hafta içinde yapının dağılmaya başladığı ve 24 hafta sonunda tamamen absorbe edildiği belirtilmiştir [45].

SF ya da SF kompozitleri ile doku mühendisliği alanında çok fazla çalışma yapılmış olup kemik, kırık, ligament-tendon, sinir ve vasküler dokularda doku eşleniği olarak kullanılmıştır. Bunun yanında mikrotaşyıcı ve partikül formunda ilaç salım sistemlerinde de çalışılmıştır. Tendon doku mühendisliği alanında ise, yine doku iskelesi materyali olarak kullanımı söz konusudur [46]. SF'in tendon doku mühendisliğinde tek başına kullanıldığı bir çalışmada bifazik SF doku iskeleleri liyofilizasyon yöntemiyle sünger formunda üretilmiştir ve hem formu hem de mekanik özellikleri açısından klinikte uygulanabilir durumda değildir. SF'in tek başına kullanıldığı bu çalışmalarda elastik modül değeri maksimum 1,322 kPa'dır ve araştırmacıların yayında belirttikleri üzere olması gereken değer 20-50 MPa aralığındadır [47]. Diğer bir çalışmada ise SF fiberler, PCL ya da P3HB polimerleri ile elektroçirme yöntemiyle nanofiber formunda kaplanmıştır. Bu çalışmada SF fiberlerinin mekanik özellikleri PCL ve P3HB gibi elastik modül değerleri yüksek, biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerle iyileştirilmeye çalışılmıştır [48]. Bu nedenle, ipek fibroinin yüksek mekanik dayanım gerektiren dokular için başka polimerlerle karıştırılarak kullanımı daha etkili bir sonuç almak için gereklidir. Aşil tendonundan elde edilen tendon kesitlerine yapılan mekanik analiz sonucunda, doğal tendon dokunun elastik modül ( $299\pm 41$  MPa), çekme dayanımı ( $35\pm 3$  MPa) ve kopma noktasındaki uzama değerleri ( $\%15\pm 3$ ) belirlenmiştir [49].

Elektroeğirme yöntemiyle üretilmiş SF nanofibröz matrislerin mekanik özelliklerinin incelendiği çalışmada ise elastik modül ( $270\pm 44$  MPa), çekme dayanımı ( $5\pm 1$  MPa) ve kopma noktasındaki uzama değeri ( $\%3\pm 1$ ) hesaplanmıştır [50]. SF'den elektroeğirme yöntemiyle üretilen doku iskeleleri doğal dokuya yakın benzerlik, biyoaktivite ve içsel bağlantılı yapısından dolayı tercih edilse de çekme dayanımı daha düşük kalmaktadır [6]. Doku mühendisliği araştırmalarında farklı ipek kaynaklarından elde edilen ipek fibroin yapıları farklı polimerle karışım halinde, farklı fabrikasyon yöntemleri veya kimyasal modifikasyonlar ile uygulamanın ihtiyacına yönelik olacak şekilde sıklıkla kullanılmıştır [51]. SF'in sıklıkla tercih edilmesi biyouyumluluğu, biyobozunurluğu, mekanik özellikleri, moleküler karakteristiği, fonksiyonelliği ve en önemlisi bu parametrelerin kolaylıkla kontrol edilebilir, amaca uygun hale getirilebilir oluşundan kaynaklanmaktadır. SF'in çekme dayanımı, kopma noktasında uzama ve tokluk gibi özellikler bakımından tendon doku mühendisliğinde tek başına kullanımı yetersizdir, ancak başka polimerlerle kolaylıkla karışım oluşturulabildiğinden tercih edilmektedir.

#### **2.4.1.2. Poli(3-hidroksi bütirat) (P3HB)**

P3HB, poli(hidroksi alkonat) (PHA) ailesinden bir polimerdir. PHA'lar biyobozunur ve biyouyumlu doğal polimerler olup yüksek konsantrasyonda azot ve düşük konsantrasyonda glikoz içeren besi ortamlarında kültüre edilen farklı mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir ve doku mühendisliği alanında farklı türleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde genelde, poli 3-hidroksibütirat (P3HB), 3-hidroksibütirat ve 3-hidroksivalerat kopolimeri (PHBV), poli 4-hidroksibütirat (P4HB), 3-hidroksibütirat ve 3-hidroksihekzonoat kopolimeri (PHBHHx) ve 3-hidroksioktanoat (PHO) türevleri kullanılmaktadır. Günümüzde 100'den fazla çeşidi bulunan PHA'ların farklı yapılara sahip olmaları mekanik özellikleri ve bozunma kinetiklerini de etkilemektedir. Ayrıca genel olarak yüksek kristaliniteye ve düşük erime noktasına sahip bu termoplastik polimer ailesinin en bilinen üyesi P3HB'dir. P3HB'nin erime sıcaklığı  $179^{\circ}\text{C}$  civarında olup molekül ağırlığı yaklaşık olarak 300 kDa'dur [8].

P3HB'nin bozunma ürünleri hücre metabolizması tarafından da üretilmektedir. P3HB, kanda ve dokularda da bulunmaktadır. Monomeri olan 3HB insan kanında keton formunda bulunan ve genelde dimer ya da trimer olarak var olan bir yapıdır. Bozunma ürünlerinin kanda 20 mg/L'den düşük tutulabilmesi için genellikle polimerin zincir uzunluğu artırılmaktadır [52]. Bu nedenle, P3HB'nin bozunma ürünleri toksik değildir ve biyouyumlu bir polimerdir. Vücut tarafından rezorbe edilebilen gastrointestinal yama çalışmasıyla ilgili olarak P3HB'nin *in vivo* ve *in vitro* ortamda bozunurluğu incelenmiş ve P3HB'nin 37°C tampon çözeltisinde 180 gün süreyle bozunmaya uğramadığı fakat molekül ağırlığının düştüğü tespit edilmiştir. Bunun yanında *in vivo* sıçan çalışmalarında ise 6 ay sonunda deneklerin %25'inde kalıntılara rastlanmıştır. Ayrıca sentetik P3HB'nin doğal P3HB'e göre daha hızlı bozunduğu ve plastikleştirici ajanlarla bu sürenin kısaltılabildiği vurgulanmıştır [53]. P3HB'nin mekanik dayanımı hidroksivalerat ya da hidroksihekzonoat içeren diğer PHA üyelerine nazaran daha yüksektir fakat uzama noktasında kopma yüzdesi daha düşüktür. Ancak P3HB'nin yüksek hidrofobitesinden dolayı düşük hücre afinitesi göstermesi ve fonksiyonel gruplarının az oluşundan dolayı biyomoleküllerle kovalent bağ yapamaması gibi bir durum söz konusudur. Bu dezavantajın önüne geçmek ve P3HB'nin fonksiyonelliğini artırmak için çeşitli yüzey modifikasyonları veya polimer karışımları denenmektedir. Literatürde yüzeye C<sup>+</sup> iyon implantasyonu ya da jelatin, hiyalüronik asit, kolajen, fibronektin ve laminin immobilizasyonu yapılan çalışmalar mevcuttur. Ayrıca P3HB'nin hidroksiapatit (HAp), PLA ve PGA asit formları gibi poliestерler, kolajen, SF, kitosan, polietilen glikol (PEG) gibi çeşitli polimerlerle kombinasyonu da farklı çalışmalarda denenmiştir [8, 54, 55].

P3HB ve diğer PHA üyeleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde tendon özelinde ilk çalışma Webb ve ark. tarafından 2013 yılında yapılmış olup çalışmada çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile PHBHHx tüpler oluşturulmuş ve tüplerin içi kolajen jel ile doldurularak sonrasında bu yapıların etkinliği sıçan Aşil tendon onarım modelinde *in vivo* incelenmiştir. Kırk günlük çalışmanın sonunda PHBHHx malzemelerde bozunmaya bağlı olarak molekül ağırlığı, polidispersite indeksi, çekme dayanımı ve elastik modül değerlerinde azalma gözlenmiş olup sıçan tenositlerini de içeren grupta histolojik boyamalara göre remodelasyon ve hücre hizalanması kaydedilmiştir [56].



Chen ve ark. yaptığı çalışmada ise P3HB nanofiberlerden oluşan boru şeklinde yapılar tek başına, dopamin ile, dopamin+kitosan ve dopamin+kitosan+PRP ile kaplanarak tavşan tenositleri ile kültüre edilmiş ve *in vivo* tavşan modelinde tendon kılıfı olarak kullanılmıştır. Hücre adezyonu ve proliferasyonu tüm gruplarda iyi sonuç verirken, ECM ve kolajen tip I gen ekspresyonlarına göre en iyi grubun PRP içeren grup olduğu belirtilmiştir [57]. Bunun yanında ticari olarak BIOFIBER™ adında kolajen tip I ile kaplı P4HB nanofibröz membran da tendon yaması olarak kullanılmaktadır [58].

#### **2.4.1.3. Poli(bütülen adipat-ko-tereftalat) (PBAT)**

PBAT; alifatik-aromatik kopoliester olup bütülen tereftalat (aromatik kısım) ve bütülen adipat (alifatik kısım) zincirlerinden oluşmakta ve BASF firması tarafından Ecoflex® ticari adıyla üretilmektedir [59]. Doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan alifatik poliesterler, yeterli mekanik ve termal özelliklere sahip değildir. Aromatik poliesterler ise, istenen fiziksel özellikleri sağlamasına rağmen biyobozunur olmadıkları için doku mühendisliğinde kullanılamamaktadır. Alifatik-aromatik kopoliesterler ise içerdikleri alifatik birimler sayesinde biyobozunur olmakla birlikte, aromatik birimler sayesinde istenen mekanik ve termal özelliklere sahiptir. Bunun yanında PBAT, yapısındaki aromatik teraftalat ile tendon rejenerasyonuna izin verecek sürede bir bozunma hızına ve yapısındaki alifatik bütülen adipat sayesinde de hücre tutunmasına ve çoğalmasına izin verecek bir kimyasal bileşime sahiptir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda PBAT'ın biyouyumlu (hücre infiltrasyonu ve proliferasyonunu sağlama), biyobozunur (hidrolitik koşullarda yüzey erozyonu şeklinde), antibakteriyel ve iyi mekanik (elastisite, aşınma ve kırılmaya olan direnç) özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir [9, 59, 60]. Bunun yanında PBAT, kompost ortamında 22 günde %99.9 bozunma göstermektedir [61]. Fakat PBAT fiberlerin hidrolitik bozunmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada, 12 hafta sonunda %1 kütle kaybı belirlenmiştir [62]. Başka bir çalışmada ise, PBAT nanofibröz matrislerin lipaz enzimi içeren ortamda 5 hafta sonunda %10 kütle kaybına uğradığı bulunmuştur [59].

Bunun yanında örümlü yapıdaki PBAT fiberlerle yapılan 2 haftalık hücre kültür çalışmasında PBAT'ın yüzey degradasyonuna uğradığı ve bozunma ürünlerinin toksik etki göstermediği belirtilmiştir [63]. PBAT ambalaj üretiminde ve tarım uygulamalarında kullanılmak üzere sentezlenmiş nispeten yeni bir kopolimer olup [64, 65], 2015 yılından itibaren kemik doku mühendisliği çalışmalarında da etkinliği incelenmiştir [9, 59, 60]. Henüz tendon doku mühendisliği uygulamalarında hiç çalışılmamış olan PBAT polimerinden elektroçizme yöntemi kullanılarak nano boyutta fiberler üretilebilmektedir [9]. Nanofiber matrikslerin mekanik analizi sonucunda PBAT'ın elastik modül ( $55\pm 2$  MPa), çekme dayanımı ( $22\pm 3$  MPa) ve kopma noktasındaki uzama değerleri ( $544\pm 113$ ) belirlenmiştir [66].

#### 2.4.2. Hücreler

Tendon dokuda bulunan hücrelerin öncelikli görevi ECM sentezi ve dokudaki fizyolojik süreçleri etkileyen biyoaktif molekül sentezidir. Bunun yanında, tendonların sınırlı rejenerasyon kapasitesi düşük hücre içeriği ve avasküler bir yapı olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, hasarlı bölgede hücre infiltrasyonunun gerçekleşebilmesi tendon rejenerasyonu çalışmalarında önemli yer teşkil etmektedir ve doku iskeleleri aracılığıyla hücre infiltrasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Tendon doku mühendisliği uygulamalarında günümüze kadar farklılaşmış (tenosit, dermal fibroblast (DF)) ve farklılaşmamış progenitor/kök hücrelerin (indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC), MSC, AdMSC, BMMSC, tendon kökenli mezenkimal kök hücre (TdMSC)) rejenerasyon üzerine etkisi incelenmiştir [5]. MSC'ler kendi kendini yenileme, tendon dahil olmak üzere birçok dokuya farklılaşma yetenekleri, salgıladıkları parakrin faktörlerle immün yanıt oluşumunu düzenlemeleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Kemik iliği, adipoz doku veya tendon dokudan izole edilebilen MSC'lerin tendon doku mühendisliğinde en sık kullanılanı BMMSC'ler olmuştur. Fakat, AdMSC'lerle karşılaştırıldığında BMMSC izolasyonu hem invaziv hem de daha az hücre sayısına ulaşılabildiğinden verimli bir yöntem olmamaktadır [67-69]. Bununla birlikte *in vitro* ve fareler üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada tenojenik farklılaşma açısından BMMSC'lerin daha yüksek bir kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir [70].

Diğer bir hücre tipi olan tendon kök/progenitör hücreleri (TdMSC) ise oldukça heterojendir ve genellikle patellar (diz) tendondan izole edilmektedir. BMSC'lerle karşılaştırıldığında, TdMSC'ler yüksek seviyede tendonla ilgili belirteçlere (skleraksis (Scx), tenomodulin (Tnmd) ve Tnc), klonojenesiteye ve proliferasyon yeteneğine sahiptir [71]. Bununla birlikte tendon dokuda az miktarda bulunmaları, uygun doku kaynağının bulunma zorluğu ve izolasyon bölgesinde morbiditeye neden olmaları dezavantaj oluşturmaktadır. Bunun yanında başka bir kök hücre kaynağı olarak tendon doku mühendisliği çalışmalarında C3H10T1/2 murin MSC hattı ile de çalışılmıştır [72, 73].

Tenositler, ECM bileşenlerinin sentezinden ve homeostazından sorumlu olan, dokuda yerleşik, terminal olarak farklılaşmış hücrelerdir. Otolog hücre ve iyileşmeden esas sorumlu hücre tipi gibi avantajlara sahip olan tenositlerin, sınırlı çoğalma kapasiteleri, izolasyonlarının morbiditeye neden olması, sayıca az izole edilmeleri ve kültür sırasında de-diferensiasyona uğrayabilmeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır [74, 75]. Tenosit kullanımıyla ilgili sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, izolasyon ve kültürasyonları kolay olan DF'ler alternatif bir hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Fakat DF'lerin, tendon rejenerasyon çalışmalarında skar doku oluşumuna neden olabilmeleri ve kültürasyonları sonucunda malzemede yeterli mekanik dayanımı oluşturmamaları nedeniyle kullanımları sınırlı kalmaktadır [76].

#### **2.4.2.1. Adipoz kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (AdMSC)**

Doku rejenerasyonunda sıklıkla tercih edilen MSC'ler kemik, kas, tendon, ligament ve adipoz gibi dokulara farklılaşabilen, doku rejenerasyonunda görev alan ve immün yanıt oluşumunu baskılayan hematopoetik olmayan stromal kök hücrelerdir ve kemik iliğinde yağ dokuya kıyasla oldukça az miktarlarda bulunmaktadır. Kültürasyonlarında, ölümsüz olmamalarına rağmen büyüme ve çeşitli dokulara farklılaşma potansiyellerini koruyarak sayılarını hızlıca artırmaktadırlar [10]. Bu hücreler günümüze kadar birçok farklı hasarlı dokuya implante edilmiş ve doku onarımını hızlandırdığı kesinleşmiştir. Fakat BMSC'lerin izolasyonu invazivdir ve donörlerin %30'unda komplikasyonlar görülebilmektedir.

AdMSC'ler ise BMMSC'ler gibi birçok farklı dokuya farklılaşabilmekte, insanlarda ve hayvanlarda çok miktarda bulunmakta ve morbidite oluşturmadan kolaylıkla izole edilebilmektedir. AdMSC'lerin de uygun koşullarda tendon dokusuna farklılaşabildiği gösterilmiştir [77]. Literatürde AdMSC'lerin tendon rejenerasyonunda kullanımıyla ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada PLGA nanofibröz matrikslere sıçan AdMSC'leri ekilmiş ve ekimin ikinci gününden itibaren bazal ortama büyüme farklılaşma faktörü-5 (GDF-5) ilavesiyle hücrelerin farklılaşması takip edilmiştir. GDF-5 uygulamasının hücre çoğalması üzerine spesifik bir etkisi olmasa da iki haftalık kültür sonunda kolajen tip I gen ekspresyonunda GDF-5 içermeyen gruba göre 4 kat, Scx ekspresyonunda 3 kat artış gözlemlenmiştir. Tnmd gen ekspresyonunun ise GDF-5 konsantrasyonundan etkilendiği ve kültürün 14. gününde 7. gün sonuçlarına göre azaldığı belirlenmiştir [78]. Kullanılacak hücre çeşidinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise deselülerize tavşan fleksör tendonları farklı hücre tipleri ile hücrelendirilerek tavşan fleksör tendon defekt modelinde çalışılmıştır. Tavşanlardan izole edilen epitenon tenosit, tendon kılıf fibroblast, BMMSC ve AdMSC'ler deselülerize doku iskelelerine ekilerek tavşanlara implante edilmiştir. Hematoksilen & eosin boyama sonuçlarına göre hücreler arası belirgin fark bulunmamış, fakat hücre çoğalmasının en çok AdMSC kültüründe olduğu belirtilmiştir. Epitenon tenosit, tendon kılıf fibroblastları ve BMMSC'lerin izolasyon protokollerini de düşününce adipoz dokunun tendon rejenerasyonunda etkili bir şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir [75]. Son yıllarda tendon doku mühendisliği alanında AdMSC'lerin kullanımı ile yapılan çalışmalar Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. 2. Tendon doku mühendisliğinde AdMSC'ler ile yapılan çalışmalar.

Hücre kaynağı	Biyomalzeme	Fabrikasyon	Kültür koşulları	Çalışma	Yazar - Yıl
<i>in vitro</i> Sıçan	PPDO ve SF	Elektroeğirme – dalgalı ve hizalı nanofiberler	Dinamik	SF katkılama etkisi	Wu ve ark. – 2021 [79]
İnsan	PCL ve jelatin	Çift fazlı elektroeğirme – hizalı nanofiberler	Statik	GDF-5 konsantrasyonu etkisi	Güner ve ark. – 2020 [80]
İnsan	PLGA – Kolajen - fibrin	3B yazıcı	Statik	Doku iskelesi katmanlarının etkisi	Jiang ve ark. – 2020 [35]
Mikro-domuz	-	-	Statik	Hipoksinin eksozomlar üzerine etkisi	Thankam ve ark. – 2020 [81]
İnsan	Timosin $\beta$ -4 yüklü PLGA/PLA	Elektroeğirme – hizalı mikro ve nanofiberler	Statik	Timosin $\beta$ -4 ve fiber çapının etkisi	Wu ve ark. – 2020 [82]
At	Süperfisial dijital fleksör tendon	Deselülerizasyon	Statik	TGF $\beta$ -3 yüklenme metodunun etkisi	Roth ve ark. – 2019 [83]
İnsan	PCL ve jelatin	Islak elektroeğirme – hizalı mikrofiberler	Statik	Tendon kemik arayüzü için HAp katkısının etkisi	Calejo ve ark. – 2019 [84]
At	Süperfisial dijital fleksör tendon	Deselülerizasyon	Dinamik	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ve lökosit içeren ortamın rejenerasyona etkisi	Brandt ve ark. – 2018 [85]

Çizelge 2. 2. Devam.

	Hücre kaynağı	Biyomalzeme	Fabrikasyon	Kültür koşulları	Çalışma	Yazar - Yıl
<i>in vitro</i>	İnsan	PLA	Santrifüjlü eriyik eletroeğirme – hizalı nanofiberler	Statik	HUVEC ile ko-kültürün etkisi	Wu ve ark. – 2017 [86]
	İnsan	SF	Çözücü döküm parçacık uzaklaştırma- bifazik yapılar	Statik	TGFβ-2 ve/veya GDF-5 büyüme faktörlerinin etkisi	Font ve ark. – 2018 - [87]
	İnsan	Kolajen	Çözücü döküm-biaksial sıkıştırma-parçacık uzaklaştırma – yoğun anizotropik jel	Statik	Fabrikasyon metodu geliştirilmesi	Zitnay ve ark. – 2018 [88]
	İnsan	PCL	Elektroeğirme - mikrofiber	Statik	Deselülerize tendon ECM'inin rejenerasyona etkisi	Yang ve ark. – 2017 [89]
<i>in vivo</i>	Sıçan	İnce bağırsak submukoza	Deselülerizasyon	Statik	Hipoksi etkisi	Guo ve ark. – 2021 [90]
	İnsan	PLA/PGA	Elektroeğirme	Statik	Adipoz kökenli mikrovasküler endotel hücreleriyle ko-kültürün vaskülerizasyona etkisi	Freiman ve ark. – 2018 [91]

### 2.4.3. Büyüme Faktörleri

Doku yenilenmesini sağlamak için anahtar bileşenlerden olan biyoaktif moleküller (anjijojenik faktörler, büyüme faktörleri, sitokinler, deoksiribonükleik asit (DNA), susturucu ribonükleik asit (RNA) ve hormonlar), organizma, doku ya da hücreler üzerinde etki oluşturmak için hücreler tarafından sentezlenen ve salgılanan bileşikler veya moleküllerdir [92]. Tendon doku mühendisliğinde biyoaktif moleküller, tenositlere farklılaşma, vaskülarizasyonu ya da ECM sentezi artırmak için hücrelerle etkileşime girip, hücre aktivitesini modüle etmek gibi işlevlere sahiptirler [31]. Bu kapsamda biyoaktif moleküller doku iskelelerine fabrikasyon esnasında katılabilmekte, partiküller aracılığıyla kontrollü salımı gerçekleştirilebilmekte veya doğrudan besi ortamına eklenebilmektedir [92]. Ayrıca son yıllarda, tendon rejenarasyonunu daha iyi taklit edebilmek amacıyla rejenerasyonun farklı aşamalarında etkin olan birkaç büyüme faktörü 'kokteyl' şeklinde aynı anda kullanılmaktadır [93].

Günümüze kadar tendon doku mühendisliğinde platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) -1, kemik morfojenik proteini (BMP) -7, BMP-12, BMP-13, BMP-14, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), interlökin (IL) -6, fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme büyüme faktörü (TGF) - $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 3 büyüme faktörlerinin etkinliği incelenmiştir [31]. TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, -2 ve -3 izoformları) tendon iyileşmesinin tüm aşamalarında, enflamatuvar hücre göçünü, fibroblastların ve yaralanma bölgesindeki diğer hücrelerin proliferasyonunu, kolajen ve ECM üretimini uyararak müdahale etmektedir. Tendon hasarından sonra TGF- $\beta$  salımının, skar doku ve adeziv fibröz doku oluşumu ile ilişkili olduğu ve TGF- $\beta$ 1 sinyal yolağının baskılanmasının sıçan modelinde tendon iyileşmesini arttırdığı bildirilmiştir [94]. Bunun yanında, TGF- $\beta$ 3'ün skarlaşma ve adezyon oluşumunun negatif düzenleyicisi olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Fakat TGF- $\beta$ 'nin üç izoformu, tendon rejenerasyonu boyunca farklı aşamalarda eksprese edilmekte ve bu nedenle daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır [95]. PDGF, tenosit proliferasyonunu, kolajen üretimini ve ECM'in yeniden şekillenmesini sağlamaktadır.

Yapılan bir çalışmada, sıçan patellar tendonlarına PDGF uygulaması sonrası mekanik özelliklerin arttığı ve etkin bir remodelasyon sağlandığı belirtilmiştir. Buna ek olarak, IGF-1 ve PDGF-BB yüklü hizalı kolajen-GAG doku iskelelerinde doza bağlı olarak tenosit proliferasyonu ve metabolik aktivitenin arttığı gösterilmiştir [96]. AdMSC hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada ise PDGF büyüme faktörü içeren grupta, hücre proliferasyonunda ve Scx ile Tnc ekspresyonunda artış kaydedilmiştir [97].

IGF-1 ile yapılan çalışmalar incelendiğinde at superfisial dijital fleksör tendon matrikslerle yapılan bir araştırmada IGF-1'in proliferasyonu, kolajen ve GAG sentezini artırdığı belirtilmiştir [98]. Aynı zamanda at BMMSC ve TdMSC'lerle yapılan başka bir çalışmada aynı etkiler görülmüştür [99]. IGF-1 ve FGF-2 büyüme faktörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise FGF-2 varlığında kolajen tip III sentezinde belirgin bir artış sağlanırken, IGF-1 varlığında hem kolajen tip I hem de tip III sentezi artmıştır [100]. FGF büyüme faktörleri de tendon doku mühendisliğinde sıkça çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmaya göre FGF yüklü hizalı fibröz PLGA doku iskeleleri sıçan rotator cuff (omuz manşet tendonu) modelinde 8 hafta sonunda iyileştirilmiş kolajen organizasyonunun, çekme dayanımının ve sertliğin artmasını sağlamıştır [101]. Bunun yanında, tek başına ya da PDGF-BB/IGF-1 ile kombine olarak kullanıldığında hücre proliferasyonunu artırdığı bildirilmiştir [102, 103].

#### **2.4.3.1. Büyüme/farklılaşma Faktörü (GDF)**

Tendon doku mühendisliğinde sıklıkla BMP'ler ile çalışılmış ve tendon rejenerasyonundaki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. TGF- $\beta$  süper ailesinin üyesi olan BMP'ler genel olarak kemotaksis, proliferasyon, matriks sentezi ve hücre farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [104]. Tendon doku mühendisliğinde ise BMP-12, BMP-13 ve BMP-14 (sırasıyla GDF-7, GDF-6 ve GDF-5 olarak bilinmektedir) büyüme faktörleri kullanılmaktadır. BMP'ler tendon rejenerasyonunun erken aşamalarında çokça eksprese olurken, zamanla kademeli olarak sentezleri azalmaktadır [104].



GDF-7 büyüme faktörünün kullanıldığı bir çalışmada, at BMMSC'lerinin Tnmd ve dekorin gibi tendonla ilişkili gen ekspresyonlarında artış görülürken aynı zamanda alkalen fosfataz ve von Kossa boyamalarında da osteojenik belirteçlerin eksprese edildiği gösterilmiştir [105]. At, köpek ve sıçan BMMSC ve AdMSC'leri üzerinde GDF-7 büyüme faktörünün etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise tendon belirteçleri olan Scx, Tnmd, Tnc, dekorin ve kolajen tip I ekspresyonunda artış belirlenmiştir [106]. GDF-6 büyüme faktörüyle yapılan çok fazla çalışma olmasa da BMMSC'ler üzerindeki teno-indüktif etkileri incelenmiştir. Deselülerize tendon matrikslerinin kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada GDF-6'nın BMMSC'lerde hem tenojenik farklılaşmayı indüklediği hem de mekanik özelliklerde iyileşme sağladığı ortaya konmuştur [107]. Bunun yanında, askorbik asitin GDF-7 ve GDF-6 büyüme faktörleriyle birlikte eklendiği kültür ortamında ve hipoksik koşullar altındaki insan embriyonik kök hücrelerinin tendon-benzeri matriks birikiminde, iğsi hücre morfolojisinde ve tenojenik gen belirteçlerinde artış gözlenmiştir [104].

GDF-5 büyüme faktörünün farklı kök hücre kaynakları üzerinde denendiği çokça çalışma bulunmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda GDF-5 ile muamele edilen sıçan AdMSC'lerinde ise özellikle 100 ng/mL konsantrasyonda hücre proliferasyonu ve Scx, Tnmd, Tnc ve kolajen tip I gibi tendon gen belirteçlerinde artış belirlenmiştir [77]. Yapılan bir çalışmada ise, kolajen doku iskeleleri üzerine ekilen sığır AdMSC'leri üzerinde hipoksik ve normoksik koşullar, GDF-5, GDF-6 ve GDF-7 büyüme faktörleri ve aynı zamanda mekanik stres uygulamasının etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçları GDF-5 büyüme faktörü, normoksik koşullar ve mekanik stres uygulamasının bir arada kullanıldığı durumda hücre morfolojisi ve tendon gen belirteç ekspresyonlarının optimum değerlerde olduğunu göstermiştir [108]. Günümüze kadar GDF-5, -6 ve -7 büyüme faktörlerinin farklı kaynaktan alınan MSC'ler üzerine etkisi çalışılmış olsa da potansiyel klinik etkisinin daha fazla *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

#### 2.4.4. Biyoreaktörler

Tendon gelişimi, homeostazı ve rejenerasyonu temel olarak tendon hücrelerinin dışarıdan uygulanan kuvvetlere verdiği biyolojik yanıt ile ilişkilidir. Hücreler uygulanan kuvvetin büyüklüğü, frekansı, yönü ve süresi gibi mekanik uyarılara karşı oldukça hassastır ve mekanik uyarım, hücrelerin katabolik ve/veya anabolik yollarla ECM organizasyonunu değiştirmesine neden olmaktadır [109]. Biyoreaktörler, hücrelerin tendon oluşumunda proliferasyon, farklılaşma, matriks üretimi gibi *in vivo* koşullarda deneyimleyeceği faktörleri *in vitro* koşullarda sağlayan ve kültür ortamını taklit eden yapılardır [41]. Temel olarak tendon biyoreaktörleri aktüator (uyarıcı motor) ve kültür haznesinden oluşmaktadır. Bunun yanında ek olarak bilgisayar ve sensörler ile sistemin kontrol edilebildiği ek mekanizmalar da bulunmaktadır. Biyoreaktörlerde mekanik uyarım, direkt olarak tek yönlü çekme hareketi ile ya da manyetik alan, şok dalgaları gibi indirekt yollarla yapılabilmektedir [110]. Ticari olarak TA Instruments® (A.B.D.), Flexcell® (A.B.D.), CellScale® (Kanada), EBERS® (İspanya), BISS® (Hindistan) ve STREX® (Japonya) gibi firmalardan temin edilebilen biyoreaktörlerin hem 2B hem de 3B yapılar için tek ve çift yönlü çekmeye izin veren hatta test cihazı olarak da işlev gören modelleri bulunmaktadır. Her ne kadar iyi tasarlanmış olsalar da kolay ve hızlı örnek yerleşimi, çok sayıda kültür haznesi içermesi ve kültür haznesi için gerekli kültür ortamı miktarı dikkate alındığında araştırmacılar basit bileşenlere sahip özelleştirilebilir mekanik uyarım biyoreaktörlerini kendileri üretmeyi tercih etmektedirler. Ticari ve özel üretim mekanik uyarım biyoreaktörleriyle yapılan çalışmalar Çizelge 2.3.'te özetlenmiştir.

Statik kültür ile belirli bir gerinim uygulanan dinamik kültür koşullarının incelendiği çalışmalarda tendon dokudaki gibi daha iğsi ve uzamış hücre morfolojisinin elde edildiği ve proliferasyonun 9 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir [111]. Bunun yanında 4 haftalık statik kültür koşullarında tenositlerin iğsi morfolojilerinden uzaklaşıp küresel morfolojiye ve kolajen fiberlerin ise krimp hale geçtiği belirlenmiştir. Uygulanan mekanik yük sonrası çekme hattı boyunca hizalı organizasyona sahip kolajen sentezi artmakta, hücreler kolajenaz aktivitesinden korunmakta ve ECM'de bulunan proteoglikanların (dekorin, biglikan, fibromodulin, fibronektin) sentezinde artış görülmektedir [112].

Ayrıca kolajen fiberlerin çekme yönü boyunca hizalanmaları elastik modül, çekme dayanımı ve maksimum yük gibi mekanik özelliklerini de iyileştirmektedir [113]. Periyodik gerinime maruz bırakılan hücrelerde tenojenik belirteç gen ekspresyonlarında da artış gözlenmektedir. Tendonun ana proteini olan kolajen tip I ekspresyonu statik kültüre göre dinamik koşullarda 2 haftalık kültür süresince 3 kat artış göstermiştir [114]. Ayrıca, farklılaşmadan sorumlu tendon-spesifik transkripsiyon faktörlerinden olan Scx'in mekanik uyarım ile ekspresyonunun arttığı ve uyarımın kesilmesi ile tersinir şekilde azaldığı bildirilmiştir [115]. Başka bir çalışmada ise 1 günlük mekanik uyarımda (%2 gerinim, 1 Hz) sığır AdMSC'lerinde kolajen tip III, Tnc, Scx ve dekorin gen ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir [116]. Xu ve ark.'nın yaptığı bir çalışma ise farklı gerinim (%2 – %4 – %8) ve farklı frekansların (0.3 Hz – 0.5 Hz – 1.0 Hz) TdMSC'lerin farklılaşma ve proliferasyonunda farklı etkilere yol açtığı, kolajen tip I, Tnc, Tnmd ve Scx ekspresyonlarının en fazla 0.5 Hz frekans ve % 4 gerinimde arttığı bulunmuştur [117]. Ayrıca, sürekli mekanik uyarım uygulanması tendon çapını etkilemekte ve hücre proliferasyonunu inhibe edip, apoptozu artırmaktadır [118].

Sonuç olarak, literatür çalışmaları incelendiğinde optimum mekanik uyarım parametrelerinde karar kılınmadığı ve tendon benzeri yapıların geliştirilmesi için uygulanan yük, frekans ve gerinimin doku iskelesinin mekanik özellikleriyle doğrudan ilişkili olduğu ve doku iskelesinin mekanik özellikleri doğrultusunda biyoreaktör seçimi ve çalışma koşullarının belirlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 2. 3. Tendon rejenerasyonunda mekanik uyarım biyoreaktörleri ile yapılan çalışmalar.

Reaktör - Üretici	Çalışma Parametreleri			Doku iskelesi	Hücre	Yazar-Yıl
	Gerinim (%)	Frekans (Hz)	Çalışma süresi			
FX-4000T (Flexcell Int. Corp., A.B.D.)	10	0.1	1,000 döngü/gün - 10 gün	RGD kaplı kolajen jel	İnsan tenosit	Mousavizadeh ve ark.– 2020 [119]
Özel üretim	10	1	4 sa/gün – 7 gün	GelMA-Aljinat kaplı PCL-PA6 nanofibröz membran	İnsan BMMSC	Rinoldi ve ark. – 2019 [120]
ElectroForce 5100 (TA Instruments, A.B.D.)	5	0.5	3 sa/gün – 7 gün	Aljinat kaplı örülü PCL-Kolajen mikro-nano fibröz iskele	Tavşan tendon fibroblast	Jayasree ve ark.- 2019 [121]
Özel üretim	2	0.0167	1 sa/gün – 7 gün	Deselülerize insan umblikal kord damarı	Sıçan BMMSC	Engbretson ve ark. – 2018 [122]
FX-4000T (Flexcell Int. Corp., A.B.D.)	6	0.25	8 sa/gün – 6 gün	Kolajen jel	Sıçan TdMSC	Wang ve ark. – 2018 [123]
Özel üretim	10	1	1/3/7 gün	Deselülerize domuz anterior tibial tendon	İnsan BMMSC	Lee ve ark. – 2018 [124]
ST-140 (STREX Co., Japonya)	15	1	3 gün	Kolajen tip I süngerimsi doku iskelesi	Sıçan BMMSC	Zhang ve ark. – 2018 [125]
Özel üretim	3	0.5	20 dk/sa – 12 sa/gün - 2 gün	Deselülerize tendon- fibrokartilaj - kemik kompoziti	Köpek BMMSC tabakaları	Liu ve ark. – 2018 [126]

Çizelge 2. 3. Devam.

Reaktör - Üretici	Çalışma Parametreleri			Doku iskelesi	Hücre	Yazar-Yıl
	Gerinim (%)	Frekans (Hz)	Çalışma süresi			
Özel üretim	3	0.2	20 dk/sa – 12 sa/gün - 14 gün	Deselülerize köpek fleksör digitorum profundus tendon	Köpek BMMSC	Wu ve ark. – 2017 [69]
Özel üretim	10	0.5	2 dk/sa – 15 gün	PEG-fibrinojen hidrojel	C3H10T1/2 (10T/2) fare MSC	Testa ve ark. – 2017 [127]
MechanoCulture T6 (CellScale, Kanada)	4	0.5	2 sa/gün – 12 gün	PLA ile örülmüş hizalı PCL nanofiber yapılar	İnsan AdMSC-tenosit-umblikal damar endotel ko-kültür	Wu ve ark. – 2017 [128]
Özel üretim	2	0.5	0.5 sa/gün - 14 gün	Deselülerize insan umblikal kord damarı	Sıçan BMMSC	Engebretson ve ark. – 2017 [129]
Özel üretim	3	0.33	1 sa/gün – 10 gün	Deselülerize at digitorum superficialis tendon	At BMMSC/AdMSC/TdMSC	Youngstrom ve ark. – 2016 [130]
Özel üretim	4	0.5	3 sa/gün – 7 gün	poli(laktik-ko-ε-kaprolakton)/kolajen nanofibröz matris	Sıçan TdMSC	Xu ve ark. – 2015 [117]
Özel üretim	10	0.5	2 sa/gün – 5 hafta	Örülü PLA/PGA sarılan PGA fiberler	Tavşan AdMSC	Deng ve ark. – 2014 [131]

#### 2.4.5. Diğer Yaklaşımlar

Tendon doku mühendisliği yaklaşımları olarak biyomalzeme teknolojileri, hücre ve büyüme faktörü kullanımı ve mekanik uyarım uygulamalarının yanı sıra hipoksi ve ko-kültür yaklaşımları da kullanılabilir.

**Hipoksi yaklaşımı:** Oksijen, doku homeostazının sürdürülmesi ve rejenerasyonun desteklenmesinde rol oynayan, hücrelerin metabolik substratı ve sinyal aracı olarak görev alan hayati bir moleküldür. Oksijen, metabolizma, göç, anjiyogenez, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi hücre biyogenezinin farklı yönlerinde önemli bir rol oynamakta ve bu nedenle son yıllarda hücrelerin normoksik koşullarını oluşturmak için düşük O<sub>2</sub> gerilimli hücre kültürleri ile çalışılmaktadır [132]. Doğal koşullar altında solunan hava 160 mmHg'ya (%20-21 O<sub>2</sub>) karşılık gelen oksijen seviyelerini içermekte ve alveollerdeki oksijen basıncı gradyan boyunca 100-120 mmHg'ya düşmektedir. Periferde ise, dokuya ve vasküler yoğunluğa göre değişmekle birlikte, hücrelerin mikroçevrelerinde fizyolojik normoksi koşulları %2-9 (14.4–64.8 mmHg) oksijen seviyeleri arasında kabul edilmiştir [133, 134]. İskelet kaslarında kasın oksijen tüketimine bağlı olarak, oksijen seviyeleri %2-5 arasında (7.5–31 mmHg) değişmekte ve tendonların oksijen tüketiminin kaslara göre oksijen tüketiminin 7.5 kat daha düşük olduğu bilinmektedir. Tenositlerin fizyolojik olarak düşük O<sub>2</sub> koşullarında varlığını sürdürmesi nedeniyle, düşük oksijen gerilimleri tendon yenilenmesi, remodelasyonu ve hücre fenotipinin korunması açısından önem teşkil etmektedir. TdMSC'ler kullanılarak %2 ve %20 O<sub>2</sub> seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, %2 O<sub>2</sub> gerilimindeki hücrelerin proliferasyonunun ve kolajen birikiminin arttığı ve matris metalloproteinaz (MMP) -1 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir [135]. Başka bir çalışmada ise TdMSC'lerin %5 O<sub>2</sub> koşullarında, farklılaşmanın yanında köklenme özelliklerinin de iyileştiği kök hücre yüzey belirteçleri olan Oct-4 ve Nanog gen ekspresyon seviyelerindeki artıştan tayin edilmiştir [136]. Farklı oksijen seviyelerine hücre adaptasyonu, hipoksiyle uyarılabilen transkripsiyon faktörleri (HIF) ailesinden hipoksinin ana düzenleyicisi olarak tanımlanan HIF-1 $\alpha$  proteini yoluyla olmaktadır. Normoksik koşullarda HIF1 $\alpha$  sürekli eksprese edilirken, hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  proteini stabilize olup hücre çekirdeğinde birikmekte ve DNA, mRNA, mikroRNA ve protein sentezi dahil olmak üzere çeşitli moleküler mekanizmaları etkilemektedir

[137]. Yin ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, AdMSC'lerin tenositlere farklılaşmasında HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun arttığı ve HIF-1 $\alpha$  inhibitörüyle muamele edilen hücrelerde kolajen tip I, kolajen tip III, Tnmd ve Scx gen ekspresyonlarının belirgin bir şekilde düştüğü ve bu nedenle hipoksiye bağlı farklılaşmanın azaldığı belirtilmiştir [68]. Bunun yanında hipoksik koşulların, büyüme faktörleriyle [104] ve mikroRNA'lar ile [138] birleştirilerek tendon rejenerasyonunda etkinliği incelenmiştir.

**Ko-kültür yaklaşımı:** Ko-kültürlerde *in vitro* koşullarda hücresel anlamda doku mikroçevresi taklit edilmeye çalışılmaktadır. İki veya daha fazla hücre tipinin karıştırılarak kültüre edildiği ve böylece hücre-ECM bağlantıları, biyosinyaller ve parakrin yolla hücre etkileşiminin sağlandığı direkt ko-kültür ya da hücrelerin aynı ortamda fakat fiziksel bağlantıları bulunmadan kültüre edildiği indirekt ko-kültür çalışmaları tendon rejenerasyonunda incelenmiştir. Özellikle fetal tendon eksplantının kullanıldığı ko-kültür çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Amniyotik epitelyal kök hücrelerin ayrı ayrı tenosit ve fetal tendon eksplantı ile ko-kültür çalışmasında, eksplant ile yapılan ko-kültürde tendonla ilişkili gen ekspresyonlarının ve tenojenik fenotipin arttığı belirlenmiştir. Bunun yanında hizalı PLGA nanofibröz matrikslere ekilen amniyotik epitelyal kök hücrelerin aynı koşullarda tendon eksplantı ile ko-kültüre edildiği gruba göre Tnmd ve kolajen tip I gen ekspresyonlarının, kolajen birikimi ve hizalanmasının azaldığı bildirilmiştir [139]. Fetal tendon eksplantının ulaşılabilirliğinin zorluğu düşünüldüğünde, tenositlerle kök hücrelerin ko-kültürü de tendon rejenerasyon modelinde avantaj sağlayabilmektedir. Bu kapsamda günümüze kadar, insan amniyon-kökenli mezenkimal kök hücreler ile anterior krusiat ligament (ACL) fibroblast hücreleri [140], sıçan TdMSC ve BMMSC'leri [67], köpek MSC ve köpek tenositleri, domuz MSC ve ACL fibroblastları [141], insan AdMSC hücreleri ve TdMSC hücreleri [142] ko-kültür çalışmalarında kullanılmış ve oluşturulan parakrin etkinin tendon rejenerasyonunda etkisi kanıtlanmıştır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması süresince yapılan deneysel çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir. Doktora çalışması temel olarak iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde, tendon doku rejenerasyonunda kullanılacak doku iskelelerinin geliştirilmesi amacıyla SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin üretim yöntemleri anlatılmıştır. Elektroçirime yöntemi ile hizalı ve nanoboyutta fiberlerin elde edilebilmesi için yapılan optimizasyon çalışmalarından ve nanofibröz matrikslerin üretiminden bahsedilmiştir. Ayrıca bu kısımda, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin yapısal karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise, karakterizasyonu yapılan doku iskelelerinin hücreli yapıya kavuşturularak, farklılaşma çalışmaları anlatılmıştır. Bu kapsamda, sıçan AdMSC izolasyonu ve statik hücre kültür koşulları detaylandırılmıştır. Ayrıca nanofibröz matrikslerin, AdMSC'lerin tutunma, çoğalma ve tenojenik farklılaşmasındaki etkinliğinin incelendiği karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Bunun yanında, tez çalışması kapsamında kullanılan özel üretim mekanik uyarım biyoreaktörü hakkında bilgi verilmiş ve biyoreaktör ile yapılan dinamik kültür çalışmaları anlatılmıştır.

#### 3.1. Malzemeler

Nanofiber matriksleri oluşturan polimerlerden P3HB ( $M_w=300$  kDa) Sigma-Aldrich (Almanya), *Bombyx mori* cinsi ipek kozaları ise Kozabirlik A.Ş.'den (Türkiye) satın alınmıştır. PBAT polimeri ise BASF (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. SF izolasyonu için kullanılan kimyasallardan sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) Sigma-Aldrich (Almanya) ve lityum bromür (LiBr) Merck (Almanya) firmasından; saflaştırma prosesinde kullanılan SnakeSkin diyaliz membran (3,5K MWCO) Thermo Fisher (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Elektroçirime çalışmalarında kullanılan 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) ve metanol kimyasalları Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) ise Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.



Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM), fetal sığır serumu (FBS), fosfat tampon çözeltisi (PBS) ve sığır serum albumin (BSA) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından; tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), penisilin/streptomisin, gentamisin, amfoterisin B ve kolajenaz Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Farklılaştırma ajanı olarak kullanılan GDF-5 büyüme faktörü BioVision (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir.

Kültür sonrası hücre canlılığını belirlemek için yapılan analizde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Morfolojik görüntülemelerde kullanılan kimyasal ve boyalardan glutaraldehit, paraformaldehit, hidroklorik asit (HCl), hekzametildisilazan (HMDS) ve Triton X-100 Merck (Almanya); kalsein asetoksimetil (AM) ve etidyum homodimer-1 ise Thermo Scientific (A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Biovision (A.B.D.) firmasından, Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikoru ise Bioss (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Hidroksiprolin tayininde kullanılan hidroksiprolin, sodyum hidroksit (NaOH), sodyum asetat, sitrik asit, kloramin T, perklorik asit ve 4-dimetil amino benzaldehit Sigma Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Gen ekspresyonlarının belirlendiği analizlerde gerekli malzemelerden Trizol ve RNA izolasyon kiti Qiagen (Almanya); kloroform Sigma Aldrich (Almanya); cDNA reverse transkripsiyon kiti Thermo Fischer (A.B.D.); EvaGreen® Solis Biodyne (Estonya); ribonükleaz (RNaz) inhibitörü ise Bioshop (Kanada) firmalarından satın alınmıştır.

## **3.2. SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin üretimi**

### **3.2.1. SF İzolasyonu**

SF eldesi için *Bombyx mori* ipek kozalarından fibroin yapının etrafını saran ve safsızlığa neden olan serisin proteininin uzaklaştırılması ve elde edilen fibroinin çözdürülerek saflaştırılması gerekmektedir.

SF izolasyonu için literatürden elde edilen protokol [143] aşağıdaki şekliyle çalışmaya uyarlanmıştır.

- Kozalar kesilerek içindeki ipek böceği ve kalıntılar alınmıştır. Oldukça küçük parçalara kesilen kozada renk farklılıkları, deforme olan veya çok kirli olan bölgeler uzaklaştırılmıştır.
- Koza parçaları 100°C'de kaynayan 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi içine atılarak 30 dk boyunca cam pipet yardımıyla, birleşen kozalar ayrılarak karıştırılmıştır.
- Serisin kısmı uzaklaştırılan kozalar 3 kez 20'şer dk boyunca ultra saf su ile yıkanmış ve fazla suyu alınan SF yapısı bir gece çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan SF 1:4 oranında 9.3 M LiBr ile karıştırılarak 60°C'de 4 sa boyunca çözdürülmüştür. Süre sonunda amber renginde berrak bir çözelti elde edilmiştir.
- Elde edilen SF çözeltisi ılıkken naylon filtreden geçirilmiş ve diyaliz membranına aktarılarak 2 gün boyunca diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. İşlem sırasında en az 6 kere (1., 4., 8., 12., 24., 36. saatler) ortam suyu değiştirilmiştir.
- Diyaliz sonrası saflaştırma amacıyla SF çözeltisine 12,000 rpm, 4°C'de, 20 dk boyunca 3 kez santrifügasyon işlemi uygulanmış ve SF izolasyonu tamamlanmıştır.

Ayrıca, saflaştırılan SF polimeri sulu çözelti olduğundan ve bu çözeltiyle elektroegirme işlemi yapılamayacağından santrifügasyon sonrası son aşamada SF çözeltisine 2 gün boyunca -80°C'de liyofilizatörde (Alpha 2-4 LSC, Christ, Almanya) dondurarak kurutma işlemi uygulanmış ve sünger formunda SF elde edilmiştir.

### **3.2.2. Elektroeğirme Çözeltilerinin Hazırlanması**

SF/P3HB matrikslerin hazırlanması için lizole edilen liyofilize SF ve P3HB polimerleri HFIP çözücüsü içerisinde çözdürülerek elektroeğirme işlemlerinde kullanılmıştır. Hazırlanan polimer çözeltileri minimum 3 gün olacak şekilde manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır. P3HB oldukça hidrofobik ve kırılabilir bir polimerdir. Yapılan ön çalışmada, P3HB'nin oran olarak SF'e eşit ve fazla olduğu (SF:P3HB; 1:1 ve 1:3) çözeltilerden hazırlanan nanofiber matrikslerin yüzeyden kırılarak kalkması ve elastik dayanımının olmaması nedeniyle çalışmanın devamında kullanılmamasına karar verilmiştir. Ayrıca toplam polimer konsantrasyonunun %7'nin (w/v, HFIP içerisinde) üzerinde olduğu durumda da nanofiber elde edilememiştir. Bu nedenle, SF/P3HB polimer çözeltisi tüm tez çalışması boyunca 3:1 oranında hazırlanarak kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere toplam polimer konsantrasyonu ise %2, %4 ve %6 (w/v) olarak ayarlanmıştır.

SF/PBAT matrikslerin hazırlanması için PBAT reçinesi ve liyofilize SF polimeri yine HFIP içerisinde çözdürülerek polimer karışımları hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları için SF/PBAT oranı 1:3, 1:1 ve 3:1 olarak belirlenmiştir. Belirtilen oranlar dahilinde toplam polimer konsantrasyonları ise %7, %11 ve %15 (w/v) olmuştur.

### **3.2.3. RSM ile Elektroeğirme Prosesinin Optimizasyonu**

Elektroeğirme yöntemiyle istenen özelliklerde nanofiber elde edebilmek için çözelti konsantrasyonu, çözelti akış hızı, iğne ucu ile toplayıcı arası uzaklık, uygulanan voltaj ve döner toplayıcı dönüş hızı gibi çok sayıda parametrenin optimize edilmesi gerekebilmektedir. Son yıllarda birçok alanda sıklıkla kullanılan tepki yüzey metodolojisi (RSM) ise bu alanda etkin bir optimizasyon kolaylığı sağlamaktadır [144]. Bu yöntemde her bir parametrenin fiber çapı ve hizalanma üzerindeki etkisi kolaylıkla bulunabilmekte ve böylece istenen koşullarda üretim yapmak için gerekli parametreler belirlenmektedir.

RSM, bağımsız değişkenlerin (sunulan çalışmada konsantrasyon, akış hızı vd.) uzayının belirlenmesi için gerekli deneysel koşulların elde edilmesi, bağımsız değişkenlerin hem kendi arasında hem de sistem yanıtı (sunulan çalışmada nanofiber çapı) üzerinde oluşturduğu etkinin belirlenmesi ve böylece prosese ait modellemenin yapılabilmesi için kullanılan modelleme ve optimizasyon tekniklerinden oluşmaktadır. Sistemin modellenmesinde, gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinomiyal modeller, üssel modeller veya eksponansiyel modeller kullanılmaktadır. Bağımsız değişkenler ile yanıt arasında lineer bir ilişki varsa 1. derece polinomlar; sistemin yanıt yüzeyinde eğrilik varsa 2. derece polinomlar (kuadratik); bazı çalışmalarda ise 3. derece polinomlar (kübik) kullanılmaktadır. Çoğu biyokimyasal süreçte ise power (üssel) modellerden yararlanılmaktadır. RSM ile optimizasyonda, öncelikle bağımsız değişkenlerin sayısı (faktör) ve her bir değişkenin çalışma aralıkları ile bu çalışma aralığındaki adım değeri (minimum, orta ve maksimum değerler arasındaki fark) belirlenmektedir. Parametreler belirlendikten sonra bu değerlere uygun deneme desenleri seçilmektedir. Deneme deseni belirlendikten sonra sistemin modellenmesi yapılmakta ve model denkliğin uygunluğu istatistiksel yöntemler ile mutlaka tespit edilmelidir.

RSM ile optimizasyonun en önemli işlevi az sayıda ve kısa sürede deney yaparak, belirlenen uzay içerisinde, istenen sistem yanıtının ve/veya parametrelerin kolaylıkla tespit edilebilmesi ve optimizasyonun yapılabilmesidir. Fiber çapının tendon rejenerasyonuna etkisinin incelendiği çalışmalarda ortalama 400 nm fiber çapına sahip doku iskelelerinde hücre sayısının, toplam kolajen ve proteoglikan miktarının daha fazla ve mekanik özelliklerin daha iyi olduğu belirtilmiştir. Mikron büyüklüğüne çıkıldığında ise kolajen I, III, V, Tnmd gibi tendonla ilişkili gen ekspresyonlarında artışın olduğu, böylelikle nanoboyutta doku iskelesinin hasar oluşumdan hemen sonra kullanılabilir, matriks birikimi için hücreleri uyarabilecek bir ortam sağladığı düşüncesine varılmıştır.

İki farklı fiber çapının da tendon rejenerasyonu için farklı yönde katkıları olacağından, bu tez çalışmasında üretilecek doku iskelelerinde optimal bir değer olarak 600-700 nm çapında fiberler elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle RSM, 600-700 nm çapında nanofiberlerin üretiminde optimizasyon tekniği olarak kullanılmıştır. Optimizasyon işlemleri Design-Expert® v11 (Design Expert Inc., A.B.D.) programı kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2.3.1. SF/P3HB Nanofiber Optimizasyonu**

Elektroeğirme işlemi için çözelti hazırlandıktan sonra NE300 (İnovenso, Türkiye) cihazında çalışmalara başlanmıştır. Hizalı yapıların elde edilmesi amacıyla döner silindiri (rotating drum) toplayıcı kullanılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda fiber hizalanmasının artışı döner toplayıcının dönme hızıyla ilişkili olduğundan öncelikli olarak bu parametre incelenmiş ve 2,000 rpm'de hizalı fiberler elde edilmiştir. Bu nedenle, döner toplayıcının hızı 2,000 rpm olarak tüm deneylerde sabit tutulmuştur. Ayrıca enjektör ucu ve toplayıcı arası mesafe de 15 cm, 20 cm ve 25 cm uzaklık olacak şekilde denenmiş ve fiber çaplarında anlamlı fark görülmemiştir, ancak düşük mesafede fiberlerin hizalanmasında problem oluşmuştur. Bu nedenle toplayıcı uzaklığı 25 cm olarak belirlenmiştir. Bunun yanında yüksek çözelti konsantrasyonlarında (%7, %10) enjektör ucunda tıkanma meydana gelmiştir. Yüksek voltaj uygulamasıyla jet oluşumunun sağlandığı sistemde 20 kV gerilimin üzerindeki değerlerde kararlı jet oluşumu gerçekleşmemiştir.

Ön çalışmalardan elde edilen bulgular neticesinde RSM'de kullanılacak faktörler (çözelti konsantrasyonu, akış hızı ve voltaj) ve bu faktörlere ait uzay sınır değerleri belirlenmiştir. İstenen fiber çapı olan 600-700 nm boyutunda fiber elde edebilmek için optimize edilecek parametreler 3 seviye olacak şekilde, polimer konsantrasyonu (%2 - %4 - %6, w/v), akış hızı (1.0 mL/sa – 1.5 mL/sa – 2.0 mL/sa) ve voltaj (15 kV – 17 kV – 19 kV) değerleri olarak belirlenmiştir. Bu değerlere göre deney seti oluşturulmuş ve deney setindeki parametrelerde elektroeğirme işlemleri gerçekleştirilerek, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi ile ortalama fiber çapları kaydedilmiştir.

Box-Behnken Design (BBD) deneme deseninin kullanıldığı RSM sonucu elektroğirme prosesi modellenmiş ve istatistiksel uygunluğu tespit edilerek istenen çapta fiberlerin elde edilebileceği optimum değer belirlenmiştir. Özetle, oda sıcaklığında ve %35 nem koşullarında yapılan elektroğirme çalışmasında, polimer konsantrasyonu %5 (w/v), SF:P3HB oranı 3:1, akış hızı 1 mL/sa, uzaklık 25 cm, döner toplayıcı dönme hızı 2,000 rpm ve uygulanan voltaj 14 kV olarak üretim koşulları optimize edilmiştir.

### **3.2.3.2. SF/PBAT Nanofiber Optimizasyonu**

Elektroğirme çalışmaları polimer çözeltileri hazırlandıktan sonra Ne300 cihazında gerçekleştirilmiştir. SF/P3HB nanofiber üretimine benzer şekilde tüm çalışmalar oda sıcaklığı, %35 nem ve 2,000 rpm toplayıcı dönüş hızında gerçekleştirilmiştir. SF/P3HB nanofiber optimizasyonunda voltajın etkili olmamasından yola çıkılarak elektroğirme işlemlerinde düzgün jet oluşumunun sağlandığı 14 kV değerinde çalışmalar yapılmıştır. RSM ile istenen boyutta fiber elde etmek için optimize edilecek parametreler olarak polimer oranı (3:1 - 1:1 - 1:3), polimer konsantrasyonu (%7 - %11 - %15) ve akış hızı (0.5 mL/sa – 1.0 mL/sa – 1.5 mL/sa) 3 seviyeli olacak şekilde belirlenmiştir.

BBD deseni kullanılarak yapılan optimizasyonda deney setleri oluşturulmuş ve her bir deney setinden örnekler alınarak SEM analizi ile incelenmiştir. Görüntülerden ortalama fiber çapları ImageJ (National Institutes of Health, A.B.D.) programı ile analiz edilmiş ve RSM ile sistem modellenmiştir. Benzer şekilde istatistiksel olarak modelin uygunluğu tespit edilerek, 600-700 nm fiber çapına sahip SF/PBAT nanofiberlerin elde edilmesi için gerekli elektroğirme koşulları toplam polimer konsantrasyonu %7.6 (w/v), SF:PBAT oranı 35:65, akış hızı 1.0 mL/sa, uzaklık 25 cm, döner toplayıcı dönme hızı 2,000 rpm ve uygulanan voltaj 16 kV olarak optimize edilmiştir.

### **3.3. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Stabilizasyonu ve Sterilizasyonu**

SF/P3HB ve SF/PBAT doku iskelelerinin hücre kültür çalışmalarında kullanılabilmesi için ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. SF suda çözünen bir protein olduğundan stabilizasyon işlemi ile yapı kararlı hale geçirilmiştir. Bu amaçla, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler %90 (v/v) metanol çözeltisinde 1 sa boyunca bekletilmiş ve 1 gece çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır. Metanolla stabilizasyon işlemi ile ipek fibroinin suda çözünmeyi sağlayan  $\alpha$ -heliks yapısı indüklenerek  $\beta$ -tabaka yapısına geçirilmiştir.

Stabilizasyonu yapılan SF/P3HB doku iskelelerini hücre kültür çalışmasında kullanabilmek için uygun sterilizasyon yöntemini belirlemek gerektiğinden doku iskeleleri hem etilen oksit gazıyla hem de otoklav yöntemiyle sterilize edilmiştir. Etilen oksit sterilizasyonunda örnekler oda sıcaklığında 8 sa boyunca etilen oksit gazına maruz bırakılmış ve sonrasında 10 gün boyunca havalandırılmıştır. Otoklav sterilizasyonunda ise örnekler basınçlı su buharı ile doymuş bir ortamda 121°C sıcaklıkta 30 dk boyunca otoklavlanmıştır. PBAT polimerinin erime sıcaklığının otoklav sıcaklığına yakın olması ve etilen oksit yönteminin havalandırma süresinin fazla olması nedenleri göz önüne alınarak SF/PBAT doku iskeleleri etanol ve mor ötesi ışık (UV) uygulaması ile sterilize edilmiştir.

### **3.4. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Karakterizasyonu**

Belirli nanofiber çap aralığında ve hizalı morfolojide SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriks fabrikasyonu için 15 sa boyunca elektroçirme işlemi uygulanmış ve ortalama 100  $\mu$ m kalınlıkta nanofibröz matriksler elde edilmiştir. Her iki nanofibröz matriks de metanol uygulaması ile stabilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yalnızca SF/P3HB nanofibröz matrikslerde ek olarak etilen oksit ve otoklav yöntemiyle sterilizasyon yöntemleri uygulanmış ve hızlı, etkin sterilizasyon yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Üretilen nanofibröz matriksler morfolojik, kimyasal, termal, mekanik ve antibakteriyal özellikler bakımından karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan malzemeler ve uygulanan işlemler Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. 1. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan malzemeler ve açıklamaları.

Kısaltma adı	Uygulanan işlemler
<b>SF</b>	Bombyx mori ipek kozalarından izole edilen liyofilize ipek fibroin
<b>P3HB</b>	P3HB reçinesi
<b>SF/P3HB</b>	Hızalı SF/P3HB nanofibröz matriks
<b>S-SF/P3HB</b>	Metanolle stabilize edilmiş SF/P3HB matriks
<b>EO-SF/P3HB</b>	Stabilizasyondan sonra etilen oksitle sterilize edilmiş SF/P3HB matriks
<b>A-SF/P3HB</b>	Stabilizasyondan sonra otoklav yöntemiyle sterilize edilmiş SF/P3HB matriks
<b>PBAT</b>	PBAT reçinesi
<b>SF/PBAT</b>	Hızalı SF/PBAT nanofibröz matriks
<b>S-SF/PBAT</b>	Metanolle stabilizasyonu yapılmış SF/PBAT matriks

### 3.4.1. Yüzey Karakterizasyonu

SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin morfolojilerinin görüntülenmesinde SEM analizi (GAIA3, Tescan, Çek Cumhuriyeti) kullanılmıştır. SEM analizinde örnekler altın-paladyum ile kaplanmış ve farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır. Elde edilen görüntülerden ImageJ programı ile minimum 200 tane ölçüm alınarak fiber çapı ve fiber hizalanması belirlenmiştir.

Hızalı nanofibröz doku iskelelerinin ıslatılabilirliğini belirlemek amacıyla su temas açısı analizi (DSA 100, Kruss, Almanya) yapılmıştır. Nanofibröz matrikslerin su temas açısı durgun damla yöntemi ile oda koşullarında ölçülmüştür. Bu analiz kapsamında, 10 tekrarlı olacak şekilde kuru matriks yüzeylere ortalama 5 µL distile su damlası bırakılmış ve 60. s'de ölçüm alınmıştır.



### **3.4.2. Kimyasal Karakterizasyon**

Polimer reçinelerinin ve üretilen nanofibröz matrikslerin kimyasal yapıları ATR tekniğinin kullanıldığı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi (Nicolet iS10, Thermo Scientific, Amerika) ile 400-4,000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında incelenmiştir.

### **3.4.3. Termal Karakterizasyon**

Polimerik malzemelerin termal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Termogravimetri (TG) analizleri yapılmıştır. DSC analizi (Diamond DSC, Perkin Elmer Inc., Amerika) oda sıcaklığından 400°C'e kadar 5°/dk hızında gerçekleştirilmiştir. Termal kütle kayıplarının belirlendiği TG analizi (EXSTAR 6000, SII Nanotechnology Inc., Japonya) ise oda sıcaklığından 700°C'e kadar 5°/dk hızında uygulanmıştır.

### **3.4.4. Kristalografik Karakterizasyon**

Film şeklindeki polimer reçinelerinin ve nanofibröz matrikslerin kristal yapıları X-ışını kristalografisi (XRD) analizi (Ultima IV, Rigaku, Japonya) ile incelenmiştir. Analiz, 5°-50° tarama aralığında ve 2°/dk hızda gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.5. Mekanik Karakterizasyon**

SF/P3HB, S-SF/P3HB, SF/PBAT ve S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin mekanik özellikleri çekme testi (TA.XTPlus, Stable Microsystems, İngiltere) ile incelenmiştir. ASTM standartlarına uygun olarak 10 mm × 100 mm × 100  $\mu\text{m}$  boyutlarındaki matriksler analiz öncesi 1 gece boyunca 37°C'de PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Islak numuneler çekme çenelerinin arasına yerleştirilmiş ve 5 N yük hücresi kullanılarak, 0.05 mm/s hızla tek-yönlü çekme testine tabi tutulmuştur. Her bir örnek ile 3 kez çalışılmıştır.

### **3.4.6. Steril SF/P3HB Nanofibröz Matrikslerde Hücre Canlılık Analizi**

SF/P3HB nanofibröz matrikslere uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin etkinliğini belirlemek amacıyla A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB doku iskelelerine L929 fare fibroblast hücreleri ekilerek kültürün belirli zamanlarında MTT analizi ile hücre çoğalması kantitatif olarak tayin edilmiştir.

Bu amaçla, 1 cm × 1 cm boyutlarında kesilen doku iskeleleri 24 gözlü kültür kaplarına alınarak 1 gece %15 FBS (v/v) ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamında şartlandırılmıştır. Şartlandırma işleminden sonra  $5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta L929 hücreleri 20 µL besi ortamında süspanse edilerek statik koşullarda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminden 2 sa sonra kültür ortamı eklenmeye başlanmış ve 5. saatte kültür hacmi 1 mL'ye tamamlanmıştır.

Kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde doku iskeleleri steril pens yardımıyla başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılarak her bir doku iskelesinin bulunduğu kuyucuğa 660 µL %10 (v/v) MTT çözeltisi (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) içeren kültür ortamı eklenmiş ve 3 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır. MTT sarı renkli formazan tuzudur ve canlı hücrelerin mitokondriyel aktiviteleri sonucu suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Inkübasyon sonunda doku iskeleleri üzerindeki ortam çekilerek, her bir kuyucuğa 400 µL DMSO çözeltisi eklenmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Her bir kuyucuktan 200 µL örnek alınıp, 96 gözlü kültür kabına aktarılmış ve 690 nm referans olmak üzere 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Asys UVM 340, Avusturya) spektrofotometrik ölçüm alınmıştır. Ayrıca kültürün 7. gününde doku iskeleleri alınarak SEM analizi yapılmıştır. Bu kapsamda Bölüm 3.6.2. *SEM Analizi* kısmında detaylı anlatıldığı şekliyle, EO-SF/P3HB ve A-SF/P3HB örneklerine sırasıyla fiksasyon, susuzlaştırma ve kurutma işlemleri uygulanmış ve altın-paladyumla kaplanarak görüntüleme yapılmıştır.

### **3.4.7. Antibakteriyal Özelliklerin Belirlenmesi**

Otoklav ile sterilize edilen A-SF/P3HB ve etanol-UV uygulaması ile sterilize edilen SF/PBAT doku iskelelerinin antibakteriyal özelliği *Escherichia coli* (gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) model bakterileri kullanılarak optik yoğunluk metodu ile incelenmiştir [145].

Bu yöntemde, doku iskeleleri 0.005 g/mL konsantrasyonda olacak şekilde tartılmış ve ardından belirtilen yöntemlerle sterilize edilerek 2 mL Mueller-Hinton sıvı besi yeri ortamı içeren tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 0.5 McFarland (~10 kob) ölçeğinde 2 µL bakteri suşu inoküle edilerek, örnekler çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (0., 3., 6., 9., 12. ve 24. sa) örnekler alınarak 5 kat PBS çözeltisi ile seyreltilmiş ve 610 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak aynı konsantrasyonda sadece bakteri suşu içeren örneklerle çalışılmıştır.

#### **3.4.8. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi**

Stabilize edilmiş S-SF/P3HB ve S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin bozunurluk özellikleri, tampon çözeltisi, kolajenaz içeren enzimatik ortam ve lizozim içeren enzimatik ortam olacak şekilde 3 farklı koşulda incelenmiştir. Hidrolitik bozunma için %0.1 (w/v) NaN<sub>3</sub> içeren PBS ortamı; enzimatik bozunma için ise ayrı ayrı olmak üzere 1U kolajenaz (%0.1 (w/v) NaN<sub>3</sub> içeren PBS ortamında) ve 10 µg/mL konsantrasyonda lizozim içeren (%0.1 (w/v) NaN<sub>3</sub> içeren PBS ortamında) ortamlara alınan 1 cm × 1 cm büyüklüğündeki doku iskelelerinden 7., 14. ve 21. günlerde örnek alınmış ve örnekler ultra saf su ile yıkanıp kurutulularak, SEM analizi ile bozunma davranışı incelenmiştir. Doku iskelelerinin içinde bulunduğu ortam haftada 1 kez değiştirilmiştir.

### **3.5. Hücre Kültür Çalışmaları**

#### **3.5.1. AdMSC İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan sıçan adipoz mezenkimal kök hücreleri (rAdMSC) Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 52338575-59 sayılı izni ile 6 adet *Sprague Dawley* cinsi sıçandan izole edilmiştir. Bu amaçla, 6 adet erkek *Sprague Dawley* cinsi sıçana ketamin/ksilazin bileşimi ile (sırasıyla; 50 mg/mL ve 20 mg/mL) kilolarına uygun doz (sırasıyla; 200 mg/kg ve 10 mg/kg) kullanılarak anestezi uygulanmış ve sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Dış yüzeyi %10 povidon iyot çözeltisi ile dezenfekte edilen sıçanların gonodal ve böbrek arkası yağ dokuları izole edilmiştir.

Çıkarılan yağ dokuları %4 (v/v) penisilin/streptomisin içeren PBS ortamına aktarılmıştır ve soğuk koşullarda izolasyona kadar saklanmıştır. Doku parçalarını 3 saatten fazla bekletmemeye dikkat edilerek, hücre izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Aşağıda belirtilen protokol izlenerek adipoz dokudan MSC'lerin eldesi gerçekleştirilmiştir:

- Adipoz dokular laminer akışlı kabin içerisine alınarak 4 kez %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren PBS içerisinde yıkanmış ve Petri kaplarına aktararak, steril bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve damar yapıları olabildiğince uzaklaştırılmıştır.
- Adipoz doku parçaları steril santrifüj tüplerine aktararak, dokunun parçalanması için her bir sıçan için 4 mL kolajenaz enzimi (%0.075 kolajenaz IA (w/v), PBS içerisinde) eklenmiş ve 37°C'de 60 dk (15 dk.da bir vorteks yapılarak) inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda enzim aktivitesini durdurmak amacıyla tüplere kolajenaz miktarının iki katı kadar kültür ortamı eklenmiş ve homojenizasyon yapıp, 1,800 rpm'de 5 dk santrifügasyon işlemi uygulanmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılıp dokular 3 kez kültür ortamıyla yıkanmış ve 1,000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- Santrifügasyon sonrası stromal vasküler fraksiyondan elde edilen hücreler 70 µm gözenek çapına sahip steril filtreden geçirilmiştir.
- Filtrasyonu yapılan hücreler %15 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin, %0.4 (v/v) penisilin-streptomisin, %0.2 (v/v) gentamisin ve %0.2 (v/v) amfoterisin B içeren α-MEM ortamı ile süspansiyon edilerek 25 cm<sup>2</sup> yüzeyli polistiren kültür kaplarına aktarılmıştır.

Hücrelerin tutunma durumuna göre 5 gün sonra kültür ortamı değiştirilmiş ve üremelerine göre kültür kabının %75'ini kaplandıktan sonra (confluency) pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işleminde kültür kabındaki üreme ortamı uzaklaştırılmış ve Dulbecco's PBS (D-PBS) ile tutunma yüzeyi yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması için %0.25'lik (v/v) tripsin/EDTA eklenmiş ve 37°C'de 5 dk enzim muamelesi yapılmıştır. Tripsinizasyon işleminden sonra hücreler kültür ortamı ile yıkanarak 1,000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve kültür ortamı ile süspanse edilerek 1:3 oranında pasajlanmıştır. Dondurma ortamı olarak, %10 (v/v) DMSO içeren FBS kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, grubumuzca daha önce de aynı protokol ile izole edilip detaylıca karakterizasyon çalışmaları yapılan [146] rAdMSC'leri akış sitometri analizi ile incelenmiş ve kök hücre karakteristikleri belirlenmiştir. Bu amaçla, 25 cm<sup>2</sup> kültür kabındaki 3. pasaj rAdMSC hücreleri 4 pozitif (CD29, CD44, CD73 ve CD90) ve 2 negatif (CD11b ve CD45) yüzey antijeni açısından incelenmiştir.

Bunun yanında statik kültür çalışmalarında kullanılacak pasaj sayısındaki hücrelerin üreme kinetiğinin belirlenmesi amacıyla, pasaj numarası 5 (P5) rAdMSC hücreleri aynı anda 2 farklı 48 gözlü hücre kültür kaplarına 8,000 hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ekilmiş ve bu kültür kaplarının birinden belirlenen zaman aralıklarında hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak hemositometrik sayım yapılmış ve diğer kültür kabından da MTT analizi ile mitokondriyal aktivite ölçümü yapılmıştır. Kültür boyunca besi ortamı değiştirilmezken, 1., 3., 5., 7., 10., 13. ve 16. günlerde örnek alınarak büyüme eğrisi oluşturulmuş ve elde edilen grafik üzerinden hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi saptanmıştır.

### 3.5.2. Statik Kültür Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında izole edilen rAdMSC'lerin, doku iskelesi bileşeni ve büyüme faktörü kullanımına bağlı olarak tenojenik farklılaşma özelliğini belirlemek amacıyla statik koşullarda 21 günlük hücre kültürü yapılmıştır.

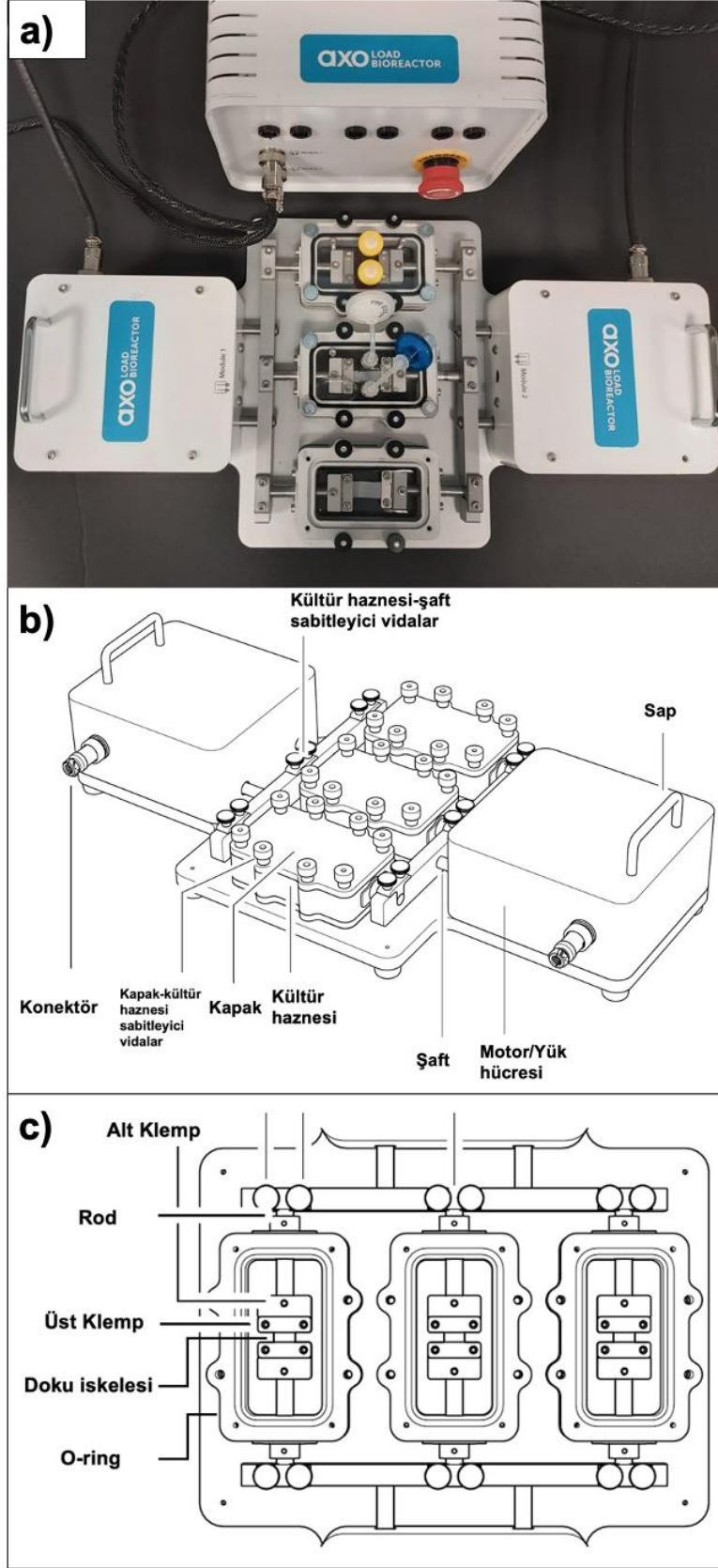
A-SF/P3HB doku iskeleleri kültür çalışması için 1 cm × 1 cm boyutlarında kesilmiş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Stabilize edilmiş S-SF/PBAT doku iskeleleri ise yine aynı boyutlarda kesilmiş ve konvansiyonel yöntem olan etanol-UV uygulaması ile sterilize edilmiştir. Bu amaçla, doku iskeleleri %70 (v/v) etanol çözeltisine alınarak 30 dk vakum etüvünde çöktürülmüştür. Laminer akışlı kabin içerisine alınan doku iskeleleri 2 kez D-PBS ile yıkanmış ve ardından her bir yüzü 15 dk UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri 24 gözlü doku kültür kaplarına aktararak 1 gece boyunca şartlandırma ortamında bekletilmiştir.

Hücre ekimi için 5. pasajdaki rAdMSC'ler tripsinizasyonla kültür kabının yüzeyinden kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonundan örnek alınarak tripan mavisi eklenmiş ve Neubauer sayım lamı ile toplam hücre miktarı belirlenmiştir. Hücre ekimi için gerekli olan miktar hesaplanarak ekim aşamasına geçilmiştir. Her bir doku iskelesine (1 cm<sup>2</sup>) 20 µL hacimde 10<sup>5</sup> rAdMSC ekimi statik koşullarda yapılmıştır. Hücre ekiminden 2 sa sonra 20 µL kültür ortamı eklenmeye başlamış ve 6. saatte kültür ortamı 1 mL'ye tamamlanmıştır. Besi ortamı olarak %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin, %0.4 (v/v) penislin-streptomisin, %0.2 (v/v) gentamisin ve %0.2 (v/v) amfoterisin B içeren α-MEM ortamı kullanılmıştır. Kültür süresi boyunca 2-3 günde bir kültür ortamı değiştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmasında; (1) normal besi ortamında A-SF/P3HB, (2) GDF-5 içeren besi ortamında A-SF/P3HB, (3) normal besi ortamında S-SF/PBAT, (4) GDF-5 içeren besi ortamında S-SF/PBAT olmak üzere toplamda 4 grupta çalışılmıştır. GDF-5 büyüme faktörü, kültür ortamına 100 ng/mL konsantrasyonda eklenerek kullanılmıştır.

### 3.5.3. Dinamik Kültür Çalışmaları

Statik Tez çalışması kapsamında A-SF/P3HB doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin, mekanik stimülasyona bağlı olarak tenojenik farklılaşmasını belirlemek amacıyla biyoreaktör ortamında dinamik koşullarda kültür çalışmaları yapılmıştır. Biyoreaktör özel üretim olup hem tek hem de çift yönlü çekme yapabilen, otoklavlanabilir, etüv içi kullanıma uygun, elektriksel stimülasyona da izin verebilen ve geniş çalışma aralığı imkanı sunan bir mekanik uyarım reaktörüdür (Şekil 3.1.).

Dinamik kültür çalışmalarında, hizalı A-SF/P3HB nanofibröz matriksleri çalışma uzunluğu 3 cm, klempler için 1'er cm pay olacak şekilde, 100 µm × 1 cm × 5 cm boyutlarında kesilmiştir. Steril matrikslere 3.5.2. *Statik kültür çalışmaları* kısmında belirtildiği şekilde ve yoğunlukta 5. pasajdaki rAdMSC'ler 10 cm çapındaki Petri kaplarında ekilmiştir. Hücrelerin doku iskelesine adaptasyonu için statik koşullarda 2 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreli doku iskeleleri laminar akışlı kabin içerisinde ve steril koşullarda mekanik uyarım biyoreaktörüne alınmıştır. Kullanılacak ekipmanlar ve reaktör parçaları otoklav ile sterilize edilmiş ve steril koşullarda çalışma yürütülmüştür. Biyoreaktör kurulumunda bütün parçalar vida yardımıyla sabitlenmiş ve son olarak çekme miline sabitlenen klempler arası mesafe 3 cm uzunluğa ayarlanmıştır. Doku iskeleleri steril pensler yardımıyla klempler arası boşluğa gevşek ya da gergin olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından doku iskelelerinin bulunduğu hazneye 35 mL besi ortamı eklenmiştir. Aynı anda 3 örnek ile çalışmaya izin veren biyoreaktörün 5 cm × 10 cm boyutlarındaki her bir haznesine 1 örnek yerleştirilmiştir. Biyoreaktör 15 cm × 35 cm × 60 cm boyutlarında olup, etüv içi kullanıma imkan tanıdığından gerekli ortam koşulları etüv ile sağlanmıştır. Tüm kültür süresi boyunca rAdMSC ekilmiş A-SF/P3HB doku iskeleleri 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Havalandırma 0.22 µm gözenek çapına sahip politetrafloroetilen (PTFE) hidrofobik filtreler kullanılarak sağlanmıştır. Mekanik uyarıma (tek yönlü çekme) ait gerinim, frekans ve süre gibi parametreler literatürden ve malzemeye ait gerilim-gerinim eğrisinden yararlanılarak bulunmuştur.



Şekil 3. 1. Mekanik uyarım biyoreaktörünün (a) genel görüntüsü (b) üstten şematik görünümü ve (c) kültür haznesi ekipmanları.



Buna göre, ön çalışmalarda rAdMSC hücreleri ekilmiş A-SF/P3HB doku iskelelerine uygulanacak çekme gerinimi %4 ve %8; çekme frekansı 0.2 Hz ve 0.5 Hz; çekme süresi 1 sa/gün ve 3 sa/gün olarak belirlenmiştir. Ekim yapılan doku iskeleleri 2 gün statik kültürü takiben 5 gün boyunca dinamik koşullarda kültüre edilmiştir. Hücre kültür ortamı 2 günde 1 yarı yarıya değiştirilmiştir. Toplamda 7 günlük kültürün sonunda örnek alınmış ve 3.4.6. *Steril SF/P3HB nanofibröz matrislerde hücre canlılık analizi* kısmında belirtildiği gibi MTT analizi ile canlılık belirlenmiştir.

### **3.6. Hücre Kültürü Sonrası Analizler**

#### **3.6.1. MTT Analizi**

Hızlı topografyaya sahip SF/P3HB ve SF/PBAT doku iskelelerinde ve ayrıca büyüme faktörü içeren ortam koşullarında rAdMSC'lerin metabolik aktivitelerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla hücre kültürünün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde MTT analizi yapılmıştır. MTT analiz protokolü 3.4.6. *Steril SF/P3HB nanofibröz matrislerde hücre canlılık analizi* bölümünde detaylıca sunulmuştur ve bu kısımda da aynı şekilde uygulanmıştır. Her bir grup 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

#### **3.6.2. SEM Analizi**

İzole edilen rAdMSC'lerin hızlı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofiberler üzerinde tutunma-yayılma davranışları ve morfolojileri kültürün 1., 7., 14. ve 21. günlerinde SEM analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla, belirlenen zamanlarda doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı alınmış ve doku iskeleleri 2 kez D-PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra doku iskeleleri 30 dk boyunca +4°C'de bulunan %2.5 (v/v) glutaraldehit (PBS içerisinde) ile muamele edilmiş ve hücrelerin fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyondan sonra tekrar seri yıkama işlemi yapılarak analiz gününe kadar doku iskeleleri %1 penisilin-streptomisin içeren D-PBS içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir. Analiz öncesi ise doku iskeleleri üzerindeki D-PBS çekilmiş ve doku iskeleleri etanol serisinden (sırayla %30 - %50 - %70 - %90 - %100, v/v) geçirilerek susuzlaştırma işlemi yapılmıştır.

Son olarak doku iskeleleri 5 dk boyunca HMDS ile muamele edilmiş ve süre sonunda HMDS ortamdan çekilip doku iskeleleri 1 gün boyunca çeker ocakta bekletilerek kurutma işlemi tamamlanmış ve örnekler analiz için hazırlanmıştır. Altın-paladyum ile kaplanan örnekler farklı büyütmeler altında incelenmiştir. Her bir grup 2 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

### **3.6.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama**

Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki rAdMSC'lerin canlılıkları canlı/ölü boyama analizi ile incelenmiştir. Canlı hücreleri boyamak için kullanılan ve floresan özelliği bulunmayan kalsein AM, hücre membranından kolaylıkla geçip hücredeki yoğun esteraz aktivitesine bağlı olarak floresan özellikte kalseine dönüştürülmekte ve yeşil floresan (eksitasyon/emisyon; 495 nm/515 nm) üretmektedir. Ölü hücreleri boyamak için kullanılan etidyum homodimer-1 (EthD-1) de benzer şekilde floresan özellikte olmayıp, canlı hücrelerin membranından geçememektedir. Ölü hücrelerin hasarlı membranından geçen EthD-1 nükleik asitlere bağlanarak kırmızı floresan ışımaya (eksitasyon/emisyon; 495 nm/635 nm) yapmaktadır. Canlı/ölü boyama için belirlenen günlerde doku iskeleleri üzerindeki hücre kültürü ortamı uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içeren PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra doku iskeleleri 2mM kalsein AM ve 4mM EthD-1 içeren PBS ortamına alınmış ve oda sıcaklığı-karanlık ortam koşullarında 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda boya çözeltisi uzaklaştırılarak doku iskeleleri 2 kez PBS ile yıkanmış ve lam üzerine aktarılarak floresan mikroskopta incelenmiştir. Her bir grup 2 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

### **3.6.4. İmmünofloresan Boyama**

Statik hücre kültürünün 7., 14. ve 21. günlerinde, doku iskeleleri üzerine ekilen rAdMSC'lerin hizalı nanofiberler üzerindeki organizasyonları hücre iskeleti/çekirdek boyaması yapılarak takip edilmiştir. Bu amaçla, belirlenen günlerde doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanmış ve ardından %2.5 (v/v, PBS içerisinde) glutaraldehit çözeltisi ile 10 dk boyunca fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra glutaraldehitin uzaklaştırılması için 3 kez PBS ile yıkama yapılarak analiz gününe kadar doku iskeleleri %1 (v/v, PBS içerisinde) penisilin/streptomisin çözeltisi içerisinde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Analiz sırasında doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve hücre membran geçirgenliğini artırmak amacıyla doku iskeleleri 5 dk %0.1 (v/v, PBS içerisinde) Triton X-100 ile muamele edilmiştir. Doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanarak, hücredeki aktin filamentlerini boyamak amacıyla %1 (v/v) (%1 (w/v) BSA içeren PBS çözeltisinde) Alexa Fluor 488 Phalloidin çözeltisi ile karanlıkta 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda doku iskeleleri 3 kez %1 (w/v, PBS içerisinde) BSA çözeltisi ile yıkanmış ve ardından hücre çekirdeğini boyamak amacıyla %0.1 (v/v) (%1 (w/v) BSA içeren PBS çözeltisinde) DAPI çözeltisi ile karanlıkta 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası %1 (w/v) BSA çözeltisi ile 3 kere yıkama yapılmış ve floresan ataşmanlı mikroskopta görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

### **3.6.5. Hidroksiprolin Analizi**

Hidroksiprolin, hayvansal dokularda sadece kolajen proteininde bulunan ve kolajenin yaklaşık %10'unu oluşturan bir aminoasittir. Hidroksiprolin analizi ile dokudaki toplam kolajen miktarı indirekt olarak belirlenebilmektedir [147]. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde doku iskelelerindeki toplam kolajen miktarının ölçülmesi amacıyla hidroksiprolin analizi yapılmıştır. Bu amaçla, doku iskeleleri belirlenen günlerde 2 kere PBS ile yıkanarak -80°C'de analize kadar saklanmıştır. Analizden 1 gün önce doku iskeleleri kurumaya bırakılmış ve analiz öncesi her bir örneğin kuru ağırlığı ölçülmüştür. Ayrıca her bir örneğe ait hidroksiprolin miktarını hesaplamak için gerekli olan standart eğrinin oluşturulması amacıyla, 0 µg'dan 20 µg'a kadar seri dilüsyonla hidroksiprolin çözeltileri hazırlanmıştır. Hidroksiprolin analizinde, kuru ağırlığı alınmış örnekler 150 µL; standart eğri çözeltileri ise hidroksiprolin içeriğine ters orantılı olarak azalan miktarlarda 2 M NaOH çözeltisi içerisinde 121°C'de 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Standart çözeltilerden ve örneklerden 50 µL hidrolizlenmiş kolajen örneği alınarak başka tüplere aktarılmış ve her birine 450 µL 0.059 M kloramin-T çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve hidroksiprolinin pirole oksidasyonunu sağlamak amacıyla oda sıcaklığında 25 dk boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda örneklere ve standart eğri çözeltilerine 500 µL 1 M Ehrlich belirteci eklenmiş ve oluşan pirol ile Ehrlich belirtecindeki p-dimetil amino benzaldehitin reaksiyona girerek renk vermesini sağlamak amacıyla 65°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Her bir örneğe ait çözelti süspanse edilerek, içerisinde 200 µL çözelti alınıp 96 gözlü hücre kültür kabına aktarılmış ve 550 nm dalga boyunda optik absorbanslar UV-spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. Elde edilen veriler, oluşturulan standart eğriye göre her bir örneğin kuru ağırlığına bölünerek hesaplanan gram başına hidrokisprolin içeriği bakımından karşılaştırılmıştır.

### 3.6.6. RT-PCR Analizi

Doku iskeleleri üzerine ekilen rAdMSC'lerin hizalı topografya ve büyüme faktörü içeren koşullarda tenosit hücrelerine farklılaşması, tendon-spesifik ve tendonla ilişkili gen belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçümü ile kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi incelenmiştir. Bu amaçla belirlenen günlerde doku iskeleleri 2 kez PBS çözeltisi ile yıkanmış ve analiz gününe kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. RT-PCR analizi için ilk aşamada rAdMSC'lerdeki mesajcı RNA (mRNA) izole edilmiş, ikinci aşamada elde edilen mRNA içeriği komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmiş ve üçüncü aşamada ise RT-PCR yapılmıştır.

RNA izolasyonunda, mikromakas yardımıyla küçültülen doku iskeleleri üzerine rAdMSC'lerin lizise uğraması için 500 µL Trizol çözeltisi eklenmiş ve 15-20 s vorteks işlemi uygulanarak 20 dk inkübe edilmiştir. Örnekler 125 µL kloroform eklenerek tüpler çalkalanmış ve 5 dk inkübasyonu takiben 13,000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan RNA-DNA-organik faz ayrımının sonucunda en üst tabakadaki RNA içeriği alınmış ve her birine alınan miktar kadar %70 (v/v, RNaz içermeyen su içerisinde) etanol çözeltisi eklenmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen toplam RNA'dan tRNA ve rRNA'nın uzaklaştırılarak mRNA'nın saflaştırılması için RNeasy® Mini Kit (Qiagen, UK) kullanılmış ve üreticinin protokolü uygulanmıştır. Elde edilen mRNA içeriğinin konsantrasyonu ve kalitesi Nanodrop (Thermo scientific 2000c, A.B.D.) cihazı ile ölçülmüştür. İkinci aşama olan cDNA sentezine eşit miktarda mRNA ile başlayabilmek için en düşük konsantrasyondaki gruba göre hesaplama yapılmış ve kullanılan kitin protokolüne göre soğuk koşullarda hazırlanan reaksiyon karışımı ve mRNA içeriği PCR tüplerine alınmıştır.

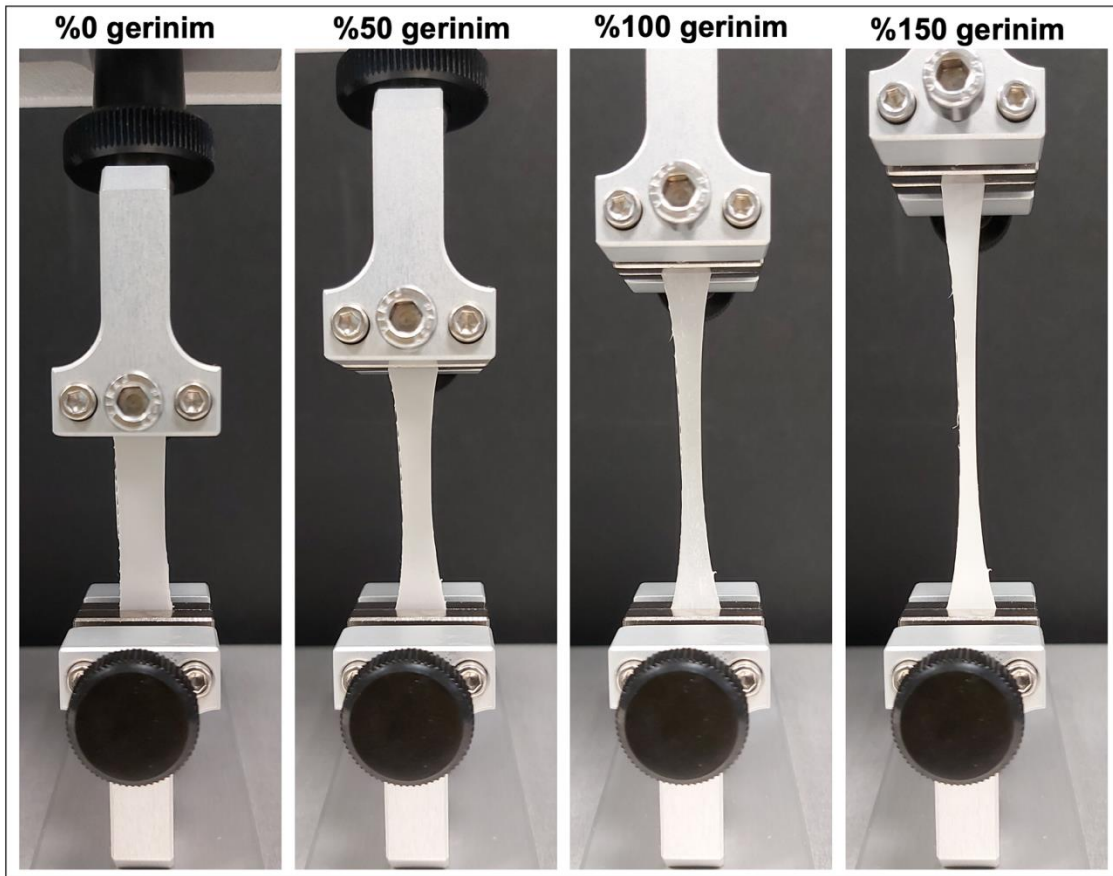
High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kit (Thermo Fischer, A.B.D.) kullanılarak, 25°C'de 10 dk, 40°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk reaksiyon programıyla Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, A.B.D.) cihazında cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA -20°C'de RT-PCR çalışmaları için saklanmıştır. RT-PCR analizinde 5X HotFire Pol® Eva Green® qPCRMix Plus (SolisBioDyne, Estonya) kiti kullanılarak reaksiyon içeriği hazırlanmış ve primer dizileri eklenerek analiz LightCycler® Nano Instrument (Roche, İsviçre) cihazında, denatürasyon basamağı 95°C'de 900 s, uzama basamağı 95°C'de 15 s, primerin yapışma sıcaklığında 20 s ve 72°C'de 20 s olacak şekilde 45 döngü ve son olarak ayrılma basamağı 60°C'de 20 s ve 95°C'de 20 s olacak şekilde uygulanmıştır. Her bir genin ekspresyon seviyesi  $\beta$ -aktin gen seviyesine göre standardize edilmiştir. Elde edilen verilerde her iki doku iskelesinin de besi ortamında kültüre edilen grubunun 7. gün örnekleri kontrol olarak alınmış ve elde edilen sonuçlar  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak kontrol grubunun katları şeklinde verilmiştir. RT-PCR analizi ile incelenen genler ve primer dizilimleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Gerçek zamanlı-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer	Primer baz dizisi (5' - 3')		
Collagen Tip I $\alpha$ -1	COL1A1	Forward	CCCAGCGGTGGTTATGACTT
		Reverse	AACGGCCACCATCTTGAGAC
Collagen Tip III $\alpha$ -1	COL3A1	Forward	AGTGGCCATAATGGGGAACG
		Reverse	CAGGGTTTCCATCCCTTCCG
Tenascin	TNC	Forward	CGCAAAAATGGACGTGAGGA
		Reverse	AGGTTATCCAGTCCAAGCCAG
Scleraksis	SCX	Forward	AGAACACCCAGCCCAAACAG
		Reverse	TGTCACGGTCTTTGCTCAACT
Tenomodulin	TNMD	Forward	ATGGGTGGTCCCACAAGTGAA
		Reverse	CTCTCATCCAGCATGGGATCAA
Peroxisom Çoğaltıcı- Aktive Edici Reseptör $\gamma$	PPAR $\gamma$	Forward	AACTCTGGGAGATCCTCCTGT
		Reverse	CTTGTGAAGTGCTCATAGGCAG
$\beta$ -aktin	$\beta$ -aktin	Forward	AGCAAGCAGGAGTACGATGAG
		Reverse	AAAGGGTGTAACGCAGCTC

### 3.6.7. Mekanik Analiz

Statik hücre kültürü sonunda (21. gün) kültür süresince bozunma ve hücre çoğalmasına bağlı olarak değişen mekanik özellikler çekme testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, kültür sonunda  $1\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$  boyutlarındaki doku iskeleleri üzerindeki fazla ortam filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve ıslak halde doku iskeleleri kopana kadar analiz devam ettirilmiştir (Şekil 3.2.). Analiz için 3.4.5. *Mekanik özelliklerin karakterizasyonu* bölümündeki koşullar uygulanarak 0.05 mm/s hızla analiz gerçekleştirilmiş ve her bir grup 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 3. 2. Mekanik özelliklerin belirlendiği çekme analizinde farklı gerinim değerlerindeki nanofibröz matrisler.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, A.B.D.) programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Her bir deney için veriler ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve  $p$ -değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında çalışmalar, (1) SF/P3HB nanofibröz matrikslerin optimizasyonu, fabrikasyonu ve karakterizasyonu, (2) SF/P3HB nanofibröz matrikslerin rAdMSC hücreleri ile statik hücre kültür çalışmaları ve (3) SF/P3HB nanofibröz matrikslerin rAdMSC hücreleri ile çekme biyoreaktörü ortamında dinamik hücre kültür çalışmaları olmak üzere 3 aşamada tez çalışması planlanmış fakat dinamik hücre kültür çalışmalarında yaşanan olumsuzluklar nedeniyle tezin ilk 2 aşamasının SF/PBAT nanofibröz matriksler için de tekrarlanarak, iki farklı biyomalzemenin birçok açıdan kıyaslanarak tendon doku mühendisliğinde kullanımı araştırılmıştır. Yürütülen deneyler farklı aşamalarda yapılmış olsa da elde edilen verilerin yorumlanması açısından tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtildiği gibi 3 ana başlıkta incelenmiştir:

- (1) SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Üretimi
- (2) SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Karakterizasyonu
- (3) Hücre Kültür Çalışmaları

### 4.1. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrikslerin Üretimi

Günümüze kadar yapılan tendon rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, yeni tendon dokusu oluşumunu indükleyici işlevi olan ve aynı zamanda mekanik dayanımı yüksek ideal doku iskelesi üretiminde halen sıkıntılar bulunmaktadır. Bu nedenle, tendon doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak uygun doku iskelelerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Doku iskelelerinde kullanılacak malzeme çeşidi, malzeme topografyası, malzeme-hücre etkileşimleri, hücre kaynakları gibi parametreler tendon doku rejenerasyonu için oldukça önemlidir. Hizalı nano-boyutta kolajen tip I fiberlerden oluşan doğal tendon dokusunu en iyi şekilde taklit edebilmek için tez çalışmasında hizalı topografyaya sahip nanofibröz matriksler üretilmesi planlanmıştır. Hizalı nanofiberlerin elde edilmesi için en optimal, verimli ve pratik yöntem olan elektroçirme ile fabrikasyon yöntemi kullanılırken, elde edilen nanofiberlerin belirli çap dağılımında olması hedeflenmiştir.



Doğal bir biyopolimer olan ipek fibroin yüksek biyoaktivite göstermesi ve kolajene göre daha kararlı yapıda olması nedeniyle tercih edilirken, tendon yaması olarak kullanımda yetersiz kalan mekanik özellikleri P3HB ve PBAT polimerleriyle katkılanarak iyileştirilmek istenmiştir. Bu aşamada katkılama oranları ve istenen topografya ve çap dağılımında nanofiberlerin elde edilmesi amacıyla RSM ile optimizasyon yapılmıştır. Literatür incelendiğinde, doku mühendisliği çalışmalarında SF/P3HB veya SF/PBAT formülasyonlarının daha önce çalışılmadığı ve bu nedenle tez kapsamında hazırlanan nanofibröz matrislerin her anlamda özgün olduğu görülmüştür.

#### **4.1.1. SF/P3HB Nanofiber Optimizasyonu**

Elektroeğirme yöntemiyle SF/P3HB nanofiber üretimi için P3HB polimeri ve 3.2.1. *SF İzolasyonu* kısmında detaylıca anlatıldığı şekliyle sünger formundaki SF polimeri HFIP çözücüsü içerisinde, 3 gün boyunca oda sıcaklığında 500 rpm'de karıştırılarak çözdürülmüştür. Yapılan ön çalışmalar doğrultusunda SF'nin P3HB'e göre oranı, toplayıcı dönüş hızı, iğne ucu-toplayıcı arası mesafe gibi parametreler sabit tutulmuştur. Buna göre SF:P3HB oranı 3:1, toplayıcı dönüş hızı 2,000 rpm ve toplayıcı uzaklığı 25 cm olarak ayarlanmıştır. Ayrıca, optimize edilecek olan toplam polimer konsantrasyonu, akış hızı ve voltaj parametreleri için uygun çalışma aralıkları belirlenmiştir. Toplam polimer konsantrasyonu %2 - %6 (w/v) arasında, akış hızı 1 mL/sa - 2 mL/sa arasında ve voltaj 15 kV – 19 kV arasında tutularak istenen fiber çapı olan 700 nm civarındaki nanofiberlerin elde edilmesi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu koşulu sağlamak için elektroeğirme çalışmalarında etkin bir optimizasyon yöntemi olan RSM kullanılmıştır. Bu yöntemde optimizasyon işlemi 3 faktörlü ve 3 seviyeli BBD deseni ile gerçekleştirilmiştir. Optimize edilecek üç faktör polimer konsantrasyonu, akış hızı ve voltaj olarak belirlenirken, üç seviye ise bu faktörlere ilişkin en yüksek, orta ve en düşük değerlerdir ve bu değerler Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 1. RSM ile SF/P3HB nanofiber optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve her bir değişkene ait sınır değerleri.

Faktör	Adı	Birimi	Düşük değer	Orta değer	Yüksek değer
A	Konsantrasyon	% (w/v)	2	4	6
B	Akış Hızı	mL/sa	1	1.5	2
C	Voltaj	kV	15	17	19

RSM için oluşturulan üç faktöre ait sınır uzay verileri Design-Expert programına girilmiş ve program tarafından oluşturulan deneme seti ve deney sonuçları ise Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Sistem yanıtı olan nanofiber çapı ise, her bir deneme setinden toplanan örneklerin SEM analiziyle elde edilen görüntülerinden ImageJ programı kullanılarak ortalama fiber çaplarının ölçülmesi ile bulunmuştur. Her bir ortalama fiber çap değeri en az 200 nanofiber üzerinden belirlenmiştir.

Çizelge 4. 2. SF/P3HB nanofiber optimizasyonu için oluşturulan deneme seti ve üç faktöre karşı sistem yanıtları.

Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Sistem Yanıtı
A: Konsantrasyon (% w/v)	B: Akış Hızı (mL/sa)	C: Voltaj (kV)	Y: Fiber Çapı (nm)
2	1.5	17	411
4	1.5	15	507
2	2	15	459
6	2	15	1630
2	1	19	298
6	1.5	17	938
4	1.5	17	526
2	2	19	491
4	1	17	478
4	1.5	17	518
4	1.5	19	543
6	1	15	714
6	2	19	1,595
2	1	15	398
4	1.5	17	523
6	1	19	769
4	2	17	676

Her bir deneme seti için bulunan sistem yanıtı (ortalama fiber çapı) tekrar programa girilerek elektroöğirme sistemi modellenmiştir. Elde edilen modelin anlamlılığı ANOVA analizi ile incelenmiş ve  $p$  değerinin 0.05'ten küçük olduğu parametreler anlamlı olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.3.). ANOVA analizinde modele ait  $p$  değerinin ( $p=0.0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı olması nedeniyle oluşturulan model geçerlidir. Bunun yanında, modele ait determinasyon katsayısı ( $R^2=0.9714$ ) ve düzeltilmiş determinasyon katsayısı (adjusted  $R^2=0.9347$ ) değerlerinin hem yüksek hem de birbirlerine yakın olması modelin doğruluğunu ifade etmektedir. Sistem yanıtının tahminlenmesinde modelin işlevselliğini belirten tahminlenmiş determinasyon katsayısı (predicted  $R^2=0.8290$ ) ise benzer şekilde elde edilen modelin öngörü için kullanılabilirliğini göstermektedir. RSM ile oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendikten sonra her bir parametrenin  $p$  değerleri incelenmiş ve ANOVA tablosunda (\*) ile işaretlenmiştir. Sistem üzerinde etkisi olduğu belirlenen parametreler üzerinden kuadratik modele ait 2. dereceden polinomial denklem kodlu ve gerçek değerler üzerinden aşağıda verilmiştir.

- SF/P3HB nanofiber optimizasyonuna ait kodlu değerlerden oluşan kuadratik model denklem;

$$\mathbf{Fiber\ Çapı} = 538.71 + 358.90 A + 219.40 B + 186.00 AB + 231.59 A^2$$

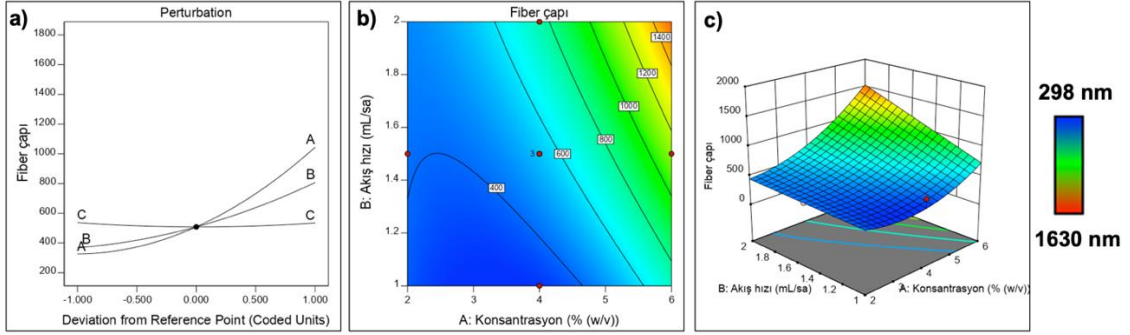
- SF/P3HB nanofiber optimizasyonuna ait gerçek değerlerden oluşan kuadratik model denklem;

$$\mathbf{Fiber\ Çapı} = 1205.05 - 562.72 \text{ Konsantrasyon} - 305.20 \text{ Akış Hızı} + 186.00 \text{ Konsantrasyon} \times \text{ Akış Hızı} + 57.89 \text{ Konsantrasyon}^2$$

Çizelge 4. 3. SF/P3HB nanofiber çapının optimizasyonu için oluşturulan modele ait ANOVA analiz sonuçları.

	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	2,294E+09	9	2,549E+08	26.46	0.0001	*
A (konsantrasyon)	1,288E+09	1	1,288E+09	133.73	< 0.0001	*
B (akış hızı)	4,814E+08	1	4,814E+08	49.97	0.0002	*
C (voltaj)	14.40	1	14.40	0.0015	0.9702	
AB	2,768E+08	1	2,768E+08	28.73	0.0011	*
AC	968.00	1	968.00	0.1005	0.7605	
BC	220.50	1	220.50	0.0229	0.8840	
A <sup>2</sup>	83731.15	1	83731.15	8.69	0.0215	*
B <sup>2</sup>	16840.63	1	16840.63	1.75	0.2276	
C <sup>2</sup>	1994.14	1	1994.14	0.2070	0.6629	
Residual	67424.97	7	9632.14			
Lack of Fit	67392.30	5	13478.46	825.21	0.0012	*
Pure Error	32.67	2	16.33			

ANOVA analizine göre voltaj parametresinin  $p$  değeri 0.05'ten büyük olduğu için fiber çapı üzerinde etkili bir faktör olarak değerlendirilmemiştir. Bunun yanında konsantrasyon, akış hızı, konsantrasyon  $\times$  akış hızı ve konsantrasyon<sup>2</sup> parametreleri sistem üzerinde etkili bulunmuştur. Yüksek  $F$  ve düşük  $p$  değerine sahip olması nedeniyle konsantrasyon parametresi, sistem üzerinde en büyük etkiyi oluşturan parametre olarak belirlenmiştir. Konsantrasyondan sonra akış hızı da SF/P3HB nanofiber çapı üzerinde olmaktadır. Bunun yanında, Şekil 4.1.a.'da verilen pertürbasyon grafiğinde tasarım parametrelerinin sistem yanıtı üzerindeki etkileri belirlenebilmektedir. Voltaj parametresinin eğri bir fonksiyona sahip olmaması da fiber çapı üzerinde etkili olmadığını ifade etmektedir. Şekil 4.1.b.'de verilen yüzey ve 4.1.c.'de verilen kontur grafiklerinde de istatistiksel olarak anlamlı parametreler olan akış hızı ve konsantrasyonun oluşturulan uzay sınır değerleri arasında fiber çapı üzerine olan etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. SF/P3HB nanofiber optimizasyon modeline ait (a) pertürbasyon, (b) kontur ve (c) 3B yüzey grafikleri.

Sadeleştirilmiş model denkleme göre istenen fiber çapı 700 nm olarak ayarlandığında gerekli olan konsantrasyon ve akış hızı az denemeye ve kolaylıkla tespit edilebilmiştir. İstenen fiber çap değeri olan 700-800 nm aralığına, %5 konsantrasyondaki SF/P3HB (3:1) çözeltisinde ve 1 mL/sa akış hızında ulaşılmıştır. Böylece, oda sıcaklığında ve %35 nem değerlerinde Ne300 cihazında yapılan elektroçirme çalışmasında; polimer konsantrasyonu %5, SF:P3HB oranı 3:1, akış hızı 1 mL/sa, uzaklık 25 cm, döner toplayıcı dönme hızı 2,000 rpm ve uygulanan voltaj 14 kV olarak optimize edilmiştir.

#### 4.1.2. SF/PBAT Nanofiber Optimizasyonu

İpek kozalarından izole edilen SF ve PBAT reçinesi HFIP çözeltisi içerisinde 3 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak çözdürülmüş ve nanofiber eldesi için ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmaların sonunda hizalı nanofiber üretimi için toplayıcı dönüş hızı 2,000 rpm ve iğne ucuyla toplayıcı arasındaki mesafe 25 cm olacak şekilde sabit tutulmuştur. SF/P3HB optimizasyonunda edinilen deneyim sonucunda voltaj, kararlı jet oluşumu olan 16 kV değerinde sabit tutulmuştur. Farklı SF ve PBAT oranlarında, 3.2.2. *Elektroçirme Çözeltilerinin Hazırlanması* kısmında bahsedildiği gibi SF/P3HB karışımındaki problemlerle karşılaşılması için SF ve PBAT oranının da optimize edilmesi gerekmektedir. Böylece, diğer parametreler olan toplam konsantrasyon ve akış hızı da SF:PBAT oranı ile birlikte RSM kullanılarak optimize edilmiştir.

RSM ile SF/PBAT nanofiber çapı optimizasyonunda SF/P3HB optimizasyonunda olduğu gibi 3 faktörlü ve 3 seviyeli BBD deseni kullanılmıştır. Üç faktör için uzay sınır değerleri ise SF miktarı %25 - %75 (w/w, toplam polimer miktarına göre), toplam konsantrasyon %7 - %11 (w/v), akış hızı 0.5 mL/sa – 1.5 mL/sa olarak belirlenmiştir. Nanofiber çap optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlere ilişkin üç seviye Çizelge 4.4.'te özetlenmiştir.

Çizelge 4. 4. RSM ile SF/PBAT nanofiber optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenler ve her bir değişkene ait sınır değerleri.

Faktör	Adı	Birimi	Düşük değer	Orta değer	Yüksek değer
A	SF miktarı	% (w/w)	25	50	75
B	Top. konsantrasyon	% (w/v)	7	11	15
C	Akış Hızı	mL/sa	0.5	1.0	1.5

Sınır koşulları belirlendikten sonra BBD desenine göre oluşturulan deneme setindeki koşullarda elektroçirime çalışmaları yapılmıştır. Her bir deneme setinden alınan örneklerden SEM analizi ile görüntüler elde edilmiş ve ImageJ programı yardımıyla ortalama fiber çapları belirlenmiştir. Oluşturulan deneme seti ve bulunan ortalama fiber çap değerleri Çizelge 4.5.'te detaylı olarak verilmiştir. Deneme setindeki 2 koşulda düzgün morfolojide fiberler elde edilememiş ve bu değerler hariç tutularak modelleme yapılmıştır.

Her bir deneme seti için bulunan sistem yanıtı tekrar programa girilerek elektroçirime sistemi modellenmiştir. Elde edilen kuadratik modelin anlamlılığı ANOVA analizi ile incelenmiş ve  $p$  değerinin 0.05'ten küçük olduğu parametreler anlamlı olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4. 5. SF/PBAT nanofiber optimizasyonu için oluşturulan deneme seti ve üç faktöre karşı sistem yanıtları.

<b>Faktör 1</b>	<b>Faktör 2</b>	<b>Faktör 3</b>	<b>Sistem Yanıtı</b>
A: SF miktarı (%, w/w)	B: Top. Konsantrasyon (%, w/v)	C: Akış Hızı (mL/sa)	Y: Fiber Çapı (nm)
50	7	0.5	0.833
25	11	0.5	0.271
25	15	1.0	-
25	7	1.0	0.471
50	11	1.0	2.514
50	11	1.0	1.864
50	11	1.0	2.054
50	15	0.5	4.285
25	11	1.5	0.307
75	7	1.0	1.784
50	15	1.5	5.551
50	11	1.0	1.937
50	11	1.0	2.14
75	15	1.0	-
50	7	1.5	1.171
75	11	1.5	4.645
75	11	0.5	2.267

ANOVA analizinde modele ait p değerinin ( $p=0.0002$ ) istatistiksel olarak anlamlı olması nedeniyle oluşturulan model geçerlidir. Ayrıca, modelin uygunsuzluğunu belirten “lack of fit” değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmayışı da modelin geçerliliğini göstermektedir. Bunun yanında, modele ait determinasyon katsayısı ( $R^2=0.9904$ ) ve düzeltilmiş determinasyon katsayısı (adjusted  $R^2=0.9730$ ) değerlerinin hem yüksek hem de birbirlerine yakın olması modelin doğruluğunu ifade etmektedir. RSM ile oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendikten sonra her bir parametrenin  $p$  değerleri incelenmiş ve (\*) ile işaretlenmiştir.

Sistem üzerinde etkisi olduğu belirlenen parametreler üzerinden kuadratik modele ait 2. dereceden polinomiyal denklem kodlu ve gerçek değerler olmak üzere aşağıda verilmiştir.

- SF/PBAT nanofiber optimizasyonuna ait kodlu değerlerden oluşan kuadratik model denklem;

$$\mathbf{Fiber\ Çapı} = + 2.10 + 1.58 A + 1.96 B + 0.50 C + 0.93 AB + 0.58 AC + 1.03 B^2$$

- SF/PBAT nanofiber optimizasyonuna ait gerçek değerlerden oluşan kuadratik model denklem;

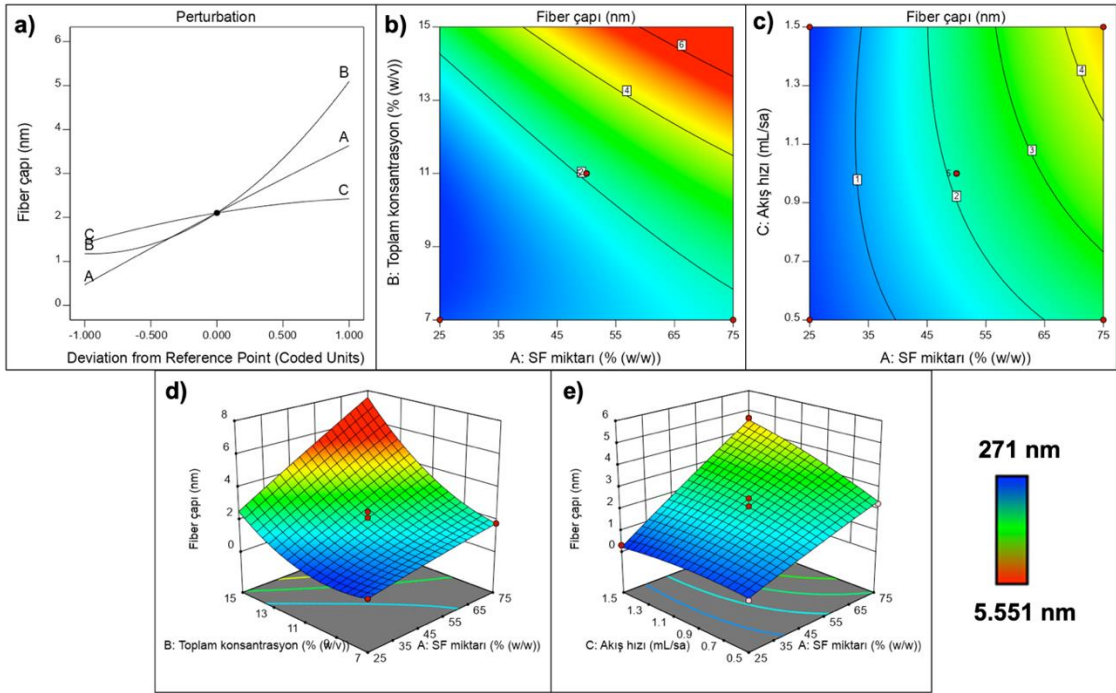
$$\mathbf{Fiber\ Çapı} = +8.17 - 0.08 SF\ miktarı - 1.51 Toplam\ konsantrasyon - 1.19 Akış\ hızı + 0.01 SF\ miktarı \times Toplam\ konsantrasyon + 0.05 SF\ miktarı \times Akış\ hızı + 0.06 Toplam\ konsantrasyon^2$$

Çizelge 4. 6. SF/PBAT nanofiber çapının optimizasyonu için oluşturulan modele ait ANOVA analiz sonuçları.

	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri	
<b>Model</b>	34.86	9	3.87	57.07	0.0002	*
A-SF miktarı	10.03	1	10.03	147.77	< 0.0001	*
B-Toplam konsantrasyon	15.34	1	15.34	225.93	< 0.0001	*
C-Akış hızı	2.02	1	2.02	29.73	0.0028	*
AB	1.15	1	1.15	16.88	0.0093	*
AC	1.37	1	1.37	20.20	0.0064	*
BC	0.2153	1	0.2153	3.17	0.1350	
A <sup>2</sup>	0.0074	1	0.0074	0.1095	0.7542	
B <sup>2</sup>	2.96	1	2.96	43.59	0.0012	*
C <sup>2</sup>	0.0868	1	0.0868	1.28	0.3094	
<b>Residual</b>	0.3394	5	0.0679			
Lack of Fit	0.0820	1	0.0820	1.27	0.3220	
Pure Error	0.2574	4	0.0643			



ANOVA analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olan parametreler SF miktarı, toplam konsantrasyon, akış hızı, SF miktarı  $\times$  toplam konsantrasyon, SF miktarı  $\times$  akış hızı ve toplam konsantrasyon<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. Hem kodlu model denklem katsayılarından hem de Şekil 4.2.a.'da verilen pertürbasyon grafiğinden sistem yanıtı üzerinde en etkiliden en zayıf etkiye göre parametrelerin sıralaması, toplam konsantrasyon>SF miktarı>akış hızı şeklindedir. ANOVA tablosunda AB ve AC parametreleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve sistem yanıtı olan fiber çapı üzerine etkileri Şekil 4.2.b ve 4.2.c.'de kontur grafiği, Şekil 4.2.d. ve 4.2.e'de 3B yüzey grafiği olarak verilmiştir. BC parametresi fiber çapını etkilemediği için detaylandırılmamıştır.



Şekil 4. 2. SF/PBAT nanofiber optimizasyon modeline ait (a) pertürbasyon, (b, c) kontur ve (d, e) 3B yüzey grafikleri.

RSM ile optimizasyonda, elektroçirme sisteminin modellenmesi tamamlandıktan sonra oluşturulan uzay içerisinde belirli bir noktanın tahminlenmesi yapılabilmektedir. İstenen fiber çapı 700 nm civarında olduğu için bu sistem yanıtını sağlayan koşullar yine istenen parametre değerleri doğrultusunda belirlenebilmektedir.

Akış hızı 1.0 mL/sa olacak şekilde seçim yapıldığında, SF miktarı %35 (w/w) ve toplam konsantrasyon %7.6 (w/v) olarak bulunmuştur. Özet olarak ortalama 700 nm çapa sahip SF/PBAT nanofiber üretim koşulları; oda sıcaklığı ve %35 nem ortamında, iğne ucu-toplayıcı arası mesafe 25 cm ve toplayıcı dönüş hızı 2,000 rpm olarak sabit tutulduğunda, akış hızı 1.0 mL/sa, SF:PBAT oranı 35:65 ve toplam polimer konsantrasyonu %7.6 (w/v, HFIP içerisinde) olarak optimize edilmiştir.

#### **4.2. SF/P3HB ve SF/PBAT Nanofibröz Matrislerin Karakterizasyonu**

Belirlenen çap değerine sahip olacak şekilde optimizasyonu yapılan SF/P3HB ve SF/PBAT nanofiberlerden oluşan matrislerin tendon rejenerasyonunda yama olarak kullanımı hedeflenmiştir. Bu nedenle, yaklaşık 100 µm kalınlıkta üretilen nanofibröz matrisler karakterizasyon ve hücre kültür çalışmalarında kullanılmak için yeterli olmaktadır. Her iki elektroçirme prosesinde de akış hızı ve uzaklık değerleri aynı olduğundan nanofiberlerin döner toplayıcı üzerinde toplanma süresi eşit ve 15 saat olarak belirlenmiştir. İpek böceğinden elde edilen ipek fiberleri, içeriğindeki serisin proteini ve β-tabaka yapısı sayesinde hidrofobik özellikte olup suda çözünmemekte ve yavaş biyobozunma göstermektedir. Serisinden uzaklaştırılan ipek fibroin proteini ise amorf bölgelerin çokluğu sebebiyle sulu ortamda hızlıca bozunmakta ve bu nedenle biyomateryal olarak kullanılacağı durumlarda β-tabaka yapısının indüklenmesi ve/veya yüksek molekül ağırlıklı, kristalinitesi yüksek başka bir polimerle karışımlarının oluşturulması gerekmektedir.

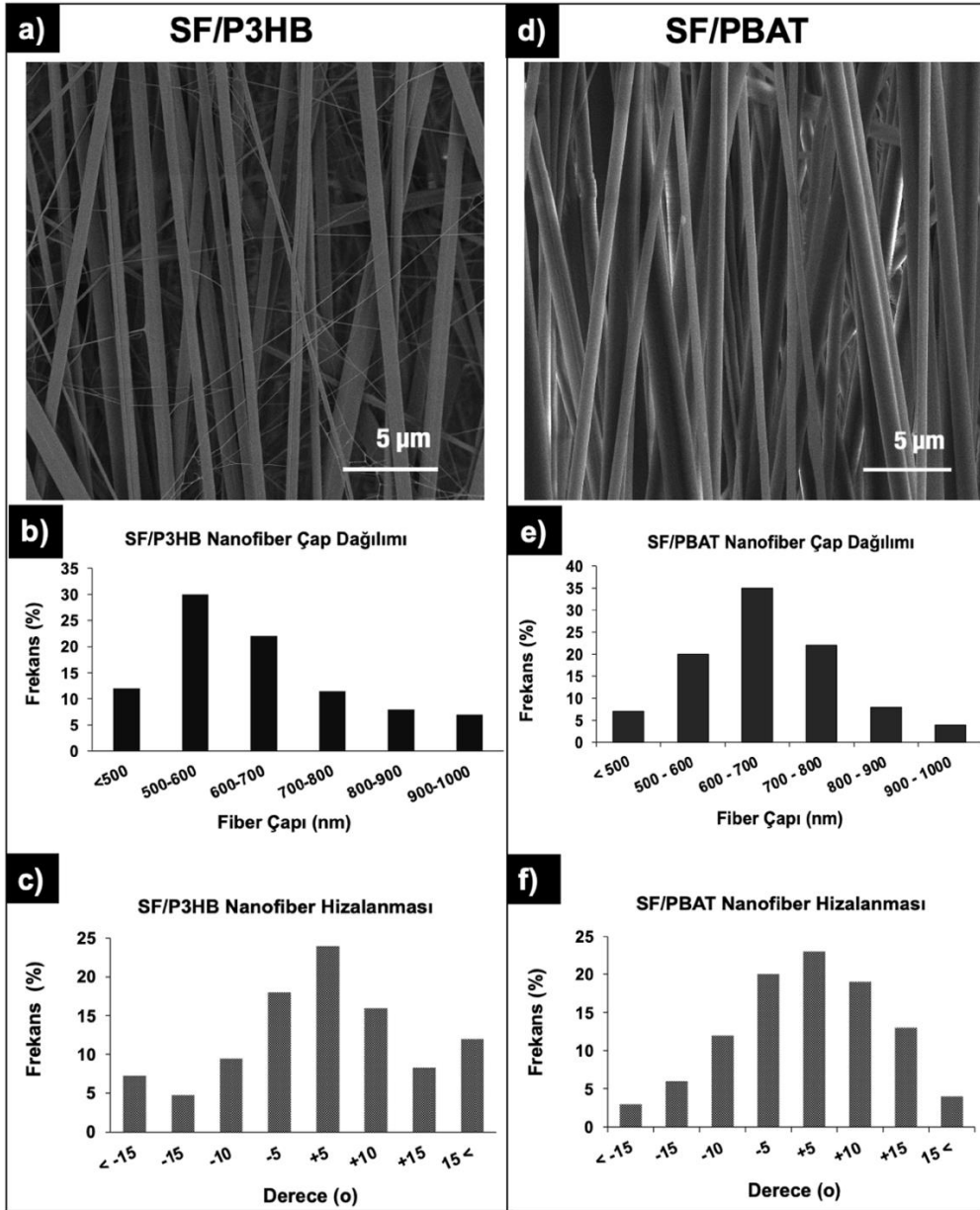
İzole edilen SF ile hazırlanan nanofibröz matrisler stabilizasyon adı verilen işleme tabi tutulmuş ve böylece SF'deki α-heliks kısımlar β-tabaka yapısına çevrilmiştir. Stabilizasyon işlemi için SF/P3HB ve SF/PBAT matrisler 1 sa boyunca %90 metanol (v/v) çözeltisinde bekletilmiş ve 1 gece boyunca çeker ocağa kurumaya bırakılmıştır. Stabilize edilen örnekler S-SF/P3HB ve S-SF/PBAT olarak isimlendirilmiştir.

Bunun yanında malzemeler için uygun sterilizasyon metodunun belirlenebilmesi amacıyla sadece S-SF/P3HB matriksler ile çalışılmış ve otoklav (A-SF/P3HB) ve etilen oksit (EO- SF/P3HB) olmak üzere 2 farklı sterilizasyon yöntemi denenmiştir. Stabilizasyonu yapılan nanofibröz matriksler, otoklav yönteminde 121°C'de 30 dk boyunca otoklavlanmış etilen oksit yönteminde ise 8 sa boyunca etilen oksit gazına maruz bırakılmış ve sonrasında 10 gün boyunca havalandırılmıştır. S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerde ise bu sterilizasyon yöntemleri uygulanmamıştır.

#### **4.2.1. Yüzey Karakterizasyonu**

Optimizasyonu ve fabrikasyonu tamamlanan SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerdeki fiber morfolojisinin incelenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. SEM analizinde, 10,000X büyütmede elde edilen görüntüler Şekil 4.3.a ve 4.3.d.'de verilmiştir. Her iki doku iskelesinde de belirli yönde hizalı, boncuk içermeyen, pürüzsüz yüzeye sahip nanofiberler elde edilmiştir. Bunun yanında, SF/P3HB nanofiberlere ait görüntülerde üretim esnasında voltaj yüksekliğinden meydana geldiği düşünülen oldukça ince, 100 nm çap değerinin altında fiberler de görülmüştür. SEM analizinde elde edilen görüntüler ImageJ programı ile analiz edilmiş ve en az 200 nanofiber üzerinden fiber çap dağılımı ve fiber hizalanması hesaplanmış ve yüzde değer üzerinden yorumlanmıştır. SF/P3HB nanofibröz matrikslere ait ortalama çap değeri  $699 \pm 203$  nm olarak bulunmuştur. SF/P3HB nanofiber çap dağılım grafiği incelendiğinde fiberlerin %70'inin 500-800 nm aralığında olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.b.). Bunun yanında, tendon rejenerasyonunda hizalı topografya hem mekanik dayanımın artması hem de kök hücrelerin tenojenik farklılaşması için önem arz ettiğinden fiber hizalanması da incelenmiştir. Fiberlerin döner toplayıcı üzerine sarıldığı eksen  $0^\circ$  olarak kabul edilirken, fiber hizalanma yönündeki sapma açıları sola (-) ve sağa (+) doğru olarak şekilde hesaplanmıştır. Buna göre, SF/P3HB nanofiberlerin %68'i  $\pm 10^\circ$ , %81'i  $\pm 15^\circ$  aralığında bir hizalanma göstermiştir (Şekil 4.3.c.).

Yapılan ölçümler sonucunda, SF/PBAT nanofiberlerin ortalama çap değeri  $677 \pm 137$  nm olarak bulunurken, çap dağılımına göre fiberlerin %75'i 500 – 800 nm aralığındadır (Şekil 4.3.e.). Ayrıca fiberlerin %74'ünün  $\pm 10^\circ$ , %90'ının  $\pm 15^\circ$  aralığında hizalandığı belirlenmiştir (Şekil 4.3.f.). Çap dağılımı ve hizalanma sonuçlarının yanında elektroçizme prosesi de göz önüne alındığında SF/PBAT nanofiber fabrikasyonunun SF/P3HB'e göre daha verimli olduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 3. Optimize edilmiş SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait (a, d) SEM görüntüleri (10 kX büyütme), (b, e) nanofiber çap dağılım grafikleri ve (c, f) nanofiber hizalanma grafikleri.

Elektroeğirme ile üretilen nanofibröz matrikslerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda kullanılabilmesi için metanol ile stabilizasyonu yapılmıştır. Bunun yanında P3HB içeren ve stabilizasyonu yapılmış matrikslere ek olarak etilen oksit ve otoklav yöntemiyle sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Nanofibröz matrikslere yapılan bu muamelelerin doku iskelesinin ıslatılabilirliğinde oluşturduğu etkiyi belirlemek amacıyla su temas açısı ölçümü yapılmıştır. Toplamda 10 farklı kuru bölgeden durgun damla yöntemiyle yapılan analizde, hem 0. s hem de 60. s' de bırakılan su damlası ile yüzey arasındaki açı ölçülmüştür (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4. 7. Farklı işlemlerin uygulandığı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait su temas açısı ölçümleri.

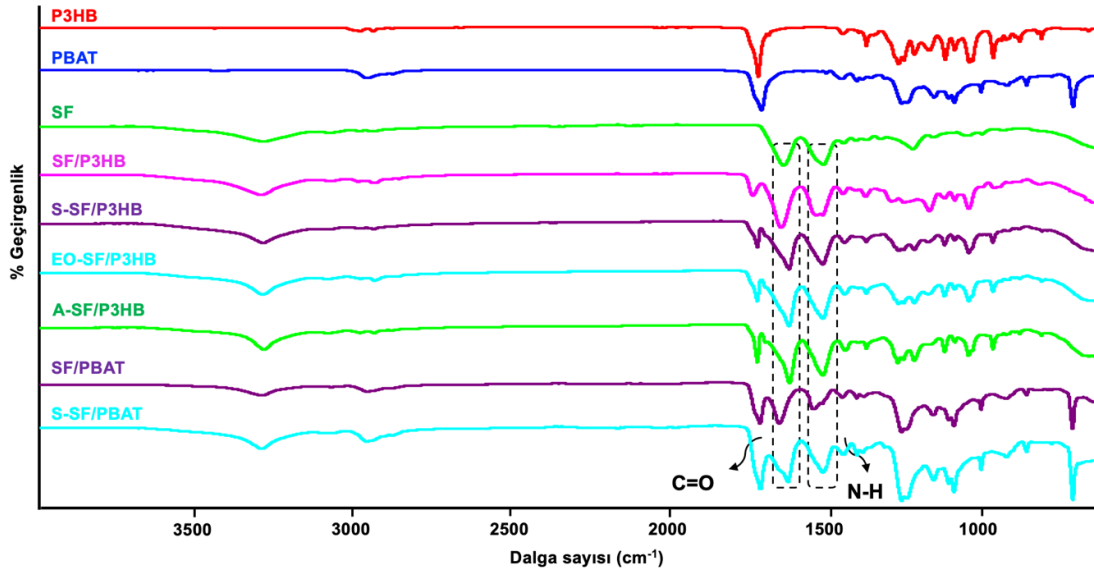
	0. s (°)	60. s (°)
SF/P3HB	114 ± 11	78 ± 16
S-SF/P3HB	115 ± 9	113 ± 10
EO-SF/P3HB	122 ± 6	122 ± 6
A-SF/P3HB	98 ± 11	97 ± 12
SF/PBAT	116 ± 4	116 ± 4
S-SF/PBAT	114 ± 8	114 ± 7

Su temas açısı sonuçları incelendiğinde SF/P3HB örneği hariç, 0. ve 60. s zaman aralıklarında su temas açısının değişmediği, yüzeye bırakılan damlanın malzeme tarafından absorblanmadığı belirlenmiştir. Metanol ile işlem görmüş doku iskelelerinde geri dönüşümsüz olarak yapıdaki su tutan kısım olan heliks yapısı tabaka yapısına indüklendiğinden dolayı ıslatılabilirlik azalmış ve su temas açısında artış görülmüştür. Bunun yanında, stabilizasyon yapılmamış SF/P3HB ve SF/PBAT doku iskelelerinin 60. s' deki (78 ± 16 ve 116 ± 4, sırasıyla) su temas açıları arasındaki farkın nedeni polimer karışımındaki SF oranı ile ilişkilidir ve yapıdaki SF miktarı arttıkça yüzey gerilimi azalmakta ve yapı daha hidrofilik hale gelmektedir.

SF/P3HB doku iskelelerindeki SF oranı toplam polimer miktarına oranla %75 iken, SF/PBAT matrikslerde %35'tir. Ayrıca, hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan stabilize doku iskelelerinde zamana bağlı olarak su temas açısının değişmemesi topografyayla da ilişkilidir. Düz toplayıcıya toplanan düzensiz fiber morfolojisindeki matrikslerde gözenekler orantısız ve daha büyük olduğu için yüzeye bırakılan su damlasının malzeme içerisinde izleyeceği dolanıklık düşükken, hizalı topografyada dolanıklık artmakta ve böylece su temas açısının azalması için gerekli süre artmaktadır. Su temas açısı 90°'den büyük olan biyomateryaller hidrofobik olarak nitelendirilirken tez çalışmasında kullanılan SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin tüm varyasyonları hidrofobik özellik göstermektedir.

#### 4.2.2. Kimyasal Karakterizasyon

Nanofibröz matrikslerin ve bu matrikslere uygulanan stabilizasyon ve sterilizasyon işlemlerinin kimyasal yapıya olan etkisi ATR tekniği kullanılarak FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumu ve kullanılan polimerlere ait karakteristik piklerin ifadeleri Şekil 4.4.'te verilmiştir. P3HB polimerine ait spesifik absorpsiyon pikleri  $2970\text{ cm}^{-1}$ ,  $2931\text{ cm}^{-1}$ ,  $1719\text{ cm}^{-1}$ ,  $1452\text{ cm}^{-1}$ ,  $1379\text{ cm}^{-1}$ ,  $1277\text{ cm}^{-1}$  dalga sayılarında gözlemlenmiştir [48, 148-150]. Literatürde SF proteininin ikincil yapılarına ait spesifik pikler  $\beta$ -tabaka için  $1625\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1515\text{--}1525\text{ cm}^{-1}$  ve  $1265\text{ cm}^{-1}$ ;  $\alpha$ -heliks için  $1650\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ ,  $1545\text{ cm}^{-1}$  ve  $1240\text{ cm}^{-1}$ ; düzensiz sarmal (random coil) için  $1640\text{--}1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1535\text{--}1545\text{ cm}^{-1}$  ve  $1235\text{ cm}^{-1}$  olarak bildirilmiştir [151]. Kullanılan ipek kaynağı, izolasyon protokolü gibi etkenlere bağlı olarak bantlarda kayma olabilmektedir. Tez çalışması kapsamında izole edilen SF'e ait karakteristik pikler  $1636\text{ cm}^{-1}$  (Amid I),  $1514\text{ cm}^{-1}$  (Amid II) ve  $1233\text{ cm}^{-1}$  (Amid III) dalga sayısında belirlenmiştir. PBAT polimerine ait spesifik pikler literatürle uyumlu olarak  $2953\text{ cm}^{-1}$ ,  $1709\text{ cm}^{-1}$ ,  $1267\text{ cm}^{-1}$  (aromatik kısım) ve  $1165\text{ cm}^{-1}$  (alifatik kısım) dalga sayısında tespit edilmiştir [152]. SF/P3HB nanofibröz matrikslerde SF ve P3HB polimerlerinin yapıya katılımı  $3289\text{ cm}^{-1}$  (SF),  $2932\text{ cm}^{-1}$  (P3HB),  $1736\text{ cm}^{-1}$  (P3HB),  $1651\text{ cm}^{-1}$  (SF),  $1538\text{ cm}^{-1}$  (SF),  $1453\text{ cm}^{-1}$  (P3HB) ve  $1381\text{ cm}^{-1}$  (P3HB) dalga sayılarındaki piklerden tayin edilmiştir.



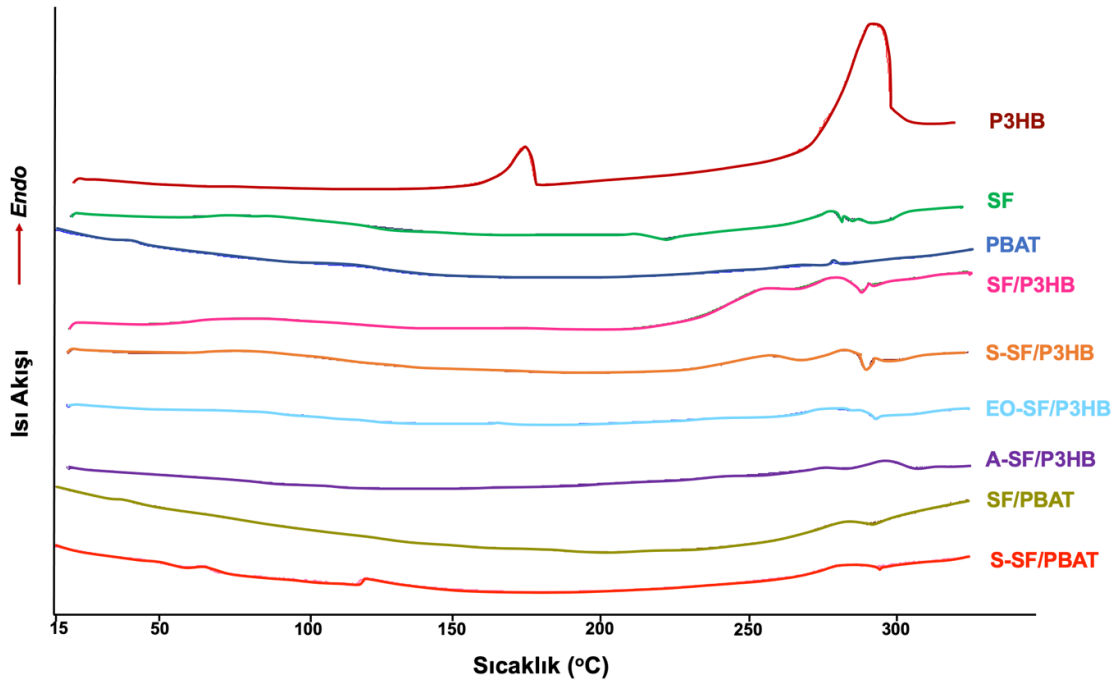
P3HB		SF	PBAT	
1719 $cm^{-1}$	Karbonil grupların C=O gerilimi	3281 $cm^{-1}$	N-H gerilimi	
1452 $cm^{-1}$	Asimetrik $CH_3$ grupların C-H deformasyonu	1636 $cm^{-1}$	C=O gerilimi (Amid I)	
1379 $cm^{-1}$	Simetrik $CH_3$ grupların C-H deformasyonu	1514 $cm^{-1}$	N-H bükülmesi (Amid II)	
1277 $cm^{-1}$	C-O-C gerilimi	1233 $cm^{-1}$	C-N gerilimi (Amid III)	
			2953 $cm^{-1}$	C-H gerilimi
			1709 $cm^{-1}$	Karbonil grupların C=O gerilimi
			1267 $cm^{-1}$	Aromatik ester O=C-O-C gerilimi
			1167 $cm^{-1}$	Alifatik ester O=C-O-C gerilimi

Şekil 4. 4. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait ATR-FTIR spektrumu.

P3HB polimerine ait piklerin düşük geçirgenlik göstermesi polimer karışımındaki P3HB oranından kaynaklanmaktadır. SF/PBAT nanofibröz matrikslerde ise SF ve PBAT polimerlerinin varlığı 3289  $cm^{-1}$  (PBAT), 2955  $cm^{-1}$  (SF), 1714  $cm^{-1}$  (PBAT), 1653  $cm^{-1}$  (SF), 1545  $cm^{-1}$  (SF) dalga sayısındaki karakteristik piklerden belirlenmiştir. Elektroçirme sonrası  $\beta$ -tabaka yapısının artırılması için metanolla stabilizasyon uygulanan S-SF/P3HB ve S-SF/PBAT matrikslerde stabilizasyona bağlı olarak, 1651  $cm^{-1}$  ( $\alpha$ -heliks) dalga sayısındaki  $\beta$ -katlanmayı ifade eden pik 1623  $cm^{-1}$  ( $\beta$ -tabaka) dalga sayısına ve 1538  $cm^{-1}$ 'deki (düzensiz sarmal) pik 1515  $cm^{-1}$  ( $\beta$ -tabaka) dalga sayısına kaymıştır. A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB matrikslerin FTIR spektrumunda ise S-SF/P3HB'e göre farklılık belirlenmemiş ve böylece sterilizasyon işlemlerinin malzemenin kimyasal yapısında değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

### 4.2.3. Termal Karakterizasyon

Nanofibröz matrikslerin ve uygulanan stabilizasyon ve sterilizasyon işlemlerinin termal özelliklerde oluşturduğu değişim DSC ve TG analizleri ile karakterize edilmiştir. Bu kapsamda P3HB ve PBAT reçineleri, liyofilize SF ve polimer karışımlarından elde edilen nanofibröz matrikslerin termal geçiş sıcaklıkları incelenmiş ve DSC termogramları (Şekil 4.5.) ile termal geçiş sıcaklıkları Çizelge 4.8.'de özetlenmiştir.



Şekil 4. 5. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait DSC termogramı.

P3HB reçinesi literatürle uyumlu olarak  $T_m = 174$  °C'de erime ve  $T_d = 292$  °C'de degradasyona ait 2 endotermik pik göstermiştir [149, 153]. Camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) -30 °C olduğu bildirilen PBAT reçinesine ait termogramda sırasıyla 125 °C ve 280 °C olmak üzere  $T_m$  ve  $T_d$  termal geçişleri belirlenmiştir [154]. SF, amid I ve amid II yapısına bağlı olarak birbirine yakın 2 degradasyon sıcaklığına sahiptir [155]. Liyofilize SF numunesinde, 221 °C'de amorf yapıyı ifade eden geniş ekzotermik pik  $T_{dI}$  olarak belirlenirken yapının tamamen degradasyona uğradığı sıcaklık  $T_{dII} = 278$  °C olarak bulunmuştur.



SF liyofilize edilerek kullanılsa da tüm SF içeren yapıların DSC ve TG termogramlarında 60 °C - 120 °C arasında su içeriğine ait geniş pik gözlemlenmiştir [156]. SF/P3HB nanofibröz matrikste SF'e ait  $T_{d1}$  sıcaklığında 236 °C'ye kayma gerçekleşmiş ve bu durum elektroöğirme prosesi sonucunda P3HB ve SF polimer zincirlerinin birbiri içine girip, kristalinite artışına bağlı olarak gerçekleşmiştir [157]. Benzer şekilde stabilizasyon işlemi sonunda kristalin bölgelerin artışına bağlı olarak S-SF/P3HB ve sterilizasyon işlemleri uygulanan EO-SF/P3HB ve A-SF/P3HB örneklerinde  $T_{d1}$  253 °C - 256 °C aralığına kaymıştır. SF/P3HB nanofibröz matriks gruplarının hepsinde oldukça küçük 173 °C - 177 °C aralığında yapıdaki P3HB'nin erimesine bağlı olarak  $T_m$  sıcaklıkları kaydedilmiştir. Özetle, SF polimerinin P3HB ile katkılanması ve stabilizasyon işlemi termal dayanımı artırırken, sterilizasyon işlemlerinin termal özelliklere etkisi bulunmamış ve otoklav yönteminin uygulanabilir güvenli aralıkta olduğu tespit edilmiştir.

SF/PBAT nanofibröz matrikse ait termogram incelendiğinde ise  $T_m = 122$  °C'de erime sıcaklığı kaydedilmiş ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin otoklav gibi termal uygulamalar için uygun olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanında SF'e ait  $T_{d1}$  PBAT'ın da amorf özellikte olmasından dolayı 190 °C'e kaymıştır [154, 156]. Stabilizasyon yapılan S-SF/PBAT nanofibröz matrikste S-SF/P3HB'e benzer şekilde  $\beta$ -tabaka yapısının artışı nedeniyle  $T_{d1}$  sıcaklığı 221 °C'ye yükselmiştir. Tüm polimer reçinelerinde ve nanofibröz matriks gruplarında 278 °C - 297 °C aralığında yapıların dekompozisyona uğradığı  $T_{d1}$  sıcaklıkları kaydedilmiştir. TG analizi sonuçlarında da DSC analizini destekler şekilde, benzer bozunma sıcaklıkları ölçülmüştür. Ayrıca, SF içeren nanofibröz matriks gruplarında 2 aşamalı bozunma gerçekleşmiştir.

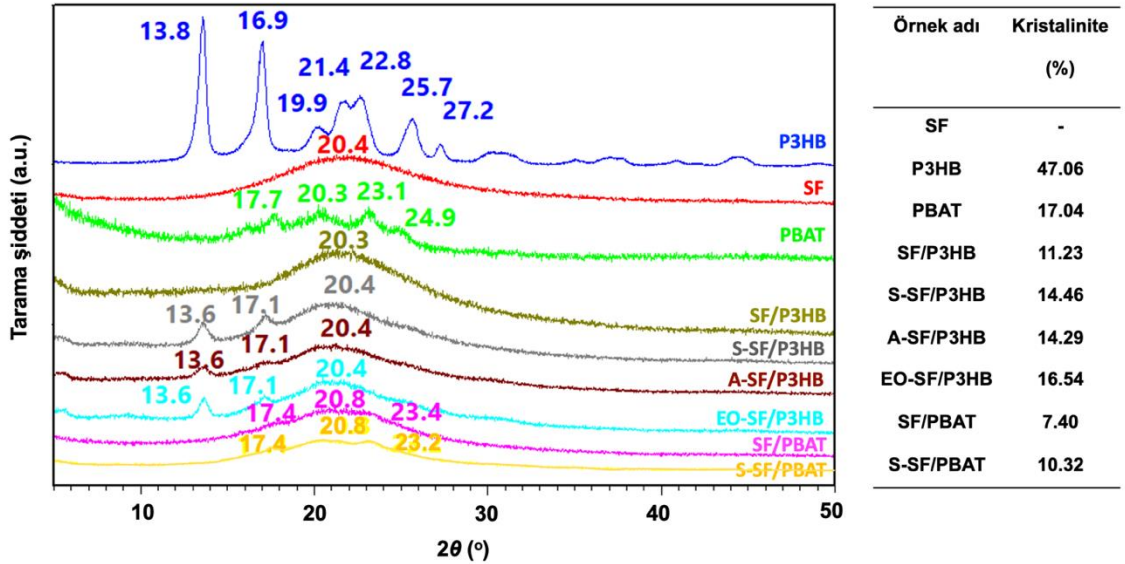
Çizelge 4. 8. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait termal geçiş sıcaklıkları.

Örnek adı	DSC			TG	
	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>d1</sub> (°C)	T <sub>d2</sub> (°C)	Bozunma I (°C)/% kütle kaybı	Bozunma II (°C)/% kütle kaybı
SF	-	221	278	290 / 39	-
P3HB	174	-	292	280 / 97	-
PBAT	125	-	279	398 / 90	-
SF/P3HB	173	236	296	270 / 26	284 / 36
S-SF/P3HB	175	253	290	272 / 27	287 / 37
EO- SF/P3HB	177	256	294	272 / 27	290 / 38
A- SF/P3HB	175	256	297	271 / 29	294 / 37
SF/PBAT	122	190	281	290 / 12	386 / 62
S-SF/PBAT	120	221	280	290 / 12	387 / 60

#### 4.2.4. Kristalografik Karakterizasyon

Nanofibröz matrikslerde fabrikasyon, stabilizasyon ve sterilizasyon işlemlerinin kristalografik özelliklere olan etkisinin belirlenmesi amacıyla 5° – 50° aralığında ve 2°/dk tarama hızında liyofilize SF, P3HB ve PBAT reçineleri ile elektroçürmeyle hazırlanan nanofibröz matrikslere XRD analizi yapılmıştır (Şekil 4.6.). Liyofilize SF örneği, yapıdaki tabaka içeriğinden kaynaklı 2θ = 21.52° etrafında geniş ve tek amorf pik vermiştir. P3HB reçinesi ise 2θ = 13.59° ve 2θ = 17.02° olmak üzere karakteristik 2 güçlü difraksiyon piki ve daha düşük yoğunlukta 2θ (20.15°, 21.49°, 22.70°, 25.59°) pikleri göstermiştir. P3HB'e ait 2θ = 20.15° β-form kristalin yapıyı ifade ederken diğer pikler ise α-form kristalin yapıları göstermektedir [148, 150]. PBAT reçinesinde literatürle uyumlu olarak, 2θ (16.25°, 17.68°, 20.34°, 22.99°, 24.77°) değerlerinde düşük şiddette difraksiyon pikleri belirlenmiştir [158, 159].

SF/P3HB nanofibröz matrikslerde düşük miktarda P3HB içeriğine bağlı olarak SF örneğine benzer bir desen görülürken, amorf olan SF polimeri oldukça kristalin bir polimer olan P3HB'nin kristal örgüsü içine girerek kristal yapısını bozmuştur [148]. Stabilizasyon işlemi uygulanan tüm SF/P3HB matrikslerde (S-SF/P3HB, A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB),  $2\theta$  ( $13.63^\circ$  ve  $17.11^\circ$ ) değerlerinde iki keskin pik ve  $2\theta = 20.26^\circ$  etrafında geniş bir pik gözlenmiştir. Keskin pikler metanolla stabilizasyon sonrası fibroindeki heliks yapısının tabaka yapısına geçişiyle P3HB polimerine ait karakteristik piklerin görünür olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bunun yanında etilen oksit ve otoklav yöntemiyle sterilizasyon işlemlerinin malzemenin kristal özellikleri üzerinde etkisi bulunmamıştır. SF/PBAT nanofibröz matrikslerdeki  $2\theta = 20.8^\circ$ 'deki geniş pik yapıdaki SF etkisini gösterirken,  $2\theta$  ( $17.43^\circ$  ve  $23.48^\circ$ ) pozisyonlarındaki daha düşük şiddetteki pikler PBAT'ın yapıya katıldığını belirtmektedir. Stabilizasyon işlemi uygulanan S-SF/PBAT örneğinde ise SF/PBAT matrikslere benzer şekilde,  $2\theta$  ( $17.39^\circ$ ,  $20.78^\circ$  ve  $23.17^\circ$ ) pozisyonlarında pikler tespit edilmiş ve SF/PBAT'a göre piklerdeki düşük pozisyona kaymalar, metanol uygulamasının etkisiyle PBAT'ın kristalin bölgelerinin daha düzenli hale geçişiyle ilişkilendirilmiştir [159].



Şekil 4. 6. P3HB, SF ve PBAT reçineleri, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler ve stabilizasyon-sterilizasyon uygulanan matrikslere ait XRD spektrumu ve % kristalinite değerleri.

XRD analiz verilerinden HighScore Plus (Malvern Panalytical, İngiltere) yazılımı yardımıyla kristalinite değerleri hesaplanmıştır ve her bir örneğe ait % kristalinite değerleri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Buna göre, P3HB polimeri hariç bütün örneklerin amorf özellik gösterdiği söylenebilmektedir. Liyofilize SF örneğinde kristal yapıyı gösteren pik olmadığı için kristalinite değeri hesaplanamamaktadır. PBAT reçinesinin ise kristalinite değeri %17.04 olarak hesaplanmıştır. P3HB'nin kristalinite değeri %47.06 olarak bulunurken, SF ile karıştırıldığı SF/P3HB matrikslerde kristalinite değeri %11.23 olarak belirlenmiştir. Stabilizasyon işlemi sonrası kristalin bölgelerin artışı nedeniyle S-SF/P3HB matrikslerde kristalinite değeri %14.46'ya yükselmiştir. Bunun yanında, EO-SF/P3HB matrikslerde S-SF/P3HB ve A-SF/P3HB örneklerine kıyasla kristalinite değerinde küçük bir artış belirlenmiş fakat literatürde etilen oksit sterilizasyonunun kristaliniteyi artırmasıyla ilgili yaklaşım bulunmadığından bu artış hata payı olarak ele alınmıştır. SF/PBAT nanofibröz matrikslerde ise kristalinite değeri yapıdaki amorf SF'e bağlı olarak %7.40 olarak bulunurken, stabilizasyon işleminden sonra S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerde yapılan işleme bağlı olarak kristalinite değerinde artış görülmüş ve %10.32 olarak hesaplanmıştır.

#### **4.2.5. Mekanik Karakterizasyon**

Hızlı fiberlerden oluşan SF/P3HB, SF/PBAT nanofibröz matrikslere ve bu matrikslere stabilizasyon işlemi uygulanmış halleri olan S-SF/P3HB ve S-SF/PBAT örneklerine statik, tek yönlü çekme testi uygulanmıştır. Her bir nanofibröz matriks 1 cm × 10 cm boyutlarında kesilerek 10 mm/s test hızında ve aynı deneysel koşullarda çalışılmıştır. Yapılan çekme testi sonucunda malzemelerin mekanik özellikleri elastik modül, çekme dayanımı, tokluk ve kopma noktasında uzama değerleri açısından yorumlanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9.'da özetlenmiştir.

Çizelge 4. 9. Stabilizasyon öncesi ve sonrası hizalı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslere ait mekanik özellikler.

Örnek adı	Elastik Modül (MPa)	Çekme Dayanımı (MPa)	Tokluk (mJ/m <sup>3</sup> )	Kopma Nok. Uzama (%)
<b>SF/P3HB</b>	197 ± 8	7.7 ± 0.4	2.3 ± 0.2	52.7 ± 3.0
<b>S-SF/P3HB</b>	182 ± 17	7.3 ± 0.7	2.3 ± 0.2	54.1 ± 3.2
<b>SF/PBAT</b>	528 ± 27	25.8 ± 1.9	11.5 ± 1.2	159.7 ± 12
<b>S-SF/PBAT</b>	541 ± 22	25.6 ± 1.5	11.6 ± 1.2	157.6 ± 13

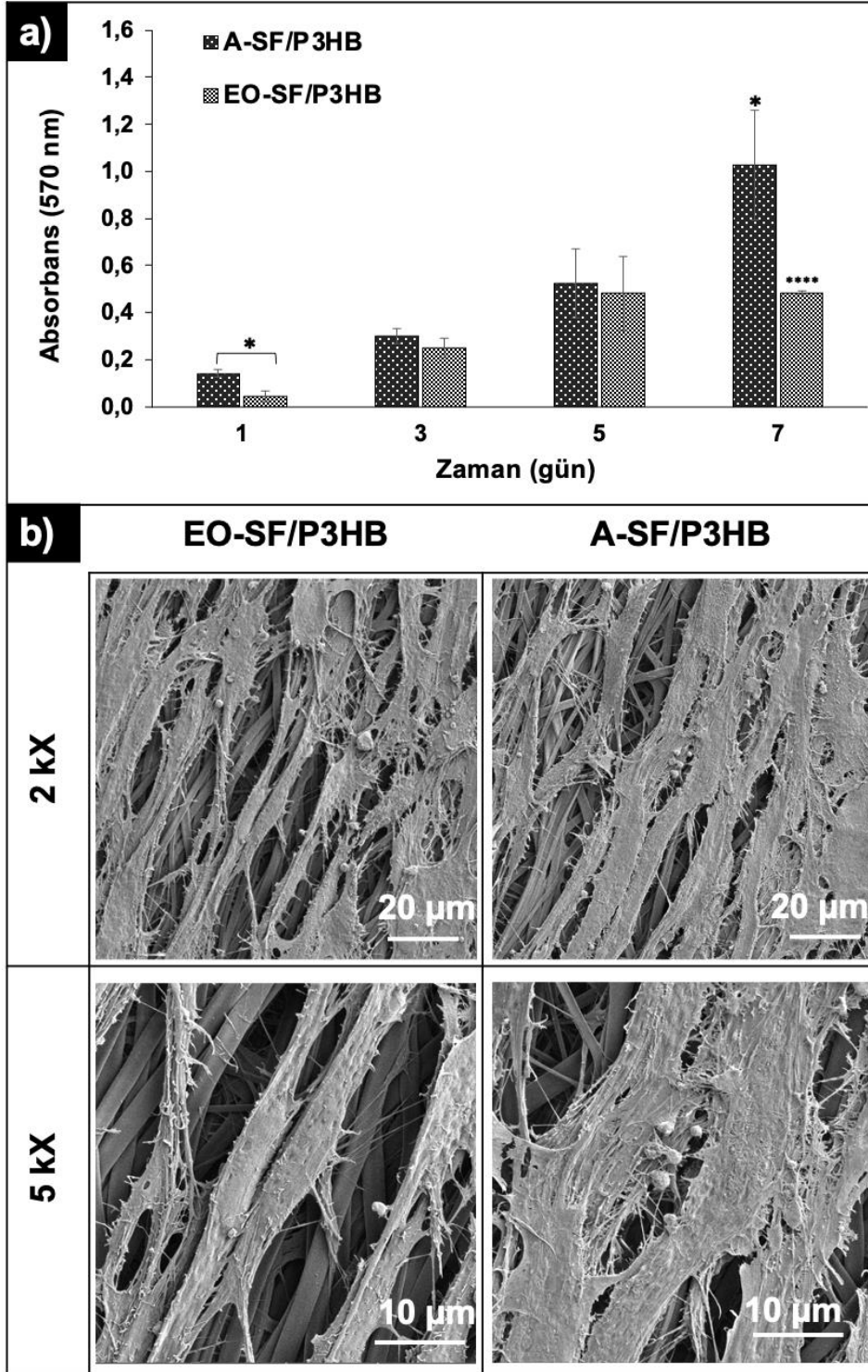
Çekme testi sonuçlarına göre her iki polimer karışımında da stabilizasyon işleminin anlamlı fark yaratacak bir etkisi bulunmamıştır. Bunun yanında hizalı SF/PBAT matriksler her koşul için SF/P3HB matrikslere göre daha üstün olmaktadır. Malzemenin mekanik özellikleri fiber çapı, topografya, proses esnasında kullanılan çözücü gibi parametreler tarafından etkilenebilmektedir. Literatürde P3HB nanofiber matrikslerde elastik modülün 1 - 3 MPa, çekme dayanımının 7 - 10 MPa, kopma noktasında uzama değerlerinin %7 - %20 arasında değiştiğini ifade eden çalışmalar mevcuttur [149, 153]. SF nanofiberlerle yapılan çalışmalarda ise elastik modülün 300 - 500 MPa, çekme dayanımının 7 - 8 MPa, kopma noktasında uzama değerlerinin ise %10 civarında olduğu çalışmalar bulunmaktadır [160, 161]. Karahaliloğlu, düzensiz morfolojide SF/PHB nanofibröz matrikslerle yaptığı çalışmada çekme dayanımının 3.81 MPa ve kopma noktasında uzama değerinin %10 olduğunu bildirmiştir [148]. Bunun yanında PBAT nanofiberlerden oluşan matrikslere yapılan mekanik analiz çalışmasında, PBAT'ın elastik modülü 55 ± 2 MPa, çekme dayanımı 22 ± 3 MPa ve kopma noktasındaki uzaması % 544 ± 113 olarak verilmiştir [66]. Literatür çalışmaları incelendiğinde, çalışmalarda kullanılan polimer kaynaklarının farklı olması, fiber morfolojisi, fiber çapı vs. parametrelerin farklı oluşundan gerçekçi bir kıyaslama yapılamasa da hizalı SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerde SF polimerinin düşük çekme dayanımı ve uzama değerlerinin iyileştirildiği, üstün mekanik özelliklere sahip yapılar elde edildiği görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada, Aşil tendonundan elde edilen tendon kesitlerine yapılan mekanik analiz sonucunda, doğal tendon dokunun elastik modülü  $299 \pm 41$  MPa, çekme dayanımı  $35 \pm 3$  MPa ve kopma noktasındaki uzama değeri  $\%15 \pm 3$  olarak belirlenmiştir [49]. Bu nedenle, tendon yaması olarak kullanımı hedeflenen hizalı SF/P3HB ve özellikle hizalı SF/PBAT nanofibröz matriksler tendon doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelesinden beklenen mekanik özellikleri karşılamaktadır.

#### **4.2.6. Steril SF/P3HB Nanofibröz Matrikslerde Hücre Canlılık Analizi**

Yapılan karakterizasyon testleri sonunda otoklav ve etilen oksit sterilizasyon yöntemlerinin malzemenin kimyasal yapısı, ıslatılabilirliği, mekanik özellikleri üzerinde belirgin bir etki oluşturmaması nedeniyle, sterilizasyon yöntemlerinin hücre kültür çalışmalarında oluşturacağı etkinin incelenmesi istenmiştir. Bu kapsamda L929 fare fibroblast hücreleri ekilen hizalı EO-SF/P3HB ve A-SF/P3HB nanofibröz matriksler 7 gün boyunca kültüre edilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre canlılığı MTT analiziyle tespit edilmiştir. Ayrıca kültür sonunda her iki doku iskelesinden de örnek alınarak SEM analizi ile morfolojik inceleme yapılmıştır.

Mitokondriyal aktivitenin ölçüldüğü MTT analiz sonuçlarına göre genel olarak A-SF/P3HB grubunda tüm zamanlarda EO-SF/P3HB grubuna göre absorbans daha yüksek çıkmıştır (Şekil 4.7.a.). Ayrıca, ekimi takiben ilk günde otoklav yönteminin uygulandığı grupta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Kültürün 7. gününde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken, A-SF/P3HB grubunun absorbans değeri ( $1.03 \pm 0.20$ ), EO-SF/P3HB grubuna ( $0.49 \pm 0.05$ ) göre daha yüksektir. Bunun yanında, otoklav ( $p < 0.05$ ) ve etilen oksit ( $p < 0.0001$ ) sterilizasyonu yapılan her iki grubunda kendi içinde 1. ve 7. günleri arasında anlamlı fark bulunmaktadır.



Şekil 4. 7. Hizalı A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB nanofibröz matrisler üzerinde kültüre edilen L929 fare fibroblast hücrelerinin (a) kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerindeki MTT analiz sonuçları, (b) kültürün 7. günündeki farklı büyütmelerdeki SEM analiz görüntüleri. (istatistiksel anlamlılık:  $n = 3$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

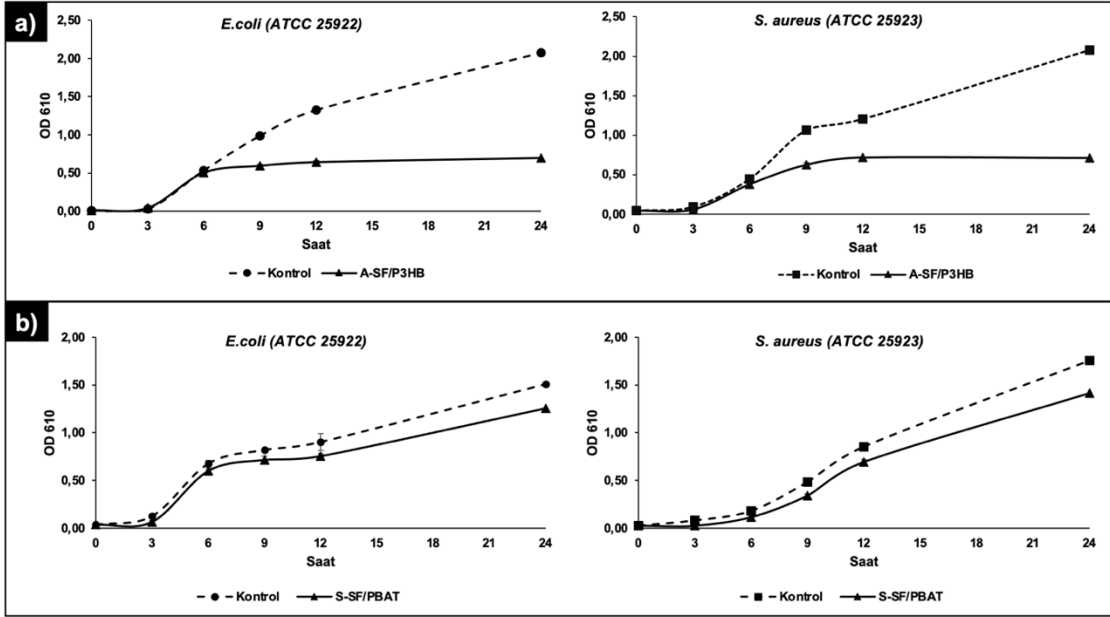
Kültürün 7. gününde yapılan SEM analizinde farklı büyütme ölçeklerinde görüntüler alınmış ve hücreler morfolojik olarak incelenmiştir (Şekil 4.7.b.). Fibroblastik, iğsi morfolojideki L929 hücreleri nanofiberler üzerinde fiber hizası boyunca tutunmuş ve çoğalmıştır. Sterilizasyon yöntemlerinin incelendiği kültür çalışmasında mikrobiyal kaynaklı kontaminasyona da rastlanmamıştır. A-SF/P3HB ve EO-SF/P3HB doku iskelelerinde hücre morfolojisi açısından fark gözlenmezken, aynı konsantrasyonda hücre ekilen A-SF/P3HB grubunda mitokondriyal aktivitenin daha fazla olması, etilen oksit yöntemiyle kıyaslandığında otoklav sterilizasyonunun çok daha az süreye ihtiyaç duyması ve pratik bir yöntem olduğundan dolayı SF/P3HB nanofibröz matrisler için en uygun sterilizasyon metodu olarak otoklav yöntemi seçilmiş ve rAdMSC hücreleriyle yapılacak statik kültür çalışmasında A-SF/P3HB doku iskelelerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

#### 4.2.7. Antibakteriyal Özelliklerin Belirlenmesi

Hızlı nanofibröz matrislerin antibakteriyal özellikleri *Escherichia coli* (gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) model bakterileri kullanılarak optik yoğunluk metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, otoklav yöntemiyle sterilize edilen A-SF/P3HB matris ve konvansiyonel yöntemle sterilize edilen S-SF/PBAT nanofibröz matrisler bakteri içeren sıvı besi yerinde inkübe edilmiş ve belirli saatlerde alınan örnekler aynı başlangıç konsantrasyonuna sahip bakteri popülasyonu ile karşılaştırılarak inhibisyon varlığı incelenmiştir.

Otoklav yöntemiyle sterilize edilen SF/P3HB matrislerde *E.coli* suşunda 6. saatten itibaren optik yoğunluk  $0.502 \pm 0.018$  değeri ile sabit kalırken, *S. aureus* bakterisinde 9. saatten itibaren optik yoğunluk  $0.623 \pm 0.025$  değerinin üzerine çıkmamıştır (Şekil 4.8.a.). Toplamda 24 saat süren analizde, doku iskelesi içermeyen kontrol grubunda artış devam ederken SF/P3HB matrisler hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerin çoğalmasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede inhibisyon etkisi oluşturmuştur ( $p < 0.0001$ ).





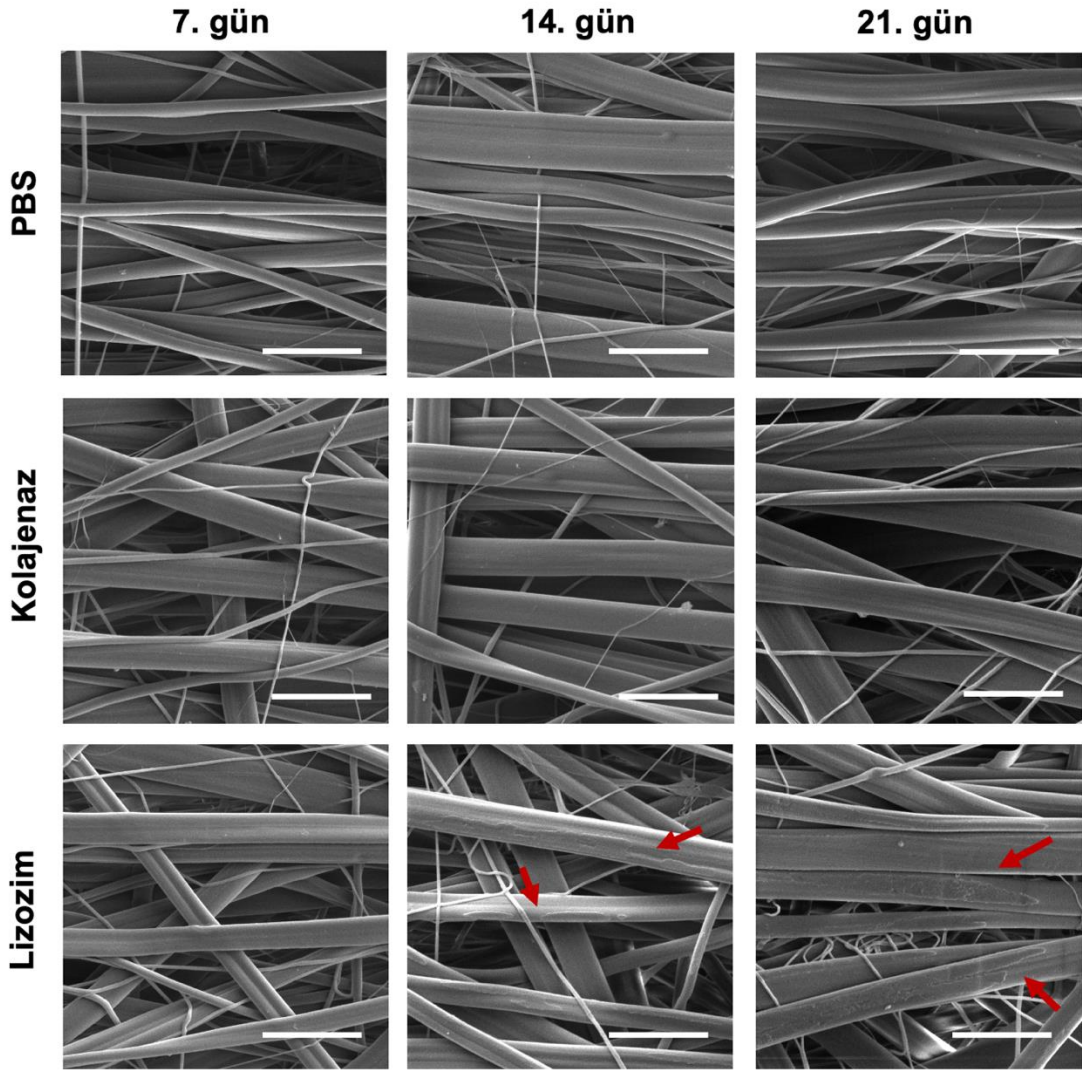
Şekil 4. 8. *E.coli* ve *S.aureus* bakteri suşlarına karşı (a) A-SF/P3HB ve (b) S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin antibakteriyal aktivite grafikleri (n=3).

SF/P3HB içeren deney grubunda inhibisyon, bakterilerin lag fazında çoğalma sürecinde gerçekleştiği için SF/P3HB nanofibröz matrikslerin antibakteriyal olmaktan ziyade bakteri üremesini durduran, bakteriyostatik özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanında, etanol çözeltisinde çöktürülüp her iki yüzeyine UV ışık uygulamak suretiyle sterilize edilen SF/PBAT matrikslerde, tüm analiz süresince her iki bakteri suşunun kontrol grubuna göre optik yoğunluk değerlerinde azalma ya da inhibisyon etkisi görülmemiştir (Şekil 4.8.b.). Bu nedenle SF/PBAT nanofibröz matriksler gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal özellik göstermediği değerlendirilmiştir. Literatürde çeşitli antibakteriyal özellik gösteren grafen oksit, gümüş, altın, çinko oksit gibi nanopartiküller veya direkt antibiyotikler için taşıyıcı olarak çalışılsa da SF, P3HB ve PBAT polimerlerinin antibakteriyal özellik gösterdiği bildirilmemiştir [162-164]. Cerrahi operasyonlar sonrası olası enfeksiyonlar antibiyotik kullanımı ile tedavi edilmeye çalışılırken, florokinolon benzeri antibiyotiklerin kullanımının tendon rüptürlerine yol açması veya ibuprofen kullanımının tendon rejenerasyonunu baskılaması gibi problemleri elimine etmek için klinikte kullanılacak doku iskelesinin antibakteriyal özellikler göstermesi oldukça önemlidir [165].

#### 4.2.8. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi

Hücre kültür çalışmalarında kullanılacak doku iskelelerinin kültür çalışması süresince bozunurluk özelliklerinin incelenmesi amacıyla A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT nanofibröz matrisler hem hidrolitik (PBS ortamı) koşulda hem de iki farklı enzim (kolajenaz ve lizozim) varlığında kültür süresine eşdeğer olarak 21 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve her bir haftanın sonunda örnek alınarak SEM analizi ile yüzey morfolojisi incelenmiştir.

A-SF/P3HB matrisin inkübasyonun 7., 14. ve 21. günlerinde PBS, kolajenaz ve lizozim içeren ortamlardan elde edilen görüntüleri Şekil 4.9.'da verilmiştir. Deney süresince PBS ve kolajenaz içeren ortamda fiber morfolojisinde, gözeneklilik ve gözenek çapında farklılık belirlenmezken, lizozim içeren ortamdan alınan örneklerin 14. ve 21. günlerinde fiber yüzeyinde aşınma gerçekleştiği görülmüştür. SEM analizinde daha derin bölgelerden görüntüleme yapmaya imkan veren derinlik modunda ise fiber morfolojisinde farklılık görülmemiş ve bu nedenle aşınmanın sadece fiber matris yüzeyiyle sınırlı kaldığı ve tam olarak bir bozunmanın gerçekleşmediği görülmüştür. P3HB'nin bozunma davranışıyla ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı olsa da Shishatskaya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, hizalı P3HB ve PHBV fiber matrisler farklı pH değerlerindeki tampon ortamında 180 gün boyunca bozunma göstermemiş, toplam kütlelerinde belirgin bir azalış görülmemiştir. Kan ve serum ortamı ile *in vivo* koşullarda tekrarlanan deneyde ise malzemelerin çekme dayanımı değişmezken, molekül ağırlığında azalma görülmüş ve *in vivo* koşullarda SEM görüntülerinde yüzey erozyonu şeklinde bozunma gerçekleşmiştir [166]. Başka bir çalışmada ise gastrointestinal yama olarak kullanımı hedeflenen P3HB ( $M_w = 640,000$ ) ve farklı plastikleştiricilerin katıldığı P3HB filmler 1 yıl içerisinde molekül ağırlıklarında yaklaşık %50 azalma göstererek hidrolitik bozunma göstermiştir.

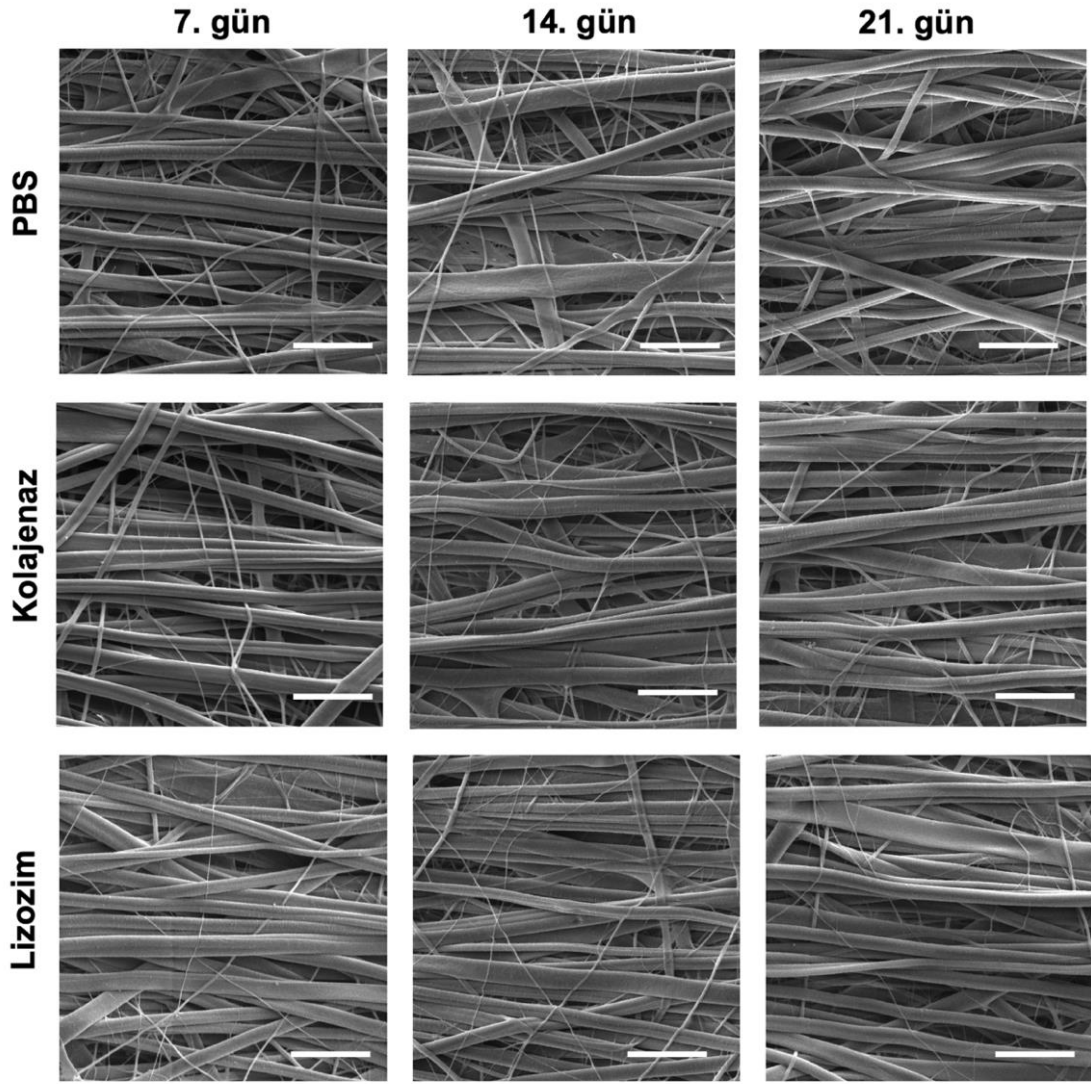


Şekil 4. 9. A-SF/P3HB nanofibröz matrikslerin PBS, kolajenaz ve lizozim içeren ortamlarda 7., 14. ve 21. günde bozunma davranışlarına ait SEM analiz görüntüleri (20 kX büyütme, ölçek çubuğu 2 µm, kırmızı oklar aşınma gerçekleşen alanları göstermektedir).

Lipaz, amilaz, α-kimotripsin, tripsin ve proteaz gibi enzimleri içeren pankreatin ortamında ise hidrolitik ortama göre bozunma derecesinin 3 kat arttığı bildirilmiş ve P3HB'nin enzimatik bozunma davranışı amorf fazın hareketliliği ve polimer hidrofobitesi ile ilişkilendirilmiştir [53]. Bunun yanında P3HB'nin düşük camı geçiş sıcaklığı ( $T_g = 5^\circ\text{C}$ ) nedeniyle  $37^\circ\text{C}$ 'da enzimatik olarak hidrolize olamayacağı ve  $T_g$  sıcaklığı daha yüksek amorf polimerlerle karışım halinde bozunma gösterebileceği belirtilmiştir [167].

Bu tez çalışmasında amorf SF ile karışım halinde kullanılan P3HB matrikslerde 3 haftalık inkübasyon boyunca bozunma görülmemiş, ancak sadece lizozim içeren ortamda aşınma tespit edilmiştir. İpek fiberler *in vivo* koşullarda bozunmayan biyomalzemeler olarak bilinse de izole edilip, saflaştırılan SF fiberler biyobozunur özelliktedir. SF bozunurluk hızı, yapıdan serisin uzaklaştırma protokolü, molekül ağırlığı, kullanılan enzim tipi ve uygulama süresi, morfolojik özellikler ve en önemlisi kristal yapıyı belirleyen  $\beta$ -tabaka oranından etkilenmektedir [168]. Literatürde sıklıkla proteaz XIV, kolajenaz ve  $\alpha$ -kimotripsin kullanılmaktadır. Proteaz XIV SF bozunurluk çalışmalarında en etkili enzim olarak nitelendirilmekte ve  $\alpha$ -kimotripsinle birlikte SF'nin amorf bölgelerini; kolajenaz ise kristalin  $\beta$ -tabaka kısımlarını etkilemektedir [169]. Bu nedenle, tez çalışmasında metanolla stabilize edilen S-SF/P3HB matriksler kullanıldığı için kolajenaz enzimi tercih edilmiştir. Stabilizasyon işlemi uygulanmamış SF filmlerle yapılan bir çalışmada, 1.0 U/mL konsantrasyonda proteaz XIV, kolajenaz ve  $\alpha$ -kimotripsinle inkübasyon sonrası yapının %70'inin 15 gün içerisinde bozunduğu ve  $\beta$ -tabaka bölgelerinin en fazla kolajenaz ortamında azalma gösterdiği bildirilmiştir [170].

Stabilizasyonu yapılan S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin aynı koşullarda bozunma davranışı incelendiğinde, 21 günün sonunda belirgin bir şekilde hidrolitik ya da enzimatik bozunma işareti rastlanmamıştır (Şekil 4.10). Yapılan bir çalışmada, ekstrüzyonla elde edilen PBAT fibröz matrikslerin hidrolitik koşullarda 8 hafta boyunca kütle kaybına uğramadığı fakat mekanik özelliklerinde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir [63]. Fukushima ve ark. PBAT filmler üzerinde yaptığı çalışmada, 8 hafta sonunda kütle kaybı ve degradasyon ürünü varlığını tespit etmemişlerdir [171]. Başka bir çalışmada ise, PBAT filmlerin lipaz enzimi içeren ortamda 5 hafta sonunda %5 kütle kaybına uğradığı fakat SEM analiz görüntülerinde yüzeyde deformasyon izine rastlanmadığı bulunmuştur [9]. Benzer şekilde proteaz enzimi varlığında yapılan 8 günlük bir çalışmada PBAT filmlerin bozunmaya dirençli olduğu gösterilmiştir [172].



Şekil 4. 10. S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin PBS, kolajenaz ve lizozim içeren ortamlarda 7., 14. ve 21. günde bozunma davranışlarına ait SEM analiz görüntüleri (10 kX büyütme, ölçek barı 5 µm).

PBAT'ın enzimatik degradasyona dayanıklı bir polimer olduğu literatürle uyumlu olarak bulunmuştur. Bunun yanında PBAT'ın yapısındaki ester bağlarının yıkımı için lipaz enzimi kullanmak uygun olsa da tendon yaması olarak kullanımı hedeflenen S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin doğal tendon mikroçevresindeki enzimatik süreçler (kolajenaz, MMP'ler) göz önüne alındığında 3 hafta boyunca enzimatik bozunmaya uğramaması istenen bir durumdur.

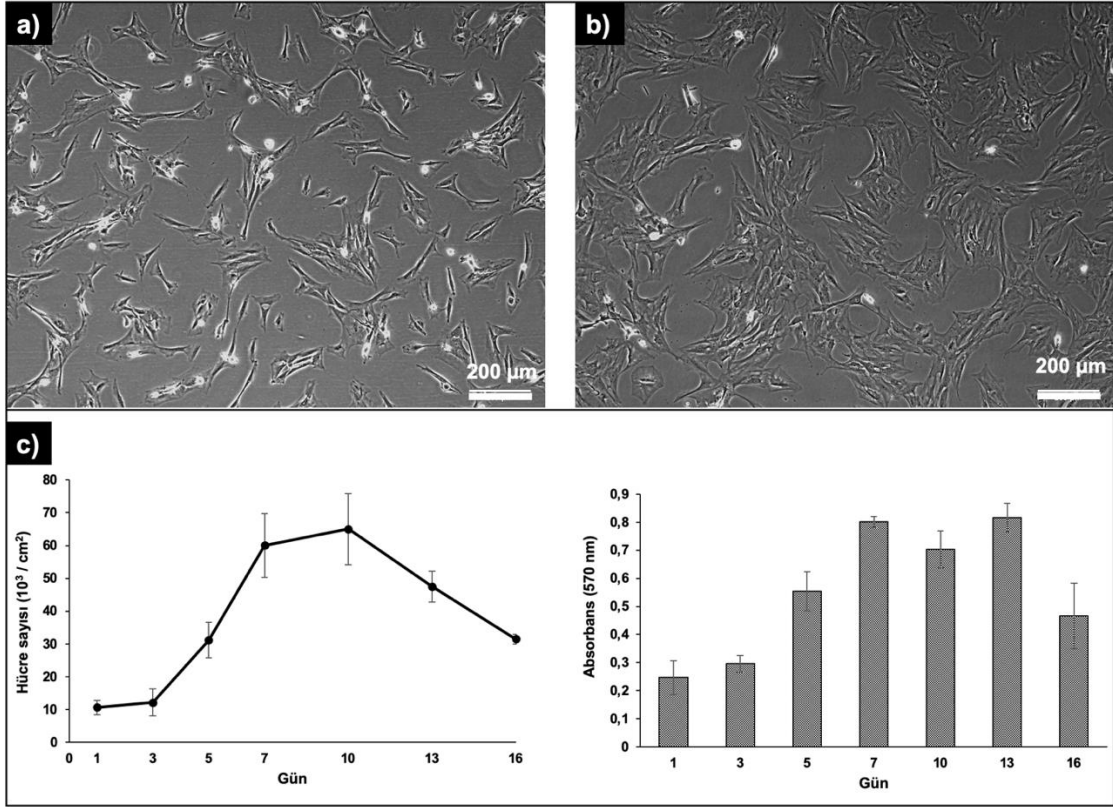
### 4.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışmasının son aşamasında fabrikasyonu ve karakterizasyonu yapılan nanofibröz matrikslerin 21 günlük statik koşullardaki hücre kültür çalışmaları tamamlanmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, ilk olarak farklılaşma kapasitesi, izolasyon kolaylığı ve yüksek sayıda hücre izole edilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı seçilen adipoz mezenkimal kök hücrelerin sıçanlardan izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Otoklav yöntemiyle sterilizasyonu yapılan A-SF/P3HB ve etanol-UV ışık uygulamasıyla sterilizasyonu yapılan S-SF/PBAT nanofibröz matrikslere izole edilen rAdMSC hücreleri ekilerek kültür 21 gün boyunca takip edilmiş ve hücre çoğalması, tutunması, farklılaşması farklı analizlerle her bir doku iskelesi için karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır. Ayrıca, mekanik stimülasyon uygulanan dinamik kültür çalışmalarına ait ön çalışma sonuçlarına yer verilmiştir.

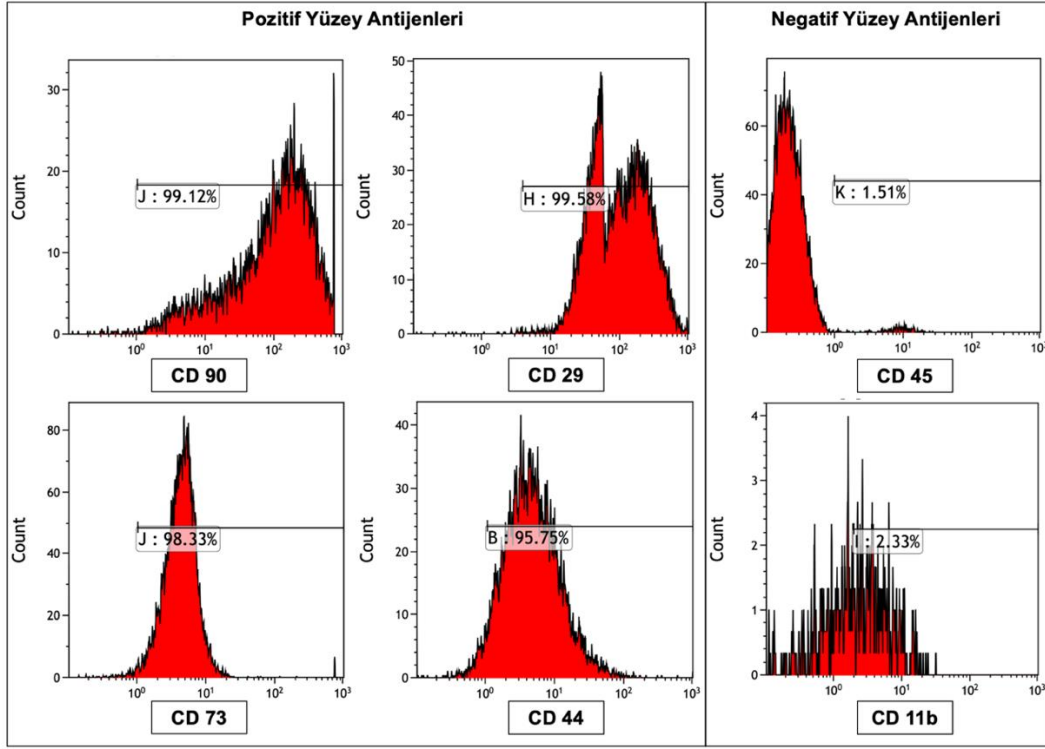
#### 4.3.1. rAdMSC İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 52338575-59 sayılı izni ile 6 adet *Sprague Dawley* cinsi sıçandan rAdMSC hücrelerinin izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu takiben, hücrelerin ilk izole edildiği P0'dan P3'e kadar stoğu oluşturulmuş ve hücreler morfolojik olarak takip edilmiştir (Şekil 4.11.a. ve Şekil 4.11.b.). Herhangi bir kontaminasyonun görülmediği kültürde, homojen hücre popülasyonu belirlenmiş ve hücrelerin ilerleyen pasajlara kadar iğsi, fibroblastik morfolojisini koruduğu görülmüştür. Bunun yanında, statik kültür çalışmalarında P5'te hücre kullanılacağı için bir miktar hücre P5'e kadar çoğaltılmış ve üreme kinetiği incelenmiştir. Paralel ekim çalışmasının 1., 3., 5., 7., 10., 13. ve 16. günlerinde hemositometrik sayım ile hücre sayısı belirlenmiş ve MTT analizi ile mitokondriyal aktivite ölçülmüştür (Şekil 4.11.c.). MTT analizine göre 3. ve 7. günler arasında eksponansiyel fazda olduğu tespit edilen hücrelerin sayısındaki artıştan yola çıkılarak özgül üreme hızı  $0.0163 \text{ sa}^{-1}$  ve ikilenme süresi 42.3 sa olarak belirlenmiştir. Bunun yanında, besi ortamının değiştirilmediği kültür süresince rAdMSC'lerin 7. günden sonra durağan faza geçtiği ve 13. günden itibaren de ölüm fazına geçtiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular literatürle uyumlu olarak bulunmuştur [146].



Şekil 4. 11. Sıçanlardan izole edilen rAdMSC hücrelerine ait (a) P0, (b) P3 optik mikroskop görüntüleri (10X) ve (c) P5'teki sırasıyla hemositometrik sayım ve MTT analizi sonucu elde edilen üreme grafikleri (n=3).

İzole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonu P5'teki hücrelerden örnek alınarak akış sitometri analizi ile yapılmış ve izole edilen kök hücreler yüzey antijenleri açısından incelenmiştir. Literatürde mezenkimal kök hücrelerin fenotipik karakteri şu şekilde belirtilmiştir; fenotip pozitif antijenler ( $\geq$  %95): CD105, CD73, CD90 ve fenotip negatif antijenler ( $\leq$  %2): CD45, CD34, CD14, CD11b [173, 174]. Ayrıca adipoz dokudan izole edilen kök hücrelere spesifik olarak CD29 ve CD90 yüzey antijenleri  $\geq$  %95 oranında ifade edilmektedir. Akış sitometri analiz sonucu, adipoz dokudan izole edilen rAdMSC hücrelerin literatürle uyumlu olarak mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD29, CD44, CD73 ve CD90 için pozitif olduğu görülmüş ve lökosit hücre belirteçleri olan CD11b ve CD45 için ise %2'den düşük işaretlenme oranları belirlenmiştir (Şekil 4.12.). Böylece, izole edilen rAdMSC'lerin mezenkimal kök hücre olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 12. rAdMSC'lerin farklı yüzey antijenleri için akış sitometri analiz sonuçları.

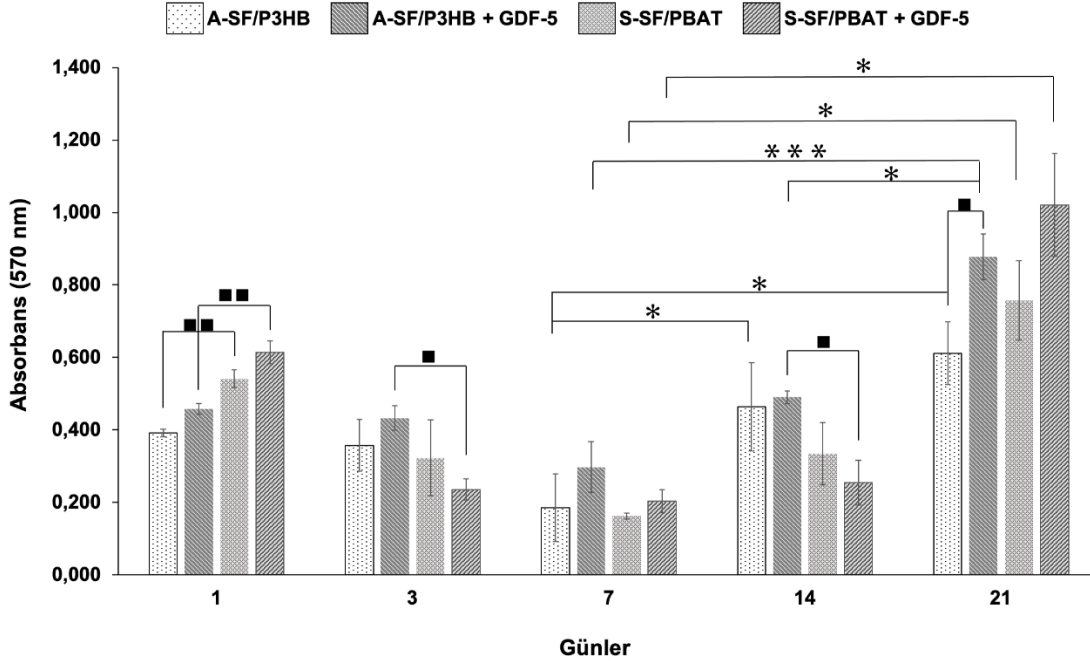
#### 4.3.2. Statik Kültür Çalışması Sonuçları

Statik hücre kültüründe, rAdMSC hücrelerinin A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri üzerinde, yüzey topografyasına ve büyüme faktörü kullanımına bağlı olarak tenositlere farklılaşması incelenmiştir. Bu nedenle, her iki doku iskelesinde de oluşturulan iki gruptan biri normal besi ortamında kültüre edilirken, diğer grubun besi ortamına GDF-5 büyüme faktörü ilave edilmiştir. GDF-5 büyüme faktörü, tendon rejenerasyonunda yeni tenosit hücrelerinin oluşumunda etkili bir sitokindir. Büyüme faktörünün uygun konsantrasyonu için optimizasyon çalışması yapılmamış ve literatürden yararlanılarak 100 ng/mL olarak belirlenmiştir [77, 78, 175-177]. Statik hücre kültüründe, otoklav ile sterilizasyonu yapılan A-SF/P3HB ve etanol-UV ışık uygulaması ile sterilizasyonu yapılan S-SF/PBAT doku iskelelerine  $10^5$  hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta P5 rAdMSC hücreleri statik koşullarda ekilmiş ve 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde örnekler alınmış ve hücrelerin tutunma, çoğalma ve farklılaşma davranışları her iki doku iskelesi için karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.



#### 4.3.2.1. MTT Analizi

A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC hücrelerinin, MTT analiz sonuçları Şekil 4.13.'te verilmiştir. Normal besi ortamındaki A-SF/P3HB grubunun 21 günlük kültür süresi incelendiğinde, benzer olan 1. ve 3. gün absorbans değerlerinin 7. günde ( $0.185 \pm 0.093$ ) azaldığı ve kültürün 14. ( $0.464 \pm 0.122$ ) ile 21. ( $0.611 \pm 0.087$ ) günlerinde absorbansın istatistiksel anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). GDF-5 içeren ortamdaki A-SF/P3HB grubunda ise genel olarak MTT absorbans değerleri normal besi ortamına göre daha yüksek olsa da, kültürün 1. gününden 7. gününe ( $0.297 \pm 0.070$ ) mitokondriyal aktivitede azalma ve 7. günden 21. güne ( $0.877 \pm 0.063$ ) kadar anlamlı bir artış ( $p < 0.001$ ) gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı mitokondriyal aktivite artışının 14. ve 21. günler arasında da ( $p < 0.05$ ) tespit edilmesi nedeniyle, hücre proliferasyonunun A-SF/P3HB + GDF-5 grubu için kültürün son haftasında ivme kazandığı yorumu yapılabilmektedir. Bunun yanında, kültürün 21. gününde A-SF/P3HB yüzeylerdeki rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren ortamdaki aktiviteleri kıyaslandığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). GDF-5 büyüme faktörü kullanımı A-SF/P3HB doku iskelelerindeki hücrelerin canlılığını pozitif yönde önemli ölçüde etkilemiştir. Normal besi ortamındaki S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin MTT absorbans değerleri incelendiğinde, 1. günden ( $0.709 \pm 0.025$ ) 7. güne ( $0.162 \pm 0.009$ ) kadar istatistiksel anlamlı bir azalma ( $p < 0.01$ ) ve 7. günden 21. güne ( $0.757 \pm 0.110$ ) kadar anlamlı bir artış ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir. Bunun yanında, kültürün 1. gününde besi ortamındaki A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri arasında da belirgin farklılık ( $p < 0.01$ ) bulunmaktadır. Aynı sayıda rAdMSC'nin yine aynı büyüklükte doku iskelelerine ekiminin yapıldığı deneyde 1. gün sonuçlarındaki farklılık, hücrelerin iskele yüzeyine tutunma davranışı ve/veya yüzey hidrofobisitesi nedeniyle ekim sırasında doku iskelesinden oluşabilecek sızıntılarla ilgili hücre kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir. GDF-5 büyüme faktörü içeren S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin mitokondriyal aktiviteleri diğer gruplara benzer şekilde, 1. günden ( $0.775 \pm 0.032$ ) 7. güne ( $0.203 \pm 0.032$ ) istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalırken ( $p < 0.01$ ), 7. günden 21. güne ( $1.021 \pm 0.142$ ) kadar yaklaşık 5 katına çıkmıştır ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4. 13. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında 21 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları (n=3, istatistiksel anlamlı farklılık: aynı grup farklı günler arasında \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; aynı gün farklı gruplar arasında □ $p < 0.05$ , □□ $p < 0.01$ ).

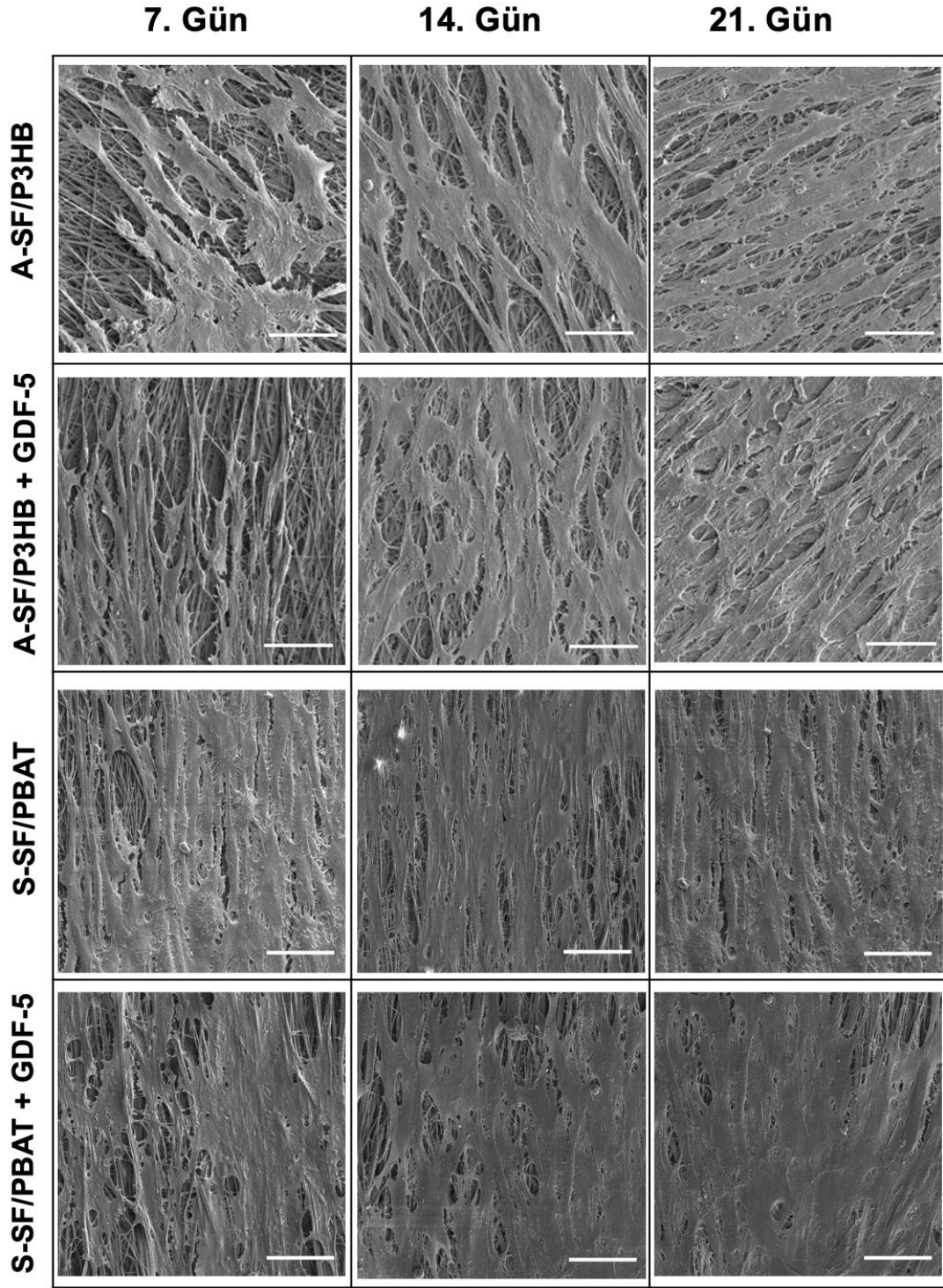
Kültürün 1. gününde normal büyüme ortamlarındaki doku iskelelerine benzer şekilde, GDF-5 büyüme faktörü içeren ortamda kültüre edilen S-SF/PBAT grubunda da A-SF/P3HB grubuna göre hücre canlılığı anlamlı olarak daha yüksektir ( $p < 0.01$ ). Bu durum ters yönde olacak şekilde kültürün 3. ve 14. günlerinde de gözlenmiş ve bu sefer GDF-5 içeren ortamdaki A-SF/P3HB grubunda S-SF/PBAT grubuna göre canlılık daha fazla çıkmıştır ( $p < 0.05$ ). Ayrıca, S-SF/PBAT doku iskelelerinde, GDF-5 büyüme faktöründen bağımsız, 1. – 3. ( $p < 0.05$ ) ve 1. – 7. ( $p < 0.05$ ) günler arasında da absorbans değerlerinde anlamlı bir azalma bulunmaktadır. Bu nedenle kültürün 1. gününün aksine, 3. ve 14. günlerinde S-SF/PBAT + GDF-5 grubunda absorbans değerlerinin düşük çıkmasının nedeni hücrelerin farklılaşmaya gitmesiyle ilişkilendirilmiştir.

Özetle MTT analizinden elde edilen sonuçlara göre; hücre tutunmasıyla ilişkili olarak S-SF/PBAT doku iskelelerinde A-SF/P3HB'e göre absorbans değerlerinin daha yüksek olduğu ve kültürün 21. gününde GDF-5 büyüme faktörü uygulanan gruplarda yine absorbans değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, tüm gruplarda kültürün 1. gününden 7. gününe mitokondriyal aktivitede azalma ve 7. günün sonrasında 21. güne kadar artış eğilimi belirlenmiştir. Absorbans değerlerindeki azalma ve artış mezenkimal kök hücrelerin 7. gün civarında proliferasyon yerine farklılaşma aşamasında olmasıyla açıklanmıştır [178].

#### **4.3.2.2. SEM Analizi**

Hızlı topografyaya sahip A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT matriksler üzerine ekilen rAdMSC'lerin morfolojileri kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yapılan SEM analizi ile incelenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.14'te sunulmuştur.

Normal besi ortamında kültüre edilen A-SF/P3HB doku iskelesi üzerindeki hücrelerin matriks yüzeyinde lokal olarak tutunup, çoğalmaya başladığı ve fiberlerin hizalanma yönünde uzantılar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında fibroblastik morfolojide hücrelere de rastlanmıştır. Kültürün ilerleyen günlerinde hücre morfolojisi daha içsi yapıya geçip, tüm hücrelerin hizalı topografya ekseninde sıralandığı belirlenmiştir. Kültürün 21. gününde, morfolojide farklılık belirlenmezken hücre proliferasyonu ve ECM artışına bağlı olarak hücreler arası boşluklar azalmıştır. GDF-5 büyüme faktörü içeren ortamdaki A-SF/P3HB doku iskelelerine ekilen hücrelerde ise kültürün 7. gününde normal besi ortamına göre hizalanmanın daha fazla olduğu, hücrelerin en/boy oranının oldukça azaldığı gözlemlenmiştir. Büyüme faktörü içeren grubun 21. gününde proliferasyona bağlı olarak hücreler tabaka oluşturacak kadar çoğalma davranışı sergilemiş ve matriks yüzeyi görünmez hale gelmiştir. Hücrelerin proliferasyona bağlı olarak nanofiber yerine birbiri üzerinde çoğalmaya başlamaları durumunda da hizalı morfolojinin korunduğu görülmüştür.



Şekil 4. 14. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde SEM analiz görüntüleri (10 kX büyütme, ölçek barı 50 µm'yi göstermektedir).

Normal besi ortamındaki S-SF/PBAT doku iskelelerindeki hücrelerin ise kültür boyunca oldukça hizalı olduğu ve tüm matriks yüzeyinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin olduğu belirlenmiştir. GDF-5 içeren besi ortamındaki S-SF/PBAT matriks yüzeylerdeki hücrelerin yine büyüme faktörü içeren ortamda kültüre edilen A-SF/P3HB doku iskelelerinde olduğu gibi 21. günde birbirleri üzerinde çoğalmaya başladığı tespit edilmiştir. GDF-5, büyüme/farklılaşma faktörü olup hem tenosit maturasyonunda hem de proliferasyonunda görev almaktadır. Bu nedenle, GDF-5 büyüme faktörü içeren gruplarda proliferasyonun normal besi ortamına göre daha fazla olması beklenen bir durumdur ve elde edilen sonuçlar MTT analizinin 21. günündeki büyüme faktörü içeren ve içermeyen gruplar arasındaki farklılıkla da örtüşmektedir. AdMSC'lerin tenojenik farklılaşması ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde elde edilen görüntülerin literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir [11, 179].

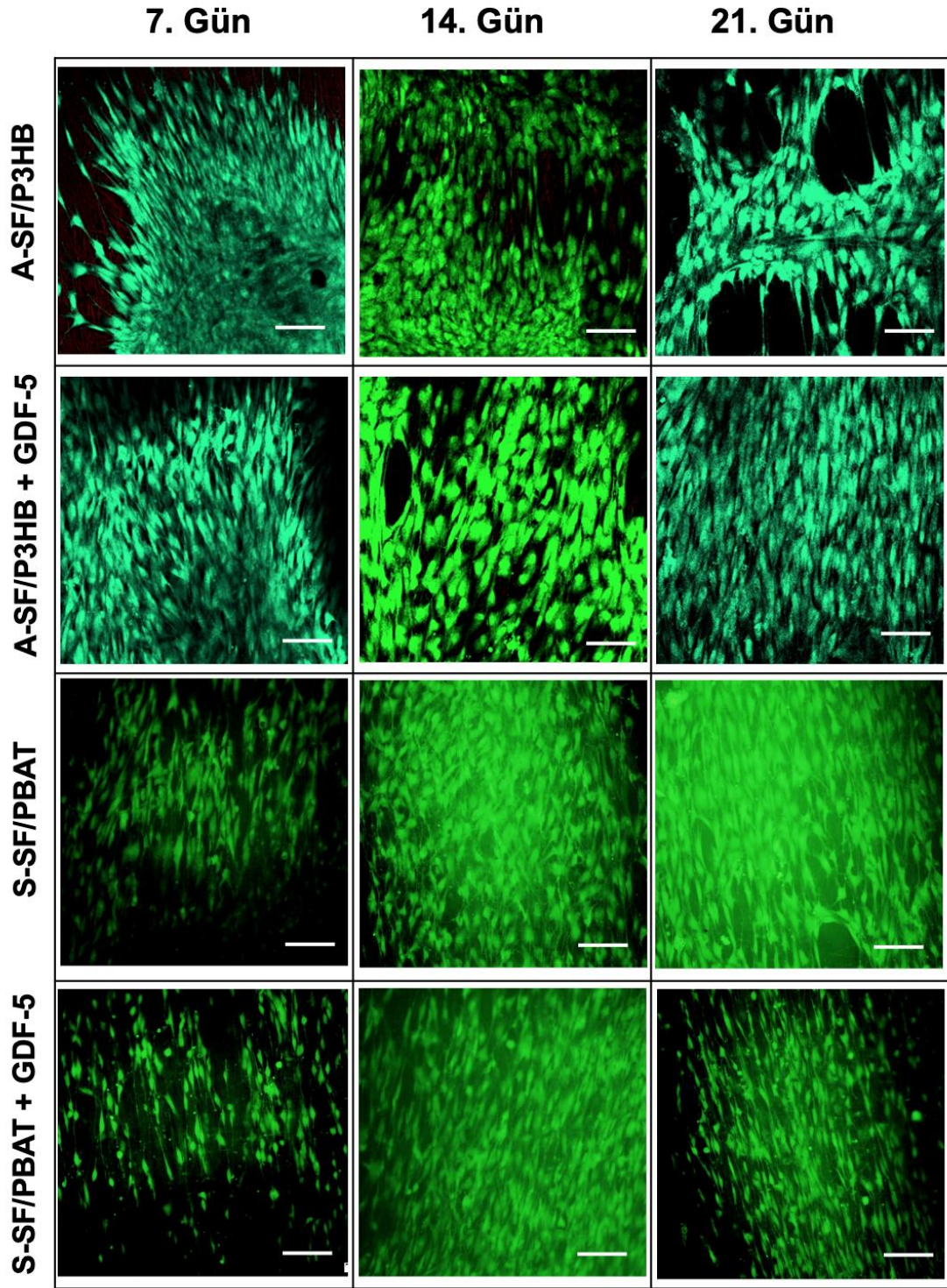
Özetle, tüm kültür boyunca rAdMSC hücreleri her iki hizalı nanofiber matriks yüzeyinde tutunmuş ve hizalı topografyaya uyumlanarak çoğalmıştır. Hücreler kültür sonunda iğsi ve hizalı morfolojisini kaybetmese de hizalanmış rAdMSC hücrelerinin eni fiberler arası uzaklığa göre çok daha büyük olduğundan hücreler doku iskelesinin iç kısımlarına migrasyon yapamamış ve yüzeyde tabaka şeklinde çoğalmıştır. Paralel nanofiber topografyası mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması için gerekli olduğu gibi gözenek büyüklüğü de önem arz etmektedir ve hizalı nanofiberlerin belli motiflerde örülerek kullanılması ile gözenek boyutu artırılabilir [128].

#### 4.3.2.3. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT nanofibröz matrikslere ekilen rAdMSC hücrelerinin kültür boyunca canlılıkları canlı/ölü boyama analizi ile takip edilmiştir. Canlı/ölü boyamada kullanılan boyalardan kalsein AM, canlı hücrelerin membranından sitoplazmaya alınarak kalseine indirgenmekte ve yeşil renkte floresan ışımaya yapmaktadır. Etidyum homodimer-1 ise canlı hücre membranından geçemez ve ölü hücrelerin hasar gören membranları nedeniyle doğrudan nükleik asitlere bağlanarak kırmızı renkte floresan ışımaya yapar. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde normal besi ortamı ve GDF-5 büyüme faktörü içeren ortamda kültüre edilen hizalı matriks yapıları üzerindeki rAdMSC'lerin canlılıklarını belirlemek için canlı/ölü boyama yapılmış ve floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.15.'te sunulmuştur.

Analiz sonuçlarına göre tüm kültür süresi boyunca ve her iki besi ortamında da hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri üzerindeki rAdMSC hücreleri canlılığını korumuştur. Bunun yanında, bazı örneklerde birkaç tane kırmızı ölü hücreye rastlanmıştır. Ancak, polipeptit yapısındaki fibroin nedeniyle doku iskeleleri de etidyum homodimer-1 boyası ile boyanmış ve bu nedenle ölü hücrelerin canlı hücrelerle birlikte görüntülerinin alınmasında zorluk yaşanmıştır. Doku iskeleleri, kullanılan besi ortamı ya da kültür süreleri arasında farklılık bulunmamış ve SEM analiz görüntülerine benzer şekilde hücrelerin hizalı topografyaya uygun, birbirine paralel ve içsi morfolojide olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılık oranının yüksek olması ve ölü hücre sayısının çok az olması literatürle uyumlu olup Wu ve ark.'nın yaptığı hizalı ve hizasız PLGA matriks yüzeylerdeki insan AdMSC hücrelerinin hizalı topografyada canlılıklarının daha fazla olduğu çalışmayla benzer sonuçlar elde edilmiştir [86].





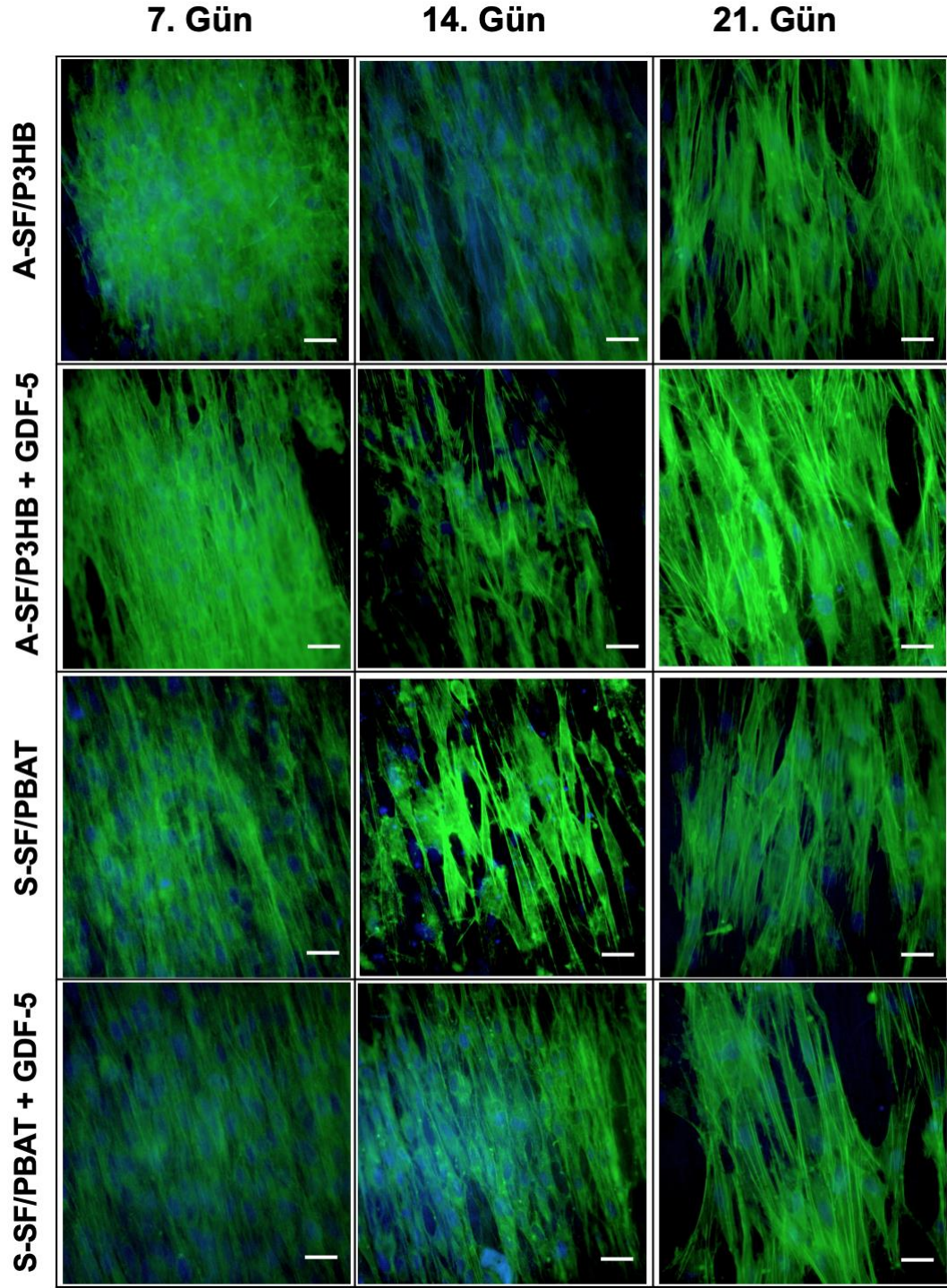
Şekil 4. 15. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır, 20X büyütme, ölçek barı 100  $\mu$ m'yi göstermektedir).

#### 4.3.2.4. İmmünfloresan Boyama

Statik hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde, hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri üzerine ekilen rAdMSC'lerin hizalı topografyadaki organizasyonları hücre iskeleti/çekirdek boyaması yapılarak takip edilmiştir. Hücre iskeletini görüntülemek için kullanılan Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti F-aktin boyası hücrelerin aktin filamentlerinin yeşil renkte görünmesini sağlarken, DAPI boyası hücre çekirdeğine bağlanarak çekirdeklerin mavi renkte ışığa yapmasını sağlamaktadır. Farklı besi ortamlarındaki hizalı nanofibröz matrikslere ekilen rAdMSC hücreleri boyama sonrası floresan mikroskopta görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4. 16.'da verilmiştir.

İmmünfloresan boyama görüntüleri incelendiğinde, normal besi ortamında kültürasyonu yapılan A-SF/P3HB grubunun 7. günde GDF-5 büyüme faktörü içeren gruba göre nispeten daha düzensiz morfoloji sergilediği belirlenmiştir. Bu durum haricinde, diğer zaman aralıkları ve farklı besi ortamlarındaki hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT yüzeylerdeki rAdMSC'lerin tamamen fiberlerin hizalanma eksenine boyunca birbirlerine paralel yerleşim gösterdikleri ve iğsi yapıda oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar SEM analiz görüntülemeleriyle benzerlik göstermektedir. Büyüme faktörü içermeyen kültür ortamındaki örneklerin de kültür süresi boyunca gergin, tek yönlü ve birbirine paralel uzanan aktin filamentlerine sahip olması hizalı topografyanın kök hücrelerin farklılaşması sürecini öncelikli olarak etkilediğini göstermektedir [180, 181]. Güner ve ark.'nın yakın zamanda yaptığı bir çalışmada, hizalı topografyaya sahip PCL-jelatin nanofiberler üzerine ekilen insan AdMSC hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0-10-50-100 ng/mL) GDF-5 büyüme faktörü ile muamelesi sonucunda hücre hizalanmasında farklılık görülmemiştir [80].

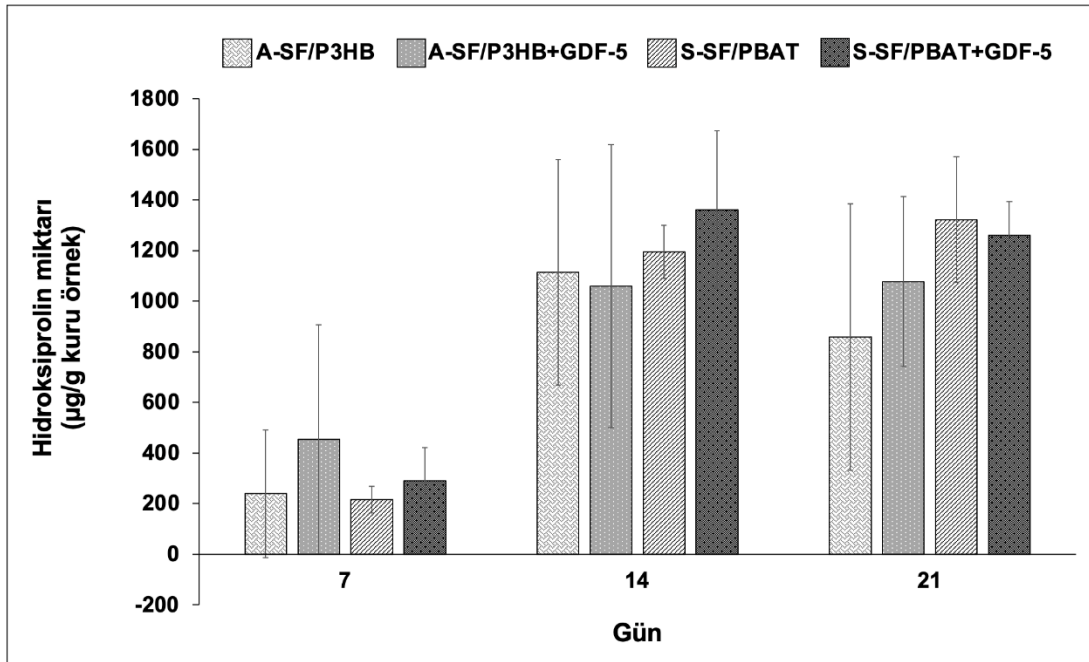




Şekil 4. 16. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde hücre iskeleti/çekerdeği boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi renkle boyanmıştır, 40X büyütme, ölçek barı 20  $\mu\text{m}$ 'yi göstermektedir).

#### 4.3.2.5. Hidroksiprolin Analizi

Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde, normal ve GDF-5 büyüme faktörü içeren ortamlarda ve A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rAdMSC hücrelerinin ürettiği kolajen miktarı indirekt bir yöntem olan hidroksiprolin analizi ile tayin edilmiştir. Hidroksiprolin, tüm kolajen tiplerinde bulunan ve kolajenin %13.4'ünü oluşturan bir aminoasittir. Kültürün belirlenen günlerinde alınan örnekler kurutulup tartılmış ve analiz sonucu elde edilen çözeltilerin absorbands değerleri 570 nm'de kaydedilmiştir. Örneklerin toplam hidroksiprolin miktarı, seri dilüsyonla oluşturulan ve hidroksiprolin konsantrasyonu bilinen standart eğriden yola çıkılarak hesaplanmış ve negatif kontrol olan hücresiz doku iskelesinden elde edilen sonuç bu değerlerden çıkarılmıştır. Böylece, rAdMSC'lerin ürettiği hidroksiprolin miktarı deney öncesi kaydedilen kuru ağırlıklara bölünerek kuru örnek başına üretilen hidroksiprolin miktarı her bir örnek için bulunmuştur (Şekil 4.17.)

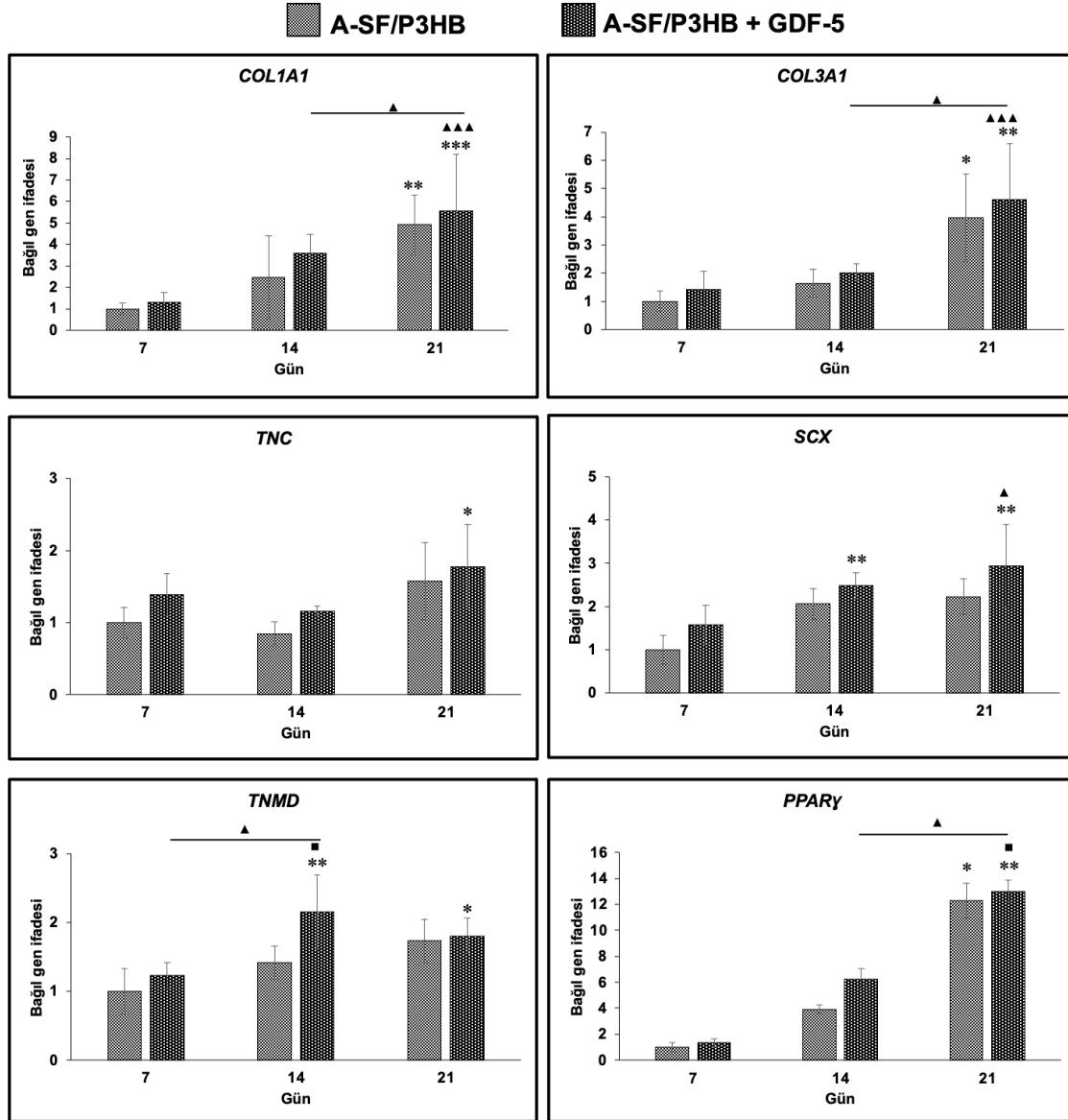


Şekil 4. 17. A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT hizalı doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde kuru ağırlığa göre hidroksiprolin analizi sonuçları (n = 3).

Hidroksiprolin analizi sonucuna göre, normal besi ortamı ve GDF-5 büyüme faktörü içeren ortamlardaki A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerinde kültürün boyunca hidroksiprolin miktarında artış eğilimi belirlenmiştir. Fakat, hata çubukları dikkate alındığında gruplar veya günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenememiştir. Tez çalışmasında yapılan diğer analizlerde 7. gün civarında rAdMSC'lerin farklılaşmaya başladığı sonucundan yola çıkarak, 14. ve 21. günlerde toplam kolajen miktarının 7. güne göre her grupta 2 – 4 kat artması bu çıkarımı desteklemektedir. Literatürde aynı hidroksiprolin analiz protokolünün [182] uygulandığı bir çalışmada, taze ve desülerize domuz tendon kesitlerinde hidroksiprolin miktarı 150 µg/g olarak bildirilmiş ve tez kapsamında elde edilen 7. gün sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir [183]. Bunun yanında yine benzer metod ile, hizalı ve hizasız PCL nanofibröz matrisler üzerine ekilen  $5 \times 10^5$  hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta insan AdMSC hücrelerinin ürettiği toplam kolajen miktarı belirlenmiş ve benzer şekilde 7. günden (ortalama 5 mg/g kolajen) 28. güne kadar (ortalama 15 mg/g kolajen) yüksek standart sapma değerleriyle birlikte artan kolajen miktarı rapor edilmiştir [39]. Hidroksiprolin aminoasiti toplam kolajenin %13.4'ünü oluşturduğu için, hidroksiprolinden toplam kolajeni hesaplamada 1:7.46 dönüşüm oranı kullanılmakta ve böylece tez çalışmasında, 7. günde ortalama 1.5 mg/g kolajen ve 21. günde ortalama 9 mg/g kolajen sentezi yapıldığı belirlenmiştir. Sonucun literatürdeki benzer çalışmaya göre düşük çıkması tez çalışmasında hücre ekiminin 5 kat daha az olmasından kaynaklanmaktadır.

#### **4.3.2.6. RT-PCR Analizi**

Statik hücre kültür çalışmasınının 7., 14. ve 21. günlerinde hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskeleleri üzerine ekilen ve farklı büyüme ortamlarında kültüre edilen rAdMSC'lerin tendonla ilişkili ve tendon spesifik gen ifadeleri RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Referans gen olarak  $\beta$ -aktin seçilmiş ve sonuçlar  $\beta$ -aktin gen ifadesine göre normalize edilmiştir. Ayrıca sonuçlar istatistiksel olarak 7. gün normal besi ortamına göre, aynı gün farklı gruplara göre ve aynı grup farklı güne göre incelenerek yorumlanmıştır. Hizalı A-SF/P3HB doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rAdMSC'lere ait sonuçlar Şekil 4.18.'de sunulmuştur.



Şekil 4. 18. Hizalı A-SF/P3HB doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde RT-PCR analizi ile yapılan COL1A1, COL3A1, SCX, TNMD, TNC ve PPAR $\gamma$  kantitatif gen ekspresyon analiz grafikleri. (y-ekseni,  $\beta$ -aktine normalize edilen gen ekspresyonunu ifade etmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=5, kontrol grubu normal besi ortamındaki A-SF/P3HB'nin 7. günü olduğunda \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; aynı gün farklı gruplar arasında  $\square$   $p$ <0.05; aynı grup farklı günler arasında  $\blacktriangle$   $p$ <0.05,  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$   $p$ <0.001).

Kolajen tip I (COL1A1), vücutta birçok dokuda bulunup tendonun en önemli yapısal proteini. Hizalı A-SF/P3HB doku iskelelerinde kültüre edilen rAdMSC'lerin kültür süresi arttıkça, COL1A1 gen ifadesi her iki besi ortamı grubunda da artmıştır. Ayrıca, normal besi ortamında kültüre edilen A-SF/P3HB grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında, hem A-SF/P3HB ( $4.91 \pm 1.37$ ,  $p < 0.001$ ) hem de A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun ( $5.55 \pm 2.62$ ,  $p < 0.01$ ) 21. gününde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir. Bunun yanında, A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 21. günündeki gen ifadesi aynı grubun 7. gününe ( $1.29 \pm 0.47$ ,  $p < 0.001$ ) ve 14. gününe ( $3.59 \pm 0.88$ ,  $p < 0.05$ ) göre belirgin artış sergilemiştir. Aynı zaman aralıklarındaki gruplar arasında istatistiksel fark belirlenmezken, GDF-5 büyüme faktörünün COL1A1 ekspresyonu üzerinde etkisi görülememiştir.

Kolajen tip III (COL3A1), kolajen tip I fibrilogenezinde önemli rol oynayan ve tendon rejenerasyonunun proliferatif fazında sentezlenen tendonla ilişkili bir proteindir. RT-PCR analiz sonuçları incelendiğinde her iki grubun da kültür boyunca, COL3A1 gen ifadesinin COL1A1 profiline oldukça benzer olduğu görülmüştür. Normal ve GDF-5 içeren büyüme ortamlarında 21 gün boyunca COL3A1 ifadesi artmış ve 7. gün A-SF/P3HB grubu kontrol olarak alındığında, A-SF/P3HB ( $3.96 \pm 1.54$ ,  $p < 0.05$ ) ve A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun ( $4.61 \pm 1.96$ ,  $p < 0.01$ ) 21. günlerinde belirgin artış belirlenmiştir. Ayrıca, GDF-5 büyüme faktörü içeren grubun 7. ( $1.41 \pm 0.64$ ,  $p < 0.001$ ) ve 14. günleriyle ( $2.02 \pm 0.30$ ,  $p < 0.05$ ) 21. günü arasında da anlamlı artış tespit edilmiştir. Bunun yanında, GDF-5 büyüme faktörünün tek başına COL3A1 gen ifadesi üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. COL1A1 ve COL3A1 gen ifadelerinin sonuçları birlikte incelendiğinde, toplam kolajen miktarını indirekt olarak gösteren hidroksiprolin analiz sonuçları ile uyumlu oldukları bulunmuştur. Tendon rejenerasyonunda, mekanik dayanımı yüksek, sağlıklı ve olgun tendon dokusu gelişimi için en önemli parametrelerden biri kolajen tip I/kolajen tip III oranıdır ve rAdMSC'lerin COL1A1/COL3A1 gen ifade oranı her iki grupta ve tüm zaman aralıklarında 1'den yüksek bulunmuştur [184].

Tenascin-C (TNC), matriks proteinlerinin mekanik uyarımından sorumlu modulator olup tendon ve ligamentlerde kolajen fibrilogenezi ile ilişkili bir glikoproteindir. Her iki besi ortamında kültüre edilen rAdMSC'lerin TNC gen ifadeleri incelendiğinde ortalama değerler üzerinden 14. günde azalma ve 21. günde artış belirlenmiştir. A-SF/P3HB grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında aynı grubun 21. gününde ( $1.57 \pm 0.53$ ) ve A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 21. gününde ( $1.77 \pm 0.59$ ,  $p<0.05$ ) TNC gen ifadesi artmıştır. Aynı zaman aralığında gruplar arasında veya aynı grubun farklı zamanlarında istatistiksel farklılık saptanmamıştır. Tenojenik farklılaşmanın geç döneminde TNC gen ifadesi yukarı doğru regüle edilirken, 21 günlük kültür süresi TNC ifadesinde belirgin bir artış gözlemlemek için erken bir zamanı ifade edebilmektedir. Literatürde sıçan tendon fibroblastlarla yapılan bir çalışmada benzer ekspresyon profili bildirilmiş, TNC gen ifadesi GDF-5 kullanımının 9. gününde artarken, 12. günde azalmıştır [175]. Park ve ark. rAdMSC'lerle yaptığı bir çalışmada, GDF-5 büyüme faktörü varlığında TNC gen ifadesi kültürün 6. gününde azalırken, 9. ve 12. günlerinde artış göstermiştir [77]. TNC geç dönem tendonla ilişkili gen belirteci olduğundan, A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 21. günündeki belirgin artış literatüre uygundur [176].

Skleraksis (SCX) tenojenezde, hücresel tendon farklılaşmasında ve ECM organizasyonunda önemli rol oynayan protein olup en bilinen tendon spesifik gen belirteçidir. SCX gen ifadeleri incelendiğinde her iki grupta da kültür boyunca artış belirlenirken, genel olarak GDF-5 içeren grupların her zaman aralığında normal besi ortamına göre gen ifadeleri daha fazla bulunmuştur. A-SF/P3HB grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında, A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 14. ( $2.47 \pm 0.29$ ,  $p<0.01$ ) ve 21. ( $2.93 \pm 0.95$ ,  $p<0.01$ ) günlerinde belirgin SCX gen ekspresyonu kaydedilmiştir. Aynı zaman aralığında GDF-5 kullanımının etkisi görülmezken, A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 7. ( $1.57 \pm 0.46$ ,  $p<0.05$ ) ve 21. günleri arasında da SCX gen ifadesinde artış bulunmuştur. GDF-5 içermeyen A-SF/P3HB grubunda ise 14. ( $2.05 \pm 0.36$ ) ve 21. ( $2.22 \pm 0.41$ ) gün bağıl gen ifadeleri birbirine oldukça yakın olup GDF-5 büyüme faktörünün tendon rejenerasyonunda gen ekspresyonlarını regüle ettiğini kanıtlamıştır.

SCX, tenojenezde Mohawk ve EGR1/2 sinyal yollarını aktive ederek kolajen tip I, kolajen tip III ve kolajen tip IV gibi tendon dokuda oldukça fazla ekspresyona edilen gen belirteçlerinin ekspresyonlarını başlatmaktadır [185]. SCX-baskılanmış farelerle yapılan bir çalışmada, tenomodulin ve kolajen IV ekspresyonunun olmadığı ve kolajen tip I ekspresyonunun kısıtlı olduğu bildirilmiştir [186]. Bu nedenle, rAdMSC'lerin COL1A1, COL3A1 ve tenomodulin gen ekspresyonları SCX ile benzer bir profil göstermektedir.

Tenomodulin (TNMD), ekspresyonu SCX tarafından yukarı yönde regüle edilen geç dönem tendon spesifik gen belirteci olup bir tip II transmembran proteindir. A-SF/P3HB grubunda SCX gen ifade grafiğine benzer şekilde kültür boyunca artan TNMD ekspresyonu kaydedilmiştir. A-SF/P3HB+GDF-5 grubunda ise, 14. gündeki ekspresyon aşımını takiben 21. günde istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma olmuştur. Literatürde, GDF-5 büyüme faktörü kullanılan bir çalışmada benzer şekilde 6. günde artış ve kültür sonuna kadar TNMD ekspresyonunda azalma bildirilmiştir [77]. A-SF/P3HB grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında, A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 14. ( $2.15 \pm 0.54$ ,  $p < 0.01$ ) ve 21. ( $1.80 \pm 0.25$ ,  $p < 0.05$ ) günlerinde TNMD gen ifadesinde anlamlı artış belirlenmiştir. Aynı zaman aralığındaki gruplar arasında A-SF/P3HB+GDF-5 grubunun 14. gününde A-SF/P3HB grubuna ( $1.42 \pm 0.24$ ,  $p < 0.05$ ) göre istatistiksel anlamlılık belirlenirken, benzer şekilde gruplar arasında farklı günler incelendiğinde yine büyüme faktörü içeren grubun 14. ve 7. ( $1.22 \pm 0.18$ ,  $p < 0.05$ ) günleri arasında belirgin artış ( $p < 0.05$ ) gözlemlenmiştir. GDF-5 büyüme faktörünün, SCX ekspresyonunu arttırdığı ve böylece Smad/BMP sinyal yolağı üzerinden TNMD gen ifadesinin de benzer şekilde arttığı belirlenmiştir [176].

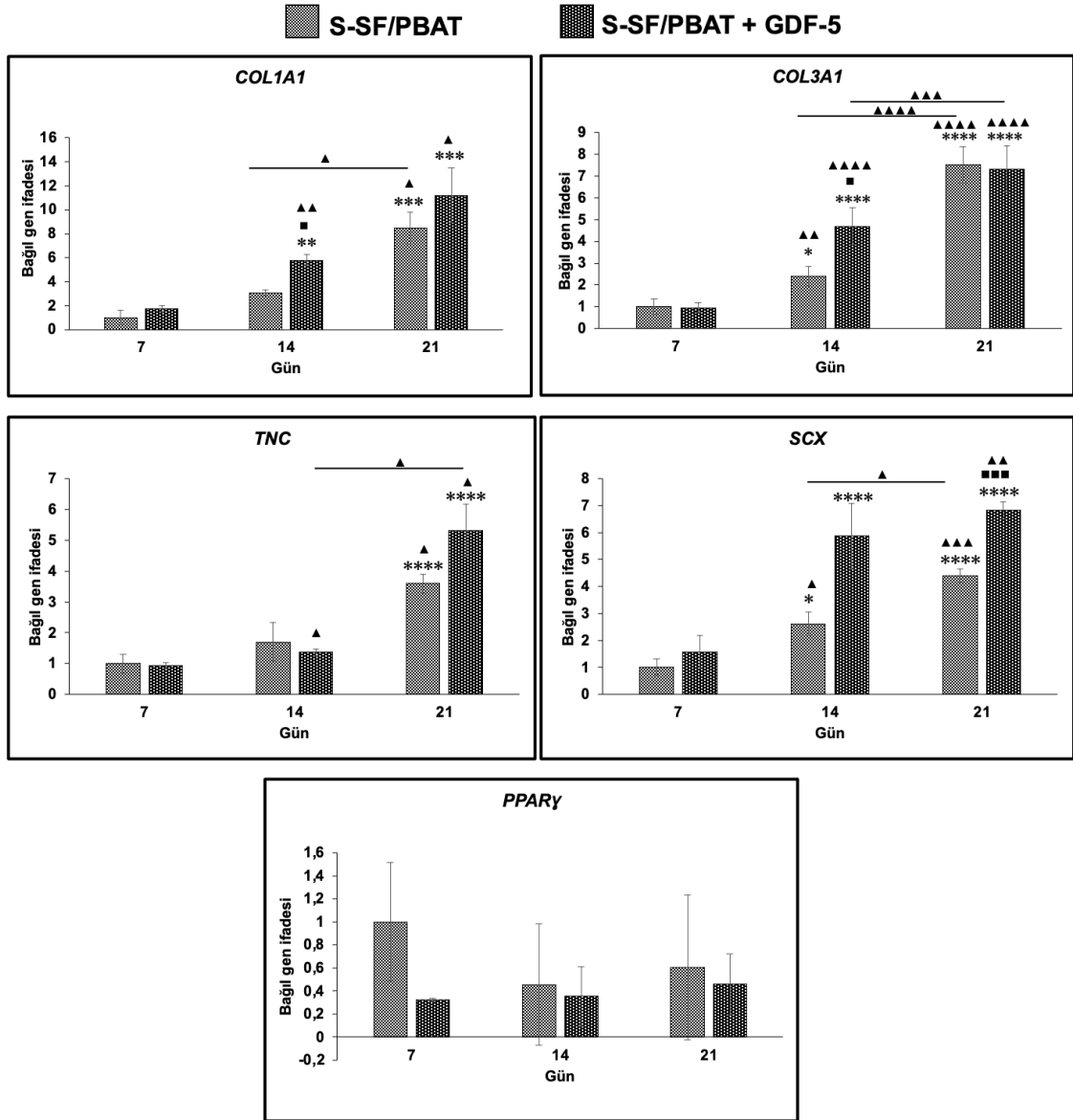
Peroksizom çoğaltıcı-aktive edici reseptör  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), kök hücrelerde Wnt sinyal yolağı ile adipojenik farklılaşmayı sağlayan transkripsiyon faktörüdür ve tez çalışmasında adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler kullanıldığı için adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla incelenmek istenmiştir. Tüm kültür boyunca her iki besi ortamı grubunda da PPAR $\gamma$  ekspresyon aşımı belirlenmiş ve A-SF/P3HB+GDF-5 grubunda, kültürün 14. ( $6.26 \pm 0.77$ ) gününden 21. gününe ( $13.00 \pm 0.85$ ,  $p < 0.05$ ) anlamlı artış belirlenmiştir.

A-SF/P3HB grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında her iki besi ortamı grubunun 21. gününde PPAR $\gamma$  gen ifadesinde anlamlı artış tespit edilmiştir. İnsan AdMSC'leriyle yapılan 7 günlük bir çalışmada, kök hücrelerin tenojenik gen belirteçlerinin yanında düşük seviye PPAR $\gamma$  ekspresyonu gösterdiği bildirilmiştir [14]. Chiu ve ark. kolajen kaplı PMDS yüzeylerde insan AdMSC'lerinin statik kültür koşullarında PPAR $\gamma$  gen ifadesini tespit etmişlerdir [187]. GDF-5 büyüme faktörünün ek olarak bir etkisi gözlemlense de, normal besi ortamında kültüre edilen grupta da PPAR $\gamma$  ekspresyon artışı hücrelerin hem tenojenik hem de adipojenik farklılaşmaya uğradığını göstermektedir. Bu nedenle, hizalı nanofiber topografyası ve GDF-5 büyüme faktörünün yanında, tenojenik farklılaşmayı artırmak için mekanik uyurum uygulanan dinamik kültür koşullarının da alternatif olarak uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Aynı deney koşullarında rAdMSC ekimi yapılan hizalı S-SF/PBAT doku iskelelerinden elde edilen RT-PCR analiz grafikleri Şekil 4.19.'da verilmiştir. TNMD gen belirteci için sonuç elde edilememiştir.

COL1A1 gen ifadesi incelendiğinde, kültür süresi boyunca her iki besi ortamında hizalı nanofiberler üzerinde kültüre edilen rAdMSC'lerde COL1A1 ekspresyon aşımı belirlenmiştir. S-SF/PBAT grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında, aynı grubun 21. (8.45  $\pm$  1.31,  $p < 0.001$ ) gününde ve S-SF/PBAT+GDF-5 grubunun 14. (5.79  $\pm$  0.45,  $p < 0.01$ ) ve 21. (11.21  $\pm$  2.31,  $p < 0.001$ ) günlerinde belirgin gen ifadesi artışı kaydedilmiştir. Ayrıca, S-SF/PBAT grubunun 21. gününde hem 7. ( $p < 0.05$ ) gün hem de 14. (3.07  $\pm$  0.26,  $p < 0.05$ ) güne göre istatistiksel anlamlı farklılık belirlenmiştir. Benzer şekilde S-SF/PBAT+GDF-5 grubunun da 7. güne göre, 14. ( $p < 0.01$ ) ve 21. ( $p < 0.05$ ) günlerinde COL1A1 gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bunun yanında, aynı zaman aralıklarında gruplar arası farklılıklar belirlenmiş ve 14. günde GDF-5 büyüme faktörü içeren grupta normal besi ortamına göre gen ifadesinde artış tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). S-SF/PBAT doku iskelelerindeki COL1A1 gen ifadesi A-SF/P3HB doku iskeleleriyle kıyaslandığında, kültür sonunda bağıl gen ifadesi yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur.





Şekil 4. 19. Hizalı S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin normal besi ortamı ve GDF-5 içeren besi ortamında kültürasyonlarının 7., 14. Ve 21. Gününde RT-PCR analizi ile yapılan COL1A1, COL3A1, SCX, TNC ve PPAR $\gamma$  kantitatif gen ekspresyon analiz grafikleri. (y-ekseni,  $\beta$ -aktine normalize edilen gen ekspresyonunu ifade etmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, kontrol grubu normal besi ortamındaki S-SF/PBAT'ın 7. Günü olduğunda \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; aynı gün farklı gruplar arasında  $\square p < 0.05$ ,  $\square\square p < 0.001$ ; aynı grup farklı günler arasında  $\blacktriangle p < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle p < 0.01$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p < 0.001$ ).

COL3A1 gen iadesi incelendiğinde, COL1A1 gen ekspresyon profiline benzer bir grafik elde edilmiştir. S-SF/PBAT grubunun 7. Günü kontrol alındığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar her iki besi ortamında da 14. Günden itibaren görülmeye başlanmış ve 21. Günde hem S-SF/PBAT ( $7.50 \pm 0.83$ ,  $p < 0.001$ ) hem de S-SF/PBAT+GDF-5 grubunda ( $7.32 \pm 1.05$ ,  $p < 0.001$ ) COL3A1 ekspresyon aşımı gözlenmiştir. COL1A1 gen ifadesiyle tutarlı şekilde kültürün 14. gününde GDF-5 büyüme faktörü içeren grup ile normal besi ortamı arasında da anlamlı farklılık belirlenmiştir. Bunun yanında, S-SF/PBAT grubunun 14. ( $2.39 \pm 0.46$ ) ve 21. günleriyle, S-SF/PBAT+GDF-5 grubunun 14. ( $4.69 \pm 0.83$ ) ve 21. günleri arasında da COL3A1 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ). Her iki besi ortamındaki doku iskelesinde de COL1A1 ve COL3A1 ekspresyonlarının A-SF/P3HB grubuna göre fazla olması, hidroksiprolin analizinde S-SF/PBAT doku iskelelerinde ortalama olarak daha fazla toplam kolajen miktarının belirlenmesiyle uyumlu bulunmuştur.

Ayrıca, daha önce de belirtildiği gibi sağlıklı tendon doku rejenerasyonunda kolajen tip I ve tip III gen ekspresyonlarının niceliğinden ziyade birbirine oranı önem arz etmektedir. Her iki besi ortamında ve her zaman aralığında COL1A1/COL3A1 oranı 1'den büyük bulunmuş ve özellikle GDF-5 büyüme faktörü içeren grupta COL1A1/COL3A1 oranı 1.53 olarak hesaplanmıştır.

TNC, geç dönem tendonla ilişkili gen belirteci olarak bilinmekte ve elde edilen sonuçlar bunu doğrulamaktadır. S-SF/PBAT grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında aynı grubun 21. ( $3.59 \pm 0.31$ ,  $p < 0.0001$ ) gününde ve S-SF/PBAT+GDF-5 grubunun 21. ( $5.31 \pm 0.84$ ,  $p < 0.0001$ ) gününde istatistiksel olarak anlamlı TNC ekspresyonu belirlenmiştir. Aynı zaman aralığında gruplar arasında farklılık bulunmazken, GDF-5 büyüme faktörü içeren grubun 7.-14., 7.-21. ve 14.-21. günleri arasında da sürekli artış tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Elde edilen 21. gün sonuçları A-SF/P3HB doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında normal besi ortamında 2.3 kat, GDF-5 büyüme faktörü içeren grupta 3.0 kat artış ölçülmüştür. Ayrıca, kültür sonunda A-SF/P3HB grubunda elde edilen bağıl gen ifadeleri, S-SF/PBAT doku iskelesi gruplarının 14. gününde yakalanmıştır. GDF-5 büyüme faktörünün istatistiksel olarak etkisi olmasa da geç dönem kültür sonunda, GDF-5 içeren grupta TNC gen ekspresyonu daha fazla bulunmuştur.

SCX gen belirteci RT-PCR analizinde çalışılan diğer gen belirteçlerinin çoğunun aktivasyonunu ve ekspresyonlarının sürekliliğini sağladığı için, 14. günden itibaren SCX gen ifadesindeki artış COL1A1 ve COL3A1 gen ifadelerinin artışıyla uyumlu bulunmuştur. S-SF/PBAT grubunun 7. günü kontrol olarak alındığında aynı grubun 14. ( $2.60 \pm 0.43$ ,  $p < 0.05$ ) ve 21. ( $4.38 \pm 0.25$ ,  $p < 0.0001$ ) günlerinde, S-SF/PBAT+GDF-5 grubunun da benzer şekilde 14. ( $5.86 \pm 1.22$ ,  $p < 0.0001$ ) ve 21. ( $6.83 \pm 0.31$ ,  $p < 0.0001$ ) günlerinde SCX gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Aynı zaman aralığı içerisinde sadece 21. günde normal besi ortamı ve GDF-5 büyüme faktörü içeren besi ortamında SCX gen ekspresyonu açısından farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Bunun yanında S-SF/PBAT grubunun 7.-14. ( $p < 0.05$ ), 7.-21. ( $p < 0.001$ ) ve 14.-21. ( $p < 0.05$ ) günleri arasında da anlamlı artış belirlenmiştir. Benzer şekilde, GDF-5 içeren grubun 7.-21. ( $p < 0.01$ ) günleri arasında SCX ekspresyon aşımı gözlemlenmiştir. Başta S-SF/PBAT doku iskelesi olmak üzere A-SF/P3HB grubunda da GDF-5 büyüme faktörü kullanımının SCX ekspresyonunu önemli derecede artırdığı görülmüştür. Bağlı gen ifadeleri incelendiğinde S-SF/PBAT doku iskelelerinde SCX ekspresyonu A-SF/P3HB'nin yaklaşık 2 katı kadardır. GDF-5 büyüme faktörünün tenojenezi indükleyerek ECM yapısını iyileştirdiği ve SCX gibi tenojenik gen belirteçlerinin ifadesini arttırdığı ispatlanmış ve elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur [77, 78].

PPAR $\gamma$  gen ifadesine ait sonuçlarda, zamana veya GDF-5 büyüme faktörüne bağlı olarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. S-SF/PBAT+GDF-5 grubunda kültür süresi boyunca PPAR $\gamma$  ekspresyonu sabit kalırken, S-SF/PBAT grubunda gen ifadesinde azalma eğilimi belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde, GDF-5 büyüme faktörünün PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunu regüle etmesi veya baskılamasıyla ilgili ipucuna rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar standart sapmalarla birlikte değerlendirildiğinde kültürün 7. gününde S-SF/PBAT ( $1.00 \pm 0.51$ ) ve S-SF/PBAT+GDF-5 ( $0.32 \pm 0.01$ ) grupları arasında istatistiksel anlamlı olmayan fark tespit edilirken, bu grup haricinde PPAR $\gamma$  gen ekspresyonu tüm gruplarda 0.60 değerinin altında kalmıştır.

A-SF/P3HB doku iskelelerinde kültür boyunca şiddetle artan PPAR $\gamma$  gen ekspresyonu, S-SF/PBAT doku iskelelerinde kontrol grubunun hep altında kalmış ve aşağı yönde düzenlenmiştir. Adipojenik farklılaşma belirteci olan PPAR $\gamma$ 'nın bağıl gen ifadesi, normal ya da GDF-5 büyüme faktörü içeren besi ortamı ve zaman farketmeksizin S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC'lerin adipojenik farklılaşmaya uğramadığını kanıtlamıştır.

Özetle, incelenen tüm genetik belirteçler ve bu gen belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri düşünüldüğünde (yüksek SCX, TNC ve düşük PPAR $\gamma$ ), S-SF/PBAT doku iskeleleri sağlıklı tendon rejenerasyonu açısından A-SF/P3HB doku iskelesine göre üstün bulunmuştur. Doku iskelelerinin yüzey, kimyasal, mekanik vb. özelliklerinden dolayı rAdMSC'lerin tutunma, çoğalma ve farklılaşma davranışları kullanılan doku iskelesine göre değişmiştir. Ayrıca, GDF-5 büyüme faktörü içeren gruplarla normal besi ortamında kültüre edilen doku iskeleleri karşılaştırıldığında, gen ekspresyon farkı her iki doku iskelesi grubunda da korunmuştur. GDF-5 büyüme faktörünün tenojenik farklılaşmada hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve gen düzeyinde SCX, TNMD, COL1A1, COL3A1 gibi tendonla ilişkili gen ekspresyonlarını artırırken, RUNX2, SOX9, BGLAP gibi osteojenik farklılaşma gen belirteçlerinin ekspresyonlarını azalttığı başka gruplar tarafından da gösterilmiştir [77, 78, 176, 188, 189].

#### **4.3.2.7. Mekanik Analiz**

Statik hücre kültür çalışmasının sonunda, normal besi ortamı ve GDF-5 büyüme faktörü içeren besi ortamında kültüre edilen rAdMSC ekilmiş hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerinin mekanik özelliklerinde oluşan değişim çekme testi belirlenmiştir. Bu amaçla, tez çalışmasında yapılan diğer analizlerden farklı olarak örnek boyutu 1 cm  $\times$  5 cm olarak belirlenmiş ve aynı yoğunlukta hücre ekimi yapılmıştır. Statik kültür öncesi hizalı nanofibröz matrikslerle aynı koşullarda çekme testi gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4. 10. Statik kültürün 21. gününde farklı ortamlarda rAdMSC'lerle kültüre edilen hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerine ait mekanik analiz sonuçları (n=3).

Örnek adı	Elastik modül (MPa)	Çekme dayanımı (MPa)	Tokluk (MJ/m <sup>3</sup> )	Kopma noktasında uzama (%)
<b>A-SF/P3HB</b>	56.8 ± 1.5	1.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	64 ± 1
<b>A- SF/P3HB + GDF-5</b>	42.5 ± 6.3	2.0 ± 0.1	0.9 ± 0.4	56 ± 3
<b>S-SF/PBAT</b>	158.4 ± 4.1	4.5 ± 0.2	4.2 ± 0.6	144 ± 15
<b>S-SF/PBAT + GDF-5</b>	155.3 ± 6.2	4.2 ± 0.4	4.1 ± 1.1	148 ± 21

Statik kültür öncesi hizalı A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan çekme testi sonuçları 4.2.5. *Mekanik Karakterizasyon* bölümünde, *Çizelge 4.9.*'da sunulmuştur. Çekme testi sonucu oluşturulan gerilim-gerinim eğrisinde elastik bölgedeki birim uzamaya karşılık uygulanan birim kuvveti ifade eden elastik modül değeri, statik kültür öncesi A-SF/P3HB doku iskelelerinde  $182 \pm 17$  MPa iken kültür sonrası  $56.8 \pm 1.5$  MPa değerine düşmüş ve benzer şekilde S-SF/PBAT doku iskelelerinde kültür öncesi  $541 \pm 22$  MPa olan elastik modül  $158.4 \pm 4.1$  MPa değerine kadar azalmıştır. Bunun yanında doku iskelelerinin çekme kuvvetine karşı gösterdiği maksimum direnç olan çekme dayanımı, A-SF/P3HB doku iskelelerinde kültür öncesi değer olan  $7.3 \pm 0.7$  MPa'dan  $2.0 \pm 0.1$  MPa değerine kadar azalırken, S-SF/PBAT doku iskelelerinde  $25.6 \pm 1.5$  MPa'dan kültür sonrası  $4.5 \pm 0.2$  MPa değerine kadar düşmüştür. Çekme testindeki gerilim-gerinim grafiğinin altında kalan alanı ifade eden tokluk değerlerinde de her iki doku iskelesi için kültür sonrasında kültür öncesine göre azalma meydana gelmiştir. Doku iskelelerine uygulanabilecek maksimum gerinimi ifade eden kopma noktasında uzama değerlerinde ise her iki grupta da kültür öncesi ve sonrası olmak üzere belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Ayrıca, 21 gün boyunca GDF-5 büyüme faktörü kullanımının sadece A-SF/P3HB doku iskelesi grubunun elastik modül değerinin daha yüksek seviyede korunmasını sağladığı, bunun dışında kalan doku mekanik özelliklerinde değişim oluşturmadığı saptanmıştır.

Kültür öncesi ve sonrasında her iki doku iskelesi grubunun elastik modül, çekme dayanımı ve tokluk değerlerinde azalma, hizalı nanofibröz matrikslerin kültür ortamları içerisinde bozunduğunu göstermektedir. *4.2.8. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi* bölümünde 21 gün boyunca hidrolitik ya da enzimatik koşullarda belirgin bir bozunma görünmese de ortam pH değeri ve hücreler tarafından ortama salınan enzimler vb. nedeniyle doku iskelelerinin *in vitro* koşullarda molekül ağırlıklarında oluşan değişimlere bağlı olarak mekanik özelliklerinin azalmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Tendon rejenerasyonunda 2-3 günlük enflamatuvar fazını takiben gelişen ve hücre proliferasyonu ile kolajen tip I üretiminin artışının gerçekleştiği yaklaşık 3-4 hafta süren proliferatif fazda, her iki doku iskelesinin de rAdMSC hücrelerinin tutunması, çoğalması ve kendi ECM elemanlarını üretmesi için destek görevi görerek zamanla bozunmaya uğraması tendon doku mühendisliği ürününden beklenen bir özelliktir.

#### **4.3.3. Dinamik Kültür Çalışmaları**

Tendon rejenerasyonunda dokuyu en iyi şekilde taklit edebilmek için kullanılan doku iskelesi özellikleri, hücre seçimi, sitokinlerin yanında mekanik uyarmı da oldukça önem arz etmektedir. Mekanik uyarılara bağlı olarak hücrelerin ECM organizasyonu değişmektedir. Bu kapsamda, kullanılan mekanik uyarmı biyoreaktörleri *in vivo* koşulları yansıtacak bir ortam sağlamaktadır. Dinamik kültür çalışmalarında, statik kültür çalışmalarındaki yöntem ve yoğunlukta hücre ekimi yapılmış fakat doku iskelesi boyutu 1cm × 5cm olarak belirlenmiştir. A-SF/P3HB doku iskeleleri hücre ekimini takiben 2 gün boyunca statik ortamda kültüre edilmiş ve sonrasında dinamik kültür koşullarının uygulanacağı mekanik uyarmı biyoreaktörüne aktarılmıştır. *Çizelge 2.3. Tendon rejenerasyonunda mekanik uyarmı biyoreaktörü ile yapılan çalışmalar* bölümünde özetlendiği gibi literatür araştırması yapılarak ön çalışmalar için gerekli olan çekme gerinimi (%4 ve %8), çekme frekansı (0.2 Hz ve 0.5 Hz) ve çekme süresi (1 sa/gün ve 3 sa/gün) koşulları belirlenmiştir. Ön çalışmalar kapsamında yapılan kültür çalışmaları 2 gün statik kültür ve 5 gün dinamik kültür olmak üzere toplamda 7 gün boyunca devam ettirilmiş ve kültür sonunda MTT analizi yapılarak mitokondriyal aktivite ve hücre canlılığı belirlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4. 11. Dinamik kültür koşullarında yapılan ön çalışmalar ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3)

Statik Kültür Süresi	Dinamik Kültür Süresi	Çekme Gerinimi	Çekme Frekansı	Çekme Süresi	MTT Absorbansı
(gün)	(gün)	(%)	(Hz)	(sa)	(OD @570 nm)
2	5	4	0.2	1	0.128 ± 0.028
2	5	4	0.2	3	0.094 ± 0.010
2	5	8	0.2	1	0.119 ± 0.009
2	5	8	0.2	3	0.110 ± 0.010
2	5	4	0.5	1	0.099 ± 0.021
2	5	4	0.5	3	0.071 ± 0.011
2	5	8	0.5	1	0.088 ± 0.012
2	5	8	0.5	3	0.085 ± 0.025

A-SF/P3HB doku iskelelerine ekilen rAdMSC hücrelerinin toplamda 7 günlük statik ve dinamik kültür sonunda mitokondriyal aktiviteleri yapılan MTT analizi ile belirlenmiş ve en fazla  $0.128 \pm 0.028$  absorbans değeri elde edilebilmiştir. Statik kültür ortamında A-SF/P3HB doku iskelelerine ait absorbans değeri Şekil 4.13.'te verildiği üzere  $0.185 \pm 0.093$  olarak belirlenmiştir. Hücre canlılığının düşük çıkması (1) hücrelerin yüzeye tutunmadan dinamik kültür koşullarına geçilmesi, (2) çekme frekansının hücreler için fazla gelerek hücrelerin iskele yüzeyinden ayrılması, (3) çekme frekansının yanında çekme süresinin de hücrelerin yüzeyden ayrılmasına neden olabileceği ve (4) biyoreaktör kültür haznesinden gelebilecek toksisitenin hücre canlılığını etkilemesi nedenlerinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Hücrelerin doku iskelesine tutunmayı tamamlamadan dinamik kültür koşullara geçilmesini önlemek için statik kültür süresi 2 günden 7 güne çıkarılmıştır. Çekme frekansının fazla gelmesi durumu için, çekme frekansı 0.2 Hz'den 0.0167 Hz'e düşürülmüş ve bunun yanında biyoreaktör kültür haznesinde 0 Hz frekansta durgun ortamda kültür yapılan bir grup denenmiştir. Çekme süresinin fazla gelmesine karşılık çekme süresi toplamda 1 sa olacak şekilde 4 kısma bölünmüş ve 15 dk/sa, 4 sa/gün olarak uygulanmıştır.

Kültür haznesinden gelebilecek toksisite etkisini gözlemlemek için de bir grup A-SF/P3HB doku iskelesi diğer gruplar gibi 7 gün statik ortamda kültüre edilmiş fakat diğer gruplar gibi biyoreaktör ortamına alınmayarak aynı kap içerisinde 7 gün daha kültürü devam ettirilmiştir. Bu kapsamda revize edilen kültür koşulları ve kültür sonunda yapılan MTT analiz sonuçları Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. Dinamik kültür çalışmalarında revize edilen kültür koşulları ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3).

Statik Kültür Süresi	Dinamik Kültür Süresi	Çekme Gerinimi	Çekme Frekansı	Çekme Süresi	MTT Absorbansı
(gün)	(gün)	(%)	(Hz)	(sa)	(OD @570 nm)
7	7	4	0.0167	1	0.111 ± 0.017
7	7	4	0.0167	3	0.106 ± 0.028
7	7	4	0.0167	15 dk/sa, 4 sa/gün	0.092 ± 0.014
7	7	-	-	-	0.065 ± 0.014
14	-	-	-	-	0.106 ± 0.030

Dinamik kültür çalışmalarında yapılan revizyonun ardından MTT absorbans değerlerinde beklenmeyen düşüklük devam etmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde statik ve dinamik kültür süresinin, gerinimin, frekansın, çekme süresinin absorbans değerlerini etkilemediği ve biyoreaktör kültür haznesinden kaynaklanabilecek herhangi bir toksisite nedeniyle absorbans değerinde ayrıca bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir. rAdMSC hücrelerinin ekim öncesi çoğaltılması sürecinde kontaminasyon yaşanmaması, üreme hızlarının normal oluşu ve hücre morfolojisinde farklılık görülmemesi nedeniyle hücrelerin sağlıklı olduğu sonucuna varılarak hücre ekimi esnasında, hücrelerin tutunmadan ölüme gitmesi olasılığı değerlendirilmek istenmiş ve buna bağlı olarak hücre ekim protokolünde değişiklik yapılmıştır.

Normal koşullarda rAdMSC ekiminde %10 FBS (v/v) içeren  $\alpha$ -MEM ile 20  $\mu$ L/cm<sup>2</sup> hacimde ve tek aşamalı ekim prosedürü uygulanırken, revize edilen ekim protokolünde serum ve glikoz miktarı fazla olan ortam kullanılarak %15 FBS (v/v) içeren  $\alpha$ -MEM:DMEM HG (1:1) besi ortamı ile 20  $\mu$ L/cm<sup>2</sup> hacimde ve 1 sa arayla iki aşamalı olacak şekilde rAdMSC hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.



Bunun yanında, A-SF/P3HB doku iskelelerine yapılan rAdMSC ekim yoğunluğunun az gelmiş olabileceği de düşünülerek bir gruba da 3 kat yoğunlukta ( $3 \times 10^5$  hücre/cm<sup>2</sup>) hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekim prosedüründe yapılan değişikliklerle birlikte A-SF/P3HB doku iskeleleri hem statik kültürde hem de mekanik uyarım olmadan biyoreaktör ortamında durgun şartlarda kültüre edilmiştir. Dinamik kültür çalışmalarında farklı ekim protokolü kullanılarak revize edilen kültür koşulları ve MTT analiz sonuçları Çizelge 4.13.'te verilmiştir.

Çizelge 4. 13. Dinamik kültür çalışmalarında farklı ekim protokolü kullanılarak revize edilen kültür koşulları ve ilgili MTT analizi absorbans değerleri (n=3).

Ekim protokolü	Statik Kültür Süresi (gün)	Biyoreaktörde Durgun Kültür Süresi (gün)	MTT Absorbansı (OD @570 nm)
Standart	7	-	0.312 ± 0.011
Standart	2	5	0.154 ± 0.034
Standart (x3 kat)	2	5	0.205 ± 0.076
Yeni	7	-	0.292 ± 0.071
Yeni	2	5	0.193 ± 0.055

Yapılan denemeler sonucunda hücre ekim protokolünün de hücre canlılığını artırmak için yeterli olmadığı görülmüştür. A-SF/P3HB doku iskelelerine 3 kat yoğunlukta yapılan rAdMSC ekimi sonrası ise MTT değerlerinde artış yaşanmamıştır. Ekim öncesi oldukça sağlıklı olan hücrelerin ekim protokolünün değiştirilmesi ve ekim yoğunluğunun artırılmasına rağmen canlılıklarının düşük çıkmasının nedeni olarak, her ne kadar statik kültür çalışmalarında problem yaşanmasa da A-SF/P3HB doku iskelelerinin dinamik kültür koşullarına uygun olmadığı düşünülmüştür.

İlk yapılan ön çalışmalarda düşük MTT absorbanslarının elde edilmesi sonucunda aşağıda sıralanan uygulamalarla olası problemler elenmiştir. Dinamik kültür çalışmaları boyunca:

- Dinamik kültür parametreleri olan gerinim, frekans ve çekme süresi hem azaltılıp hem de tamamen durgun koşullarda çalışma yapılarak mekanik uyarıma bağlı ihtimaller,
- A-SF/P3HB doku iskelelerinin statik kültür çalışmalarında 14. günde gözlenen MTT absorbans artışlarına istinaden kültür süresinin uzatılarak dinamik kültür koşullarındaki kültür süresinin az gelme ihtimali,
- Hem biyoreaktör haznesinde hem de ekim yapılan Petri kabında aynı sürelerde kültür yapılarak biyoreaktör haznesinden gelebilecek toksisite ihtimali,
- A-SF/P3HB doku iskelesine 3 kat fazla yoğunlukta rAdMSC ekimi yapılarak hücre yoğunluğunun dinamik kültür çalışması için düşük gelme ihtimali,
- Farklı ekim protokolü uygulanarak rAdMSC'lerin ekim sırasında besin yetersizliğinden veya ekim süresinden ölüme gitme ihtimali elenmiştir.

Özetle dinamik kültür koşulları ve hücre tutunmasını artıracak girişimlerin etkisi test edilmiş ve düşük MTT absorbans değerlerinin A-SF/P3HB doku iskelesi kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, tez çalışması kapsamına S-SF/PBAT doku iskelelerinin üretimi, karakterizasyonu ve statik hücre kültür çalışmaları dahil edilmiştir. S-SF/PBAT doku iskelelerinin mekanik özellikler, hücre tutunması, hücre proliferasyonu ve farklılaşma açısından A-SF/P3HB doku iskelelerine göre daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle de, dinamik kültür çalışmaları için daha uygun olacağı değerlendirilmiştir.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında tendon doku mühendisliği çalışmalarında yama olarak kullanılabilecek hizalı topografyaya sahip SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin elektroğirme yöntemiyle fabrikasyonu gerçekleştirilmiştir. Belirli çap dağılımında nanofiberlerin elde edilmesi için optimizasyon tekniğinden yararlanılmıştır. Üretilen nanofibröz matriksler ve bu matrikslere uygulanan stabilizasyon ve sterilizasyon uygulamaları sonunda nanofibröz matriksler mekanik, yüzey, termal, kimyasal, ıslatılabilirlik, kristalografik özellikler açısından karakterize edilmiştir. Primer rAdMSC hücrelerinin hizalı topografyaya sahip SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matriksler üzerine ekilerek normal besi ortamı ve GDF-5 büyüme faktörü içeren besi ortamlarında 21 günlük statik kültür çalışmaları tamamlanmıştır. Statik kültür sonrası hücrelerin tutunma, çoğalma ve farklılaşma özellikleri çeşitli tekniklerle belirlenmiştir. Bunun yanında mekanik uyarım biyoreaktörü ile dinamik hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- RSM ile yapılan SF/P3HB nanofiber optimizasyonunda elektroğirme parametreleri toplam polimer konsantrasyonu %5, SF:P3HB oranı 3:1, akış hızı 1 mL/sa, uzaklık 25 cm, döner toplayıcı dönme hızı 2,000 rpm ve uygulanan voltaj 14 kV olarak optimize edilmiştir. Toplamda 15 sa boyunca yapılan elektroğirme ile yaklaşık 100  $\mu\text{m}$  kalınlıkta,  $699 \pm 203$  nm ortalama fiber çapında ve  $\pm 15^\circ$  aralığında %81 hizalanmaya sahip SF/P3HB nanofibröz matriksler üretilmiştir.
- RSM ile yapılan SF/PBAT nanofiber optimizasyonunda elektroğirme parametreleri toplam polimer konsantrasyonu %7.6, SF:P3HB oranı 35:65, akış hızı 1 mL/sa, uzaklık 25 cm, döner toplayıcı dönme hızı 2,000 rpm ve uygulanan voltaj 16 kV olarak optimize edilmiştir. Toplamda 15 sa boyunca yapılan elektroğirme ile yaklaşık 100  $\mu\text{m}$

kalınlıkta,  $677 \pm 137$  nm ortalama fiber çapında ve  $\pm 15^\circ$  aralığında %90 hizalanmaya sahip SF/PBAT nanofibröz matriksler elde edilmiştir.

- SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin metanolla stabilizasyon uygulaması sonrasında, ipek fibroine ait  $\alpha$ -heliks yapısının  $\beta$ -tabaka yapısına geçişi FTIR analizi ile  $1623 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1515 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki piklerin varlığıyla tayin edilmiştir. Stabilizasyon uygulamasının kristalinite ve bozunma sıcaklıklarında artışa neden olduğu gözlenirken, malzemelerin mekanik dayanımı ve ıslatılabilirlik özellikleri üzerinde etkisi bulunmamıştır.
- SF/P3HB nanofibröz matrikslerin bakteriyostatik etkisi olduğu belirlenmiş ve SF/P3HB matrikslere uygulanan otoklav ve etilen oksit yöntemlerinin malzemede herhangi bir yapısal değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir. L929 hücreleri ile yapılan 7 günlük hücre kültür çalışmasına göre SF/P3HB nanofibröz matrikslerin sterilizasyonunda otoklav yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.
- Sıçan adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler akış sitometri analizi ile mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri açısından karakterize edilmiş ve P5'teki rAdMSC hücrelerinin özgül üreme hızı  $0.0163 \text{ sa}^{-1}$  ve ikilenme süresi 42.3 sa olarak hesaplanmıştır.
- A-SF/P3HB ve S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC hücrelerinin normal besi ortamı ve farklılaşmayı indükleyen GDF-5 büyüme faktörü içeren besi ortamı içerisindeki 21 günlük statik kültür çalışmasında, MTT analiziyle farklılaşmaya bağlı olarak mitokondriyal aktivitenin kültürün 7. gününe kadar azalma ve 7. günden sonra artış eğilimine geçtiği belirlenmiştir. Kültürün ilk ve son günleri temel alınarak, GDF-5 büyüme faktörü kullanımının ve S-SF/PBAT nanofibröz matrikslerin hücrelerin tutunma ve çoğalmasını artırdığı görülmüştür.
- Statik kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yapılan görüntülemeler sonucunda hücrelerin her iki doku iskelesi üzerinde ve her iki besi ortamı koşullarında kültür boyunca canlılıklarının yüksek olduğu, hizalı topografya uygun şekilde hizalandıkları ve hücre iskeletinin de nanofiber eksenine boyunca uzadığı gözlemlenmiştir.

- Statik kültür sonunda yapılan mekanik analiz sonucunda her iki doku iskelesinde de bozunmaya bağlı olarak mekanik dayanımın azaldığı belirlenmiş ve A-SF/P3HB doku iskelelerinde statik kültür öncesi  $182 \pm 17$  MPa olan elastik modül değeri  $56.8 \pm 1.5$  MPa'a; S-SF/PBAT doku iskelelerinde statik kültür öncesi  $541 \pm 22$  MPa olan elastik modül değeri ise kültür sonrası  $158.4 \pm 4.1$  MPa değerine kadar azalmıştır.
- Tenojenik farklılaşma kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde tendonla ilişkili ve tendon spesifik gen ekspresyonları üzerinden belirlenmiştir. S-SF/PBAT doku iskelelerine ekilen rAdMSC hücrelerinin A-SF/P3HB doku iskelelerine göre, daha yüksek COL1A1/COL3A1 oranı, SCX ve TNC gen ekspresyonu ve daha düşük PPAR $\gamma$  gen ekspresyonu nedeniyle sağlıklı tendon rejenerasyonu için daha uygun bir biyomalzeme olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, GDF-5 büyüme faktörü kullanımının hücrelerin proliferasyon ve tenojenik farklılaşma özelliklerini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.
- Hücrelerin A-SF/P3HB doku iskeleleri üzerinde ve özgün olarak üretilen mekanik uyarım biyoreaktör ortamında dinamik kültür çalışmaları yapılmış, ancak farklı parametrelerin denenmesine rağmen hücre canlılıklarının artmadığı belirlenmiş ve A-SF/P3HB doku iskelesinin dinamik kültür çalışmaları için mekanik özellikleri açısından uygun olmadığı değerlendirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, rAdMSC hücrelerinin yüzey topografyası ve mekanik uyarıma bağlı olarak ek farklılaştırıcı ajan gerektirmeksizin tenojenik farklılaşabileceği hipotezinden yola çıkılmıştır. Bu kapsamda, hizalı topografyaya ve belirli nanofiber çap değerlerine sahip, SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrisler üretilmiştir. rAdMSC hücrelerinin sadece polimer bileşimi ve hizalı topografyaya bağlı olarak tutunma, çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin literatürdeki çalışmalara göre daha iyi olduğu belirlenmiş, fakat GDF-5 büyüme faktörünün gen düzeyinde etki ederek, hücrelerin ECM organizasyonunu iyileştirdiği değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında SF/P3HB ve SF/PBAT doku iskelelerinden elde edilen sonuçlar literatüre katkı sağlamış ve tendon rejenerasyonu çalışmalarında yama olarak kullanımı hedeflenen SF/P3HB ve SF/PBAT nanofibröz matrikslerin tendon doku mühendisliği için etkinliği belirlenmiştir. Dinamik kültür çalışmaları için etkili sonuçlar alınabileceği düşünülen S-SF/PBAT doku iskeleleri ile biyoreaktör çalışmalarının tamamlanarak ileri uygulamalar için kullanılması önerilmektedir. Bu alışmalar tamamlandığında alınacak olumlu sonuçlar ile SF/PBAT doku iskelelerinin hem *in vivo* hem de klinikte kolaylıkla uygulanabilir mezenkimal kök hücrelerle bütüncül bir tedavi olanağı sunabileceği değerlendirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] M.R. Citeroni, M.C. Ciardulli, V. Russo, G. Della Porta, A. Mauro, M. El Khatib, M. Di Mattia, D. Galesso, C. Barbera, N.R. Forsyth, N. Maffulli, B. Barboni, In Vitro Innovation of Tendon Tissue Engineering Strategies, *Int J Mol Sci*, 21 (2020) 6726.
- [2] A.J. Lomas, C.N.M. Ryan, A. Sorushanova, N. Shologu, A.I. Sideri, V. Tsioli, G.C. Fthenakis, A. Tzora, I. Skoufos, L.R. Quinlan, G. O'Laighin, A.M. Mullen, J.L. Kelly, S. Kearns, M. Biggs, A. Pandit, D.I. Zeugolis, The past, present and future in scaffold-based tendon treatments, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84 (2015) 257-277.
- [3] G. Yang, H. Lin, B.B. Rothrauff, S. Yu, R.S. Tuan, Multilayered polycaprolactone/gelatin fiber-hydrogel composite for tendon tissue engineering, *Acta Biomater*, 35 (2016) 68-76.
- [4] N.M. Lee, C. Eriskin, T. Iskratsch, M. Sheetz, W.N. Levine, H.H. Lu, Polymer fiber-based models of connective tissue repair and healing, *Biomaterials*, 112 (2017) 303-312.
- [5] S. Ruiz-Alonso, M. Lafuente-Merchan, J. Ciriza, L. Saenz-del-Burgo, J.L. Pedraz, Tendon tissue engineering: Cells, growth factors, scaffolds and production techniques, *Journal of Controlled Release*, 333 (2021) 448-486.
- [6] S.Y. Xie, L.H. Peng, Y.H. Shan, J. Niu, J. Xiong, J.Q. Gao, Adult Stem Cells Seeded on Electrospinning Silk Fibroin Nanofibrous Scaffold Enhance Wound Repair and Regeneration, *J Nanosci Nanotechnol*, 16 (2016) 5498-5505.
- [7] F. Ak, Z. Oztoprak, I. Karakutuk, O. Okay, Macroporous Silk Fibroin Cryogels, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 719-727.
- [8] G.Q. Chen, Q. Wu, The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26 (2005) 6565-6578.
- [9] A. Arslan, S. Çakmak, A. Cengiz, M. Gümüşderelioğlu, Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27 (2016) 1841-1859.
- [10] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton, Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells*, 25 (2007) 2739-2749.
- [11] V. Kishore, W. Bullock, X. Sun, W.S. Van Dyke, O. Akkus, Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads, *Biomaterials*, 33 (2012) 2137-2144.

- [12] M. El Khatib, A. Mauro, M. Di Mattia, R. Wyrwa, M. Schweder, M. Ancora, F. Lazzaro, P. Berardinelli, L. Valbonetti, O. Di Giacinto, A. Polci, C. Cammà, M. Schnabelrauch, B. Barboni, V. Russo, Electrospun PLGA Fiber Diameter and Alignment of Tendon Biomimetic Fleece Potentiate Tenogenic Differentiation and Immunomodulatory Function of Amniotic Epithelial Stem Cells, *Cells*, 9 (2020) 1207.
- [13] Z. Liu, Z. Hu, Aligned contiguous microfiber platform enhances neural differentiation of embryonic stem cells, *Scientific Reports*, 8 (2018) 6087.
- [14] K. Zhou, B. Feng, W. Wang, Y. Jiang, W. Zhang, G. Zhou, T. Jiang, Y. Cao, W. Liu, Nanoscaled and microscaled parallel topography promotes tenogenic differentiation of ASC and neotendon formation in vitro, *International journal of nanomedicine*, 13 (2018) 3867-3881.
- [15] A.I. Gonçalves, M.T. Rodrigues, R.L. Reis, M.E. Gomes, Chapter 15 - Bioengineered Strategies for Tendon Regeneration, in: S.J. Lee, J.J. Yoo, A. Atala (Eds.) *In Situ Tissue Regeneration*, Academic Press, Boston, 2016, pp. 275-293.
- [16] K.M. Heinemeier, M. Kjaer, In vivo investigation of tendon responses to mechanical loading, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 11 (2011) 115-123.
- [17] M. Kaya, N. Karahan, B. Yilmaz, Tendon Structure and Classification, in: H. Sözen (Ed.) *Tendon*, IntechOpen, İstanbul, (2019).
- [18] P. Kannus, Structure of the tendon connective tissue, *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 10 (2000) 312-320.
- [19] Y. Liu, H.S. Ramanath, D.-A. Wang, Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies, *Trends in Biotechnology*, 26 (2008) 201-209.
- [20] C. Güngörmüş, D. Kolankaya, E. Aydın, Histopathological and biomechanical evaluation of tenocyte seeded allografts on rat Achilles tendon regeneration, *Biomaterials*, 51 (2015) 108-118.
- [21] J.-I. Liang, P.-C. Lin, M.-Y. Chen, T.-H. Hsieh, J.-J.J. Chen, M.-L. Yeh, The effect of tenocyte/hyaluronic acid therapy on the early recovery of healing Achilles tendon in rats, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25 (2014) 217-227.
- [22] R. James, G. Kesturu, G. Balian, A.B. Chhabra, Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options, *The Journal of Hand Surgery*, 33 (2008) 102-112.
- [23] J.H.C. Wang, Mechanobiology of tendon, *Journal of Biomechanics*, 39 (2006) 1563-1582.
- [24] C.T. Thorpe, C. Klemm, G.P. Riley, H.L. Birch, P.D. Clegg, H.R. Screen, Helical sub-structures in energy-storing tendons provide a possible mechanism for efficient energy storage and return, *Acta Biomater*, 9 (2013) 7948-7956.
- [25] N. Maffulli, P. Renström, W.B. Leadbetter (Eds), *Tendon injuries: Basic science and clinical medicine*, Springer, London, (2005).



- [26] D.S. Morais, J. Torres, R.M. Guedes, M.A. Lopes, Current Approaches and Future Trends to Promote Tendon Repair, *Annals of Biomedical Engineering*, 43 (2015) 2025-2035.
- [27] J.S. Everhart, D. Cole, J.H. Sojka, J.D. Higgins, R.A. Magnussen, L.C. Schmitt, D.C. Flanigan, Treatment Options for Patellar Tendinopathy: A Systematic Review, *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 33 (2017) 861-872.
- [28] W.L. Lim, L.L. Liao, M.H. Ng, S.R. Chowdhury, J.X. Law, Current Progress in Tendon and Ligament Tissue Engineering, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16 (2019) 549-571.
- [29] D. González-Quevedo, I. Martínez-Medina, A. Campos, F. Campos, V. Carriel, Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries, *Bone & Joint Research*, 7 (2018) 318-324.
- [30] H. Zhang, M.F. Liu, R.C. Liu, W.L. Shen, Z. Yin, X. Chen, Physical Microenvironment-Based Inducible Scaffold for Stem Cell Differentiation and Tendon Regeneration, *Tissue Eng Part B Rev*, 24 (2018) 443-453.
- [31] M. Beldjilali-Labro, A. Garcia Garcia, F. Farhat, F. Bedoui, J.-F. Grosset, M. Dufresne, C. Legallais, Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges, *Materials*, 11 (2018) 1116.
- [32] M. Silva, F.N. Ferreira, N.M. Alves, M.C. Paiva, Biodegradable polymer nanocomposites for ligament/tendon tissue engineering, *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (2020) 23.
- [33] F. Alshomer, C. Chaves, D.M. Kalaskar, Advances in Tendon and Ligament Tissue Engineering: Materials Perspective, *Journal of Materials*, Vol:2018 (2018) 9868151.
- [34] D. Stanco, M. Boffito, A. Bogni, L. Puricelli, J. Barrero, G. Soldati, G. Ciardelli, 3d bioprinting of human adipose-derived stem cells and their tenogenic differentiation in clinical-grade medium, *Int J Mol Sci*, 21 (2020) 1-23.
- [35] X. Jiang, S. Wu, M. Kuss, Y. Kong, W. Shi, P.N. Streubel, T. Li, B. Duan, 3D printing of multilayered scaffolds for rotator cuff tendon regeneration, *Bioactive Materials*, 5 (2020) 636-643.
- [36] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications, *Chem Rev*, 119 (2019) 5298-5415.
- [37] C. Zhang, X. Wang, E. Zhang, L. Yang, H. Yuan, W. Tu, H. Zhang, Z. Yin, W. Shen, X. Chen, Y. Zhang, H. Ouyang, An epigenetic bioactive composite scaffold with well-aligned nanofibers for functional tendon tissue engineering, *Acta Biomater*, 66 (2018) 141-156.
- [38] A. Sensini, C. Gualandi, A. Zucchelli, L.A. Boyle, A.P. Kao, G.C. Reilly, G. Tozzi, L. Cristofolini, M.L. Focarete, Tendon Fascicle-Inspired Nanofibrous Scaffold of Polylactic acid/Collagen with Enhanced 3D-Structure and Biomechanical Properties, *Scientific Reports*, 8 (2018) 17167.

- [39] S.B. Orr, A. Chainani, K.J. Hippensteel, A. Kishan, C. Gilchrist, N.W. Garrigues, D.S. Ruch, F. Guilak, D. Little, Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering, *Acta Biomater*, 24 (2015) 117-126.
- [40] B.B. Rothrauff, B.B. Lauro, G. Yang, R.E. Debski, V. Musahl, R.S. Tuan, Braided and Stacked Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Tendon and Ligament Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A*, 23 (2017) 378-389.
- [41] J.L. Chen, Z. Yin, W.L. Shen, X. Chen, B.C. Heng, X.H. Zou, H.W. Ouyang, Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles, *Biomaterials*, 31 (2010) 9438-9451.
- [42] C. Vepari, D.L. Kaplan, Silk as a Biomaterial, *Prog Polym Sci*, 32 (2007) 991-1007.
- [43] A. Leal-Egaña, T. Scheibel, Interactions of cells with silk surfaces, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 14330-14336.
- [44] T. Arai, G. Freddi, R. Innocenti, M. Tsukada, Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films, *Journal of Applied Polymer Science*, 91 (2004) 2383-2390.
- [45] Y. Cao, B. Wang, Biodegradation of silk biomaterials, *Int J Mol Sci*, 10 (2009) 1514-1524.
- [46] D. Yao, H. Liu, Y. Fan, Silk scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *Exp Biol Med (Maywood)*, 241 (2016) 238-245.
- [47] S. Font Tellado, W. Bonani, E.R. Balmayor, P. Foehr, A. Motta, C. Migliaresi, M. van Griensven, (\*) Fabrication and Characterization of Biphasic Silk Fibroin Scaffolds for Tendon/Ligament-to-Bone Tissue Engineering, *Tissue Eng Part A*, 23 (2017) 859-872.
- [48] E. Naghashzargar, S. Farè, V. Catto, S. Bertoldi, D. Semnani, S. Karbasi, M.C. Tanzi, Nano/micro hybrid scaffold of PCL or P3HB nanofibers combined with silk fibroin for tendon and ligament tissue engineering, *J Appl Biomater Funct Mater*, 13 (2015) e156-168.
- [49] L.-J. Ning, Y. Zhang, X.-H. Chen, J.-C. Luo, X.-Q. Li, Z.-M. Yang, T.-W. Qin, Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A (2012) 1448-1456.
- [50] S.D. Aznar-Cervantes, D. Vicente-Cervantes, L. Meseguer-Olmo, J.L. Cenis, A.A. Lozano-Pérez, Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33 (2013) 1945-1950.
- [51] D. Ma, Y. Wang, W. Dai, Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 89 (2018) 456-469.
- [52] Q. Wu, Y. Wang, G.Q. Chen, Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 37 (2009) 1-12.

- [53] T. Freier, C. Kunze, C. Nischan, S. Kramer, K. Sternberg, M. Saß, U.T. Hopt, K.-P. Schmitz, In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate), *Biomaterials*, 23 (2002) 2649-2657.
- [54] A.J. Lomas, W.R. Webb, J. Han, G.Q. Chen, X. Sun, Z. Zhang, A.J. El Haj, N.R. Forsyth, Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/collagen hybrid scaffolds for tissue engineering applications, *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 19 (2013) 577-585.
- [55] Y. Ke, Y.J. Wang, L. Ren, G. Wu, W. Xue, Bioactive surface modification on amide-photografted poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Biomedical Materials*, 6 (2011) 025007.
- [56] W.R. Webb, T.P. Dale, A.J. Lomas, G. Zeng, I. Wimpenny, A.J. El Haj, N.R. Forsyth, G.-Q. Chen, The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model, *Biomaterials*, 34 (2013) 6683-6694.
- [57] W.C. Chen, C.H. Chen, H.W. Tseng, Y.W. Liu, Y.P. Chen, C.H. Lee, Y.J. Kuo, C.H. Hsu, Y.M. Sun, Surface functionalized electrospun fibrous poly(3-hydroxybutyrate) membranes and sleeves: a novel approach for fixation in anterior cruciate ligament reconstruction, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (2017) 553-564.
- [58] M.D. Burkhard, M. Dietrich, O. Andronic, N. Nikolic, P. Grueninger, Arthroscopic repair of posterosuperior rotator cuff tears with bioabsorbable patch augmentation: a magnetic resonance–controlled case series with 1-year follow-up, *JSES International*, 4 (2020) 860-868.
- [59] A. Arslan, S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46 (2018) 790-799.
- [60] W.A. Ribeiro Neto, A.C.C. de Paula, T.M.M. Martins, A.M. Goes, L. Averous, G. Schlatter, R.E. Suman Bretas, Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery, *Polymer Degradation and Stability*, 120 (2015) 61-69.
- [61] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.D. Deckwer, R.J. Müller, Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere*, 44 (2001) 289-299.
- [62] Z.N. Correa-Pacheco, J.D. Black-Solís, P. Ortega-Gudiño, M.A. Sabino-Gutiérrez, J.J. Benítez-Jiménez, A. Barajas-Cervantes, S. Bautista-Baños, L.B. Hurtado-Colmenares, Preparation and Characterization of Bio-Based PLA/PBAT and Cinnamon Essential Oil Polymer Fibers and Life-Cycle Assessment from Hydrolytic Degradation, *Polymers (Basel)*, 12 (2019) 38.
- [63] M. Nar, G. Staufenberg, B. Yang, L. Robertson, R.H. Patel, V.G. Varanasi, N.A. D'Souza, Osteoconductive bio-based meshes based on poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(butylene adipate-co-

- terephthalate) blends, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 38 (2014) 315-324.
- [64] H. Wang, M. Langner, S. Agarwal, Biodegradable aliphatic–aromatic polyester with antibacterial property, *Polymer Engineering & Science*, 56 (2016) 1146-1152.
- [65] Y.-X. Weng, Y.-J. Jin, Q.-Y. Meng, L. Wang, M. Zhang, Y.-Z. Wang, Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions, *Polymer Testing*, 32 (2013) 918-926.
- [66] I.F. Pinheiro, F.V. Ferreira, D.H.S. Souza, R.F. Gouveia, L.M.F. Lona, A.R. Morales, L.H.I. Mei, Mechanical, rheological and degradation properties of PBAT nanocomposites reinforced by functionalized cellulose nanocrystals, *European Polymer Journal*, 97 (2017) 356-365.
- [67] T. Wu, Y. Liu, B. Wang, Y. Sun, J. Xu, L.W. Yuk-Wai, L. Xu, J. Zhang, G. Li, The Use of Cocultured Mesenchymal Stem Cells with Tendon-Derived Stem Cells as a Better Cell Source for Tendon Repair, *Tissue Eng Part A*, 22 (2016) 1229-1240.
- [68] Z. Yin, J. Guo, T.-y. Wu, X. Chen, L.-l. Xu, S.-e. Lin, Y.-x. Sun, K.-M. Chan, H. Ouyang, G. Li, Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo, *Stem Cells Translational Medicine*, 5 (2016) 1106-1116.
- [69] J.H. Wu, A.R. Thoreson, A. Gingery, K.N. An, S.L. Moran, P.C. Amadio, C. Zhao, The revitalisation of flexor tendon allografts with bone marrow stromal cells and mechanical stimulation, *Bone & Joint Research*, 6 (2017) 179-185.
- [70] L. Dai, X. Hu, X. Zhang, J. Zhu, J. Zhang, X. Fu, X. Duan, Y. Ao, C. Zhou, Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12, *J Transl Med*, 13 (2015) 200.
- [71] Y.F. Rui, P.P. Lui, G. Li, S.C. Fu, Y.W. Lee, K.M. Chan, Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells, *Tissue Eng Part A*, 16 (2010) 1549-1558.
- [72] T. Baudequin, L. Gaut, M. Mueller, A. Huepkes, B. Glasmacher, D. Duprez, F. Bedoui, C. Legallais, The Osteogenic and Tenogenic Differentiation Potential of C3H10T1/2 (Mesenchymal Stem Cell Model) Cultured on PCL/PLA Electrospun Scaffolds in the Absence of Specific Differentiation Medium, *Materials (Basel)*, 10 (2017) 1387.
- [73] R.D. Cardwell, J.A. Kluge, P.S. Thayer, S.A. Guelcher, L.A. Dahlgren, D.L. Kaplan, A.S. Goldstein, Static and cyclic mechanical loading of mesenchymal stem cells on elastomeric, electrospun polyurethane meshes, *J Biomech Eng*, 137 (2015) 0710101-0710108.
- [74] G. Yang, B.B. Rothrauff, R.S. Tuan, Tendon and ligament regeneration and repair: clinical relevance and developmental paradigm, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 99 (2013) 203-222.

- [75] G.S. Kryger, A.K. Chong, M. Costa, H. Pham, S.J. Bates, J. Chang, A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering, *J Hand Surg Am*, 32 (2007) 597-605.
- [76] M. Young, Stem cell applications in tendon disorders: a clinical perspective, *Stem Cells Int*, Vol:2012 (2012) 637836.
- [77] A. Park, M.V. Hogan, G.S. Kesturu, R. James, G. Balian, A.B. Chhabra, Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon-specific markers, *Tissue Eng Part A*, 16 (2010) 2941-2951.
- [78] R. James, S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, G. Balian, A.B. Chhabra, Tendon tissue engineering: adipose-derived stem cell and GDF-5 mediated regeneration using electrospun matrix systems, *Biomed Mater*, 6 (2011) 025011.
- [79] S. Wu, J. Liu, Y. Qi, J. Cai, J. Zhao, B. Duan, S. Chen, Tendon-bioinspired wavy nanofibrous scaffolds provide tunable anisotropy and promote tenogenesis for tendon tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 126 (2021) 112181.
- [80] M.B. Guner, A.D. Dalgic, A. Tezcaner, S. Yilanci, D. Keskin, A dual-phase scaffold produced by rotary jet spinning and electrospinning for tendon tissue engineering, *Biomedical Materials (Bristol)*, 15 (2020) 065014.
- [81] F.G. Thankam, I. Chandra, C. Diaz, M.F. Dilisio, J. Fleegel, R.M. Gross, D.K. Agrawal, Matrix regeneration proteins in the hypoxia-triggered exosomes of shoulder tenocytes and adipose-derived mesenchymal stem cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 465 (2020) 75-87.
- [82] S. Wu, R. Zhou, F. Zhou, P.N. Streubel, S. Chen, B. Duan, Electrospun thymosin Beta-4 loaded PLGA/PLA nanofiber/ microfiber hybrid yarns for tendon tissue engineering application, *Materials Science and Engineering: C*, 106 (2020) 110268.
- [83] S.P. Roth, W. Brehm, C. Groß, P. Scheibe, S. Schubert, J. Burk, Transforming Growth Factor Beta 3-Loaded Decellularized Equine Tendon Matrix for Orthopedic Tissue Engineering, *Int J Mol Sci*, 20 (2019) 5474.
- [84] I. Calejo, R. Costa-Almeida, R.L. Reis, M.E. Gomes, A Textile Platform Using Continuous Aligned and Textured Composite Microfibers to Engineer Tendon-to-Bone Interface Gradient Scaffolds, *Advanced Healthcare Materials*, 8 (2019) 1900200.
- [85] L. Brandt, S. Schubert, P. Scheibe, W. Brehm, J. Franzen, C. Gross, J. Burk, Tenogenic Properties of Mesenchymal Progenitor Cells Are Compromised in an Inflammatory Environment, *Int J Mol Sci*, 19 (2018) 2549.
- [86] S. Wu, H. Peng, X. Li, P.N. Streubel, Y. Liu, B. Duan, Effect of scaffold morphology and cell co-culture on tenogenic differentiation of HADMSC on centrifugal melt electrospun poly (Llactic acid) fibrous meshes, *Biofabrication*, 9 (2017) 044106.

- [87] S. Font Tellado, S. Chiera, W. Bonani, P.S.P. Poh, C. Migliaresi, A. Motta, E.R. Balmayor, M. van Griensven, Heparin functionalization increases retention of TGF- $\beta$ 2 and GDF5 on biphasic silk fibroin scaffolds for tendon/ligament-to-bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 72 (2018) 150-166.
- [88] J.L. Zitnay, S.P. Reese, G. Tran, N. Farhang, R.D. Bowles, J.A. Weiss, Fabrication of dense anisotropic collagen scaffolds using biaxial compression, *Acta Biomaterialia*, 65 (2018) 76-87.
- [89] G. Yang, B.B. Rothrauff, H. Lin, S. Yu, R.S. Tuan, Tendon-derived extracellular matrix enhances transforming growth factor- $\beta$ 3-induced tenogenic differentiation of human adipose-derived stem cells, *Tissue Engineering - Part A*, 23 (2017) 166-176.
- [90] X. Guo, H. Lv, Z.W. Fan, K. Duan, J. Liang, L.F. Zou, H. Xue, D.H. Huang, Y.H. Wang, M.Y. Tan, Effects of hypoxia on Achilles tendon repair using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells seeded small intestinal submucosa, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16 (2021) 570.
- [91] A. Freiman, Y. Shandalov, D. Rosenfeld, E. Shor, D. Ben-David, S. Meretzki, S. Levenberg, D. Egozi, Engineering vascularized flaps using adipose-derived microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (2018) e130-e141.
- [92] K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *Journal of The Royal Society Interface*, 8 (2011) 153-170.
- [93] I. Rajpar, J.G. Barrett, Optimizing growth factor induction of tenogenesis in three-dimensional culture of mesenchymal stem cells, *J Tissue Eng*, 10 (2019) 2041731419848776.
- [94] A.E. Loisel, K. Yukata, M.B. Geary, S. Kondabolu, S. Shi, J.H. Jonason, H.A. Awad, R.J. O'Keefe, Development of antisense oligonucleotide (ASO) technology against Tgf- $\beta$  signaling to prevent scarring during flexor tendon repair, *J Orthop Res*, 33 (2015) 859-866.
- [95] S.C. Juneja, E.M. Schwarz, R.J. O'Keefe, H.A. Awad, Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: a histological and gene expression analysis, *Connect Tissue Res*, 54 (2013) 218-226.
- [96] S.R. Caliri, B.A. Harley, The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity, *Biomaterials*, 32 (2011) 5330-5340.
- [97] A.I. Gonçalves, M.T. Rodrigues, S.J. Lee, A. Atala, J.J. Yoo, R.L. Reis, M.E. Gomes, Understanding the role of growth factors in modulating stem cell tenogenesis, *PLoS One*, 8 (2013) e83734.
- [98] S.S. Durgam, A.A. Stewart, H.C. Pondenis, S.M. Gutierrez-Nibeyro, R.B. Evans, M.C. Stewart, Comparison of equine tendon- and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix with or without insulin-like growth factor-I supplementation, *Am J Vet Res*, 73 (2012) 153-161.

- [99] L.A. Dahlgren, A.J. Nixon, B.D. Brower-Toland, Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes, *Am J Vet Res*, 62 (2001) 1557-1562.
- [100] S.S. Durgam, A.A. Stewart, H.C. Pondenis, A.C. Yates, R.B. Evans, M.C. Stewart, Responses of equine tendon- and bone marrow-derived cells to monolayer expansion with fibroblast growth factor-2 and sequential culture with pulverized tendon and insulin-like growth factor-I, *Am J Vet Res*, 73 (2012) 162-170.
- [101] S. Zhao, J. Zhao, S. Dong, X. Huangfu, B. Li, H. Yang, J. Zhao, W. Cui, Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes, *Int J Nanomedicine*, 9 (2014) 2373-2385.
- [102] S. Thomopoulos, H.M. Kim, R. Das, M.J. Silva, S. Sakiyama-Elbert, D. Amiel, R.H. Gelberman, The effects of exogenous basic fibroblast growth factor on intrasynovial flexor tendon healing in a canine model, *J Bone Joint Surg Am*, 92 (2010) 2285-2293.
- [103] M.A. Costa, C. Wu, B.V. Pham, A.K. Chong, H.M. Pham, J. Chang, Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation, *Tissue Eng*, 12 (2006) 1937-1943.
- [104] T.P. Dale, S. Mazher, W.R. Webb, J. Zhou, N. Maffulli, G.Q. Chen, A.J. El Haj, N.R. Forsyth, Tenogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells, *Tissue Eng Part A*, 24 (2018) 361-368.
- [105] S. Violini, P. Ramelli, L.F. Pisani, C. Gorni, P. Mariani, Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12, *BMC Cell Biology*, 10 (2009) 29.
- [106] M. Schneider, P. Angele, T.A.H. Järvinen, D. Docheva, Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129 (2018) 352-375.
- [107] D. Jiang, P. Gao, Y. Zhang, S. Yang, Combined effects of engineered tendon matrix and GDF-6 on bone marrow mesenchymal stem cell-based tendon regeneration, *Biotechnol Lett*, 38 (2016) 885-892.
- [108] O. Raabe, K. Shell, D. Fietz, C. Freitag, A. Ohrndorf, H.J. Christ, S. Wenisch, S. Arnhold, Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions, *Cell Tissue Res*, 352 (2013) 509-521.
- [109] M. Lavagnino, M.E. Wall, D. Little, A.J. Banes, F. Guilak, S.P. Arnoczky, Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities, *Journal of Orthopaedic Research*, 33 (2015) 813-822.
- [110] M. Govoni, C. Muscari, J. Lovecchio, C. Guarnieri, E. Giordano, Mechanical Actuation Systems for the Phenotype Commitment of Stem

Cell-Based Tendon and Ligament Tissue Substitutes, *Stem Cell Rev Rep*, 12 (2016) 189-201.

- [111] R.I. Abousleiman, Y. Reyes, P. McFetridge, V. Sikavitsas, Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator, *Tissue Eng Part A*, 15 (2009) 787-795.
- [112] K. Webb, R.W. Hitchcock, R.M. Smeal, W. Li, S.D. Gray, P.A. Tresco, Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modulus of fibroblast-seeded polyurethane constructs, *Journal of Biomechanics*, 39 (2006) 1136-1144.
- [113] S. Saber, A.Y. Zhang, S.H. Ki, D.P. Lindsey, R.L. Smith, J. Riboh, H. Pham, J. Chang, Flexor tendon tissue engineering: bioreactor cyclic strain increases construct strength, *Tissue Eng Part A*, 16 (2010) 2085-2090.
- [114] D.L. Butler, S.A. Hunter, K. Chokalingam, M.J. Cordray, J. Shearn, N. Juncosa-Melvin, S. Nirmalanandhan, A. Jain, Using functional tissue engineering and bioreactors to mechanically stimulate tissue-engineered constructs, *Tissue Eng Part A*, 15 (2009) 741-749.
- [115] T. Maeda, T. Sakabe, A. Sunaga, K. Sakai, Alexander L. Rivera, Douglas R. Keene, T. Sasaki, E. Stavnezer, J. Iannotti, R. Schweitzer, D. Ilic, H. Baskaran, T. Sakai, Conversion of Mechanical Force into TGF- $\beta$ -Mediated Biochemical Signals, *Current Biology*, 21 (2011) 933-941.
- [116] J. Burk, A. Plenge, W. Brehm, S. Heller, B. Pfeiffer, C. Kasper, Induction of Tenogenic Differentiation Mediated by Extracellular Tendon Matrix and Short-Term Cyclic Stretching, *Stem Cells International*, Vol:2016 (2016) 7342379.
- [117] Y. Xu, Q. Wang, Y. Li, Y. Gan, P. Li, S. Li, Y. Zhou, Q. Zhou, Cyclic Tensile Strain Induces Tenogenic Differentiation of Tendon-Derived Stem Cells in Bioreactor Culture, *Biomed Res Int*, Vol:2015 (2015) 790804.
- [118] T. Barkhausen, M. van Griensven, J. Zeichen, U. Bosch, Modulation of cell functions of human tendon fibroblasts by different repetitive cyclic mechanical stress patterns, *Exp Toxicol Pathol*, 55 (2003) 153-158.
- [119] R. Mousavizadeh, P. Hojabrpour, F. Eltit, P.C. McDonald, S. Dedhar, R.G. McCormack, V. Duronio, S.M. Jafarnejad, A. Scott,  $\beta$ 1 integrin, ILK and mTOR regulate collagen synthesis in mechanically loaded tendon cells, *Scientific Reports*, 10 (2020) 12644.
- [120] C. Rinoldi, A. Fallahi, I.K. Yazdi, J. Campos Paras, E. Kijeńska-Gawrońska, G. Trujillo-de Santiago, A. Tuoheti, D. Demarchi, N. Annabi, A. Khademhosseini, W. Swieszkowski, A. Tamayol, Mechanical and Biochemical Stimulation of 3D Multilayered Scaffolds for Tendon Tissue Engineering, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5 (2019) 2953-2964.
- [121] A. Jayasree, S. Kottappally Thankappan, R. Ramachandran, M.N. Sundaram, C.-H. Chen, U. Mony, J.-P. Chen, R. Jayakumar, Bioengineered Braided Micro–Nano (Multiscale) Fibrous Scaffolds for



Tendon Reconstruction, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5 (2019) 1476-1486.

- [122] B. Engebretson, Z.R. Mussett, V.I. Sikavitsas, The effects of varying frequency and duration of mechanical stimulation on a tissue-engineered tendon construct, *Connect Tissue Res*, 59 (2018) 167-177.
- [123] T. Wang, C. Thien, C. Wang, M. Ni, J. Gao, A. Wang, Q. Jiang, R.S. Tuan, Q. Zheng, M.H. Zheng, 3D uniaxial mechanical stimulation induces tenogenic differentiation of tendon-derived stem cells through a PI3K/AKT signaling pathway, *Faseb j*, 32 (2018) 4804-4814.
- [124] K.I. Lee, J.S. Lee, K.T. Kang, Y.B. Shim, Y.S. Kim, J.W. Jang, S.H. Moon, D.D. D'Lima, In Vitro and In Vivo Performance of Tissue-Engineered Tendons for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, *Am J Sports Med*, 46 (2018) 1641-1649.
- [125] B. Zhang, Q. Luo, B. Deng, Y. Morita, Y. Ju, G. Song, Construction of tendon replacement tissue based on collagen sponge and mesenchymal stem cells by coupled mechano-chemical induction and evaluation of its tendon repair abilities, *Acta Biomater*, 74 (2018) 247-259.
- [126] Q. Liu, T. Hatta, J. Qi, H. Liu, A.R. Thoreson, P.C. Amadio, S.L. Moran, S.P. Steinmann, A. Gingery, C. Zhao, Novel engineered tendon-fibrocartilage-bone composite with cyclic tension for rotator cuff repair, *J Tissue Eng Regen Med*, 12 (2018) 1690-1701.
- [127] S. Testa, M. Costantini, E. Fornetti, S. Bernardini, M. Trombetta, D. Seliktar, S. Cannata, A. Rainer, C. Gargioli, Combination of biochemical and mechanical cues for tendon tissue engineering, *J Cell Mol Med*, 21 (2017) 2711-2719.
- [128] S. Wu, Y. Wang, P.N. Streubel, B. Duan, Living nanofiber yarn-based woven biotextiles for tendon tissue engineering using cell tri-culture and mechanical stimulation, *Acta Biomater*, 62 (2017) 102-115.
- [129] B. Engebretson, Z.R. Mussett, V.I. Sikavitsas, Tenocytic extract and mechanical stimulation in a tissue-engineered tendon construct increases cellular proliferation and ECM deposition, *Biotechnol J*, 12 (2017) 1600595.
- [130] D.W. Youngstrom, J.E. LaDow, J.G. Barrett, Tenogenesis of bone marrow-, adipose-, and tendon-derived stem cells in a dynamic bioreactor, *Connect Tissue Res*, 57 (2016) 454-465.
- [131] D. Deng, W. Wang, B. Wang, P. Zhang, G. Zhou, W.J. Zhang, Y. Cao, W. Liu, Repair of Achilles tendon defect with autologous ASCs engineered tendon in a rabbit model, *Biomaterials*, 35 (2014) 8801-8809.
- [132] M. Ejtehadifar, K. Shamsasenjan, A. Movassaghpour, P. Akbarzadehlaleh, N. Dehdilani, P. Abbasi, Z. Molaeipour, M. Saleh, The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology, *Adv Pharm Bull*, 5 (2015) 141-149.
- [133] M.C. Simon, B. Keith, The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9 (2008) 285-296.

- [134] A. Carreau, B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda, Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia, *J Cell Mol Med*, 15 (2011) 1239-1253.
- [135] Y. Zhang, B. Wang, W.J. Zhang, G. Zhou, Y. Cao, W. Liu, Enhanced proliferation capacity of porcine tenocytes in low O<sub>2</sub> tension culture, *Biotechnology Letters*, 32 (2010) 181-187.
- [136] J. Zhang, J.H. Wang, Human tendon stem cells better maintain their stemness in hypoxic culture conditions, *PLoS One*, 8 (2013) e61424.
- [137] B. Keith, M.C. Simon, Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer, *Cell*, 129 (2007) 465-472.
- [138] M.A. Usman, T. Nakasa, T. Shoji, T. Kato, Y. Kawanishi, M. Hamanishi, N. Kamei, M. Ochi, The effect of administration of double stranded MicroRNA-210 on acceleration of Achilles tendon healing in a rat model, *J Orthop Sci*, 20 (2015) 538-546.
- [139] V. Russo, M. El Khatib, L. di Marcantonio, M. Ancora, R. Wyrwa, A. Mauro, T. Walter, J. Weisser, M.R. Citeroni, F. Lazzaro, M. Di Federico, P. Berardinelli, C. Cammà, M. Schnabelrauch, B. Barboni, Tendon Biomimetic Electrospun PLGA Fleeces Induce an Early Epithelial-Mesenchymal Transition and Tenogenic Differentiation on Amniotic Epithelial Stem Cells, *Cells*, 9 (2020) 303.
- [140] Y. Li, Z. Liu, Y. Jin, X. Zhu, S. Wang, J. Yang, Y. Ren, Q. Fu, H. Xiong, G. Zou, Y. Liu, Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells into Human Anterior Cruciate Ligament Fibroblast Cells by In Vitro Coculture, *BioMed Research International*, Vol:2017 (2017) 7360354.
- [141] P.R. Schneider, C. Buhrmann, A. Mobasheri, U. Matis, M. Shakibaei, Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells, *J Orthop Res*, 29 (2011) 1351-1360.
- [142] A. Kraus, C. Woon, S. Raghavan, K. Megerle, H. Pham, J. Chang, Co-Culture of Human Adipose-Derived Stem Cells with Tenocytes Increases Proliferation and Induces Differentiation into a Tenogenic Lineage, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132 (2013) 754e-766e.
- [143] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature Protocols*, 6 (2011) 1612-1631.
- [144] N. Angel, L. Guo, F. Yan, H. Wang, L. Kong, Effect of processing parameters on the electrospinning of cellulose acetate studied by response surface methodology, *Journal of Agriculture and Food Research*, 2 (2020) 100015.
- [145] A. Haider, S. Kwak, K.C. Gupta, I.-K. Kang, Antibacterial Activity and Cytocompatibility of PLGA/CuO Hybrid Nanofiber Scaffolds Prepared by Electrospinning, *Journal of Nanomaterials*, Vol:2015 (2015) 832762.
- [146] Ö.E. Akdere, İ. Shikhaliyeva, M. Gümüşderelioğlu, Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells, *Cytotechnology*, 71 (2019) 611-622.

- [147] D.D. Cissell, J.M. Link, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23 (2017) 243-250.
- [148] Z. Karahaliloğlu, Cell-compatible PHB/silk fibroin composite nanofiber mat for tissue engineering applications, *Turkish Journal of Biology*, 41 (2017) 503-513.
- [149] N. Nagiah, L. Madhavi, R. Anitha, C. Anandan, N.T. Srinivasan, U.T. Sivagnanam, Development and characterization of coaxially electrospun gelatin coated poly (3-hydroxybutyric acid) thin films as potential scaffolds for skin regeneration, *Materials Science and Engineering: C*, 33 (2013) 4444-4452.
- [150] N. Naveen, R. Kumar, S. Balaji, T.S. Uma, T.S. Natrajan, P.K. Sehgal, Synthesis of Nonwoven Nanofibers by Electrospinning – A Promising Biomaterial for Tissue Engineering and Drug Delivery, *Advanced Engineering Materials*, 12 (2010) B380-B387.
- [151] H.-Y. Wang, Y.-Q. Zhang, Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization, *Soft Matter*, 9 (2013) 138-145.
- [152] Y. Cai, J. Lv, J. Feng, Spectral characterization of four kinds of biodegradable plastics: poly (lactic acid), poly (butylenes adipate-co-terephthalate), poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylenes succinate) with FTIR and raman spectroscopy, *Journal of Polymers and the Environment*, 21 (2013) 108-114.
- [153] J. Ramier, T. Boudierlique, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, V. Langlois, E. Renard, P. Albanese, D. Grande, Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrospayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, 38 (2014) 161-169.
- [154] H. Moustafa, C. Guizani, A. Dufresne, Sustainable biodegradable coffee grounds filler and its effect on the hydrophobicity, mechanical and thermal properties of biodegradable PBAT composites, *Journal of Applied Polymer Science*, 134 (2017) 44498.
- [155] M. Li, S. Lu, Z. Wu, H. Yan, J. Mo, L. Wang, Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin, *Journal of Applied Polymer Science*, 79 (2001) 2185-2191.
- [156] Q. Lu, X. Zhang, X. Hu, D.L. Kaplan, Green Process to Prepare Silk Fibroin/Gelatin Biomaterial Scaffolds, *Macromolecular Bioscience*, 10 (2010) 289-298.
- [157] J. Zhu, H. Shao, X. Hu, Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH, *Int J Biol Macromol*, 41 (2007) 469-474.
- [158] G. Li, S. Shankar, J.-W. Rhim, B.-Y. Oh, Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films, *Food Science and Biotechnology*, 24 (2015) 1679-1685.

- [159] R.A. Garalde, R. Thipmanee, P. Jariyasakoolroj, A. Sane, The effects of blend ratio and storage time on thermoplastic starch/poly(butylene adipate-co-terephthalate) films, *Heliyon*, 5 (2019) e01251.
- [160] Y. Kishimoto, T. Kobashi, S. Yamanaka, H. Morikawa, Y. Tamada, Comparisons between silk fibroin nonwoven electrospun fabrics using aqueous and formic acid solutions, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67 (2018) 462-467.
- [161] J. Ayutsede, M. Gandhi, S. Sukigara, M. Micklus, H.-E. Chen, F. Ko, Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat, *Polymer*, 46 (2005) 1625-1634.
- [162] P. Slepíčka, Z. Malá, S. Rimpelová, V. Švorčík, Antibacterial properties of modified biodegradable PHB non-woven fabric, *Materials Science and Engineering: C*, 65 (2016) 364-368.
- [163] S. Calamak, E.A. Aksoy, N. Ertas, C. Erdogdu, M. Sagiroglu, K. Ulubayram, Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag<sup>+</sup> release and antibacterial activity, *European Polymer Journal*, 67 (2015) 99-112.
- [164] C.-S. Wu, Aliphatic–aromatic polyester–polyaniline composites: preparation, characterization, antibacterial activity and conducting properties, *Polymer International*, 61 (2012) 1556-1563.
- [165] K.T. Shalumon, C. Sheu, C.-H. Chen, S.-H. Chen, G. Jose, C.-Y. Kuo, J.-P. Chen, Multi-functional electrospun antibacterial core-shell nanofibrous membranes for prolonged prevention of post-surgical tendon adhesion and inflammation, *Acta Biomaterialia*, 72 (2018) 121-136.
- [166] E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, S.A. Gordeev, A.P. Puzyr, Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16 (2005) 643-657.
- [167] A. Banerjee, K. Chatterjee, G. Madras, Enzymatic degradation of polymers: a brief review, *Materials Science and Technology*, 30 (2014) 567-573.
- [168] R. You, Y. Zhang, Y. Liu, G. Liu, M. Li, The degradation behavior of silk fibroin derived from different ionic liquid solvents, *Natural Science*, 5 (2013) 10-19.
- [169] J. Brown, C.-L. Lu, J. Coburn, D.L. Kaplan, Impact of silk biomaterial structure on proteolysis, *Acta biomaterialia*, 11 (2015) 212-221.
- [170] M. Li, M. Ogiso, N. Minoura, Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets, *Biomaterials*, 24 (2003) 357-365.
- [171] K. Fukushima, A. Rasyida, M.-C. Yang, Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites, *Applied Clay Science*, 80-81 (2013) 291-298.
- [172] X. Ai, X. Li, Y. Yu, H. Pan, J. Yang, D. Wang, H. Yang, H. Zhang, L. Dong, The Mechanical, Thermal, Rheological and Morphological Properties of PLA/PBAT Blown Films by Using Bis(tert-butyl dioxy

- isopropyl) Benzene as Crosslinking Agent, *Polymer Engineering & Science*, 59 (2019) E227-E236.
- [173] H.J. Charvet, H. Orbay, L. Harrison, K. Devi, D.E. Sahar, In Vitro Effects of Adipose-Derived Stem Cells on Breast Cancer Cells Harvested From the Same Patient, *Annals of Plastic Surgery*, 76 (2016) 241-245.
- [174] A.A. Nery, I.C. Nascimento, T. Glaser, V. Bassaneze, J.E. Krieger, H. Ulrich, Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications, *Cytometry Part A*, 83 (2013) 48-61.
- [175] T.C. Keller, M.V. Hogan, G. Kesturu, R. James, G. Balian, A.B. Chhabra, Growth/differentiation factor-5 modulates the synthesis and expression of extracellular matrix and cell-adhesion-related molecules of rat Achilles tendon fibroblasts, *Connective Tissue Research*, 52 (2011) 353-364.
- [176] S.L. Tan, R.E. Ahmad, T.S. Ahmad, A.M. Merican, A.A. Abbas, W.M. Ng, T. Kamarul, Effect of Growth Differentiation Factor 5 on the Proliferation and Tenogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells in vitro, *Cells Tissues Organs*, 196 (2012) 325-338.
- [177] M.C. Ciardulli, L. Marino, E.P. Lamparelli, M. Guida, N.R. Forsyth, C. Selleri, G. Della Porta, N. Maffulli, Dose-Response Tendon-Specific Markers Induction by Growth Differentiation Factor-5 in Human Bone Marrow and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, *Int J Mol Sci*, 21 (2020) 5905.
- [178] K.P. Quinn, G.V. Sridharan, R.S. Hayden, D.L. Kaplan, K. Lee, I. Georgakoudi, Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation, *Scientific Reports*, 3 (2013) 3432.
- [179] T. Tu, Y. Shen, X. Wang, W. Zhang, G. Zhou, Y. Zhang, W. Wang, W. Liu, Tendon ECM modified bioactive electrospun fibers promote MSC tenogenic differentiation and tendon regeneration, *Applied Materials Today*, 18 (2020) 100495.
- [180] J. Huang, Y. Chen, C. Tang, Y. Fei, H. Wu, D. Ruan, M.E. Paul, X. Chen, Z. Yin, B.C. Heng, The relationship between substrate topography and stem cell differentiation in the musculoskeletal system, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (2019) 505-521.
- [181] Z. Yin, X. Chen, H.-x. Song, J.-j. Hu, Q.-m. Tang, T. Zhu, W.-l. Shen, J.-l. Chen, H. Liu, B.C. Heng, Electrospun scaffolds for multiple tissues regeneration in vivo through topography dependent induction of lineage specific differentiation, *Biomaterials*, 44 (2015) 173-185.
- [182] X. Duan, H. Sheardown, Crosslinking of collagen with dendrimers, *J Biomed Mater Res A*, 75 (2005) 510-518.
- [183] C.R. Deeken, A.K. White, S.L. Bachman, B.J. Ramshaw, D.S. Cleveland, T.S. Loy, S.A. Grant, Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96B (2011) 199-206.

- [184] J. Pingel, Y. Lu, T. Starborg, U. Fredberg, H. Langberg, A. Nedergaard, M. Weis, D. Eyre, M. Kjaer, K.E. Kadler, 3-D ultrastructure and collagen composition of healthy and overloaded human tendon: evidence of tenocyte and matrix buckling, *Journal of Anatomy*, 224 (2014) 548-555.
- [185] H. Liu, S. Zhu, C. Zhang, P. Lu, J. Hu, Z. Yin, Y. Ma, X. Chen, H. OuYang, Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: their potential for tendon regeneration, *Cell and Tissue Research*, 356 (2014) 287-298.
- [186] B.A. Pryce, S.S. Watson, N.D. Murchison, J.A. Staverosky, N. Dünker, R. Schweitzer, Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGF $\beta$  signaling are essential for tendon formation, *Development*, 136 (2009) 1351-1361.
- [187] C.-H. Chiu, Y.-W. Tong, W.-L. Yeh, K.F. Lei, A.C.-Y. Chen, Self-Renewal and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Stimulated by Multi-Axial Tensile Strain in a Pneumatic Microdevice, *Micromachines*, 9 (2018) 607.
- [188] H. Shen, R.H. Gelberman, M.J. Silva, S.E. Sakiyama-Elbert, S. Thomopoulos, BMP12 induces tenogenic differentiation of adipose-derived stromal cells, *PLoS One*, 8 (2013) e77613.
- [189] S.L. Tan, T.S. Ahmad, W.M. Ng, A.A. Azlina, M.M. Azhar, L. Selvaratnam, T. Kamarul, Identification of Pathways Mediating Growth Differentiation Factor5-Induced Tenogenic Differentiation in Human Bone Marrow Stromal Cells, *PLoS One*, 10 (2015) e0140869.

## Ek-2: Hidroksiprolin analizi kalibrasyon grafiği

