

**KOLAJEN/BETA-TRİKALSİYUM FOSFAT BAZLI
SENTETİK KEMİK GREFTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF COLLAGEN/ BETA-TRICALCIUM
PHOSPHATE BASED SYNTHETIC BONE GRAFTS**

BURCU SARIKAYA

DOÇ. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

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

2015

**DEVELOPMENT OF COLLAGEN/ BETA-TRICALCIUM
PHOSPHATE BASED SYNTHETIC BONE GRAFTS**

**KOLAJEN/BETA-TRİKALSİYUM FOSFAT BAZLI
SENTETİK KEMİK GREFTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

BURCU SARIKAYA

ASSOC. PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Supervisor

Submitted to Institute of Sciences of Hacettepe University
as a Partial Fulfillment to the Requirements
for the Award of the Degree of Master of Science
in Bioengineering

2015

BURCU SARIKAYA'nın hazırladığı “**Kolajen/Beta-Trikalsiyum Fosfat Bazlı Sentetik Kemik Greftlerinin Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Başkan

.....

Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Danışman

.....

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye

.....

Doç. Dr. Memed DUMAN

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Sedat ODABAŞ

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Aileme...

ETİK

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

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

beyan ederim.

20/07/2015

BURCU SARIKAYA

ÖZET

KOLAJEN/BETA-TRİKALSİYUM FOSFAT BAZLI SENTETİK KEMİK GREFTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Burcu SARIKAYA

Yüksek Lisans, Biyomühendislik A.B.D.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Temmuz 2015, 97 sayfa

Dünya'da milyonlarca insan trafik kazası, spor yaralanması, günlük yaralanma veya genetik hastalıklar yüzünden kemik yaralanması tedavilerine ihtiyaç duymaktadır. Oluşan travmalar uygun implantlar ile fikse edilirken doğal/sentetik kemik greftleri ile de desteklenmektedir. Tez çalışmasının amacı biyouyumlu, biyobozunur, gözenekliliği yüksek ve kemik oluşumunu artıracak sentetik kemik greftlerinin hazırlanmasıdır. Çalışmada oluşturulması hedeflenen doku iskelelerinin kanla ıslandığında esneyebilme, hemostatik olma, hücre ya da büyüme faktörü ile desteklenebilme, osteokondüktif ve osteoindüktif olma gibi önemli özelliklere sahip olması hedeflenmiştir. Bu amaç ve hedefler doğrultusunda tezin ilk aşamasında öncelikle sığır kaynaklı kolajen tip-I ve beta trikalsiyum fosfat (β -TCP) karışımı oluşturulmuş ve dondurulduktan sonra liyofilizasyon ile gözenekli yapılar oluşturulmuştur. Hazırlanan yapılar vakum altında ve 100°C üzerinde sıcaklıkta dehidrotermal (DHT) yöntem kullanılarak değişik sürelerde çapraz bağlanmış ve örneklerin bir kısmı gama radyasyonu ile steril edilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında nihai formuna kavuşan doku iskelelerinin karakterizasyon testleri tamamlanmıştır. Seramik fazın belirlenmesi için X-ray difraksiyonu (XRD), oluşturulan doku iskelesindeki fonksiyonel grupların tespit edilmesi için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), termal davranışların karakterize edilmesi amacıyla da diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri yapılmıştır. Hazırlanan kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin aynı zamanda üç nokta eğme ve basma analizleri yapılarak, mekanik davranışları belirlenmiştir. Mekanik analiz sonuçlarına göre doku iskelelerinin basma mukavemeti oldukça fazla olup, kemik dokusuna oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Gözenekli doku iskeleleri taramalı elektron mikroskop (SEM) ve mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ile görüntülenmişlerdir. Analiz sonucunda doku iskelelerinin %65 gözeneklilik ve gözeneklerin birbiriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Malzemenin su alım kapasitesi de ölçülerek şişme davranışı irdelenmiştir.

Mekanik, termal ve kimyasal olarak karakterizasyonu yapılan doku iskelelerinin *in vitro* ortamda hücre kültürü analizleri ile biyolojik olarak da karakterizasyonu yapılmış ve kolajen/ β -TCP doku iskelelerine MG63 insan osteosarkoma hücre hattı ekilmiştir. Hücre ekimi sonrasında doku iskelelerinin sitotoksikite ve dağılma davranışları gözlemlenmiştir. Hücre kültürü sonuçlarında doku iskeleleri herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Hayvan çalışmalarında BMP-2 ve TGF- β 1 büyüme faktörü kullanıldığından dolayı, çalışma öncesi doku iskelelerinden büyüme faktörlerinin salım kinetiklerine bakmak amacıyla, model protein olan serum albümin doku iskelelerine yüklenmiş ve bir haftalık salımı incelenmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında ise hazırlanan kolajen/ β -TCP doku iskeleleri 120 adet Sprague Dawley cinsi sıçana implante edilmiş ve sıçanların kranyum ve femur kemiklerinde iki farklı defekt modeli oluşturulmuştur. Kontrol, doku iskelesi, doku iskelesi+BMP-2, doku iskelesi+TGF- β 1, doku iskelesi+BMP-2+ TGF- β 1 ve otogreft grupları oluşturulmuştur. Kranyum defekti oluşturulan hayvanlar 4 ay, femur defekti oluşturulanlar ise 6 ay sonra sakrifiye edilmiştir. Spesimenler saklanarak μ -CT analizi ile kemik rejenerasyon oranları bulunmuş ve en iyi gelişme otogreft uygulamasında görülmüştür. Doku iskelesi grubu ile büyüme faktörü içeren gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: kolajen Tip-I, beta-trikalsiyum fosfat, kemik doku mühendisliği, dehidrotermal yöntem, kranial defekt, iyileşmeyen kemik defekti

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF COLLAGEN/ BETA-TRICALCIUM PHOSPHATE BASED SYNTHETIC BONE GRAFTS

Burcu SARIKAYA

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

July 2015, 97 pages

Millions of patients worldwide need bone injury treatments due to traffic accidents, sports injuries, daily injuries or genetic diseases. While originating traumas are fixated with appropriate implants, they are also supported by natural and synthetic bone grafts. The aim of this thesis is to prepare synthetic bone grafts that have high porosity and are also biocompatible and biodegradable which will improve bone growth. It was intended in this study for the prepared tissue scaffolds to become osteoconductive and osteoinductive, that can be supported with cells or growth factors, that are able to bend and twist when wetted with blood, and that are also hemostatic. According to these aims, in the first stage of the thesis, firstly, bovine collagen type-I and beta tricalcium phosphate (β -TCP) mixture was prepared and porous structures were obtained via freeze drying. The structures prepared were cross-linked by dehydrothermal method above temperatures over 100°C for varying periods of time, and some of the samples were sterilised via gamma radiation.

In the second stage of the thesis, characterisation of the scaffolds that have assumed their final form were completed. X-Ray Diffraction (XRD) was used to determine the ceramic phase, while Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) was used to determine the functional groups in the prepared tissue scaffold,

and to characterise thermal behaviour, differential scanning calorimetry (DSC) analysis was performed. Mechanical behaviour of the prepared collagen/ β -TCP scaffolds was determined via three point bending and compression analyses. According to mechanical analysis results, strength values of the scaffolds were found to be significantly high and were close to that of bone tissue. Morphology was observed by using scanning electron microscopy (SEM) and micro-computed tomography (μ -CT). With the results of these analyses, it was found that the scaffolds have over 65% porosity and that these pores are interconnected. Swelling capacity of the material was also investigated.

In order to investigate *in vitro* performance of the collagen/ β -TCP scaffolds, a MG63 human osteosarcoma cell line was seeded onto constructs. The scaffolds were tested for cytotoxicity and degradation/disintegration behaviour. Cell culture results have indicated that scaffolds have not shown any cytotoxic effects. To investigate the release kinetics of the growth factors, model protein of serum albumin was loaded into the scaffolds and its release was observed for a week before the study.

In the last stage of the thesis, prepared collagen/ β -TCP scaffolds were implanted into 120 Sprague Dawley rats and two types of defect models were created in the cranium and femur of these animals. Six groups were formed, which were: control, scaffold, scaffold+BMP-2, scaffold+TGF- β 1, scaffold+BMP-2+TGF- β 1 and autograft. Animals with cranium defects and femur defects were sacrificed after, 4 months and 6 months, respectively. Specimens were preserved and bone regeneration ratios were determined with μ -CT analysis, and the the highest bone formation was observed in autograft group with no significant difference between bare and growth factor containin groups.

Keywords: collagen Type-I, beta-tricalcium phosphate, bone tissue engineering, dehydrothermal treatment, cranial defect, non-union femur defect

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar beni destekleyen, kendisiyle çalışma imkânı bulabildiğim ve kendisinden çok şey öğrendiğim saygıdeğer hocam Doç. Dr. Halil Murat Aydın'a;

Tez çalışmam boyunca tecrübe ve bilgileriyle bana yön veren değerli hocam Prof. Dr. İbrahim Vargel'e;

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve desteklenmesinde çok büyük katkıları olan BMT Calsis Ailesi'ne, Levent Mete Özgürbüz ve Deniz Özdil'e;

Tez çalışması boyunca bana deneylerimde yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Hakan Hamdi Çelik, Prof. Dr. Ying Yang'a ve araştırma görevlileri Dr. İbrahim Utku Özcan, Dr. Ömer Ekin, Alper Vatansever, Dr. Arda Büyüksungur, Elif Bilgiç, Doç. Dr. Müge Andaç Özdil'e;

Biyomühendislik ve Nanotıp Anabilim Dalı'nda bulunan arkadaşlarım Bahar Aslan, Pezhman Hosseinian, Cansel Öğütçü ve çalışma arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen annem Semiha, babam Orhan, ablam İlkay, abim Sabri ve biricik yeğenim Bilge'ye teşekkür ederim.

Burcu Sarıkaya

2015, Ankara

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 7120905 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Biyomalzemeler	4
2.2 Doku Mühendisliği	7
2.3 Kemik Doku Mühendisliği	10
2.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler	12
2.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Fabrikasyon Teknikleri	14
2.3.3 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	16
2.3.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri	17
2.4 Kemiğin Yapısı ve Özellikleri	18
2.4.1 Kemik Hücreleri	20
2.4.2 Kemik matriksi	22
2.4.2.1 Kolajen ve Yapısı	23
2.4.2.2 Kolajenin Çapraz Bağlanması	25
2.4.2.3 Kalsiyum Fosfatlar	27
2.5 Kemik Rejenerasyonu	29
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31

3.1	Kullanılan Malzemeler	31
3.2	Kolajen ve β -TCP İçeren Doku iskelelerinin Hazırlanması	31
3.3	Doku iskelesi Karakterizasyonu.....	32
3.3.1	Kimyasal Ve Termal Özelliklerin Karakterizasyonu	32
3.3.2	Mekanik Özelliklerin Karakterizasyonu.....	33
3.3.3	Doku iskelesi Morfolojisinin Karakterizasyonu.....	34
3.3.4	Gama Radyasyonunun Etkilerinin Değerlendirilmesi	34
3.3.5	Şişme Davranışının İncelenmesi.....	34
3.3.6	Kontrollü BSA Salım Çalışması	35
3.3.7	<i>In vitro</i> Hücre Kültürü Testleri.....	36
3.4	<i>In vivo</i> Hayvan Çalışmaları	37
3.5	İstatistiksel Analiz	40
4	SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR	41
4.1	Doku iskelesi Karakterizasyonu.....	41
4.2	<i>In vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	59
4.3	Kontrollü BSA Salım Çalışması	66
4.4	<i>In vivo</i> Hayvan Çalışmaları.....	67
	KAYNAKLAR.....	83
	EK-I	93
	Ek-II.....	95
	Ek-III.....	96
	ÖZGEÇMİŞ	96

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin biyolojik özelliklerine göre sınıflandırılması	5
Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan polimerlerin genel özellikleri [21,22]	13
Çizelge 2.3. Kemik doku mühendisliği fabrikasyonunda kullanılan geleneksel yöntemler [22-28]	15
Çizelge 2.4. Kemik doku mühendisliği fabrikasyonunda kullanılan bilgisayar destekli yeni yöntemler [22-28].....	16
Çizelge 2.5. Kemik formasyonu ve şekillenmesinde yer alan hücreler ve genel özellikleri [58].....	21
Çizelge 2.6. İn vitro ortamda kolajenin çapraz bağlanma yöntemleri [65-69]	26
Çizelge 2.7. Kalsiyum fosfat içeren ticari ürünler (accessgudid.nlm.nih.gov)	28
Çizelge 2.8. Kemik rejenerasyonunda görev alan elemanlar	29
Çizelge 3.1. Hayvan çalışmasına ait gruplar ve hayvanların dağılımı	37
Çizelge 4.1. μ -CT sonuçlarına göre doku iskelesi gözeneklilik özellikleri	44
Çizelge 4.2. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait DTA sonuçları.....	51
Çizelge 4.3. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait erime ve degradasyon sıcaklıkları.....	52
Çizelge 4.4. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz sonuçları (Emod: elastik modül, σ_M : mukavemet, stress F_{max}/A , a_0 : yükseklik, b_0 : genişlik).....	53
Çizelge 4.5. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (n=3) (Emod: elastik modül, F_{max} : uygulanan max kuvvet, dL : F_{max} gelene kadarki bozulma, h_0 : yükseklik, S_0 : yüzey alanı).....	55
Çizelge 4.6. 1, 3 ve 5 gün boyunca DHT yöntemine tabi tutulan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları (n=3).....	57
Çizelge 4.7. Hayvan deneylerinde kullanılan hayvanlar ve sakrifikasyon sonrası özellikleri.....	68

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Doku mühendisliği kavramının şematik anlatımı (en.wikipedia.org).....	8
Şekil 2.2. Doku mühendisliği yaklaşımında ana unsurlar	9
Şekil 2.3. Uzun kemiğin oluşturan elemanların şematik olarak gösterimi [58]	19
Şekil 2.4. Kemiğin hiyerarşik olarak yapısal sınıflandırması [59]	20
Şekil 2.5. Kolajen fiberlerinin oluşum mekanizması [62].....	25
Şekil 3.1. 3 nokta eğme testi yapım şekli	33
Şekil 3.2. BSA salım çalışmasında kullanılan kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.3. Hayvan denemelerinden elde edilen görüntüler. (A) Kullanılan malzemeler (B) Femur çalışmasında iyileşmeyen kemik defektinin oluşma aşaması, (C) Femur çalışmasında implantasyon, (D), Kranyum çalışmasında defekt oluşturulması	39
Şekil 4.1. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin makroskopik görüntüleri	42
Şekil 4.2. Gama radyasyonu ile steril edilmiş kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (A) 110, (B) 250, (C) 1000, (D) 5000X büyütme	42
Şekil 4.3. Steril edilmemiş kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (A) 110, (B) 250, (C) 1000, (D) 5000X büyütme.....	43
Şekil 4.4. Steril doku iskelesine ait μ -CT radyografisi (yandan görünüş).....	44
Şekil 4.5. Steril doku iskelesine ait μ -CT radyografisi (üstten görünüş).....	45
Şekil 4.6. Steril β -TCP'e ait XRD grafiği	46
Şekil 4.7. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait XRD grafiği	46
Şekil 4.8. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait XRD grafiği.....	47
Şekil 4.9. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait grafiklerin üst üst çakıştırılmış görüntüsü.....	47
Şekil 4.10. Saf kolajene ait FTIR grafiği	48
Şekil 4.11. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait FTIR grafiği.....	49
Şekil 4.12. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait FTIR grafiği	50

Şekil 4.13. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait üst üste çakıştırılmış FTIR grafikleri.....	50
Şekil 4.14. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait TG-DTA grafiği	52
Şekil 4.15. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait TG-DTA grafiği	53
Şekil 4.16. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz grafiği	54
Şekil 4.17. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz grafiği...	54
Şekil 4.18. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait basma analizi grafiği	56
Şekil 4.19. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait basma analizi grafiği	56
Şekil 4.20. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin şişme davranışları (n=5)	57
Şekil 4.21. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait ESR grafiği	58
Şekil 4.22. Doku iskelelerine ilk hücre ekimine ilişkin görüntüler. A ve C) 2 saat sonundaki görüntüler. B ve D) ekmenin 24 saat sonrası. A ve B) x 4 büyütme. C ve D) x10 büyütme	60
Şekil 4.23. Hücre ekiminden 2 saat sonra doku iskelelerinin morfolojisi. A ve D) Hücre ekiminden 48 saat sonraki görüntü. B ve E) Hücre ekiminden 72 saat sonraki görüntü. C ve F) Hücre ekiminden 192 saat sonraki görüntü. A-C) 1 mL kuyucuk hacmi. D-F) 2mL kuyucuk hacmi.....	61
Şekil 4.24. Hücre ekiminden 192 saat sonra doku iskelelerine yapılan Canlı/Ölü boyama. A) x4 büyütme. B) x10 büyütme	61
Şekil 4.25. Farklı sıvı besi yerlerinde ıslatılan doku iskelelerinin morfolojisi. A-D) Islatılmadan 1 saat sonra. E-H) Islatılmadan 5 saat sonra. I-L) Islatılmadan 24 saat sonra. M-P) Transferden sonra (24 saat). A, E, I, M) Alpha-MEM. B, F, J, N) DMEM. C, G, K, O) MG63 katkılı besiyeri. D, H, L, P) PBS	63
Şekil 4.26. 12 Saat (A ve B), 24. Saat (C ve D), 36. saatlerde (E ve F) doku iskelesinin bozunma davranışı. (X6.3 büyütme).....	64
Şekil 4.27. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinden BSA salım grafiği (n=5).....	67
Şekil 4.28. Femur çalışmasında doku iskelesi yerleşimi.....	69

Şekil 4.29. Kranyum çalışması sonrası spesimen örnekleri. (A) doku iskelesi ve (B) otogreft grubu.....	70
Şekil 4.30. Kranyum çalışması sonrası μ -CT görüntüleri (A) kontrol, (B) otogreft, (C) doku iskelesi, (D) doku iskelesi+BMP-2, (E) doku iskelesi+TGF- β 1, (F) doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1	72
Şekil 4.31. Kranyum çalışmasında μ -CT analizi sonuçlarına göre defekt bölgesinde yeni kemik oluşum oranları ($p<0,05$)	73
Şekil 4.32. Femur modelinde mamografi görüntüleri (A) kontrol, (B) doku iskelesi, (C) doku iskelesi+BMP-2, (D) doku iskelesi+TGF- β 1	74
Şekil 4.33. Kranyum modelinde mamografi görüntüleri (A) kontrol, (B) doku iskelesi, (C) doku iskelesi+BMP-2, (D) doku iskelesi+TGF- β 1.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	alfa
β	beta
μ	mikro

Kısaltmalar

GAG	Glikoz amin glikan
PRP	Plateletçe zengin plazma
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
MSC	Mezenkimal kök hücre
NHS	N- hidroksisülfosuksinimid
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]
DPPA	Difenilfosforilazid
DMF	Dimetil formamid
NDGA	Nordihidroguaiaretik asit
EDAC	Karbodiimid hidroklorid
B-TCP	Beta-trikalsiyum fosfat
HA	Hidroksi apatit
DHT	Dehidrotermal yöntem
UV	Ultraviyole
TNF	Tümör nekroz faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteini
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü

1 GİRİŞ

Her yıl milyonlarca insan kaza, kırıklar, osteoporoz, tümör alınması, genetik rahatsızlıklar gibi nedenlerden dolayı kemik doku kaybı yaşamakta ve bu konu halk sağlığı açısından tedavi edilmesi gereken ciddi bir durum oluşturmaktadır. Özellikle Amerika ve Avrupa Birliği ülkelerinde yaş ortalamasının artışıyla birlikte kemikle ilişkili rahatsızlıklar büyük endişe uyandırmakta ve doku mühendisliği uygulamaları teşvik edilmektedir. Günümüzde otolog greftler altın standart olarak kişinin kendi dokusundan alınmakta ve bu uygulama hali hazırda osteojenik hücreleri ve osteokondüktif faktörleri içerdiğinden oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Fakat otogreft uygulamasının kısıtlı miktarda doku alınabilmesi ve donör alanda oluşan morbidite gibi dezavantajları bulunmaktadır. Alternatif olarak allogreft uygulaması yapılmakta ve aynı türe ait başka bir bireyden kemik dokusu alınabilmektedir. Allogreft transplantasyonundan sonra doku reddi, patojen aktarımı, nadiren de olsa enfeksiyon gibi riskler oluşabilmektedir. Bu uygulamaların dezavantajlarının önüne geçmek amacıyla doku mühendisliği teknikleriyle üretilmiş greftlerin kullanımı son 20 yıl içerisinde oldukça artmıştır [1].

Doku mühendisliği hasarlı doku veya organların tedavisinde konvansiyonel yöntemlerin kısıtlarını aşan biyolojik malzemelerin üretimini hedeflemektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan metotlardan biri hücre kültürü teknikleriyle *in vitro* ortamda hedef doku hücrelerini çoğaltıp hastaya implante edilmesidir ve bu işlem için hücrelerin mutlaka üç boyutlu doku iskelelerine yapışması gerekmektedir. Doku iskeleleri ya da doku iskeleleri hedef dokunun makro ve mikro düzeyde yapısını taklit edebilen ve hücre büyümesini destekleyecek ekstraselüler matriks özelliklerini sağlayabilen yapılardır. Doku iskeleleri; hücre yapışması, proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlayabilecek yüzey kimyasına sahip olmalı, uygun hızlarda bozunabilmeli ve bozunma ürünleri istenmeyen ürün oluşturmamalı, yeterli mekanik özellikleri sağlayabilmeli, değişik şekillerde ve boyutlarda üretilmeli aynı zamanda da damarlanmanın sağlanabilmesi için birbiriyle ilişkili gözeneklere sahip olmalıdır [2].

Sert doku mühendisliğinde sıkça kullanılan β -trikalsiyum fosfat sentetik olarak sentezlenen seramiklerdendir ve kalsiyum/fosfat oranları kemik dokusuna oldukça yakındır. Tamamen biyoyumlu olan β -trikalsiyum fosfat doku iskelelerinde mekanik dayanım sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Kolajen Tip-I kemik ekstraselüler matriksinin doğal yapısında en çok bulunan protein olup, tamamen biyoyumludur. Kolajen Tip-I hücre yapışmasını ve büyümesini desteklediği için doku mühendisliği uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır. Kolajenin proteolitik reaksiyonlara dayanım göstermesi için çapraz bağlanması gerekmektedir ve bu amaçla birçok yöntem geliştirilmiştir. Kimyasal çapraz bağlayıcı ajanlar oldukça verimli olsalar da geride bıraktıkları rezidüel sitotoksik etki göstermektedir. Biyolojik ajanlar böyle bir etki göstermese de yetersiz çapraz bağlama özelliklerinden dolayı kolajenin çapraz bağlanmasında çok tercih edilmemektedirler. Gama ve ultraviyole radyasyonu gibi fiziksel yöntemler ise kolajenin yapısını bozmaktadır. Fiziksel yöntemlerden olan dehidrotermal uygulamasında ise kolajenin yapısına zarar verilmemekte ve malzemeye herhangi bir malzeme ya da solüsyon eklenmediğinden dolayı sitotoksik etki görülmemektedir. Dehidrotermal yöntemde doku iskeleleri yüksek sıcaklık ve düşük basınca maruz bırakılmaktadır [1].

Tez çalışmasının amacı sert doku onarımında kullanılacak, kolajen Tip-I proteini ve β -trikalsiyum fosfat seramiğinden oluşan kompozit malzemelerin hazırlanmasıdır. Belirli formulasyona göre hazırlanan karışım gözenekli yapının sağlanması amacıyla liyofilize edilmiştir. İstenen gözeneklilik ve gözenek yapısının sağlandığı taramalı elektron mikroskobu ve mikro-bilgisayarlı tomografi analizleri ile kanıtlanmıştır. Hazırlanan doku iskeleleri daha sonra dehidrotermal yöntem kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Nihai formuna kavuşan doku iskeleleri kimyasal olarak fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), X-ışını difraksiyonu (XRD) gibi analizlerle karakterize edilmiştir. Doku iskelelerinin mekanik dayanımı ise basma ve üç nokta eğme testleri yapılarak denenmiş ve kemik doku mühendisliği için uygun bulunmuştur. Doku iskelelerinin şişme davranışları değerlendirilmiş ve kontrollü sığır serum albümini yüklemek suretiyle salım kinetiği incelenmiştir.

Hazırlanan doku iskeleleri hücre kültür ortamında da test edilmiştir. Doku iskelelerine MG63 osteosarkoma hücre hattı ekilerek sitotoksisite ve hücre canlılığı ölçülmüş; aynı zamanda hücresiz doku iskelelerinin dağılma ve bozunma davranışları farklı hücre kültür ortamlarında incelenmiştir. Sitotoksik etki göstermeyen doku iskeleleri kısa süre içerisinde dağılım (disintegrasyon) göstermiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında doku iskeleleri Sprague Dawley cinsi sıçanların kranyum ve femurlarında kritik boyda defekt oluşturularak *in vivo* performans bakımından incelenmiştir. Kranyumda 8mm genişliğinde ve 1mm yüksekliğinde defekt oluşturulmuş ve oluşturulan defektlerde (1) kontrol, (2) doku iskelesi, (3) doku iskelesi+kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2), (4) doku iskelesi+dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), (5) doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1 ve (6) otogreft grupları çalışılmıştır. Deney hayvanları 4 ay sonra sakrifiye edilmiştir. Femur grubunda ise (1) kontrol, (2) doku iskelesi, (3) doku iskelesi+kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2), (4) doku iskelesi+dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), (5) doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1 grupları denenmiş ve hayvanlar 6 ay sonunda ex edilmiştir. Hayvan çalışmalarının tamamlanmasının ardından kemik rejenerasyonunu ölçmek amacıyla mikro-bilgisayarlı tomografi ile yeni oluşan kemik hacimleri belirlenmiş ve spesimenlere mamografi analizi yapılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler ya da başka bir deyişle biyomateryaller, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitü'sü tarafından "bireylerin yaşam kalitesini artırmak ya da devamlılığını sağlamak amacıyla, ilaçlar dışında sentetik ya da doğal kaynaklı, kısa süreliğine kullanılabilen, doku, organ ya da vücut fonksiyonlarının bir kısmını ya da tamamını iyileştiren, geliştiren içerikler veya bu içeriklerin birleşimi" şeklinde tanımlanan malzemelerdir [3]. Fakat bu tanım cerrahi aletleri kapsamamaktadır. Daha genel olarak biyomalzemeler, biyolojik sistemlerde etkileşime girebilecek tek başına ya da başka sistemlerle kullanılabilen malzemelerdir [4].

Biyomalzemelerin kullanımı eski Mısır uygarlıklarında ipek dikiş ipliklerinin kullanımıyla başlamış olup, 1950'li yıllara kadar cerrahi ihtiyaçlar doğrultusunda cerrahlar tarafından çözüm odaklı geliştirilmiştir. 1870'lerde "aseptik" ifadesinin ortaya atılması ve aseptik şartların varlığının gereksiniminin anlaşılmasıyla yapılan çalışmalar hız kazanmış fakat malzeme dayanımı, biyouyumluluk gibi sorunlar nedeniyle başarılı olunamamıştır. Bugünkü ifadesiyle ürün olarak kullanıma hazır, fabrikasyon tekniğiyle üretilmiş biyomalzemelerin gelişimi cerrah, fizikçi ve mühendislerin işbirliği sayesinde 2. Dünya Savaşı'ndan sonra gerçekleşmiştir. Devrim niteliğindeki ilk implantı, kendisine Sör ünvanı kazandıracak buluşuyla 1949 yılında Harold Ridley, ICI Perspex® poli(metil metakrilat) (PMMA) malzemesinden geliştirdiği yapıyı kontakt lens olarak uygulamıştır. 1952'de Per Ingvar Branemark tavşanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada titanyum vidanın kemiğe oldukça sıkı bir şekilde bağlandığını ve dayanımının yüksek olduğunu bulmuş ve ilk olarak "osteointegrasyon" kelimesini ortaya atmıştır ve titanyumun diş implantı olarak kullanılmasını çalışmıştır. 1956 yılında ise İngiliz John Charney ilk başarılı toplam kalça implantını gerçekleştirmiştir. Hollanda'lı Willem Kolff 1943 yılında diyaliz membranını kullanmış fakat sistemin kullanılabilir hale gelişi 1960 yılını bulmuştur. Kolff aynı zamanda polivinilklorürden ilk yapay kalp çalışmasını yapmıştır. 1964 yılında ise John Gibbon kalp-akciğer makinesini geliştirmiştir [5].

Biyomalzemeler medikalde stent, katater, dikiş ipi, kontakt lens, dental braket ve implantlar, yara örtü materyali, ilaç salımı yapan tıbbi cihazlar, pacemaker, kondüit, meme implantları, intraoküler implantlar gibi birçok şekilde kullanılırken; medikal haricinde hücre kültürü çalışmalarında, analiz kitlerinde, biyosensörler ve çiplerde, kontrollü salım sistemlerinin zirai ve çevre amaçlı uygulamalarında, gıda sektöründe ve ayırma-safılaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır.

Biyomalzemeler doku etkileşimlerine göre inert, rezorbe olabilen ve biyoaktif materyaller olmak üzere üçe ayrılmaktadır. İnert materyallere karşı biyolojik yanıt oluşmadığı gibi mekanik dayanımları yüksektir fakat genel olarak rezorbe olamayan malzemelerdir. Rezorbe olabilen biyomalzemeler dokuların iyileştirmesini sağlarken aynı zamanda yeni doku oluşumunu da teşvik etmekte ve bu süreçte yeni doku oluşurken biyomalzeme de aynı hızda rezorbe edilmektedir. Böyle malzemelerin bozunma ürünleri de tamamen biyouyumlu olmalıdır. Biyoaktif materyaller ise hasarlı bölgeye yerleştirildiklerinde biyofiziksel ve biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayarak doku-malzeme arayüzeyinde güçlü bağlantı oluşturmaktadırlar. Çizelge 2.1 de biyomalzemeler biyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmış ve örneklendirilmiştir.

Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin biyolojik özelliklerine göre sınıflandırılması

Sentetik Biyomalzemeler	Metaller	Kalça protezi, sabitleyiciler, dental implant ve amalgam, nanopartikül
	Polimerler	İlaç taşıyıcı sistemler, kontakt lensler, dikiş iplikleri, yara-yanık örtü materyalleri, meme implantları, kalp kapakları, kondomlar, kataterler
	Seramikler	Kemik çimentosu, implant kaplamaları, diş dolgu materyali, kemik grefleri, protezler

	Kompozitler	Dental ve ortopedik implantlar, yapay damar, antiadeziv membranlar, oftalmolojik implantlar, ilaç taşıyıcı sistemler
Doğal Biyomalzemeler	Doğadan elde edilen (mercan, kitin, jelatin, kolajen)	Tek başına ya da kompozit olarak implant malzemelerinde,
	Doğal olarak bulunan (hücre, doku, deselülerize matris)	Oküler, ortopedik, dental, vasküler greftlerde

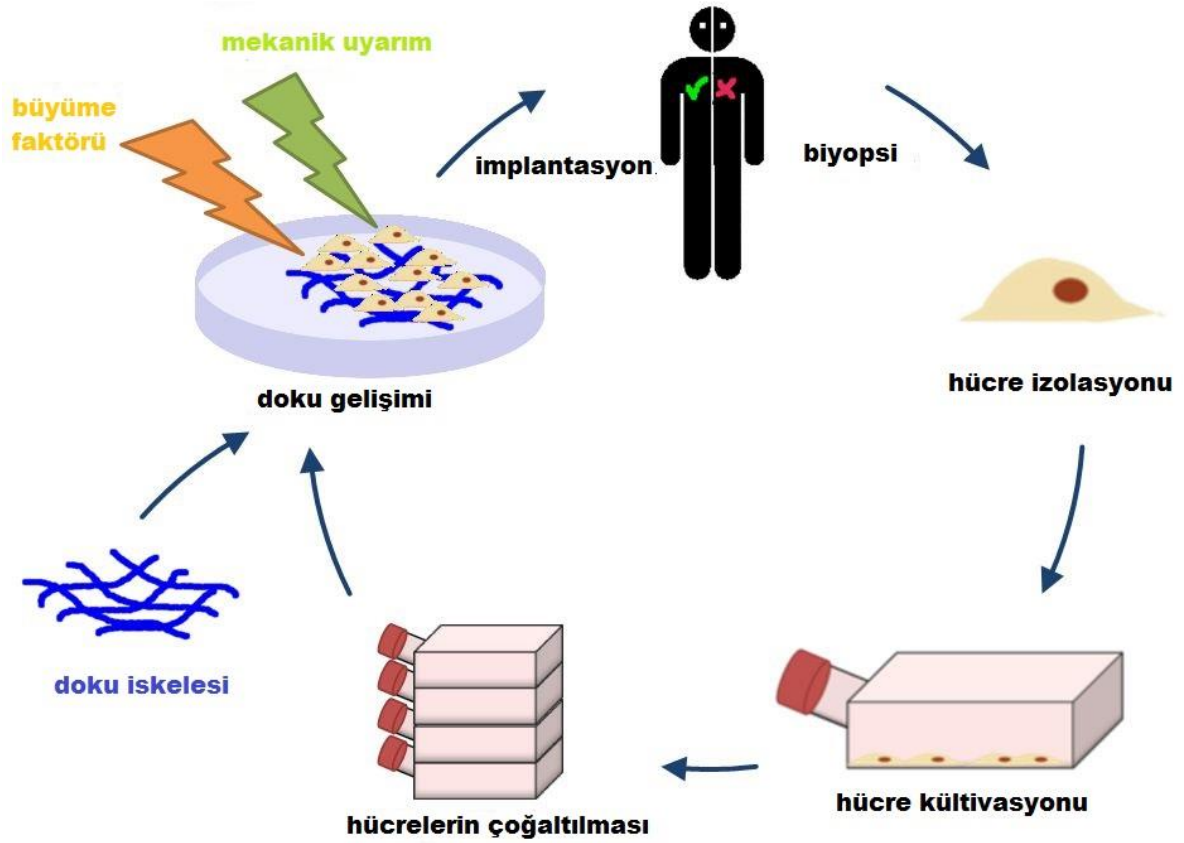
Biyomalzemeler yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine yardımcı olsa da hala biyouyumluluk, mekanik özellikler, hedefleme, bozunma kinetiği ve diğer birçok önemli özelliklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Modern biyomateryal bilimi hücresel sinyal proseslerinin üzerinde durarak, hücre-matriks etkileşimini ve performansı artırmaya yönelik çalışmaktadır. Biyomalzemelerin tıpta kullanımı da her geçen yıl artmaktadır. Polimer içeren kontrollü ilaç salım sistemleri her yıl 10 milyon hasta üzerinde kullanılmaktadır. Örneğin polimer kaplı stentler, insan büyüme hormonu gibi proteinleri salan kontrollü ilaç salım sistemleri, peglenmiş interferonlar gibi birçok biyomateryal uygulaması insanların sağlığını ve refahını artırmaya yönelik olarak kullanılmaktadır.

Biyomalzemelerin doku mühendisliği uygulamalarında da yeri oldukça önemlidir. Biyouyumlu polimerlerin hücrelerle birleştirilmesi ile yapay deri, mesane gibi organ yapı ilerleyen teknoloji sayesinde mümkün olmuştur. Biyomalzemeler, günümüzde hasarlı dokuların doğal yapıtaşlarını kullanarak doku replasmanını yapan, biyolojik ve medikal uygulamalar için özel olarak tasarlanıp üretilebilen, sadece tedavi değil tanı ve teşhiste, array ve çip teknolojilerinde de kullanılan özellikli malzemelerdir.

Son yıllarda klinik tıp, malzeme bilimi ve mühendislik bilimlerinin ortak çalışmaları sonucu biyomalzemeler konusunda oldukça önemli gelişmeler yaşanmıştır. Farklı disiplinlerden insanların ortak çalışmaları, eğitim programlarına katılmaları şüphesiz biyomalzemeler konusunda daha fazla ilerlemenin olmasını sağlayacak ve tıpta yeni uygulamaların yapılabilmesine olanak sağlayacaktır [6].

2.2 Doku Mühendisliği

Her yıl milyonlarca hasta organ yetmezliği gibi hastalıklardan ötürü organ nakli sırası beklemektedir. Donör sayısının azlığı, bu konudaki teşviklerin ve eğitimin yetersizliğinden dolayı ise bu hastaların büyük bir bölümünün yaşam kalitesi düşmekte ya da hayatlarını kaybetmektedirler. Bu problemlerin önüne geçmek amacıyla doku nakline ihtiyaç duyulan kişilere, altın kural olarak nitelendirilen ototransplatasyon yani hastanın başka bir yerinden alınan doku nakledilmektedir. Böbrek, karaciğer yetmezliği, otoimmün rahatsızlıklar gibi nedenler dolayı ikamesi mümkün olmayan durumlarda hastanın birinci dereceden yakınlarına başvurulmakta ya da kadavradan doku/organ temin edilmektedir. Bazı durumlarda ise insan harici dana, domuz gibi memeli türlerinden yararlanılmakta ve tedavi için zenotransplantasyon yapılmaktadır. Burada bahsedilen yaklaşımlarda donörde hasar ve morbidite oluşması, bulaşıcı hastalık kapma, bağışıklık sisteminin bariyer oluşturması ve doku reddi gibi ciddi problemler doğabilmektedir. Bu problemlerin önüne geçmek için kimya, biyoloji, tıp ve mühendislik disiplinlerini kapsayan doku mühendisliği teknikleri geliştirilmiştir (Şekil 2.1).



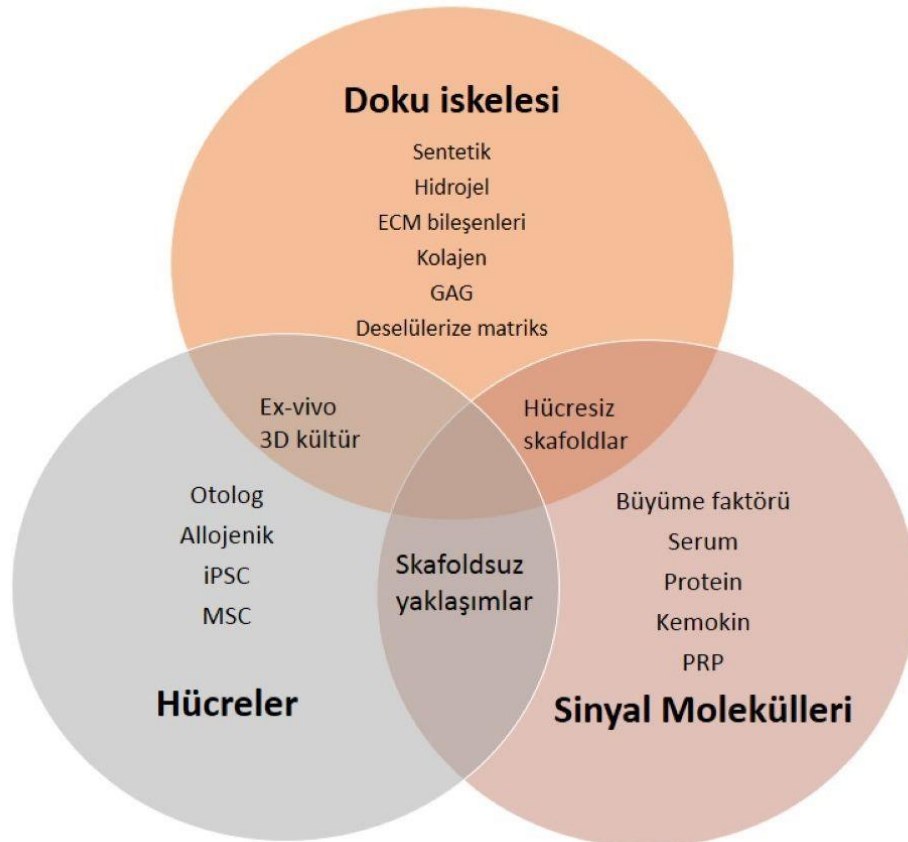
Şekil 2.1. Doku mühendisliği kavramının şematik anlatımı (en.wikipedia.org)

Doku mühendisliği genel olarak doku iskelesi, hücre ve büyüme faktörü olmak üzere üç bileşenden oluşur. Şekil 2.2.'de doku mühendisliğinde kullanılan materyaller özetlenmiştir. Doku iskelesi ya da başka bir deyimle doku iskeleleri üzerlerine ekilen hücreler için üç boyutlu destek materyali olarak işlev görürler ve hücrelerin kendi mikroçevrelerini oluşturmalarını sağlarlar. Hücreler öncelikle doku iskelelerine bağlanıp, migrasyon yapar ve daha sonra farklılaşarak çoğalabilirler. Doku iskeleleri aynı zamanda biyokimyasal faktörlerin iletimini sağlayıp, gaz ve kütle transferini sağlamaktadırlar. Hücreler kendi mikroçevre ve ekstraselüler matrikslerini oluşturana kadar bölgede mekanik destek sağlayıp, süreç tamamlandığında ise cerrahi işleme gerek kalmadan vücut tarafından absorbe edilmektedirler. Doku iskelesi tasarımında biyouyumluluk, biyobozunma, gözenek boyutu ve açık gözeneklilik önemli parametrelerdir. Bu alanda halen daha aşılması gereken en önemli problem ise damarlanmadır. Bu sorunu çözmek amacıyla doku

iskelelerinin tasarlanması gerektiğinde büyüme faktörü ilave edilmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliğinde hücre kullanımı dokunun daha verimli yenilenmesi için gereklidir. Kullanılan hücreler çok çeşitli olup; “otolog” hücre olarak kişinin kendi sağlam hücrelerinden, “allojenik” hücre olarak aynı tür içerisinde farklı bir donörden, “zenojenik” hücre olarak farklı bir türden, “kök hücre” olarak ise indüklenmiş pluripotent kök hücre, mezenkimal kök hücre vb. olarak gruplandırılabilir.

Biyosinyal molekülleri ise hücresel süreçlerin düzenlenmesini sağlayarak, hücre büyümesi, iyileşmesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını artırmaktadırlar. Biyosinyal molekülleri, hormon, nörotransmitter maddeler, sitokinler, büyüme faktörleri gibi oldukça çeşitlidir.



Şekil 2.2. Doku mühendisliği yaklaşımında ana unsurlar

2.3 Kemik Doku Mühendisliği

Kemik oldukça dinamik, skar dokusu oluşturmadan yeniden şekil alabilen ve eşsiz bir iyileşme kapasitesi olan dokudur. Vücut için temel görevi destek sağlamak olup, mineral deposudur ve hareket esnasında kasların kasılmasını destekleyerek iç organları korumaktadır. Bu yüzden kemik dokuda oluşabilecek yaralanma veya hastalıkların kişinin yaşam kalitesini ve vücut dengesini oldukça kötü etkilemesi kaçınılmazdır [1].

Bu amaçla özellikle sentetik biyomateryaller kemiğin yerine geçebilen malzemeler olarak kullanılmaktadır. İlk başlarda biyomekanik özelliklerine göre seçilen bu malzemeler ilerleyen zamanlarda doku büyümesini artıracak şekilde biyoaktif ya da biyobozunur şekilde tasarlanmıştır. Günümüzdeki doku iskelelerinin ise kemik oluşumunu ve damarlanmayı artırması hedeflenmiş ve bu amaçla gözenekli, büyüme artıracak hücre, ilaç, büyüme faktörü ya da genleri taşıyabilecek malzemeler geliştirilmiştir [7].

Kemik dokusunun oldukça karmaşık bir biyomekanik sistemi olup, ideal doku iskelelerini oluşturabilmek için bazı önemli kıstaslar bulunmaktadır. İdeal doku iskelesi için gereklilikler aşağıda madde madde özetlenmiştir:

- *Biyouyumluluk* doku iskelelerinin konak dokuda hiçbir lokal ya da sistematik toksik etki oluşturmadan moleküler sinyal sistemleri dahil tüm doğal hücrel aktiviteyi desteklemesi yeteneğidir. Kemik doku iskeleleri yüzeyinde ve gözeneklerinde ektarselüler matriks oluşmasına ve kemik hücrelerinin bağlanıp, çoğalmasına izin verecek şekilde osteokondüktif olmalıdır. Ayrıca doku iskeleleri osteoindüksiyon olarak da bilinen progenitör hücrelerin ve biyomoleküler sinyallerin toplanması yoluyla yeni kemik formasyonunun indüklenmesini desteklemektedir. İdeal doku iskelesi nutrient, oksijen ve atık maddelerin transferinin sağlanması amacıyla implantasyondan birkaç hafta içerisinde yeni damarların oluşmasını sağlayabilmelidir [7].

- *Mekanik özellikler* konak dokunun kemik özellikleriyle eşleşmeli ve uygulanan yüke dayanıklı olmalıdır. Kancelöz ve kortikal kemiğin mekanik özellikleri oldukça farklılık göstermektedir. Genellikle kortikal kemiğin young modülüsü 15-20 GPa iken; kancelöz kemiğinki 0,1-2 GPa arasında değişmektedir. Basma dayanımı ise kortikal kemik için 100-200 MPa; kancelöz kemik için 2-20 MPa olarak ifade edilmektedir [9].
- *Gözenek büyüklüğü* hücre büyümesi için gerekli oksijen ve esansiyel nutrientlerinin difüzyonunun sağlanması için en az 100 µm ve gözeneklerin birbiriyle bağlantılı olması gerekmektedir. Kemik dokusu gelişimi için optimum gözenek çapı 200-350 µm olarak bulunmuştur [10]. Yapılan çalışmalarda mikro ve makro ölçekte çeşitli çaplarda gözeneklerin bulunmasının sadece makro gözenekler içeren doku iskelelerine oranla daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur. Fakat gözenekliliğin artışı basma mukavemeti gibi mekanik özelliklerde azalmaya sebebiyet verdiği için uygun bir gözeneklilik oranı bulunması gerekmekte ya da kullanılan polimer, metal, seramik gibi malzemelerde değişikliğe gidilmelidir.
- *Rezorbe olabilme* elzem bir faktördür. İdeal doku iskelesi konak dokuyla aynı mekanik özelliklere sahip olmakla kalmayıp aynı zamanda *in vivo* ortamda zamanla bozunabilmeli, özellikle yeni kemik dokusu oluşurken ona yer açacak şekilde kontrollü bir hızla vücut tarafından rezorbe edilebilmelidir. Örneğin omurga füzyonu operasyonlarında 9 aydan daha fazla bir süre gerekirken, kranio-maksillofasial operasyonlarında bu süre 3-6 ay arasında değişmektedir [9].

Geçmişten beri kemik rejenerasyonu alanında oldukça önemli aşamalar kaydedilse de günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri bazı kısıtlara sahiptir. Malzeme biliminde yapılan gelişmeler oldukça iyi olsa da henüz tam olarak kemiğin yerine geçebilen, esneklik ve kullanım kolaylığı, sunan farklı endikasyonlarda kullanılabilecek yapılar geliştirilememiştir. Günümüzde hala yeterli şekilde tedavi edilemeyen kemikle ilişkili yaralanmalar mevcuttur [1].

2.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Kemik rejenerasyonunun sağlanması amacıyla kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi oluşturmak için en uygun materyalin seçilmesi gerekmektedir. Günümüze kadar sentetik ya da doğal kaynaklı metal, seramik ve polimerler gibi birçok malzeme denenmiştir. Fakat metaller ve seramiklerin çoğu biyobozunur olmadıklarından ötürü araştırmacılar az miktarda seramik ve polimerler ile çalışmaktadırlar.

Seramikler, biyomedikal mühendisliği ve kemik rejenerasyonunda oldukça fazla çalışılmaktadır ve mercanlardan elde edilen hidroksiapatit (HA) gibi doğal ya da sentetik olarak HA, β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) gibi malzemeler olabilmektedirler. Özellikle osteokondüktif ve osteoindüktif oluşlarından dolayı kemik doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedirler. Seramiklerin kullanıldığı çalışmaların çoğunda kemik hücreleri olmaksızın iyi sonuçlar alınmıştır. Fakat seramiklerin kırılma ve düşük mekanik özellikler göstermesi büyük kemik defektlerinde kullanımlarında kısıt oluşturmaktadır. Ayrıca *in vivo* ortamdaki osteoklastik aktivite gibi faktörlerden dolayı seramiklerin bozunma/dağılma hızları kestirilememektedir. Hali hazırda mekanik dayanımı düşük olan seramiklerin erken bozunması mekanik kararlılığı azaltacak ve ekstraselüler matrikste kalsiyum ve fosfat tuzlarının artışından dolayı hücre ölümüne yol açacaktır [11].

Seramiklere alternatif olarak biyobozunur polimerler kullanılmaktadır. Polimerler doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadır. Doğal biyobozunur polimerler hayvan ya da bitki olmak üzere doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Kemik doku mühendisliğinde en çok kullanılan doğal biyopolimerler, kolajen, fibrinojen, kitosan, nişasta, hiyaluronik asit ve poli(hidroksibütirat)'tır ve genel özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu malzemelerin düşük immünojenik potansiyele sahip olmaları, biyoaktif davranış potansiyellerinin yüksek oluşu, kimyasal olarak dönüşebilirlikleri ve bazılarının kaynaklarının sınırsız oluşu gibi avantajları bulunmaktadır [2,12-14]. Sentetik biyobozunur polimerler ise biyomedikal mühendisliğinde sıklıkla kullanılmakta ve kimyasal olarak istenildiği gibi şekillendirilebilmeleri nedeniyle tercih edilmektedirler. En çok poli(α -hidroksi asit), poli(ϵ -kaprolakton), poli(propilen

fumarat), poli(karbonat), poli(fosfazen) ve poli(anhidrid) gibi polimerler kullanılmaktadır [15-20,28].

Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan polimerlerin genel özellikleri [21,22]

Materyal	Orijin	Özellikler
Kolajen	Doğal	Düşük immün yanıt Kemotaktik Düşük mekanik özellikler Hücre yapışmasını sağlama
Fibrin	Doğal	Osteokondüksiyonu artırma Hücre göçünü ve damarlanmayı artırma Hücre taşıyıcı olarak kullanılabilme
Kitosan	Doğal	Hemostatik Osteokondüksiyon ve yara iyileşmesini hızlandırma
Nişasta	Doğal	Termoplastik davranış Hücre yapışmasını sağlama Biyouyumlu ve sitotoksik etkisi yok HA ile kullanıldığında kemiğe bağlanma davranışının artması
Hyaluronik asit	Doğal	Düşük immünojenite Hemostatik Düşük mekanik özellikler
Poli(hidroksi bütirat)	Doğal	Kemik gelişimi için yeterli substrat içermesi

		Kırılgan malzeme
Poli(α -hidroksi asit)	Sentetik	Hidroliz ile bozunabilme Özellikle alifatik poliestерlerin çoğu kurum tarafından onaylanması Bozunma ürünlerinin idrar ile atılabilmesi Bazı durumlarda sitotoksisite yaratması
Poli(ϵ -kaprolakton)	Sentetik	Alifatik poliestер Hidroliz ya da kütlese aşınmayla bozunma Bozunma hızı yavaş Kimyasal olarak düzenlenebilme potansiyeli düşük
Poli(anhidrid)	Sentetik	Biyouyumlu İlaç taşıyıcı sistemler için uygun Kortikal kemik rejenerasyonunu destekleme
Poli(propilen fumarat)	Sentetik	Fumarik asit ve propilen glikol bozunma ürünleri Biyolojik sonuçları olumlu
Poli(fosfazen)	Sentetik	Hidroliz ile bozunma Polimer gövdesinde karbon atomu olmadan birbirini takip eden azot ve fosfat içerme

2.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Fabrikasyon Teknikleri

Kemik rejenerasyonunu sağlayacak uygun biyobozunur polimer belirlendikten sonra bu polimerin fabrikasyonu için uygun tekniğin seçilmesi ya da geliştirilmesi gerekmektedir. Belirlenen fabrikasyon metodunun malzeme özelliklerini etkilememesi, kimyasal ve biyouyumluluk özelliklerini değiştirmemesi, hassas ve sürekli uygulanabilir olması ve böylece her zaman aynı gözeneklilik, gözenek boyutu ve gözenek dağılımı gibi parametrelerin yakalanabilmesi, her bir üretimde

şartlar değiştirilmediği sürece çok az varyasyon görülmesi gibi kriterlere sahip olması gerekmektedir. Yıllar boyunca geliştirilen ve genel olarak uygulanan teknikler çözücü dökme-partikül uzaklaştırma, dondurarak kurutma, elektroğirme, eriyikten kalıplama, süperkritik akışkan kullanımı, üç boyutlu baskı, stereolitografi olup, tekniklerin bir kısmı Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'de verilmiştir [22-28].

Çizelge 2.3. Kemik doku mühendisliği fabrikasyonunda kullanılan geleneksel yöntemler [22-28]

Geleneksel Fabrikasyon Teknikleri	
Eriyik eğirme	Dondurarak kurutma
Islak eğirme	Eriyik kalıplama
Kuru eğirme	Ekstrüzyon
Çekme	Membran laminasyonu
Elektroğirme	<i>in situ</i> polimerizasyon
Faz ayrımı (katı/sıvı, sıvı/sıvı)	Kendiliğinden düzenlenme
Fiber bağlama	Gazla köpüklendirme
Süperkritik akışkan ile muamele etme	Çözücü dökme - partikül uzaklaştırma

Teknolojinin ilerlemesi sayesinde hızlı prototipleme ya da başka bir deyişle solid free form teknikleri imalat süresini kısaltmıştır. Konvansiyonel yöntemlerdeki gibi hammaddeden malzemeyi almak yerine bilgisayar programında çizilen desenlerin üst üste eklenmesiyle üç boyutlu yapılar oluşturulmaktadır [1].

Çizelge 2.4. Kemik doku mühendisliği fabrikasyonunda kullanılan bilgisayar destekli yeni yöntemler [22-28]

Bilgisayar Destekli Fabrikasyon Teknikleri	
Isı kullanarak	Seçici lazer sinterleme (SLS)
	Birleşmiş depozisyon modelleme
Işık kullanarak	Stereolitografi
Yapıştırıcı kullanarak	3 boyutlu basma
Kalıp kullanarak	Kalıplama

2.3.3 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Gözenekli, biyouyumlu, sitotoksik etkisi bulunmayan doku iskeleleri elde edildikten sonra kemik rejenerasyonunu artırmak için çok sayıda ve izole edilebilir hücrelerin kullanılması gerekmektedir. İdeal hücre kaynağı yüksek pasajlara çıkabilmeli, kolay üreyebilmeli, immünojenik etkiye sahip olmamalı ve kemik dokusuna benzer protein ekspresyonları yapabilmelidir. Bu amaçla en çok kişinin kendi kemik dokusundan alınan otolog osteoblast hücreleri kullanılmaktadır. Fakat bu uygulamanın zaman alma, üreme hızlarının düşük olması ve kişinin kemikle ilişkili hastalıklarının istenen özellikte hücre özelliklerini gösterememesi gibi kısıtları bulunmaktadır. Bunun yanında kemik iliği stromal hücreleri, periostal hücreler, mezenkimal kök hücreler, hücre hatları ya da zenojenik hücre kaynakları kullanılmaktadır [1,29-33].

Kök hücre kullanımı da giderek artmakta ve kök hücrelerin yüksek çoğalma kapasiteleri, kendilerini yenileyebilmeleri, farklı dokulara farklılaşabilme gibi özellikleri ile tercih edilmektedir. İnsan kaynaklı embriyonik kök hücreler etik kaygılar ve teratom oluşturma kapasiteleri nedeniyle kullanılmazken, yetişkin kök hücre çeşitlerinden mezenkimal kök hücreler, adipoz dokudan türetilmiş kök

hücreler, hematopoetik kök hücreler doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hematopoetik hücreler yüzeye bağımlı olmadıklarından ötürü kemik rejenerasyonu uygulamalarında kullanılmaları da, pluripotent olan mezenkimal kök hücreler sıklıkla kullanılmaktadırlar. Teratom oluşturmeyen, immün süpresif, dokuya özgü farklılaşabilen, yüzeye bağımlı üreyen ve etik sorunlar çıkarmayan mezenkimal kök hücreler embriyonik süreçte köken aldıkları dokuya daha kolay dönüşmektedirler [34-42].

2.3.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri sitokinlerin alt grubu olup birçok hücre tarafından salgılanıp, sinyal molekülü olarak işlev görmektedirler. Büyüme faktörünün reseptörüne bağlanması ile hücre içi sinyal yolları aktive olup, hücre yapışması, çoğalması ve göçü sağlanabilir ya da engellenebilir, çeşitli proteinlerin ve büyüme faktörlerinin sentezi artabilir ya da azalabilir. Bu yüzden, büyüme faktörleri doku mühendisliği uygulamalarında oldukça önem arz etmektedirler. Kemik iliği kemik morfojenik proteinler (BMP), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin büyüme faktörü I ve II (IGF I/II) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörlerini salgılamaktadır [43]. BMP'ler TGF- β süper ailesinin alt grubu olup, protein yapıları ve sekansları birbirlerini oldukça benzemektedir ve ikisi de kırık iyileşmesinin erken döneminde salgılanmaktadır. Kemik doku mühendisliğinde osteoindüktif özelliklerinin fazla oluşundan dolayı en çok BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 kullanılmaktadır. BMP'lerin esas göre iyileşme bölgesine kök hücrelerin gelmesini sağlayıp osteokalsin, alkalın fosfataz (ALP) gibi osteojenik markırların ekspresyonunu artırmaktır [44-47].

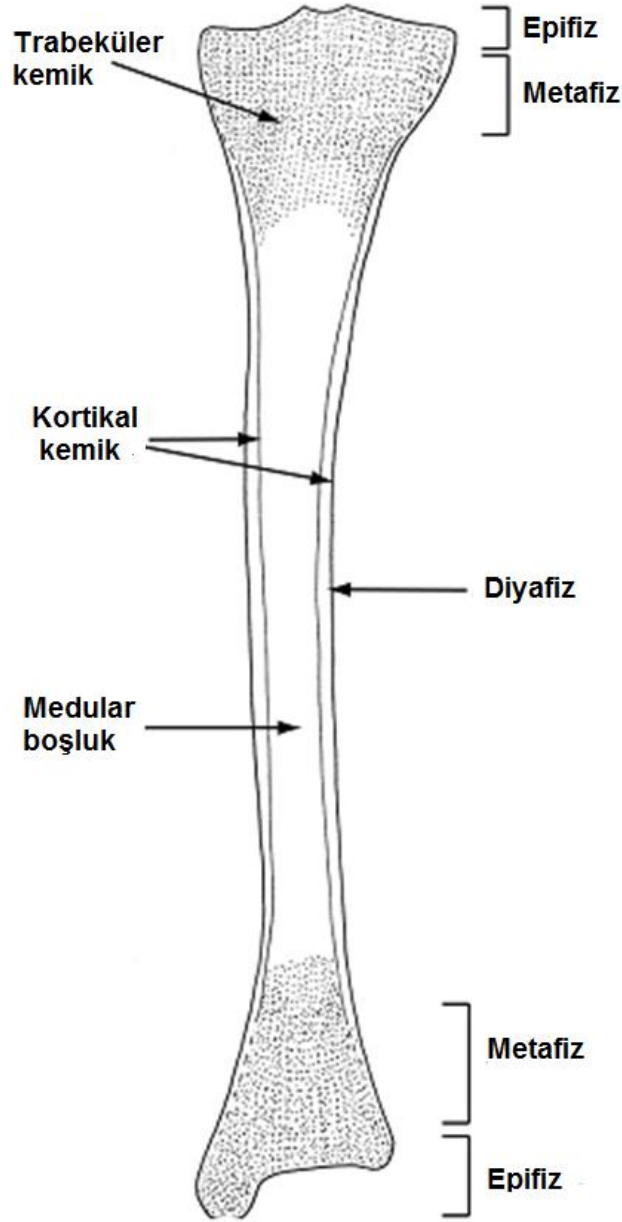
TGF- β büyüme faktörlerinin *in vitro* ortamda hücre çoğalmasını uyarma, hücrelerin hipertropi ve farklılaşmasını artırma gibi görevleri bulunmaktadır. Bunun yanında hücresel göçün başlamasını sağlayabilir ya da durdurabilmektedirler. TGF- β ailesi genel olarak *in vitro* ortamda osteoblast benzeri hücrelerin çoğalmasını ve kolajen üretimini artırma özellikleriyle bilinirler. *In vivo* çalışmalarda ise TGF- β 'ların kırık iyileşme bölgesinde kallus oluşumunu artırdığı görülmüştür [48,49].

IGF I ve IGF II büyüme faktörleri iskelet hücreleri tarafından eksprese edilmekte kemik metabolizması üzerinde benzer etkileri bulunmaktadır. İyileşme bölgesinde IGF I'in etkisi ise IGF II'e göre matris artış hızını artırma, kolajen Tip-I sentezini uyarma gibi yönlerden daha fazla olmaktadır. Bunların yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve FGF'ler de yaygın olarak kullanılmaktadır. VEGF yüksek damarlanma gösteren dokular tarafından eksprese edilmekte ve iyileşme bölgesine endotelial hücrelerin göç etmesini sağlayarak bölgede damarlanmanın artışı sağlanmaktadır. FGF grubundan özellikle FGF-2, kemiğin yeniden şekillenmesinde büyük önem arz etmektedir. Kemiği oluşturan ve yıkımını sağlayan hücreler arasında dengenin kurulmasını düzenlemektedirler. PDGF büyüme faktörleri de osteoblast, platelet, makrofajlar tarafından üretilmekte ve yara iyileşme bölgesine mezankimal kök hücrelerin göç etmesinde rol oynamaktadırlar [44,49-51].

Kemik rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda hangi büyüme faktörü kullanılırsa kullanılsın dozu ayarlamak oldukça önemlidir [43].

2.4 Kemiğin Yapısı ve Özellikleri

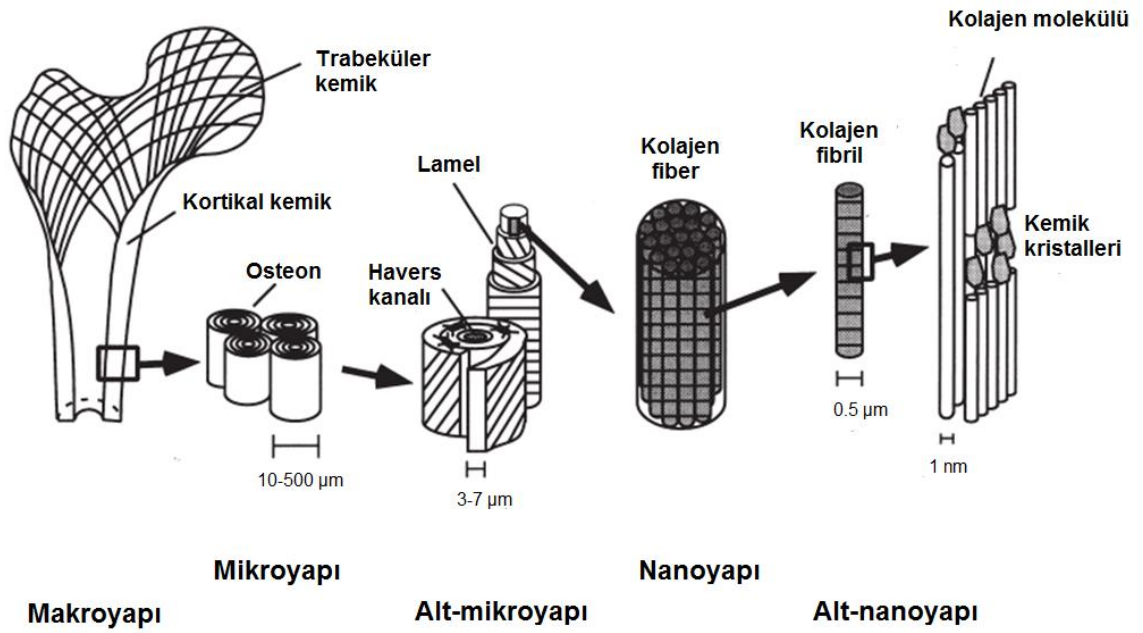
İskeleti oluşturan kemik doku vücutta iki farklı formda bulunmaktadır. Bunlar toplam iskeletin yaklaşık %20'sini oluşturan trabeküler kemik (kanselöz ya da süngerimsi kemik olarak da adlandırılır) ve %80'ini oluşturan kortikal ya da kompakt kemiklerdir. Trabeküler ve kortikal kemik iskeletin farklı yerlerinde değişik oranlarda bulunmaktadır. Kortikal kemik %10 gözenekliliğe sahip ve oldukça sağlam olup; uzun kemik (femur ve tibia), kısa kemik (bilek ve parmaklar) ve düz kemik (şekilsiz kemikler) olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. Trabeküler kemik ise %50-90 gözenekliliğe sahip olup, Young modülü ve basma dayanımı kortikal kemiğe oranla 20 kat daha azdır. Trabeküler kemik sünger şeklinde bir yapıya sahip olup, bal peteği görünümünü andıran trabeküllerden oluşmaktadır. Genellikle omurga kemiklerinde ve uzun kemiklerin metafiz kısımlarında kortikal kemikle kaplanmış halde bulunmaktadır (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3.Uzun kemiğin oluşturan elemanların şematik olarak gösterimi [58]

Kemikler yapısal olarak ise ikiye ayrılmaktadırlar. Kemik büyümesi, patolojik durumlar, kırık iyileşmesi gibi durumlarda kemik düzenli bir şekilde oluşmaz. Kolajen düzensiz bir şekilde çapraz bağlanır ve bunun sonucunda dokunmuş kemik olarak nitelendirilen kemik oluşmaktadır. Dokunmuş kemiğin dokudaki değişikliklere çabuk yanıt verebilme, yara iyileşmesi ve kallus oluşumunda rol alma gibi özellikleri bulunmaktadır. Kemiğe asıl dayanımı veren yapı ise çocukluktan erişkin döneme kadar şekillenen, oldukça düzgün sıralı kolajen lifleri ve

minarelden oluşan lamellar kemiktir. Lamellar kemik yaşam döngüsünde dokunmuş kemiğe dönüşmektedir. Lameller kortikal kemiğin periostunun alt kısmında paralel tabakalar şeklinde bulunmaktadır. Osteonlar lamellerden oluşurken orta kısımlarından kan damarlarını barındıran Havers kanalı geçmektedir. Havers kamallarını dik bir şekilde kesecek şekilde ise kılcal damarları içeren Volkmann kanalları bulunmaktadır (Şekil 2.4.) [1, 52-57].



Şekil 2.4. Kemiğin hiyerarşik olarak yapısal sınıflandırması [59]

2.4.1 Kemik Hücreleri

Kemiklerin oluşum, yıkım süreçlerini sağlayan kemik hücreleri ise osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve lining (yüzey) hücreleridir. Özet olarak osteoblastlar kübik şekilli, kemik yüzeyinde tabaka şeklinde bulunan polarize hücrelerdir. Mekanik uyarımı sağlarlar ve kemik sentezi ve düzenlenmesinde ekstraselüler matriks içeriğinin düzenlenmesi ve mineralizasyonda görev almaktadırlar. Osteositler yıldız şeklinde morfolojiye sahip olup, osteoblastlara göre daha az organel barındırırlar ve organik mineralsiz kemik matriksin (osteoid) kalsifikasyonunu, kan-kalsiyum dengesini sağlarlar. Osteoklastlar çok çekirdekli

polarize hücrelerdir ve osteoklastların görevi kemik yıkımını sağlamaktır. Kemik hücreleri ve özellikleri Çizelge 2.5.'de verilmiştir [1, 53, 55, 56, 58].

Çizelge 2.5. Kemik formasyonu ve şekillenmesinde yer alan hücreler ve genel özellikleri [58]

Kemik hücreleri	Fonksiyonları
Osteoblastlar	Yeni kemik dokusu oluşturma Osteoid matriksi üretme Matriks mineralizasyonunu düzenleme Mezenkimal hücrelerden köken alma Kemik rejenerasyonunda osteoklastlarla görev alma
Osteoklastlar	Kemik yıkımını sağlama Yıkım için özel enzimlere ve apikal membrana sahip olma Hematopoetik hücrelerden köken alma Kemik rejenerasyonunda osteoblastlarla görev alma
Lining (yüzey) hücreleri	Osteoblast ailesinin bir üyesi Kemik matriksi salgılamaz Kemik yüzeyini kaplamak Kemik yıkımına membranı kaldırarak yardım etme
Osteositler	Olgun osteoblast hücrelerinden dönüşme Lakünlerde bulunma Hücreler arası iletişimi sağlama Kemiğin yeniden şekillenmesinde yardımcı olma

2.4.2 Kemik matriksi

Kemiğin işlevlerini yerine getirebilmesi kemik matriksinin yapısına bağlıdır. Kemiğin %10'u hücre ve kan damarlarından oluşurken, %90'lık kısmı ise ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Kemik matriksi mineral ve organik kısım olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Matriksin de %65-70'i inorganik kısım, %25-30'luk kısmı organik kısımdan meydana gelmektedir [1].

Organik kısım kolajen, glikoprotein, proteoglikan, sialoprotein ve gla proteinlerinden oluşmaktadır. Kolajen osteoblast hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Kemik dokuda en çok kolajen Tip-I ve kolajen Tip-III bulunurken, daha az miktarlarda kolajen tip V, kolajen tip VI, kolajen tip X ve tip XII de bulunmaktadır. Kolajen molekülleri ekstraselüler matrikste kolajen fibrillerine dönüşür ve burada bir dizi çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleşerek üçlü yapısını almaktadır. Düzgün bir şekilde sıralanan fibriller çapraz bağlandığında oldukça kararlı bir yapıya sahip olup, mekanik dayanımı sağlamaktadırlar [53].

Biglikan ve dekorin proteoglikanlardan olup, kolajen fiberlerinin çapını ve büyümelerini etkilemektedir. Ayrıca matriks mineralizasyonunda da görev almaktadır. Osteonektin glikoprotein çeşididir ve kalsiyum ile kolajenin bağlanmasını, hidroksiapatitin oluşumunu sağlamaktadır. Trombospondin de yine glikoprotein çeşidi olup, kalsiyum, hidroksiapatit, osteonektin ve diğer hücre yüzey proteinlerinin bağlanmasını, RGD (Arg-Gly-Asp üçlü peptid) sekansından bağımsız hücre yapışmasını sağlamaktadır. Fibronektin ise osteoblastların substrata bağlanmasında etkili olmaktadır. Osteopontin ve kemik sialoproteini, sialoprotein ailesinden türemiştir ve kemik sementinin bir parçasıdır. Osteokalsin gla proteinlerinden olup, kemik rejenerasyonunda görev almakta ve mineralizasyon sürecinde kontrol elemanlarından biri olmaktadır [1].

Kemiğin inorganik kısmının iyonların, minerallerin depo görevini görmek, çekme-basma dayanımı oluşturmak gibi oldukça önemli görevleri bulunmaktadır. Kemikte bulunan mineral maddelerin %99'unu kalsiyum, %85'ini fosfat ve %40-60'ını sodyum ve magnezyum tuzları oluşturmaktadır. Sinirlerde uyarıların iletimi ve

kasların kasılması gibi fizyolojik olaylarda kemiklerde bulunan iyonların oldukça önemi olup, gerektiğinde kullanılmaktadırlar. Kalsiyum-fosfat tuzları şeklinde bulunan hidroksi apatit doku mühendisliğinde vücut tarafından rezorbe edilmediğinden bunu taklit etmek amacıyla trikalsiyum fosfat tuzları sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik dokusundaki kalsiyum/fosfat oranına en yakın malzeme ise beta trikalsiyum fosfat olmaktadır [57, 59].

2.4.2.1 Kolajen ve Yapısı

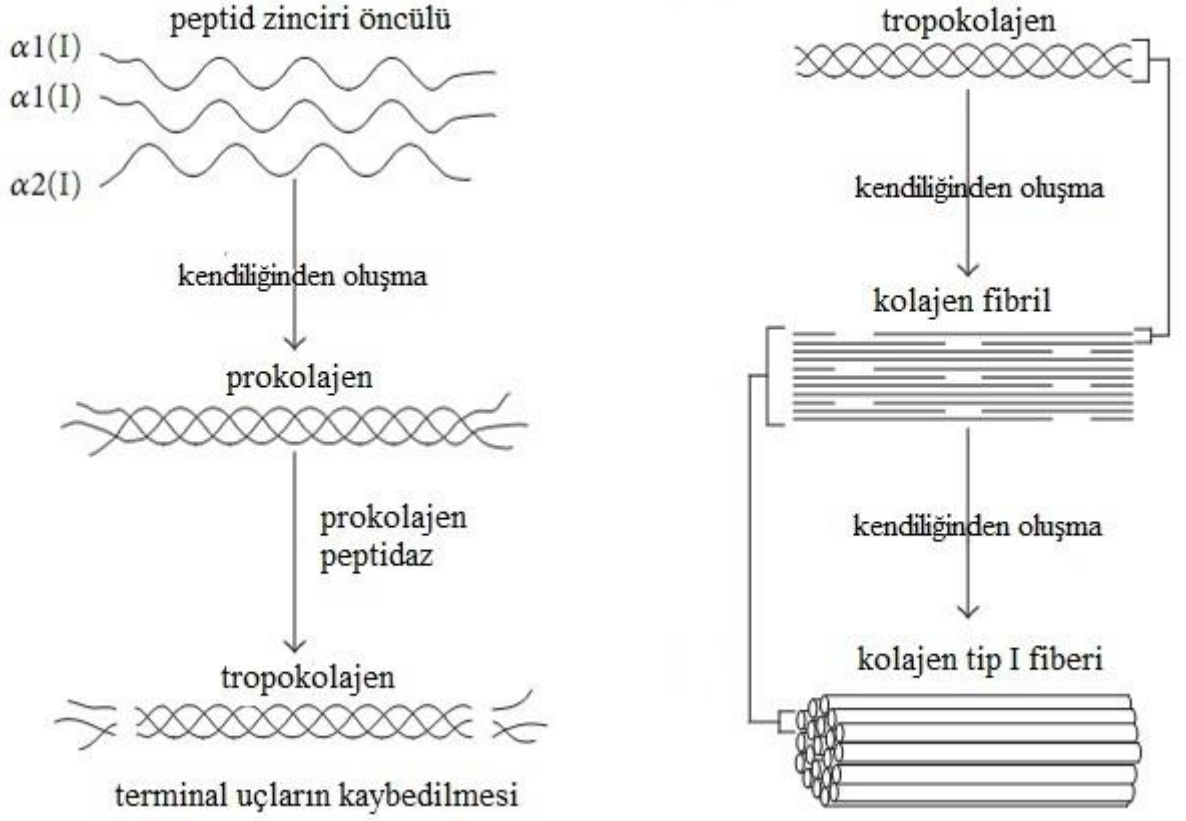
Kolajen hayvanlar aleminde en çok bulunan protein olup, 28 den fazla çeşidi bulunmakta omurgalıların vücut proteinlerinin %25'ini oluşturmaktadır. Özellikle memelilerin kemik, kıkırdak, tendon, ligament gibi bağ doku elemanlarında bulunmaktadırlar. Kolajen Tip-I ise kolajen tipleri arasında en yaygın olanıdır.

Kolajen üçlü sarmal yapısında glisin-X-Y sekansı içermektedir. Bu noktada X genellikle prolin, Y ise hidroksiprolin aminoasiti olmaktadır. Glisin en küçük aminoasit olup he üç aminoasit dizisinde bir tekrar etmekte ve kolajenin üçlü zincirlerinin katlanmasında görev almaktadır. Sadece glisin aminoasitinde meydana gelen bir mutasyon bile kolajenin kararlı yapısının oluşmasını engelleyecek ve ciddi genetik hastalıklara sebebiyet verebilecektir. Hidroksiprolin aminoasiti kolajenin katlanmasında, termal kararlılığının sağlanmasında yardımcı olmaktadır [60]. Oluşturulacak kolajenin tipine göre prolin ve hidroksi prolin aminoasitleri translasyon sonrası enzimatik hidroksilasyonla modifiye edilmektedirler. 4-hidroksiprolin içeriği üçlü sarmal yapının kararlılığını sağlayacak hidrojen bağlarının oluşumunda önemli bir kriterdir. Bazı hidroksilizinler ise glikozilasyon ile modifiye edilmektedir. Üçlü yapının uzunluğu kolajen tipine göre değişirken, fibril oluşturan kolajen tiplerinde (I, II, III) gly-X-Y tekrarları 300 nm uzunluğunda olmaktadır.

Yapılarına ve moleküler organizasyonlarına bakıldığında kolajen; fibril oluşturan kolajen, fibrille ilişkili kolajen, ağ oluşturan kolajen, transmembran kolajenleri ve membran kolajenleri olarak gruplandırılmaktadır. Kolajen Tip-I ve V fibrilleri kemiğin yapısına katılırken, Tip-II ve XI artiküler kıkırdak matriksinde

bulunmaktadır ve kemik, kıkırdak gibi dokulara mukavemetini veren bu proteinlerdir. Kolajen Tip-IV daha esnek yapıya sahip olup hücre membranının tabanını oluşturmaktadır. Mikro fibriller tip VI ise disülfid bağlarıyla oldukça çapraz bağlanmıştır ve diğer kolajen fibrilleriyle bağlanarak örülü yapıların kazanılmasını sağlamaktadır. Kolajen Tip-IX, XII ve XIV fibrille ilişkili kolajenler grubundandır ve tek bir büyük kolajen fibrilinden oluşmaktadır. Kolajen tip VIII ve X hegzagonal ağların oluşturulmasını sağlamaktadır [61-64].

Kolajen Tip-I çubuk şeklinde bir molekül olup, yaklaşık 300 nm uzunluğunda ve 1,5 nm çapındadır. Tip-I, her biri neredeyse 1000 aminoasit içeren, iki adet $\alpha 1$ ve bir adet $\alpha 2$ zincirinden oluşmaktadır. Molekül N-telopeptid domeyni ile başlayıp, üçlü heliks domeyni ile devam etmekte ve C-telopeptid domeyni ile sonlanmaktadır. N-telopeptid ucu sarmal yapısının kazanılmasında; C- ucu ise saç tokası/kanca şeklinin alınmasında önem arz etmektedir. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirleri kendiğinden düzenlenerek prokolajenleri oluşturmakta ve prokolajenler ise prokolajen peptidaz enzimi ile tropokolajenlere dönüşmektedir. Üçlü sarmal yapıyı kazanan tropokolajenlerin terminal uçları kesilmekte ve tropokolajenler kendi düzenlerinde sıralanarak kolajen fibrillerini ve fibriller de demet halini alarak kolajen fibrillerini oluşturmaktadırlar (Şekil 2.5.) [62].



Şekil 2.5. Kolajen fiberlerinin oluşum mekanizması [62]

2.4.2.2 Kolajenin Çapraz Bağlanması

Kolajen Tip-I başta olmak üzere çoğu kolajen yüksek biyoyumluluk göstermeleri, biyobozunur olmaları, proteolize dayanıklı olmaları, düşük antijeniteye sahip olmaları ve immün yanıt oluşturmamaları, değişik formlarda oluşturulabilmeleri, hücrelerin bağlanıp, büyümesini destekleyerek doku iyileşme ve rejenerasyon sürecine katkı yaptıklarından dolayı doku mühendisliği yaklaşımlarında sıkça kullanılmaktadır. Fakat kolajenin fiziksel özelliklerinin hedeflenen doku ile eşleşmesi gerekmektedir. Kolajenin vücut içerisinde doğal olarak çapraz bağlanması molekül içi ve moleküller arası bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bu sayede kolajen gerekli mekanik özellikleri ve proteolitik reaksiyonlara dayanımı sağlayabilecektir. Laboratuvar koşullarında kolajen molekülleri lizil oksidaz merkezli doğal çapraz bağlanma mekanizması ile bağlanamadığından, *in vivo* ortamda gerekli mekanik dayanım sağlanamamakta, basınç altında dağılım göstermektedir.

Bu problemleri aşmak amacıyla kolajen molekülleri kimyasal, fiziksel ya da biyolojik olarak çapraz bağlanmaktadır [65]. Çizelge 2.6.'da kolajenin çapraz bağlanması için kullanılan yöntemler özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. İn vitro ortamda kolajenin çapraz bağlanma yöntemleri [65-69]

Fiziksel	Kimyasal	Biyolojik
Ultra viyole (UV) radyasyon	Aldehitler (gluteraldehit, formaldehit)	Transglutaminaz enzimi
Boya kullanılarak foto-oksidasyon	İzosiyanatlar (hekzametilen diizosiyanat)	Genipin
Dehidrotermal (DHT) çapraz bağlanma	Karbodiimid (NHS, EDC, EDAC)	Aljinat dialdehit
Gama radyasyonu	Açıl azid (DPPA, DMF)	
	Epoksid (etilen glikol diglisid eter, diepoksi propil eter)	
	Karbohidrat (riboz)	
	Kuinon (NDGA)	

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin birbirlerini göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Kimyasal yöntemlerde daha kısa zamanlarda daha verimli sonuçlar alınsa da bu yöntemler ve bunların kombinasyonlarının uzun yıkama sürelerine ihtiyaçları vardır ve yıkama işlemleri sonunda ortamda bıraktıkları rezidüer oldukça fazladır, bu yüzden hücre kültür çalışmalarında sitotoksik etki oluşturmaktadırlar. Biyolojik kaynaklardan elde edilen çapraz bağlayıcı ajanlar ise daha düşük sitotoksite göstermeleri ve kimyasal yöntemlere göre biyoyumluluk sorunu yaratmadıklarından ötürü tercih edilmektedir. Fakat verimsiz oluşları,

malzemede renk değişimine sebebiyet vermeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Gama ya da ultraviyole radyasyonu doğal protein yapısını bozduğundan dolayı araştırmacılar termal olarak çapraz bağlanmayı sağlayan dehidrotermal yöntem üzerinde durmaktadırlar [66, 68, 69].

2.4.2.3 Kalsiyum Fosfatlar

Kemiğın inorganik kısmını oluşturan bileşenler; kalsiyum fosfatlar (%85-90), kalsiyum karbonat (%8-10), magnezyum fosfat (%1,5) ve kalsiyum floridlerdir. Kemik dokudaki bu mineraller apatit kristalleri şeklinde bulunmaktadır ve hekzagonal bir yapı oluşturmaktadırlar. Hidroksiapatit ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) ise kalsiyum fosfat tuzlarının hidroksillenmiş halidir ve kolajen molekülleriyle bağlanarak kemiğe sertlik ve dayanım vermektedir. Aynı zamanda Ca/P oranı (1,67) kemik dokusuna oldukça yakındır. Hidroksiapatit çok uzun sürelerde bozunabilmekte ve oldukça asidik ortamlarda çözünebilir hale gelmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında yeni kemik oluşum sürecinde halen bozunmadığı ve kemik hücrelerine yer açmadığı için son zamanlarda hidroksiapatitin tek başına kullanımını tercih edilmemektedir.

Kemiğın doğal yapısındaki $CaO:P_2O_5$ oranına (3:1) en yakın ve biyouyumlu malzemeler ise trikalsiyum fosfat seramikleridir. Genel olarak trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatitler biyouyumlu ve osteokondüktif olup, immünojenik ya da yan etki göstermemektedirler. Trikalsiyum fosfatların kimyasal bileşiminde ve kristalin yapısında yapılan en ufak bir değişim *in vivo* ortamda malzemenin fiziksel özelliklerinin değişimine sebep olmaktadır. Kemik oluşumunun sağlanmasında seramiklerin gözenekliliğinin (%35-50), gözenek çapının (100-300 μm) ve gözenek yapılarının oldukça önemi bulunmaktadır. Gözenekliliğın yüksek oluşu, seramiğın düşük yoğunlukta oluşu, kemik büyümesi ve damarlanma için yüzey alanını artıracığından istenen bir özelliktir. Fakat bu noktada mekanik dayanımın azalmamasına ve degradasyon hızının fazla olmamasına dikkat edilmelidir.

Trikalsiyum fosfatlar α ve β olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. α -trikalsiyum fosfat bir yılı bulan sürelerde vücut tarafından abzorbe edilmekte ve bazı durumlarda vücut

içerisinde hidroksiapatite dönüşebilmektedir. β -trikalsiyum fosfat ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) ise birkaç ay içerisinde absorbe edilmekte ve diğer malzemelere göre yüksek biyouyumluluk göstermektedir. Doku mühendisliğinin en büyük problemi olan damarlanma β -trikalsiyum fosfatın mikrogözenekli yapısı sayesinde bölgeye implante edilip kan akışını hemen sağlayabilmesiyle iyileştirilmektedir. Bahsedilen özellikler bakımından β -trikalsiyum fosfatlar kemik rejenerasyonu için ideal matriks olmaktadır. Ticari olarak satılan bir çok kemik dolgu materyali medikal cihazda kalsiyum fosfat ve türevleri kullanılmaktadır ve Çizelge 2.7.'de bu ürünler içerikleriyle birlikte verilmiştir [70-74].

Çizelge 2.7. Kalsiyum fosfat içeren ticari ürünler (accessgudid.nlm.nih.gov)

Ürün	Firma	İçerik
MasterGraft®	Medtronic	%15 HA ve %85 β -TCP
Norian SRS®	Synthes	Kalsiyum fosfat
chronOS®	Synthes	β -TCP
PRO-DENSE®	Wright Medical Technology	Kalsiyum sülfat / kalsiyum fosfat
CopiOs®	Zimmer	Kalsiyum fosfat ve kolajen Tip-I
Vitoss®	Orthovita	β -TCP
Integra Mozaik™	Integra Orthobiologics	80% β -TCP ve 20% kolajen Tip-I
OpteMx™	Exactech	HA ve TCP
HEALOS®	DePuy Spine	TCP ve kolajen
CONDUIT®	DePuy Spine	β -TCP
ProOsteon®	Biomet Osteobiologics	HA ve kalsiyum karbonat
SupraBone®	BMT Calsis	β -TCP

2.5 Kemik Rejenerasyonu

Kemik dokusu kendini yenileyen bir dokudur. Her yıl toplam kemik ağırlığının %5-15'i yeniden oluşturulmaktadır. Kemiğin kendini yeniden şekillendirmesi ise yapıda değişim olmadan mineralize kemiğin değişimini ifade etmektedir. Kemiğin kendini yenilenmesi sürecinde öncelikle osteoklastlar tarafından kemik yıkımı başlar ve daha sonra monosit ve makrofajlar tarafından yıkım yapılan yüzey osteoblastların tutunması için hazırlanmaktadır. İyileşme bölgesine gelen osteoblast ve osteositler burada çoğalıp, yeni kemik dokusunu üretmektedirler. Yeni kemik oluşum tamamlandığında ise bir sonraki sürece kadar yüzey lining hücreleri ile kaplanmaktadır. Son olarak ise osteoid matriksin mineralizasyonu tamamlanıp kemik dokusu son haline gelmektedir. Bu süreç paratiroid hormon, östrojen, testosteron gibi hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir (Çizelge 2.8.).

Çizelge 2.8. Kemik rejenerasyonunda görev alan elemanlar

Hücreler	Büyüme faktörleri	Sitokinler	Hormonlar
Osteoklastlar	BMP	İnterlökin-1	Kalsitonin
Osteoblastlar	TGF	İnterlökin-6	Tiroid hormon
Osteositler	PDGF	İnterlökin-11	Östrojen
Makrofajlar	IGF	İnterlökin-18	Testesteron
Monositler	FGF	TNF- α	Paratiroid hormon
MSC			Osteokalsin
Koloni oluşturan fibroblastlar			

Kemiğin yenilenmesi oldukça önemli bir konu olup, travmalar, tümör insizyonları sonrası doku kaybı, spinal füzyon, artroplasti, metabolik rahatsızlıklar, iyileşmeyen kırıklar gibi durumlarda bu sürecin daha hızlı gerçekleşmesi gerekmektedir. Doku mühendisliği teknikleri sayesinde daha hızlı ve istenen sonuçlar alınabilmektedir. Kullanılan doku iskeleleri osteojenez ile kemik hücrelerinin bölgeye migrasyonunu sağlamalı, osteoindüksiyon ile hücreleri kemik oluşumu için uyarmalı, osteokondüksiyon ile kemik oluşumunu sağlayacak ortam oluşturmalı ve osteopromosyon ile kemik iyileşmesini ve rejenerasyonunu artırabilmelidir [75-79].

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar dört ana başlıkta toplanmıştır. İlk başlıkta kolajen ve β -TCP partiküllerinden doku iskeleleri oluşturulmuştur. Gözeneklerin açık ve birbirine bağlı olması amacıyla liyofilizasyon metoduyla poröz doku iskeleleri elde edilmiştir. Kolajen içeriğinin dağılımını önleyip, mukavemetini artırmak için çapraz bağlama prosedürü uygulanmıştır. Doku iskeleleri değişik sürelerde dehidrotermal yöntemle tabii tutularak çapraz bağlanmıştır. İkinci başlık ise oluşturulan doku iskelelerinin mekanik, kimyasal ve termal özelliklerinin karakterize edilmesini kapsamaktadır. Karakterizasyonu tamamlanan nihai doku iskelesinin üçüncü başlıkta hücre kültürü (*in vitro*) analizleri yapılmış, sitotoksikite gibi özellikleri incelenmiştir. Deneysel çalışmaların son aşamasında ise biyouyumluluğu test edilmiş, istenen mekanik özelliklerdeki kolajen/ β -TCP doku iskeleleri, Sprague Dawley cinsi sıçanların kranial ve femoral bölgerinde oluşturulan kritik çaptaki defektler için dolgu malzemesi olarak kullanılmış ve bu çalışmanın sonuçları μ -CT (mikro bilgisayarlı tomografi) çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

3.1 Kullanılan Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sığır kolajen Tip-I (*ticari sır*) firmasından sipariş edilmiştir. Kolajenin çözündürülmesi için kullanılan asetik asit ise (Sigma-Aldrich, ABD) firmasından satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan β -TCP (0,5-1 mm partikül büyüklüğü) SupraBone® isimli ticari bir ürün olup, BMT Calsis Sağlık Teknolojileri A.Ş.'den temin edilmiştir. *in vivo* hayvan çalışmalarında kullanılan büyüme faktörleri BMP-2 ve TGF- β 1 (Gibco, ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.2 Kolajen ve β -TCP İçeren Doku iskelelerinin Hazırlanması

Kolajen Tip-I belirli formülasyon dahilinde seyreltik asetik asit (0,1 N) içerisinde çözündürülmüştür. Çözünmeyi artırmak için, karıştırıcı kullanılarak karışım 5 dakika süreyle ve 500 rpm de oluşabilecek ısıdan dolayı kolajene zarar vermemek amacıyla buz dolu kabın içerisinde karıştırılmıştır. Kolajen tamamen çözündürüldükten sonra karışımın üzerine ağırlıkça oranı 80/20 olacak şekilde poröz β -TCP partikülleri eklenmiş ve karıştırıcı hızı yarıya indirilerek 3 dakika daha

karıştırılmıştır. Karışım son halini aldıktan sonra ise 5x25x100mm boyutlarındaki teflon kalıba dökülmüş ve kalıp etrafı tamamen kapatılmıştır. Kalıp daha sonrasında -80°C de 3 saat süreyle dondurucuda saklanmış ve örnekler liyofilizasyona uygun hale getirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi 24 saat süreyle 0.100 atm basıncında gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon işlemiyle gözenekliliği sağlanan örnekler daha sonrasında kolajenin çapraz bağlanması amacıyla vakumlu etüvde 110°C sıcaklıkta ve değişken sürelerde (1, 3, 5 gün) dehidrotermal prosese tabi tutulmuştur. Örneklerin bazıları karakterizasyon testleri için steril edilmezken, bir kısmı oda sıcaklığında 25 kGy dozunda gama radyasyonu (Gamapak A.Ş.) ile steril edilmiştir.

3.3 Doku iskelesi Karakterizasyonu

Hazırlanan doku iskelelerinin analizinde aşağıdaki teknikler kullanılmıştır.

3.3.1 Kimyasal Ve Termal Özelliklerin Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında elde edilen poröz doku iskelelerinin kristalin fazları toz haline getirilen numunenin üzerine gönderilen X ışınlarının kırınımı hesaplanarak ölçülmüştür. Bu amaçla steril ve steril olmayan numunelere X-ray Difraksiyonu (XRD, RIGAKU, RINT 2000) analizi yapılmıştır. Işın demetinin açısı (θ) değeri 0-80 arası olarak kullanılmıştır.

β -TCP/kolajen doku iskelesinin içeriğindeki bileşenleri, fonksiyonel grupları belirlemek ve β -TCP partikülleri ile kolajen fibrilleri arasındaki etkileşimi görmek amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, BRUKER TENSOR 27) analizi gerçekleştirilmiştir. Toz haline getirilen steril ve steril olmayan numuneler potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak preslenmiş ve cihaza yerleştirilmiştir. Analiz $4,0\text{cm}^{-1}$ rezolüsyonda kaydedilmiştir.

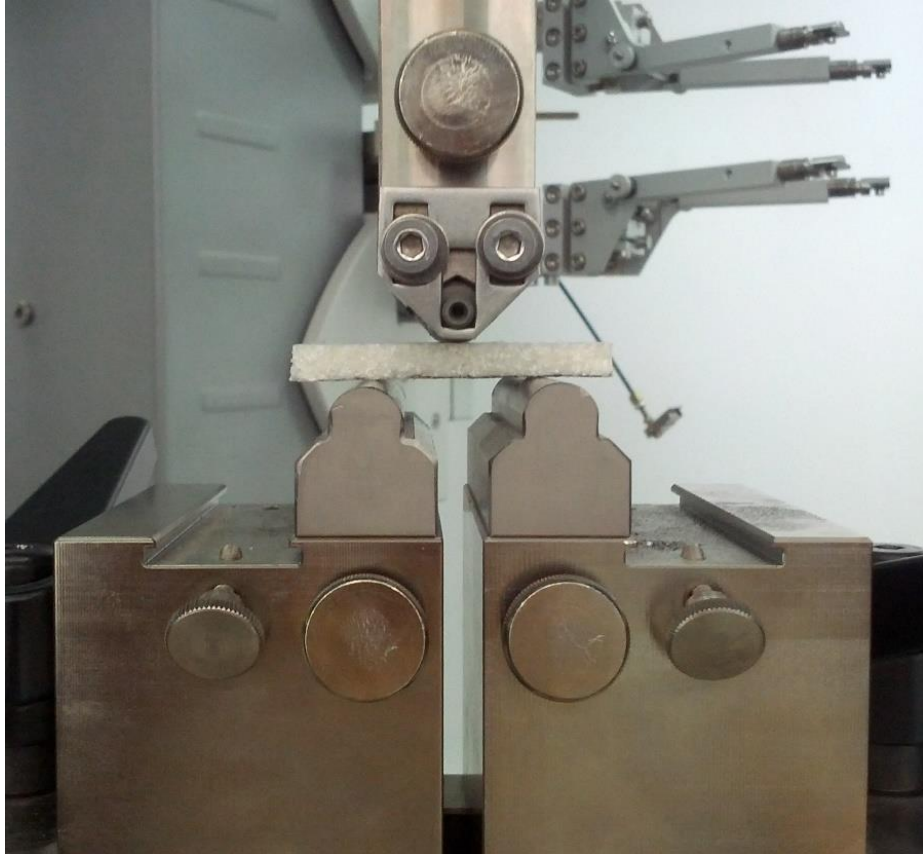
Çalışma kapsamında hazırlanan steril ve steril olmayan doku iskelelerinin termal davranışlarının belirlenmesi için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC, STA 449

F3 JUPITER) analizi yapılmıştır. Analiz hava ortamında ve ısıtma hızı 10°C/dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Mekanik Özelliklerin Karakterizasyonu

Tez çalışmasında hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin incelenmesi amacıyla steril ve steril olmayan numunelere 3-nokta eğme ve basma testleri (Zwick/Roell Z250) yapılmıştır. 3-nokta eğme testi için kullanılan numunelerin boyutları yaklaşık olarak 5x12,5x50mm dir. 0,2 N yük numuneye 10 mm yukarıdan 12,5x50mm lik yüzeyin tam ortasına gelecek şekilde uygulanmıştır. Analize ait görüntü Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Basma testi (Zwick/Roell Z010) için 5 mm yüksekliğinde 10x10mm boyutlarında kare olacak şekilde numuneler hazırlanmıştır. Numunelerin üzerine 0,25 N'luk kuvvet uygulanmış ve %50 sıkışma olana kadar analiz devam ettirilmiştir. Tüm mekanik analizlerde üçer tekrarlı çalışılmış olup, piston başlığının hızı 2mm/dakika olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.1. 3 nokta eğme testi yapım şekli

3.3.3 Doku iskelesi Morfolojisinin Karakterizasyonu

β -TCP/kolajen doku iskelelerinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM, SUPRA 50VP); üç boyutlu yapısı ise mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT, SkyScan 1172) ile aydınlatılmıştır. Hazırlanan steril ve steril olmayan numunelerin yüzeyi altın-paladyum alaşımı ile kaplandıktan sonra 20 kV enerji ile görüntü elde edilmiştir. 110x, 250x, 1000x ve 2500x büyütmelerde farklı noktalardan farklı büyütmelerde veri toplanmıştır.

Doku iskelelerinin üç boyutlu yapısını incelemek amacıyla yapılan μ -CT analizinde isotropik kesitler sistem tarafından iki boyutlu hale çevrilip, sonra yazılım tarafından kantitatif yapısal parametrelerin belirlenmesi amacıyla üç boyutlu hale dönüştürülmektedir. Gözeneklilik, gözenek büyüklüğü ve porların dağılımı gibi parametreler incelenmiştir.

3.3.4 Gama Radyasyonunun Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sterilizasyon metodu olarak uygulanan gama radyasyonunun, çalışma kapsamında hazırlanan poröz β -TCP/kolajen doku iskeleleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla steril numunelere elektro spin rezonans (ESR, Bruker ELEXSYS E580) analizi yapılmıştır. Analiz ise 9,85 GHz mikrodalga frekansı, 100 kHz manyetik alan frekansı şartları altında gerçekleştirilmiştir.

3.3.5 Şişme Davranışının İncelenmesi

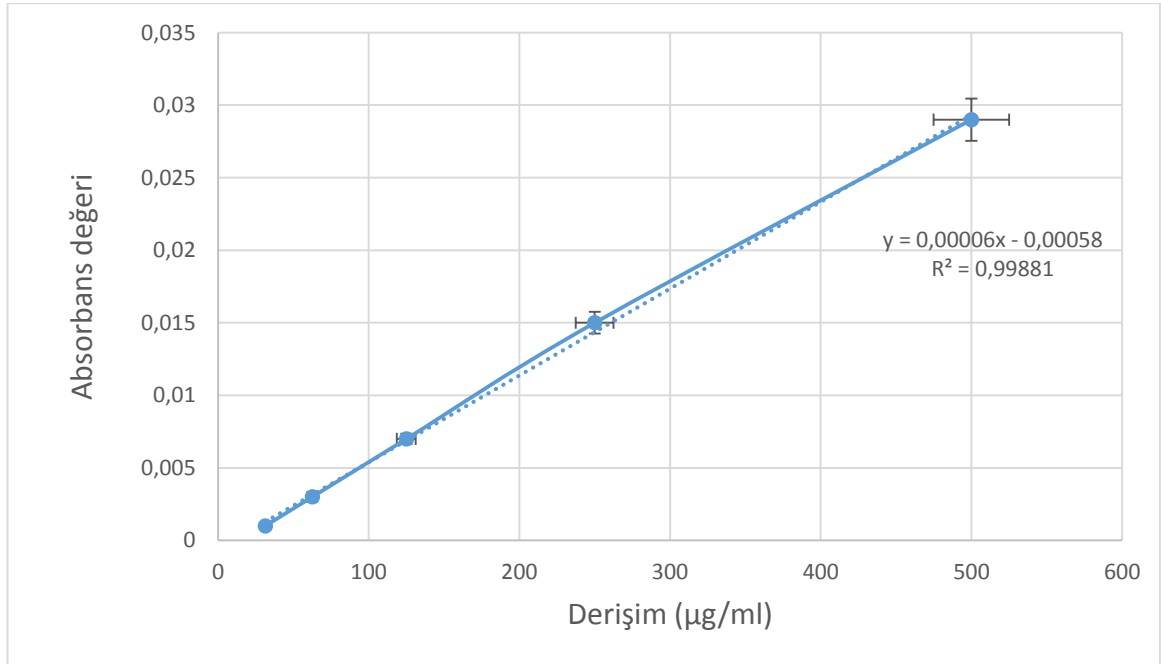
Hazırlanan poröz doku iskelelerinin su tutma kapasitelerinin ölçülmesi amacıyla şişme testi yapılmıştır. Hepsi aynı ölçüde (10mm x 12mm x 5mm) olacak şekilde kesilen numunelerin öncelikle kuru ağırlıkları (W_0) alınmış ve sonra 37°C'de 3 mL PBS solüsyonuna batırılmıştır. Belirli zaman aralıkları sonunda ise örnekler alınıp, filtre kağıdı yardımı ile fazla suları alınmış ve tekrar tartılmışlardır (W_s). Şişme ya da su tutma kapasitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{şişme kapasitesi} = \frac{(W_s - W_0)}{W_s} \times 100$$

3.3.6 Kontrollü BSA Salım Çalışması

In vivo çalışmada kullanılacak olan BMP-2 ve TGF- β 1 büyüme faktörlerinin salım kinetiğini incelemek amacıyla model protein olarak serum albümin (Sigma, ABD) seçilmiş ve doku iskelelerine taşıyıcı sistem olmadan yüklenmiştir. 4 mm yüksekliğinde ve 8 mm çapında kesilen doku iskelelerine 2mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan BSA solüsyonu emdirilmiş ve dondurulduktan sonra 2 gün boyunca liyofilizatörde kurutulmuştur. Daha sonra liyofilize edilen BSA yüklü doku iskeleleri şişelere alınarak üzerlerine %0,01 sodyum azid içeren PBS solüsyonu eklenmiştir. 37°C' de çok düşük karıştırma hızında 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 1 gün, 2 gün ve 4 gün zaman noktalarında her şişeden örnek alınmış ve yerine aynı miktarda PBS solüsyonu eklenmiştir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 500, 250, 125, 62.5 ve 31.25 μ g/ml BSA solüsyonları hazırlanarak NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında 280 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. BSA salım çalışmasında kullanılan kalibrasyon grafiği

3.3.7 *In vitro* Hücre Kültürü Testleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan poröz doku iskelelerinin canlı hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi ISO10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi-Bölüm 5: *in vitro* sitotoksikite testleri” standartına uygun olarak gerçekleştirilmiştir ve hücre hattı olarak MG63 osteosarkoma hücre hattı kullanılmıştır. Testlerde kullanılan besiyeri; %88 α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle), %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 L-glutamin, %1 antibiyotik ve antimikotik çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış ve kullanımlardan önce 37°C’deki su banyosunda ısıtılmış, geri kalan zamanlarda ise 4°C’de saklanmıştır.

Hücre ekiminden önce 36 tane doku iskelesi 6x6mm olacak şekilde bisturi ile kesilmiş ve 30 dakika boyunca hazırlanan besi yerinde bekletilmiştir. Daha sonra petri kabına aktarılan doku iskelelerinin üzerine $0,5 \times 10^6$ hücre içerecek şekilde 100 μ L besi yeri eklenmiş ve etüve kaldırılmıştır. İnkübasyon koşulları 37°C, %5 CO₂ ve >%90 nem oranı olarak sabit tutulmuştur. 2 saat sonra petri kabındaki doku iskeleleri 24 kuyucuklu steril plakalara transfer edilmiş ve üzerlerine 1 mL besi yeri eklenmiştir. 24 saat sonra ise kuyucuk hacminin yarısı olacak şekilde besi yeri 2 mL tamamlanmıştır. 2., 24., 48., 72. ve 192. saat aralıklarında doku iskelelerinin görüntüsü alınmıştır. MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analizi 45. ve 70. Saatlerde hücre canlılığını test etmek amacıyla üretici firmanın protokolüne göre hazırlanmıştır.

Doku iskelelerinin bütünlüğünü test etmek amacıyla 8 tane yine aynı ölçülerdeki doku iskelesi 24 kuyucuklu plakalara DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium), α -MEM, çalışma için hazırlanan MG63 besi yeri ve PBS ortamlarına konulmuş ve 5 saat boyunca her yarım saatte bir, 24. ve 48. Saatlerde olacak şekilde görüntülenmiştir. İlk 24 saatin sonunda ise doku iskelesi bütünlüğünü gözlemek amacıyla doku iskeleleri yeni kuyucuklara transfer edilmiştir. Aynı zamanda yine aynı ölçülerde kesilen doku iskeleleri 24 kuyucuklu plakalara üzerlerinde 1mL MG63 besi yeri olacak şekilde ekilmiştir ve 12., 24. ve 36. saatlerde görüntüleri alınmıştır.

3.4 *In vivo* Hayvan Çalışmaları

In vitro ortamda karakterizasyon testleri tamamlanan poröz β -TCP/kolajen doku iskelelerinin 120 adet dişi Sprague Dawley cinsi sıçanlarda hayvan çalışmaları yapılmıştır. Çalışma boyunca etik değerler çerçevesinde steril cerrahi teknikler kullanılmıştır (Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Etik Kurul İzin No 2013/51-08, tarih:03/09/2013). Etik Kurul izni EK-2'de verilmiştir.

Hayvan çalışması hem yük taşıyan bölgede non-union femur defekti; hem de yük taşımayan bölgede kranyum defekti oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Hayvan çalışmasına ait gruplar aşağıdaki Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hayvan çalışmasına ait gruplar ve hayvanların dağılımı

Kranium (60 sıçan)	Femur (60 sıçan)
Kontrol (10 sıçan)	Kontrol (12 sıçan)
Doku iskelesi (10 sıçan)	Doku iskelesi (12 sıçan)
Doku iskelesi+ BMP-2 (10 sıçan)	Doku iskelesi+ BMP-2 (12 sıçan)
Doku iskelesi + TGF- β 1 (10 sıçan)	Doku iskelesi+ TGF- β 1 (12 sıçan)
Doku iskelesi + BMP-2+ TGF- β 1 (10 sıçan)	Doku iskelesi+ BMP-2+ TGF- β 1 (12 sıçan)
Otogreft (10 sıçan)	-

Çalışma esnasında tüm malzemeler sterilizasyon solüsyonuyla temizlenmiş ve öncelikle deney ortamı hazırlanmıştır. Rastgele seçilen hayvanların ağırlıkları ölçülmüş ve deney bitene kadar da ağırlık kayıpları takip edilmiştir. Deney hayvanlarına, 2,5 mL ksilazin (%2) (Alfasan, Hollanda), 4,5 mL ketamin (%10) (Alfasan, Hollanda) ve 3 mL izotonik serum içerecek şekilde anestezi karışımı

hazırlanıp her bir hayvana 0,6 mL anestezi karışımı karın içinden uygulanmıştır. Gerekli durumlarda ise 0,2 mL ek doz uygulaması yapılmıştır. İmplantasyon bölgesi traş edilmiş ve Batikon solüsyonu ile bölge dezenfekte edilmiştir. Operasyon alanına iyot çözeltilsinin sürülmesinin ardından delikli kompres kapatılmış ve kranial bölgede 8mm çaplı kritik çapta defekt oluşturulmuştur. Kranial yüzeyden periosteum kaldırıldıktan sonra 8mm çaplı yuvarlak uçlu döner testere yardımıyla defekt kaldırılmış ve zaman kaybetmeden doku iskelesi yerleştirilmiştir. Kontrol grubunda kemik tamamen çıkartılırken; otolog grubunda kaldırılan kemik yerine yeniden konularak kapatılmıştır. Doku iskelesi grubunda defekt hacmini dolduracak şekilde kesilen doku iskeleleri bölgeye hemen nakledilmiş ve büyüme faktörü içeren gruplarda üzerlerine emdirme yöntemiyle gerekli büyüme faktörleri ilave edilip defekt kapatılmıştır. Tüm modellerde insizyon 4/0 ipek dikiş kullanılarak kapatılmıştır.

Femur modelinde ise hayvanların sol bacakları opere edilmiş ve femur plak ve vidalar yardımıyla sabitlendikten sonra distal ve proksimal uçlardan eşit mesafede olacak şekilde orta segmentde 3 mm genişliğinde defekt açılmıştır. İyileşmeyen kemik defekti oluşturmak için önceden kesilip steril edilen 3x4x4mm boyutundaki silikon bloklar bölgeye yerleştirilmiş hatta gereken durumlarda etrafı tel ile sarılıp sabitlenmiştir. Buradaki amaç iki kemik bölgesi arasında büyüme kan yoluyla taşınabilecek büyüme faktörü ve hücre migrasyonunu engelleyerek defektin iyileşmez duruma getirilmesidir. Defekt bölgesi kapatılıp bir ayın sonunda tekrar açılmış ve silikon blok yerinden alınarak doku iskelesi yerleştirilmiştir. Sıçanlarda doku rejenerasyonu hızlı olduğundan dolayı eğer kemik uçları arasında rejenerasyon oluşmuşsa bunlar tekrardan kesici drilr yardımıyla temizlenmiştir. Kontrol grubunda defekt bölgesine bir şey konulmazken; doku iskelesi gruplarında bölgeye uygun şekilde kesilen ve steril edilen doku iskeleleri yerleştirilmiş ve büyüme faktörü belirli noktalardan doku iskelesine operasyon esnasında emdirilmiştir. İnsizyonun kapatılması için 4/0 ipek dikiş kullanılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Hayvan denemelerinden elde edilen görüntüler. (A) Kullanılan malzemeler (B) Femur çalışmasında iyileşmeyen kemik defektinin oluşma aşaması, (C) Femur çalışmasında implantasyon, (D), Kranyum çalışmasında defekt oluşturulması

Cerrahi işlem sonrasında sıçanlar uygun şekilde kafeslerine yerleştirilmiş ve operasyon öncesinde olduğu gibi tüm deney boyunca 12 saat karanlık 12 saat aydınlık çevrim altında, sabit sıcaklık altında tutulan odalarda bulunan kafesleri içerisinde *ad libitum* beslenmişlerdir. Deney hayvanları kranyum çalışmasında 4 ay; femur modelinde ise 6 ay sonra sakrifiye edilmişlerdir. Belirlenen zaman noktalarının bitiminde hayvanlar CO₂ inhalasyonu yöntemiyle ex edilmişlerdir. Operasyon geçirdikten sonra kranyum modelinde ölüm olmazken; femur grubunda bağımsız bir nedenden ötürü ölen hayvanların femur kemikleri izole edilip, saklanmış ve incelenmiştir.

3.5 İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında, sonuçlar ortama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Hayvan çalışmalarına ilişkin μ -CT sonuçları istatistiksel analiz yapılarak yorumlanmıştır. Bağımsız değişken olarak gruplar alınırken; bağımlı değişken olarak yeni kemik oluşum oranları alınmıştır. Normalliğin yakalandığından emin olunduktan sonra, sonuçlar parametrik varyans analizi testlerinden olan tek yönlü ANOVA ve Brown Forsythe testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi için post hoc LSD testi ve deney gruplarının kontrol grubuyla olan ilişkisini belirleyebilmek için de Dunnet analizi yapılmıştır. Buna göre 0,05'in altında çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve gruplar arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler SPSS 17 programı ile yapılmıştır. İstatistiksel veriler EK-1'de verilmiştir.

4 SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR

Bu bölümde, Deneysel Çalışmalar kısmında yapılan çalışmaların sonuçları bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında kolajen/ β -TCP sentetik kemik greftlerinin kemik rejenerasyonuna etkisi belirlenmek istenmiştir. Bu hedef doğrultusunda ilk aşamada sentetik kemik greftlerinin hazırlanmış ve gerekli olan karakterizasyon testleri yapılmıştır. İkinci aşamada kimyasal, fiziksel olarak test edilen numuneler *in vitro* hücre kültürü testlerine tabi tutulmuş ve sonuçlar verilmiştir. Son kısımda ise kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin *in vivo* hayvan denemelerine geçilmiş ve bu çalışmaya ilişkin mikro-tomografi ve mammografi sonuçları verilmiştir. Hayvan çalışmasına ait femur ve kranyum spesimenleri histolojik olarak da inceleniyor olup, doku takibine alınmıştır fakat sonuçları yetişemediğinden tez kapsamında verilememiştir.

4.1 Doku iskelesi Karakterizasyonu

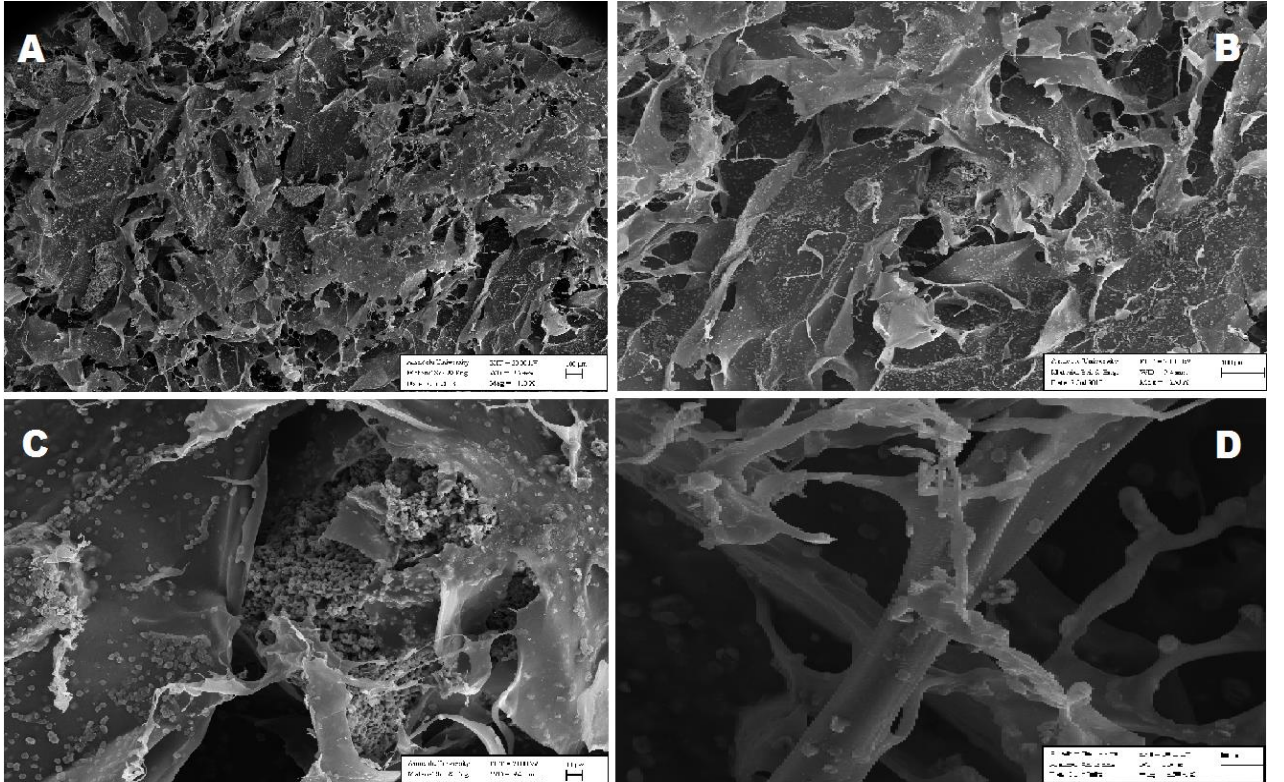
Doku mühendisliği yapılarının geliştirilmesinde en önemli bileşenlerden biri doku iskelesi tasarımıdır. Doku iskelesi olarak da adlandırılan doku iskelesi hücrelerin iskele içerisine migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlayarak hücrelerin burada çoğalmasını ve yeni doku oluşturabilmesini sağlayacak özelliklere sahip olmalıdır. Üç boyutlu doku iskelelerinin implante edildiği dokuda hücre büyümesini gerçekleştirebilmesi için öncelikle biyouyumlu olması ve yüksek gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir. Vaskülarizasyon sayesinde anjiyojenez kolaylaşacak ve hücrelerin ihtiyacı olan besin maddeleri gerekli yerlere ulaştırılabilecektir. Gözeneklerin açık ve birbirleriyle bağlantılı oluşu da gaz, besin ve atık gibi kütlelerin transferi için oldukça önemli bir husustur. Ayrıca tasarlanan doku iskelelerinin biyobozunur olması da ikinci bir cerrahi operasyon gerekliliğini ortadan kaldıracığından önemli bir etmendir. Hasarlı bölgeye yerleştirilen doku iskelesi yeni doku oluşana kadar bölgede kalıp, hücrelere destek sağlamalı ve yeni doku oluşumu boyunca da aynı hızla bozunabilmelidir.

Bahsedilen hususlar çerçevesinde hazırlanan doku iskelelerinin bu özellikleri karşılama durumu farklı analizlerle incelenmiştir. Hazırlanan doku iskelesinin makroskopik görünümü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



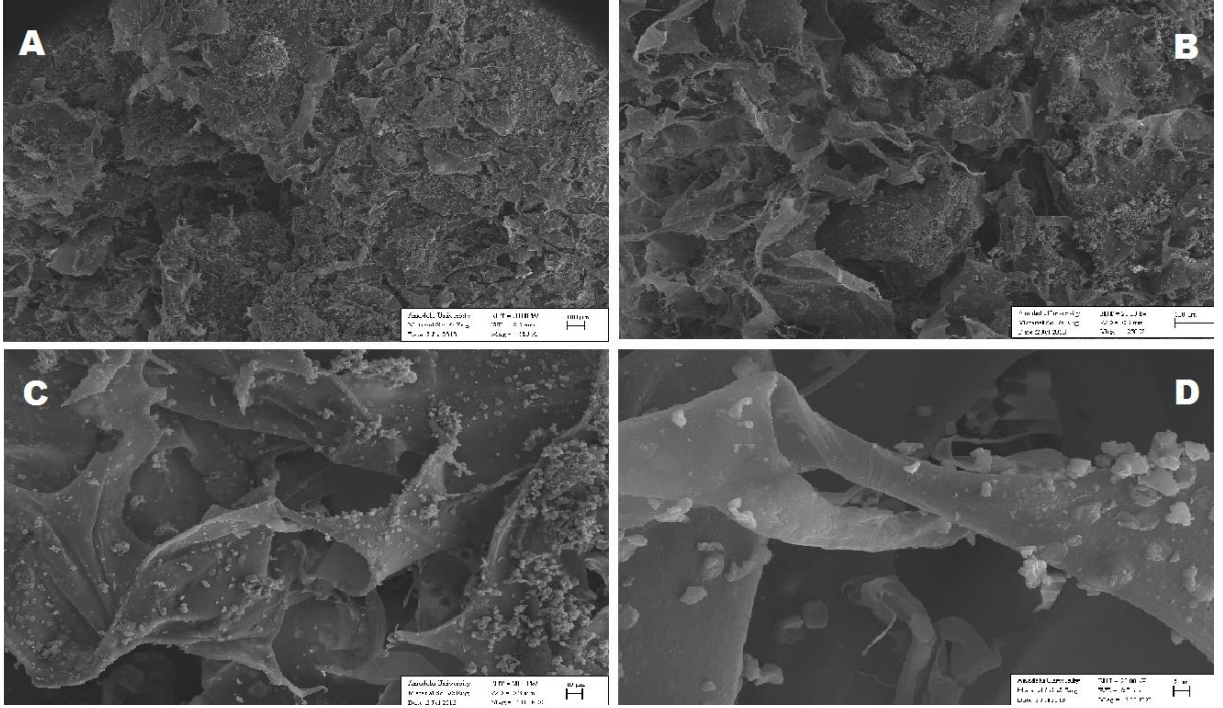
Şekil 4.1. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin makroskopik görüntüleri

Hazırlanan doku iskelelerinin mikroskopik incelemesi ve yüzey topografisi ise SEM analizi ile incelenmiştir. SEM analizi sadece 5 gün boyunca DHT uygulanan steril ve steril olmayan numunelere uygulanmıştır.



Şekil 4.2. Gama radyasyonu ile steril edilmiş kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (A) 110, (B) 250, (C) 1000, (D) 5000X büyütme

DHT yöntem ile hazırlanan kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Şekil 4.2.A gama radyasyonu ile steril edilmiş doku iskelesinin 110X büyütme altındaki görüntüsü iken; Şekil 4.2.B aynı numunenin aynı bölgesinin 250X, Şekil 4.2.C 1000X, Şekil 4.2.D 5000X büyütme altında çekilmiştir. Steril olmayan doku iskelesine ait SEM görüntüleri ise aşağıda Şekil 4.3.'de verilmiştir.



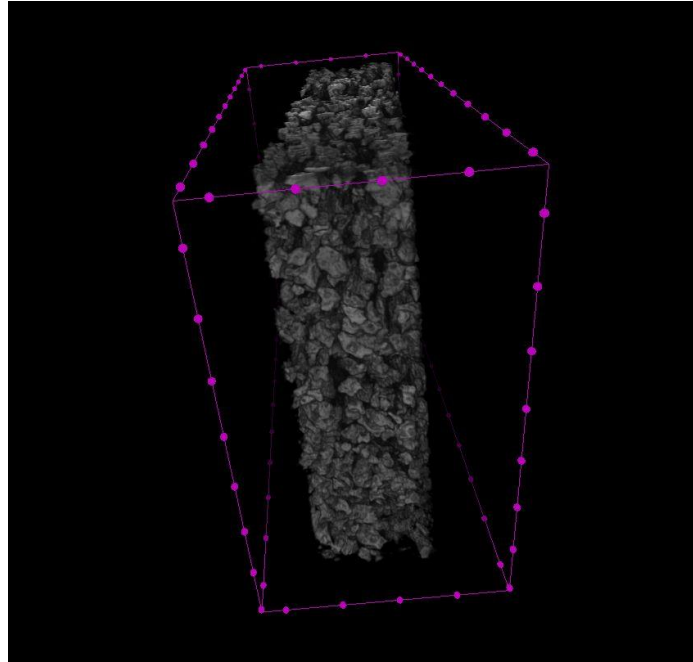
Şekil 4.3. Steril edilmemiş kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin SEM görüntüleri. (A) 110, (B) 250, (C) 1000, (D) 5000X büyütme

Kolajen ve β -TCP'den oluşan kemik greftinin gözeneklilik, seramik fazın dağılımı, 3 boyutlu yapısının yüksek çözünürlükte incelenebilmesi için mikro-bilgisayarlı tomografi tekniği kullanılmıştır. Analiz sadece gama sterilizasyonu ile steril edilen numunelere uygulanmıştır. Toplam porozite oranı (kuru halde) %65.63 olup, açık gözeneklilik oranı ise %65.54 dür. Bu oran oluşturulan doku iskelesinin tüm gözeneklerinin açık ve birbiriyle bağlantılı olduğunu ve hücre migrasyonuna oldukça elverişli olduğunu göstermektedir. Normalleştirilmiş doku iskelesi yüzeyi (SS/SV) ve gözenekler arası bağlantı yoğunluğu Çizelge 4.1. 'de verilmiştir. μ -CT

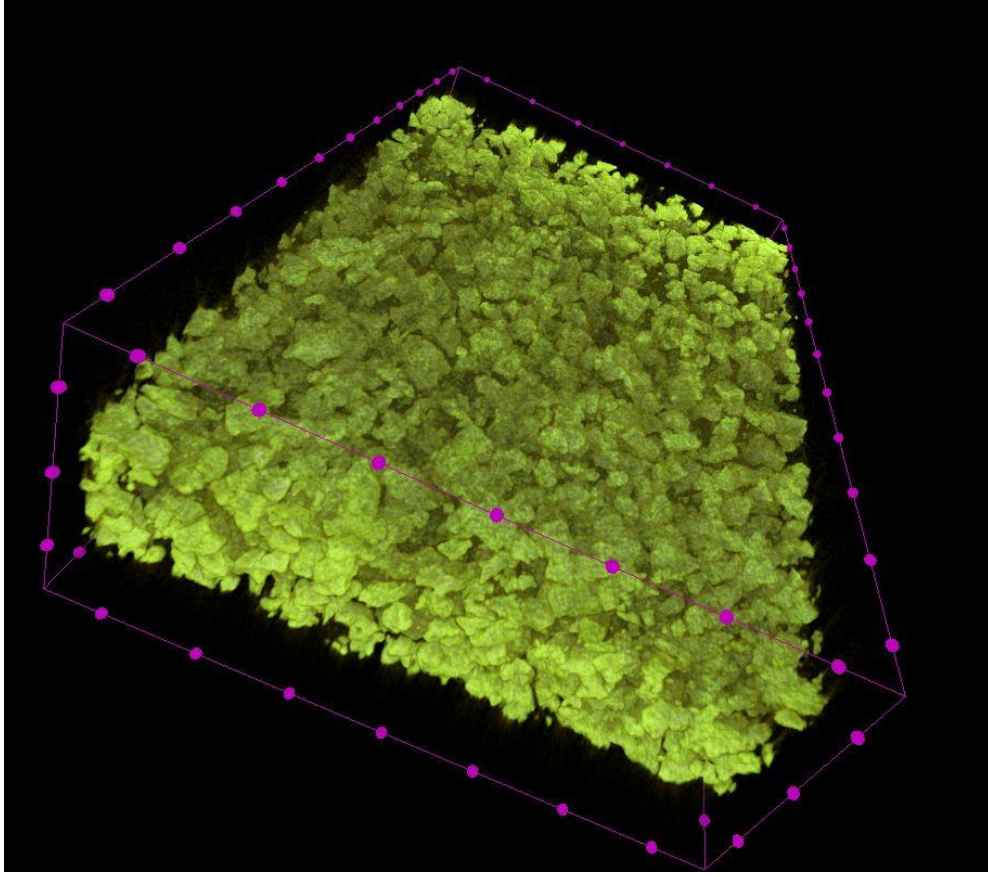
analiz sonuçları görüntüleri aşağıda Şekil 4.4. ve 4.5.'de verilmiştir. X-ray radyografilerinde de görüldüğü gibi seramik fazın kolajen içerisinde dağılımı oldukça homojendir. X ışınını fazla soğuran kısımlar daha açık renklidir ve bu kısımlar β -TCP moleküllerini göstermektedir. Kolajen kısımlar ise TCP'ler arasındaki boşluklardadır ve geçirgenliği çok olduğu için koyu renkte gözükümler.

Çizelge 4.1. μ -CT sonuçlarına göre doku iskelesi gözeneklilik özellikleri

Parametreler	Sonuçlar
Toplam gözeneklilik (%)	65,63
Açık gözeneklilik (%)	65,54
Doku iskelesi yüzeyi (1/mm)	8,845
Conn. D. (1/mm ³)	177,98

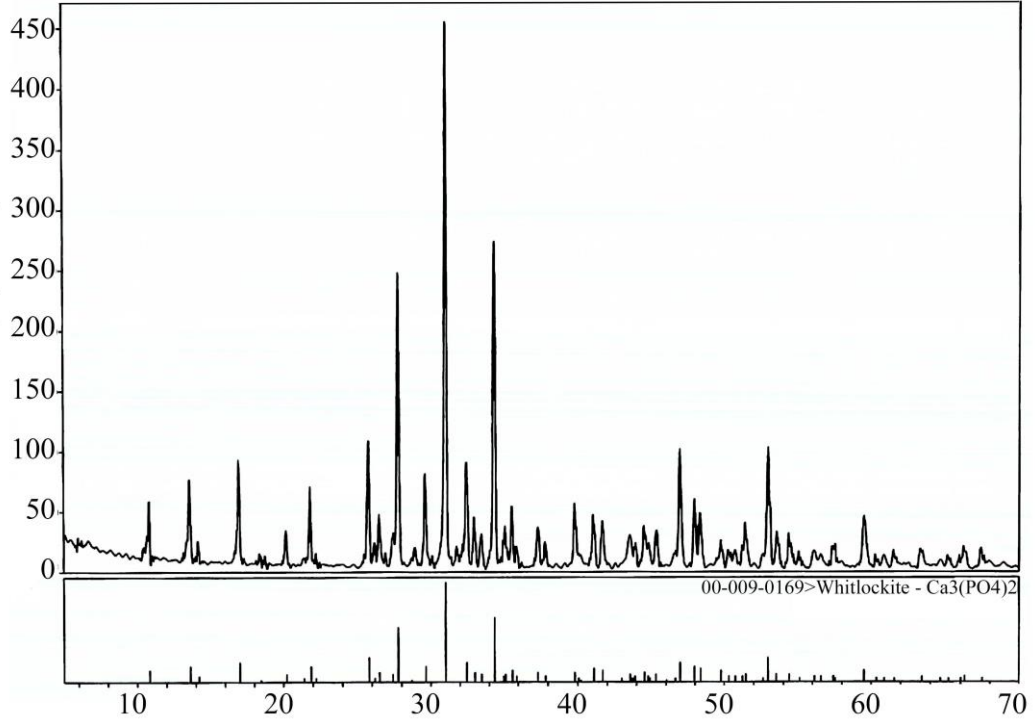


Şekil 4.4. Steril doku iskelesine ait μ -CT radyografisi (yandan görünüş)

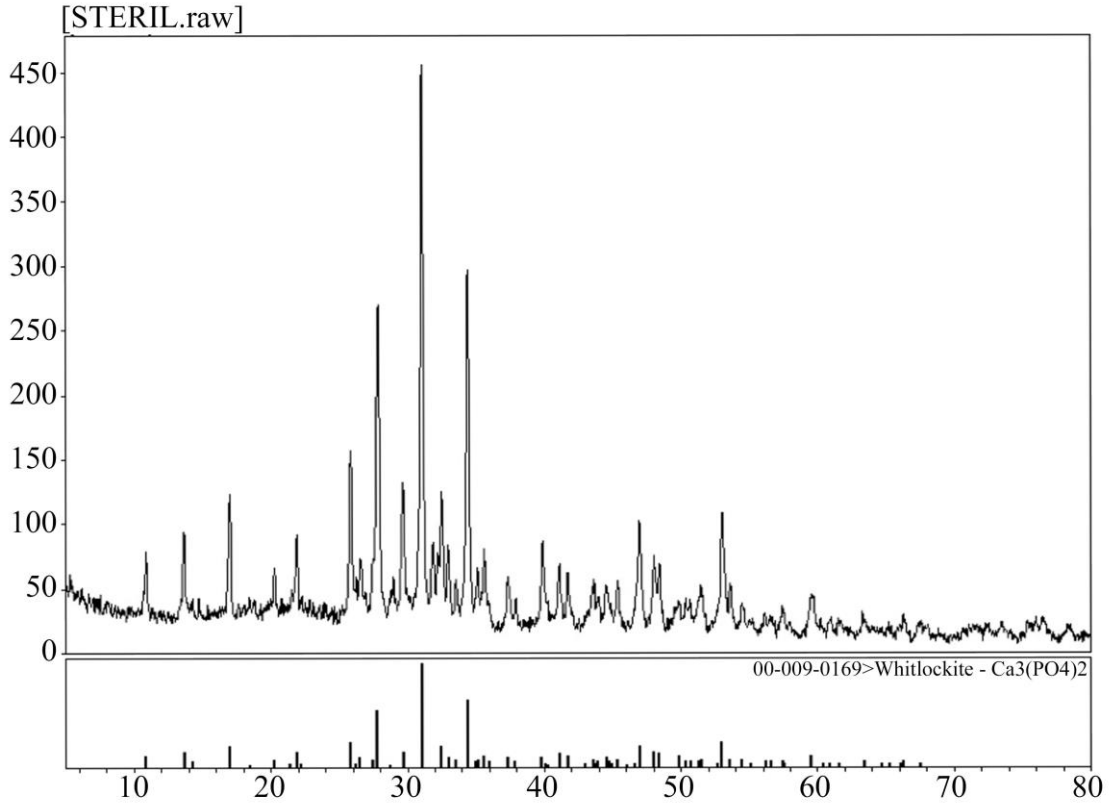


Şekil 4.5. Steril doku iskelesine ait μ -CT radyografisi (üstten görünüş)

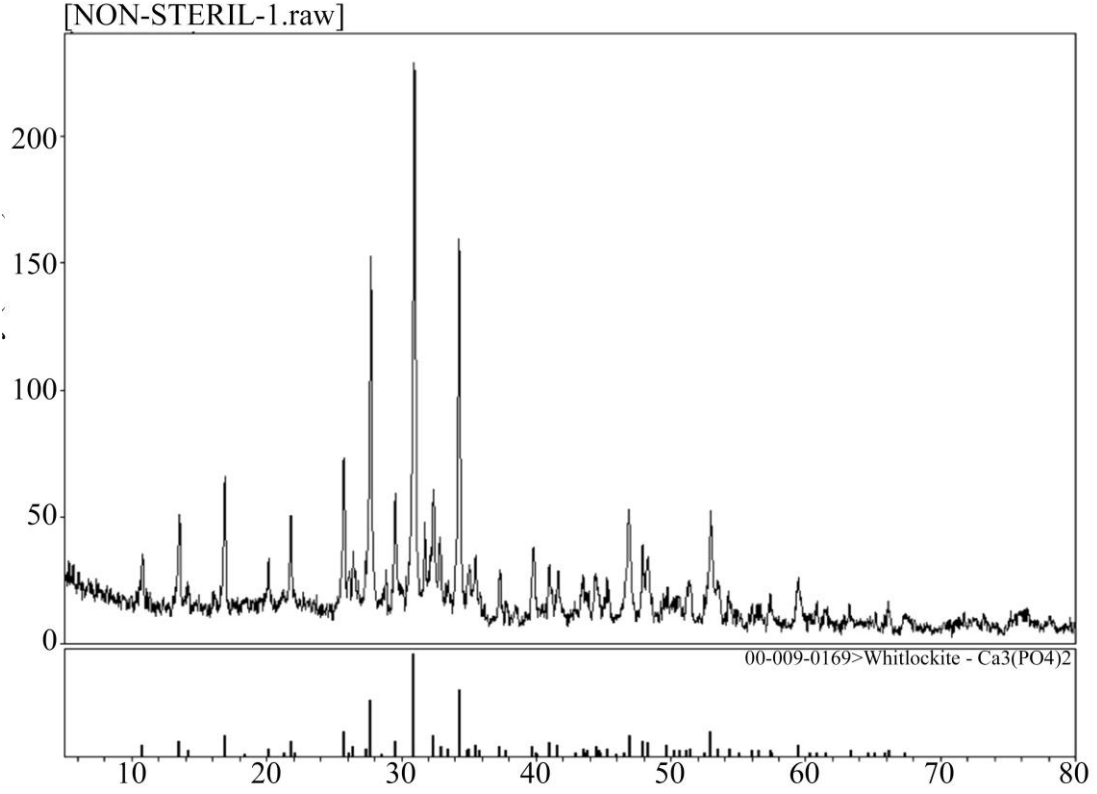
XRD ile numunelerin kantitatif incelenmesi sonucu minerolojik fazlar belirlenmektedir. Bu analiz için θ açısı aralığı $0-80^\circ$ olarak olabildiğince geniş tutulmuştur. Minerolojik analiz sonuçları incelendiğinde steril ve steril olmayan numunelerin Whitlockite [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] fazı içerdikleri tespit edilmiştir. Şekil 4.6.'da sadece beta-trikalsiyum fosfata ait XRD grafiği verilmiştir. Kolajenin amorf yapıda olmasından dolayı XRD analizinde kolajen Tip-I pik vermemiştir fakat $25-35^\circ$ arasındaki tepe/çan şeklindeki yapıdan dolayı steril (Şekil 4.7) ve steril olmayan numunelerde (Şekil 4.8) amorf yapının varlığı anlaşılmıştır. Steril ve steril olmayan numunelere ait grafikler üst üste çakıştırıldığında ise (Şekil 4.9.) Whitlockite fazına ait pikler arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Böylece gama radyasyonu ile sterilizasyonun maddenin minerolojik yapısını etkilemediği sonucuna varılmıştır.



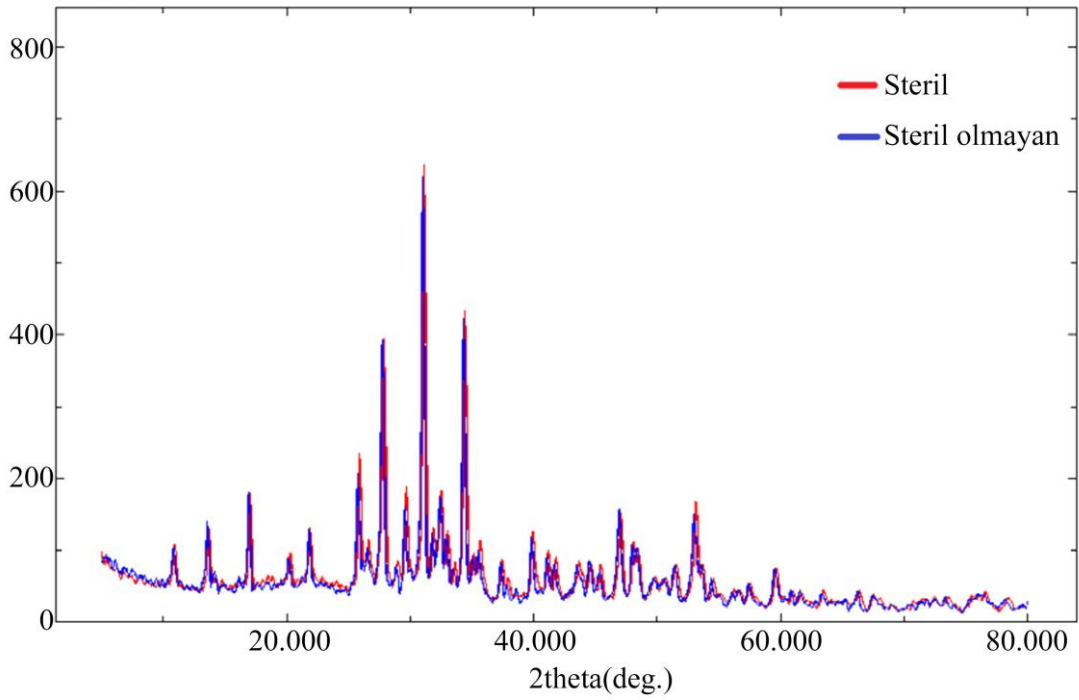
Şekil 4.6. Steril β -TCP'e ait XRD grafiği



Şekil 4.7. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait XRD grafiği

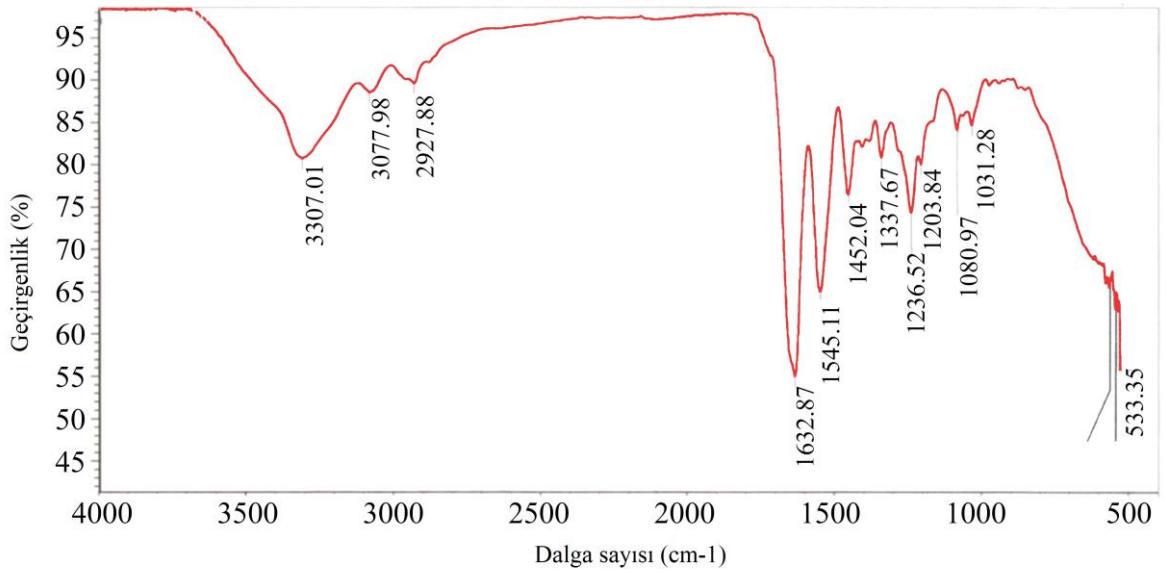


Şekil 4.8. Steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait XRD grafiği

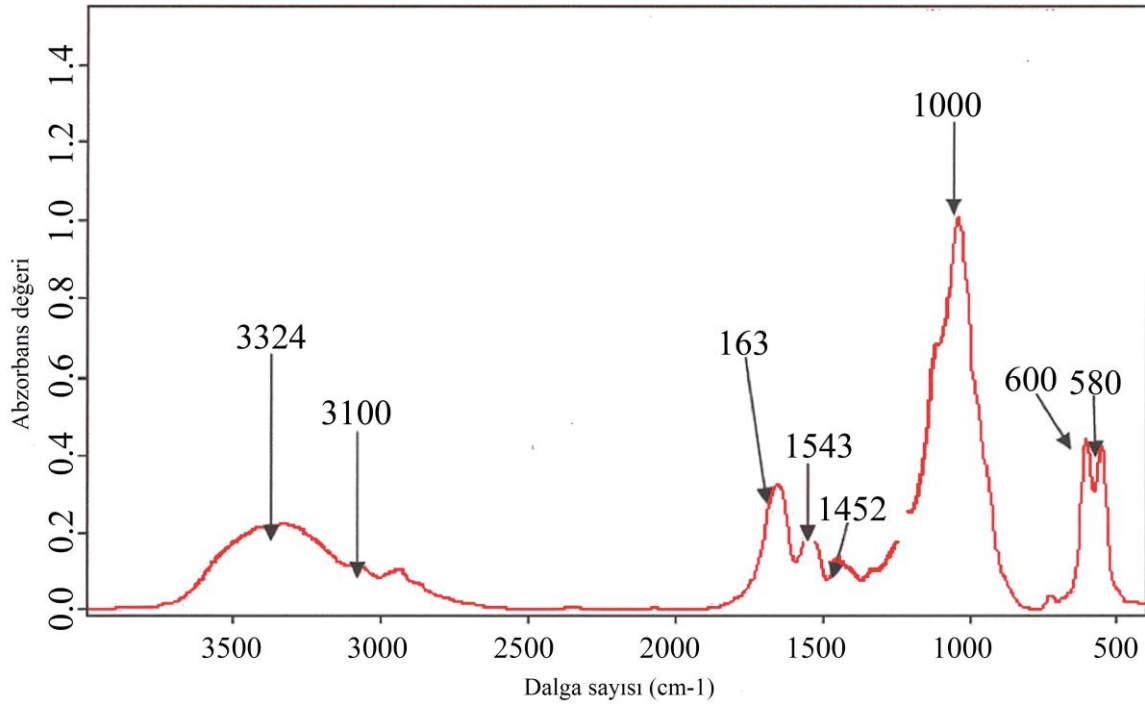


Şekil 4.9. Steril ve steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait grafiklerin üst üst çakıştırılmış görüntüsü

Amorf olan kolajenin, tez kapsamında hazırlanmış çapraz bağlı kolajen/beta trikalsiyum fosfat sentetik greft malzemesinin kimyası ve gama radyasyonunun ardından yapıda meydana gelecek değişikliklerin belirlenmesi için FTIR analizi yapılmıştır. Bu amaçla FTIR'da pik vermeyen fakat numuneyi katı halde tutabilen KBr ile numune karıştırılıp, preslenip cihaza yerleştirilmiştir. Grafikte görülen ilk pik başlıca proteinlerin N-H gerilimine ait amid I Bandından elde edilen 3324 cm^{-1} dalga sayısındadır. 3100 cm^{-1} de görülen bant ise O-H bağıını göstermektedir. 1630 cm^{-1} yine N-H amidlerinin birinci bandından elde edilen piktir ve büyük oranda C=O gerilimi vardır. 1543 cm^{-1} de görülen yine kolajene özgü amid II piki C-N gerilimi ve N-H bükülmesi içermektedir. 1452 cm^{-1} piki ise kolajene ait CH_2 bağıını göstermektedir. 1000 cm^{-1} , 600 cm^{-1} ve 580 cm^{-1} dalga sayısında görülen piklerin ise β -TCP'e ait PO_4^{3-} bandından elde edildiği tespit edilmiştir.

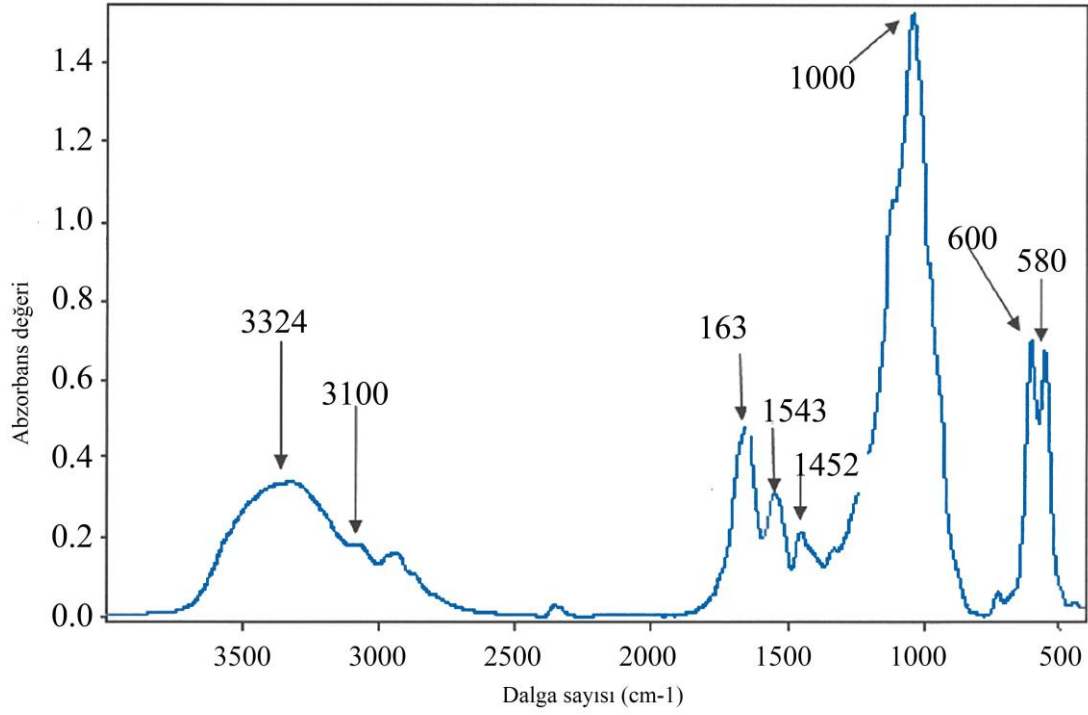


Şekil 4.10. Saf kolajene ait FTIR grafiği

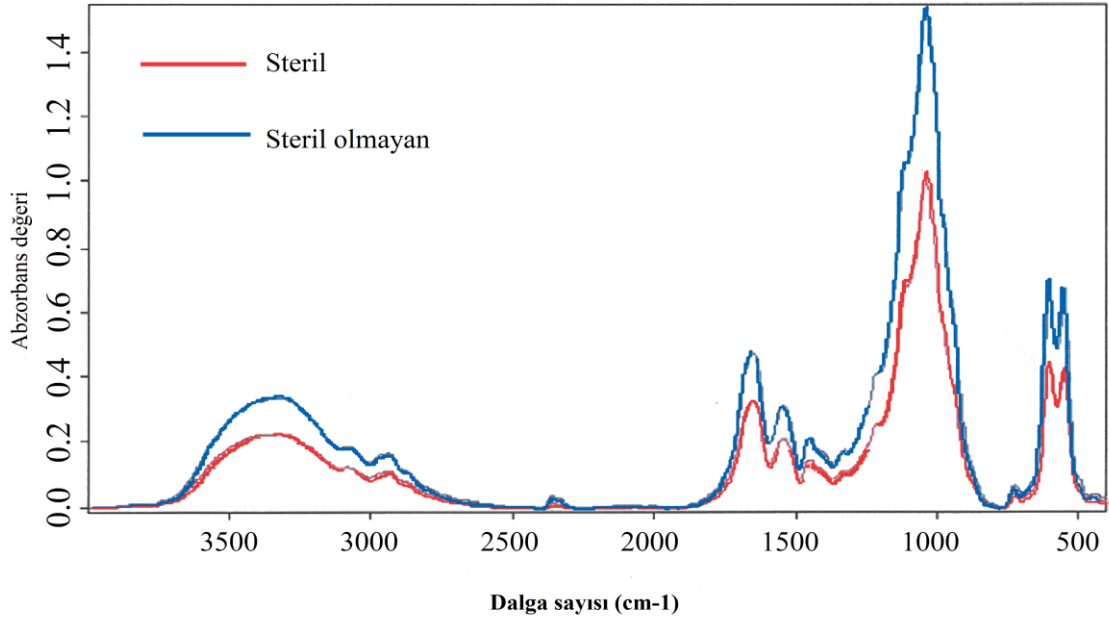


Şekil 4.11. Steril kolajen/β-TCP doku iskelesine ait FTIR grafiği

Kontrol amaçlı olarak daha önceden yapılan sadece saf kolajene ait numunenin FTIR grafiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Steril olan (Şekil 4.11) ve steril olmayan (Şekil 4.12) örneklerin FTIR grafikleri üst üste çakıştırıldığında bağlar hep aynı yerde pik vermiştir, fakat IR bandının alanı değişmektedir. Çapraz bağlanma etkisiyle pikin altında kalan azalmıştır, keskin tek bir pik olunca ise kristalin faza yaklaşılmaktadır. IR bantlarının yerinin değişmemesi gama sterilizasyonu etkisiyle oluşan ikinci bir çapraz bağlanmanın kolajenin ikincil yapısını değiştirmemiş olmasından kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak sterilizasyon esnasında malzemedeki su içeriğinde kayıp olmaktadır ve böylece 3324 cm⁻¹ dalga sayısındaki amid ve 3100 cm⁻¹ dalga sayısındaki OH bandının alanı steril olmayana göre daha az çıkmaktadır (Şekil 4.13.).



Şekil 4.12. Steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait FTIR grafiği



Şekil 4.13. Steril ve steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait üst üste çakıştırılmış FTIR grafikleri

TG-DTA ısı analiz için kullanılan termo analitik bir yöntemdir. Malzemenin ısıtıldığı zaman ne gibi fiziksel değişimlere uğrayacağını gösterir. Yapıyı oluşturan hammaddelerin karakterizasyonu ve hazırlanan sentetik kemik greftlerinin çapraz bağlanmasının konfirmasyonu ile sterilizasyonun yapı üzerine etkileri özellikle erime ve degradasyon sıcaklığındaki değişimler üzerinden irdelenmesi amacıyla TG-DTA analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarında ağırlık kaybına da bakılmıştır. Ağırlık kayıplarının belirlendiği TG-DTA analizinde üç aşamalı bir degradasyon (Şekil 4.14 ve 4.15’de siyah eğri) görülmüştür. Veriler Çizelge 4.2.’de özetlenmiştir. Ağırlık kaybı sonuçlarındaki ilk endotermik pik ve buna bağlı olan ağırlık kaybı suyun uzaklaşması anlamına gelmektedir. İkinci ekzotermik pikin olduğu 200-400 °C aralığında ise kolajen degradasyona uğramıştır. Üçüncü aşamada görülen ekzotermik pik ise $Ca_2P_2O_7$ arafazını oluşturmak için $CaCO_3$ ve P_2O_5 reaksiyonundan kaynaklanmaktadır ve ortamdan CO_2 uzaklaşmaktadır. Steril ve steril olmayan numunelerdeki DTA sonuçları karşılaştırıldığında sterilizasyona dayalı belirgin bir fark gözükmemiştir sadece gama sterilizasyonu yapılan steril numunelerde %4.7 ağırlık kaybı daha fazladır. Örnekler benzer termal davranış sergilemektedir.

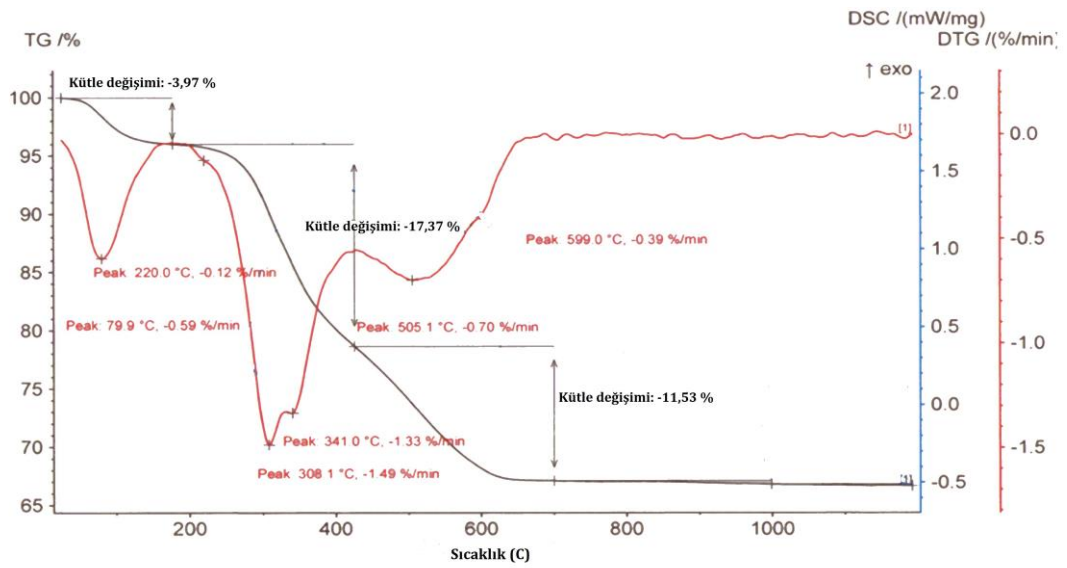
Çizelge 4.2. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait DTA sonuçları

	Steril doku iskelesi	Steril olmayan doku iskelesi
1.Aşama (30-200°C)	% 3,97	% 3,01
2.Aşama (200-450°C)	%17,37	% 15,76
3.Aşama (450-700°C)	%11,53	%9,56
TOPLAM	%33,3	%28,6

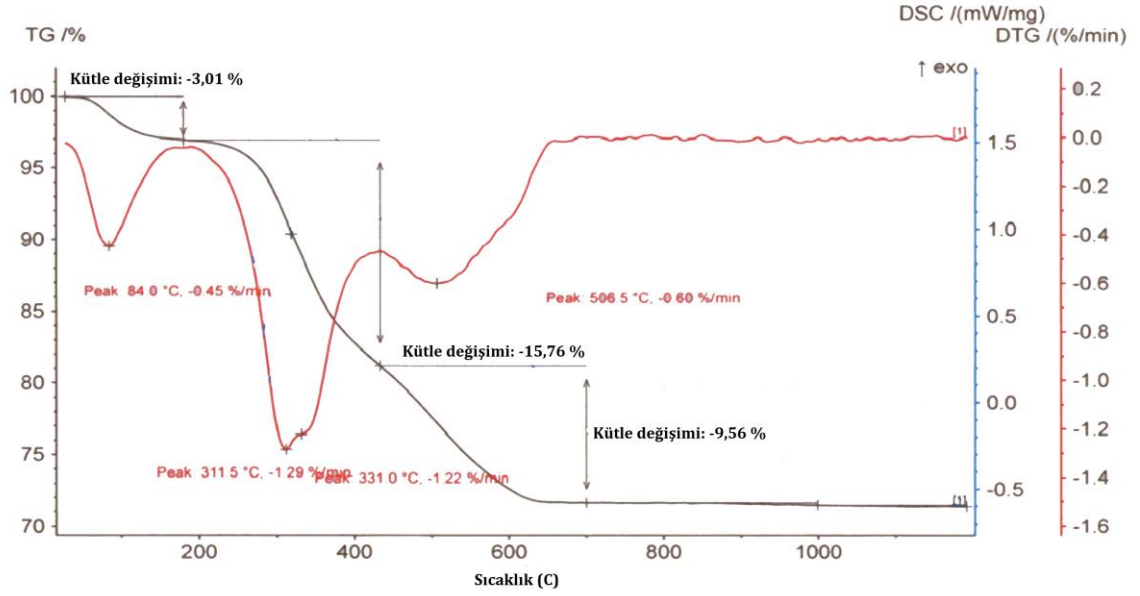
TG-DTA analizinde kırmızı renkli eğri ise kolajen içeren sentetik kemik greftinin ısıya karşı bozunma davranışını göstermektedir. Kolajen gibi biyopolimerlerin genelde degradasyon (T_g) ve denatürasyon/erime (T_m) sıcaklıkları bulunmaktadır. Yapılan hesaplamalara göre steril olan ve olmayan numunelere ait T_m ve T_d sıcaklıkları Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Gama sterilizasyonu sonucunda çapraz bağlanmaların artmasıyla numunedeki kolajenin degradasyon sıcaklığı yükselmiştir. Fakat T_d sıcaklığının aksine steril örnekteki erime sıcaklığı (T_m) düşmüştür.

Çizelge 4.3. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait erime ve degradasyon sıcaklıkları

	STERİL	STERİL OLMAYAN
T_m	46,6 °C	53,3°C
T_d	133,3 °C	120,0 °C



Şekil 4.14. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait TG-DTA grafiği



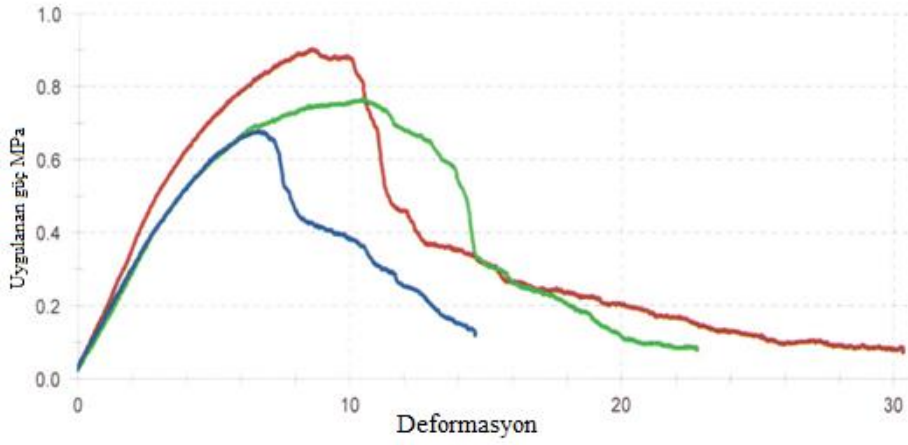
Şekil 4.15. Steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait TG-DTA grafiği

Çizelge 4.4. Steril ve steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz sonuçları (Emod: elastik modül, σ_M : mukavemet, stress F_{max}/A , a_0 : yükseklik, b_0 : genişlik)

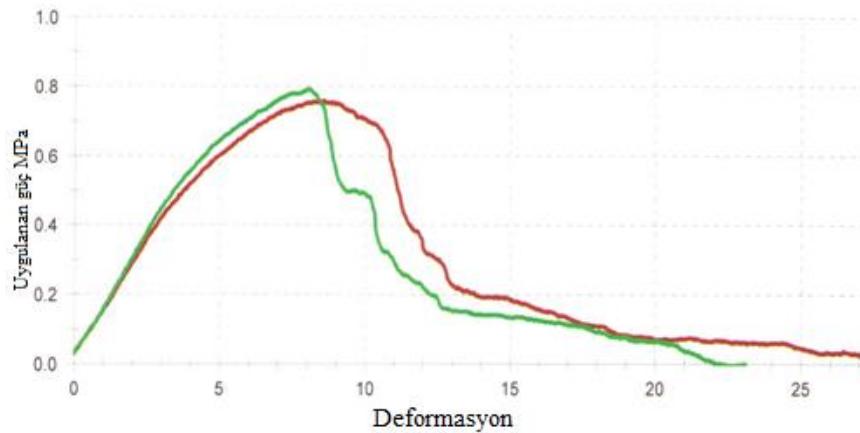
	E_{mod} MPa	σ_M MPa	F_{max} N	dL @ F_{max} %	a₀ mm	b₀ mm
Steril numune	14,122	0,77	5,90	8,3	4,973	11,55
Steril olmayan numune	14,839	0,78	6,00	8,5	5,014	11,49

Tez çalışmasında üretilen kolajen/β-TCP polimerik doku iskelesinin değişik şartlar altındaki davranışının incelenmesi ve mekanik özelliklerinin anlaşılabilmesi için

basma ve 3-nokta eğme analizleri yapılmıştır. Kolajen ve β -TCP den oluşan kemik grefti için çekme deneyi yapılmak istenmiş fakat analiz için gerekli uzunlukta malzeme üretilmediğinden ve malzeme yapısının çekme testine uygun olmayışından çekme analizi yapılamamıştır. 3-nokta eğme testi 0,2 N'luk yükleme ve 2 mm/dk hızla 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elastik modül regresyon yöntemiyle %0,5 - 2,5 deformasyon arasında hesaplanmıştır. Steril olan ve steril olmayan doku iskelelerine ait 3-nokta eğme analizinin şeması ve sonuçları aşağıda Şekil 4.16, Şekil 4.17. ve Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Mekanik analizler 3 tekrarlı yapılmış ve sonuçlar aritmetik ortalama alınarak verilmiştir.



Şekil 4.16. Steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz grafiği



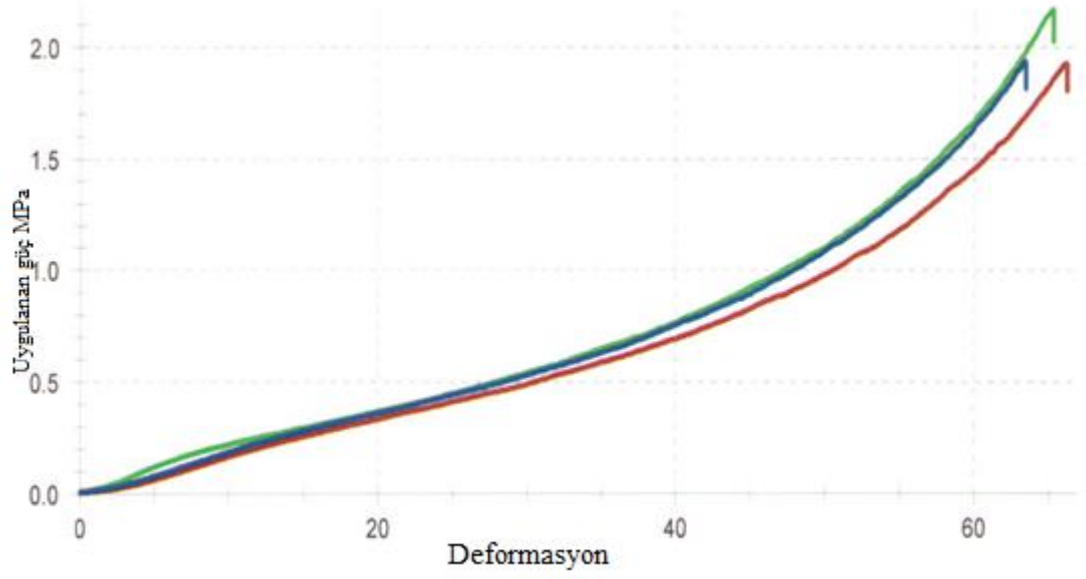
Şekil 4.17. Steril kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait 3-nokta eğme analiz grafiği

Sentetik kemik greftlerine yapılan basma testi ise steril ve steril olmayan numunelere üç tekrarlı olarak uygulanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Analiz, 0,25 N'luk yükleme ve 2 mm/dk şartlarında gerçekleştirilmiştir. Elastik modül regresyon yöntemiyle %3-5 arasında hesaplanmıştır. Deney için 10x10x5mm boyutunda numuneler ile çalışılmıştır. Analiz sonuçları aşağıda Şekil 4.18, Şekil 4.19. ve Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

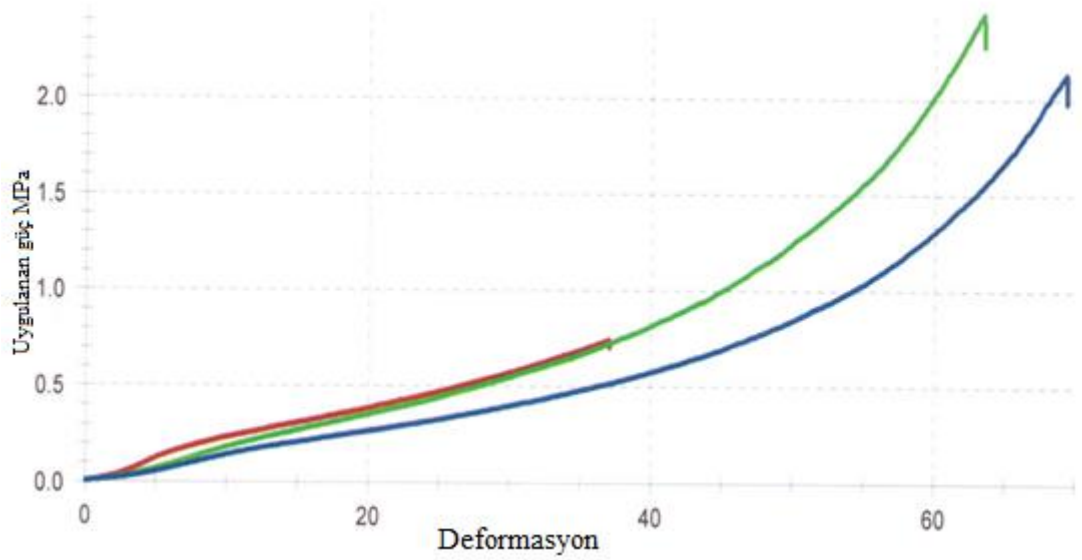
Basma testi sonuçlarına göre steril olan ve olmayan numunelerin elastik modül değerleri birbirlerine oldukça yakın çıkmıştır. Böylece gama ışını ile sterilizasyonun malzemenin mekanik özelliklerine bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.5. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait basma analizi sonuçları (n=3) (E_{mod}: elastik modül, F_{max}: uygulanan max kuvvet, dL: F_{max} gelene kadarki bozulma, h₀: yükseklik, S₀: yüzey alanı)

	E_{mod} MPa	F_{max} kPa	dL at F_{max} %	h₀ mm	S₀ mm²
Steril numune	2,22	1770	56,6	5,058	132,62
Steril olmayan numune	2,19	2010	64,9	4,943	134,66



Şekil 4.18. Steril olmayan kolajen/β-TCP doku iskelesine ait basma analizi grafiği



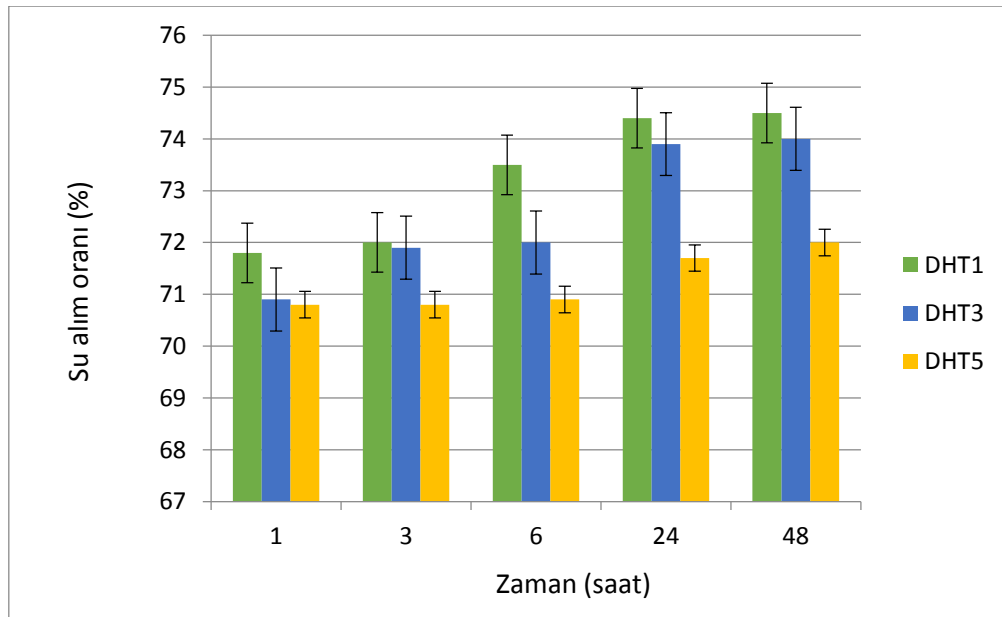
Şekil 4.19. Steril kolajen/β-TCP doku iskelesine ait basma analizi grafiği

Ayrıca 1 ve 3 gün süreyle DHT yöntemi ile çapraz bağlanmış doku iskeleleri için de basma testi uygulanmıştır. 3 gün süreyle DHT yapılan numunelerin basma mukavemeti 1 ve 5 günlüklere oranla daha fazla bulunmuştur. Analiz sonucu Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. 1, 3 ve 5 gün boyunca DHT yöntemine tabi tutulan doku iskelelerine ait basma analizi sonuçları (n=3)

Uygulama zamanı	1-gün	3-gün	5- gün
Steril doku iskelesi (MPa)	2,32	3,07	2,22
Steril olmayan doku iskelesi (MPa)	3,67	3,45	2,19

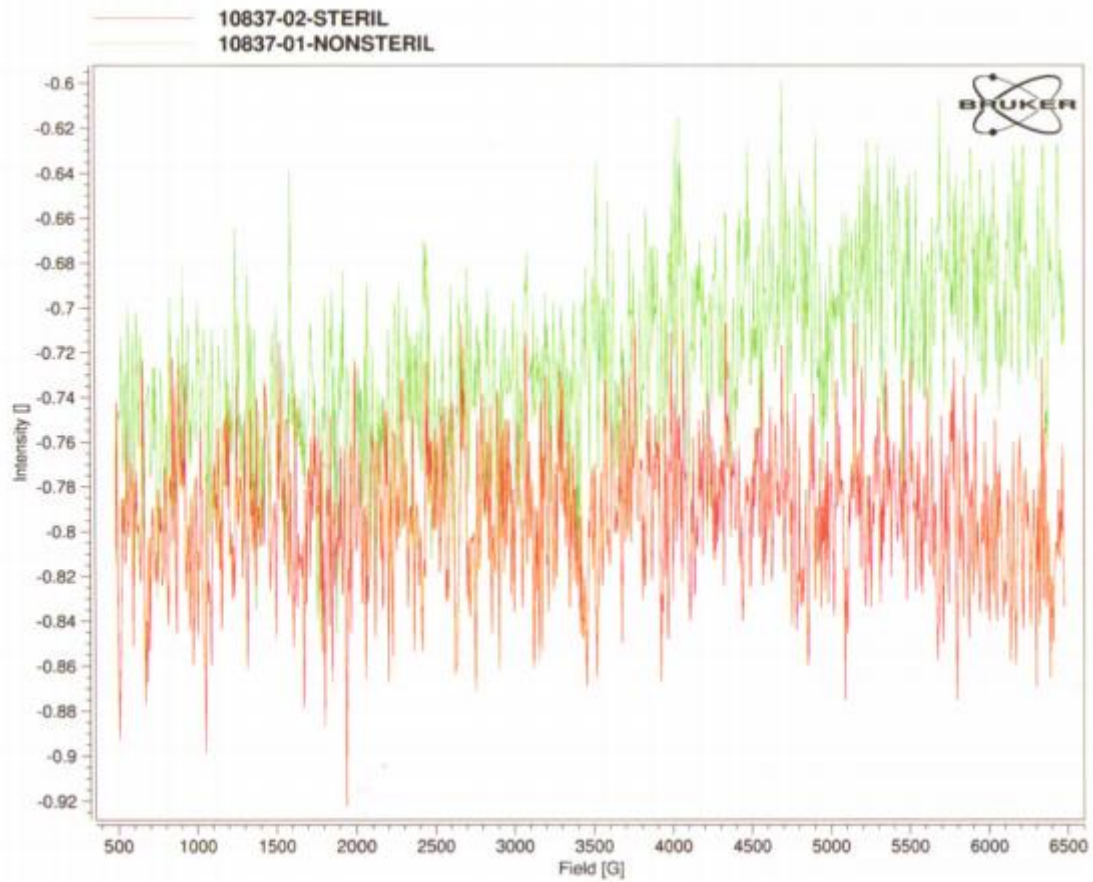
Tez çalışmasında 1, 3 ve 5 gün süreyle DHT yöntemine tabi tutulan doku iskelelerine üç tekrarlı yapılan şişme testi sonuçlarına göre doku iskelelerinin su alımı 48 saatten az bir sürede dengeye gelmiştir. Şekil 4.20.'de verildiği üzere doku iskelelerinin su tutma kapasitesi DHT süresiyle ters orantılı olarak değişmektedir. DHT süresi artan numune daha fazla çapraz bağlanacağından su alım kapasitesi düşmektedir.



Şekil 4.20. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin şişme davranışları (n=5)

Gama radyasyonunun farmasötik ya da ortobiyojik malzemelerin sterilizasyonu için kullanımı gitgide yaygınlaşan bir yöntemdir. Bu yöntem uygulanması kolay, ekonomik olarak uygundur fakat önemli yan etkilerinin yokluğu mutlaka doğrulanmalıdır. İncelenmesi gereken yan etkilerden biri de serbest radikal oluşumudur. Yüksek enerjili radyasyon radikal oluşumu ile ilişkilendirilmektedir ve ESR analizi ile sterilizasyon sonucu oluşabilecek eşleşmemiş elektronlar ve stabil serbest radikallerin ölçümü yapılabilmektedir.

Tez kapsamında hazırlanan ve önceden 25 kGy dozda gama ışınıyla steril edilen kolajen/ β -TCP doku iskeleleri ile steril edilmeyen scaffold arasındaki radikal sinyal oluşumu ölçülmek istenmiştir. Deney 9.85 GHz mikrodalga frekansında ve 100 kHz manyetik alan değişimi frekansında yapılmıştır. Analiz sonucu ise Şekil 4.21.'de verilmiştir. Kırmızı sinyal steril numuneyi belirtirken; yeşil sinyal steril olmayan numuneyi göstermektedir.



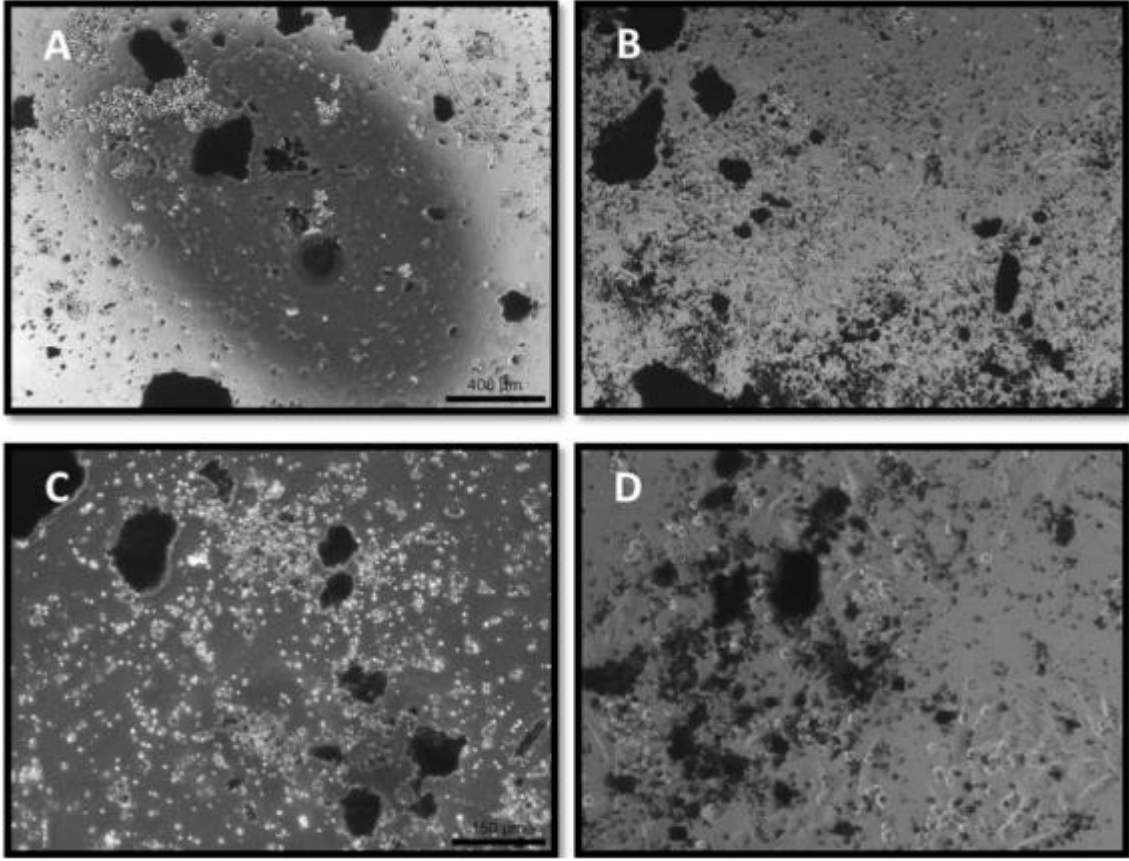
Şekil 4.21. Steril ve steril olmayan kolajen/ β -TCP doku iskelesine ait ESR grafiği

Analiz sonucunda zigzag şeklindeki sinyaller arka plan gürültüsüdür. Serbest radikal oluşum bölgesi olan 3500 Gauss'da dalgalanma olmayışı ve yoğunluğun 10 kat artırılması sonucu da herhangi bir dalgalanma görülmediğinden, steril ve steril olmayan numunelerde serbest radikal oluşumu gözlenmediği sonucuna varılmıştır. Üretilen greftlerin 25 kGy dozda gama ışınına maruz bırakılması sonucu malzemede bir değişiklik saptanmadığı bulgusuna ulaşılmıştır.

4.2 *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

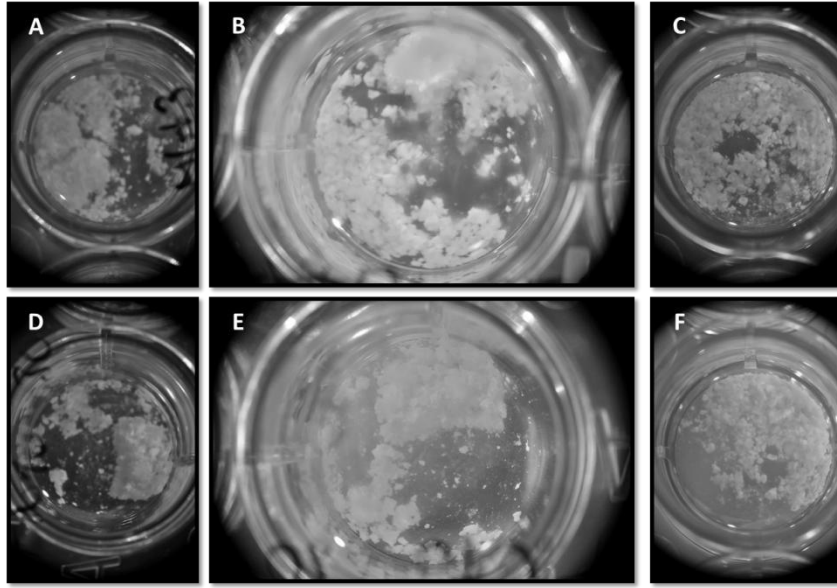
Tez kapsamında oluşturulan kolajen/ β -TCP içeren sentetik kemik greftinin vücut içerisindeki davranışını taklit etmek amacıyla hücre kültürü analizleri yapılmış ve malzemenin hem bozunmasına hem de sitotoksitesine bakılmıştır. Oluşturulan doku iskelelerin sitotoksitesini belirlemek üzere, doku iskelelerine sıkça kullanılan insan osteoblast-benzeri hücre hattı (MG63) hücreleri ekilmiştir. Hücreler bu deneye özel olarak kullanılan α -MEM, 10% FBS, 1% L-Glutamin, 1% antibiyotik & antimiyotik içeren sıvı besiyeri ile kültür edilmişlerdir. Hücreleri ekmeden önce, 36 tane doku iskelesi 6x6mm boyunda steril bisturi ile kesilmiştir. Sonrasında, iskeleler hazırlanmış α -MEM besiyeri içerisinde 30 dakika boyunca tutulmuştur.

İlk hücre ekiminin verimliliğini anlamak için, iskelelere tekrardan steril kültür kapları içerisinde hücre eklenmiştir. 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki doku iskelelerine 0.5×10^6 hücre ekilmiş ve hücre solüsyonunun eşit dağıldığından emin olmak için her bir göze toplamda 100 μ L hücre solüsyonu olacak şekilde 5 kez 20 μ L besin ortamı eklenmiştir. Böylece ekimi yapılan doku iskelelerinden hücre süspansiyonunun sızması da önlenmiş olmaktadır. Ekimi yapılan doku iskeleleri 2 saat boyunca inkübasyon için 37°C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılmış ve süre sonunda toplam hacim 1 mL olacak şekilde üzerlerine α -MEM besin ortamı ilave edilmiştir. 24. saatin sonunda, besi yeri hacminin doku iskelesi sitotoksitesinin ve bütünlüğünün üzerindeki etkisini ölçmek için kuyuların yarısına fazladan 1mL α -MEM besi yeri (kuyuların yarısının toplam hacmini 2ml yükselterek) ilave edilmiştir. Doku iskelelerinin 2 saat, 24 saat, 48 saat ve 192 saat zaman noktalarında görüntüleri alınmıştır. α -MEM besi yerinin hücre ekim işlemi öncesi ve deney sonrasında pH değeri ölçülmüştür.



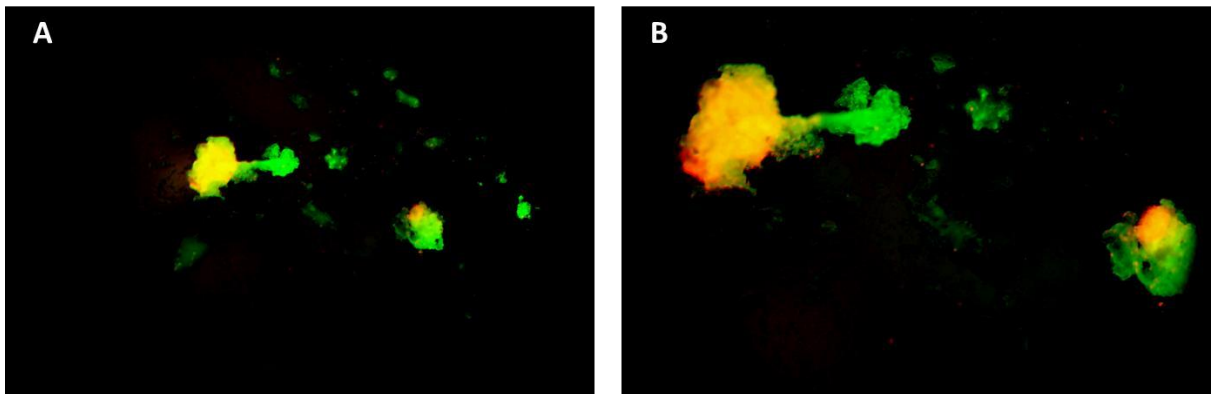
Şekil 4.22. Doku iskelelerine ilk hücre ekimine ilişkin görüntüler. A ve C) 2 saat sonundaki görüntüler. B ve D) ekmenin 24 saat sonrası. A ve B) x 4 büyütme. C ve D) x10 büyütme

2 saat inkübasyon (37°C ve $5\% \text{CO}_2$) sonrasında, bütün doku iskelelerinde dağılma oluşmaya başlamıştır ve besin ortamında hücre ve doku iskelesi artıkları görülmüştür. Bu sürenin sonunda iskeleler 24-kuyulu hücre kültür kaplarına transfer edilerek görüntülenmiştir. Şekil 4.22’de büyük boylarda doku iskelesi parçaları, kabın yüzeyinden ayrılmış küçük hücre kümeleriyle birlikte görülebilmektedir. 24 saat sonrasında ise doku iskelelerine hücre tutunması görülmüştür.



Şekil 4.23. Hücre ekiminden 2 saat sonra doku iskelelerinin morfolojisi. A ve D) Hücre ekiminden 48 saat sonraki görüntü. B ve E) Hücre ekiminden 72 saat sonraki görüntü. C ve F) Hücre ekiminden 192 saat sonraki görüntü. A-C) 1 mL kuyucuk hacmi. D-F) 2mL kuyucuk hacmi

Doku iskelelerinde dağılma hücre ekiminin 48 saat sonrasında da devam etmiştir. 192 saatde (8. gün) doku iskeleleri disintegre olmuştur (dağılmıştır). Geriye kalan parçacıkların sentetik kemik greftini oluşturan TCP ve çapraz bağlanmış kolajen bileşenleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.23.).

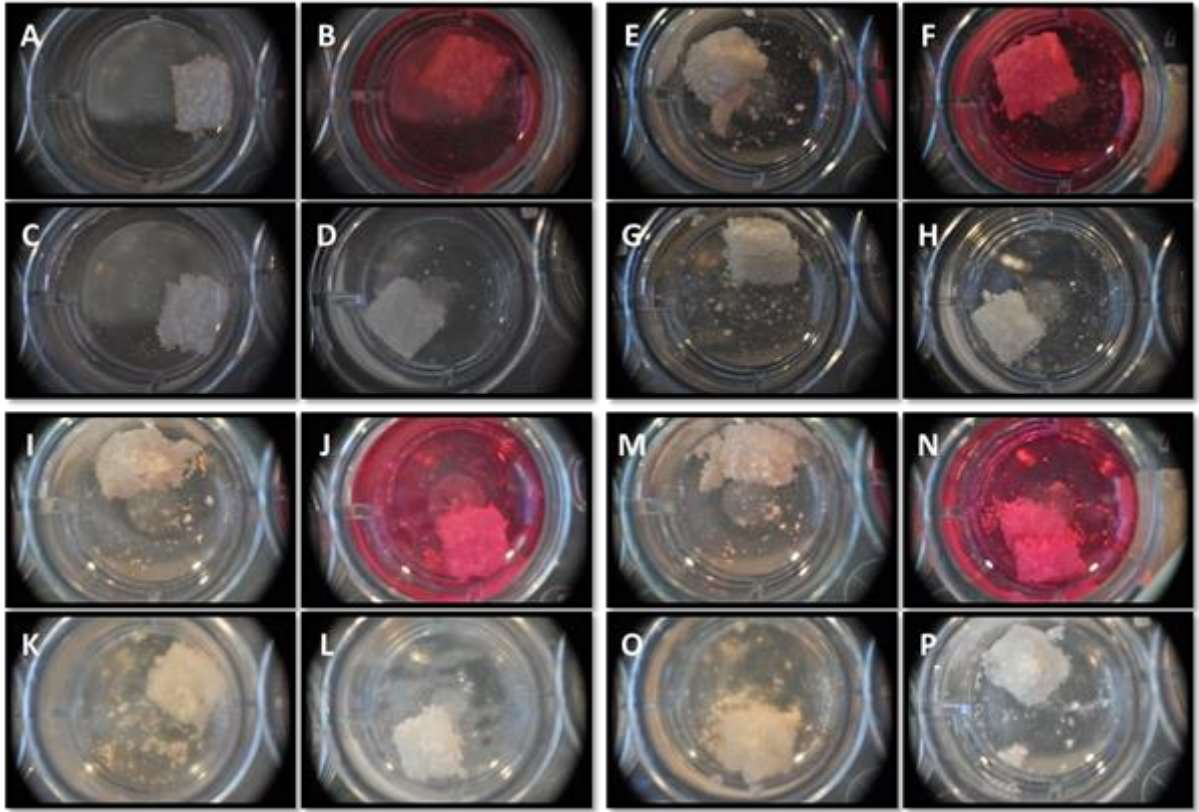


Şekil 4.24. Hücre ekiminden 192 saat sonra doku iskelelerine yapılan Canlı/Ölü boyama. A) x4 büyütme. B) x10 büyütme

Canlı/ölü boyama sonuçlarına göre ise doku iskelesinin birçok parçası yüksek derecede hücre canlılığı göstermiştir. Kalsein ile boyanan yeşil kısımlar canlı hücreleri belirtirken; etidyum homodimer-1 ile boyanan kırmızı kısımlar ölü hücreleri göstermektedir. (Şekil 4.24).

Doku iskelelerine hücre ekilmesi işlemindeki izlemlerin yanında iskelelerin bütünlüğünü test etmek için başka bir deney daha yapılmıştır. DMEM, α -MEM, katkılı MG63 sıvı besi yeri ve PBS gibi farklı sıvı besi yerler içerisinde degradasyon boyutunu izlemek ve analiz etmek için sekiz doku iskelesi (hücre ekimi için kullanılan ölçülerde kesilmiş) kullanılmıştır. Doku iskeleleri kesildikten hemen sonra 24-kuyulu hücre kabına transfer edilmiştir. Her kuyucuk grubuna belirlenen miktarda besi yeri ilave edilmiştir ve 3'er tane doku iskelesi ayrı ayrı DMEM, α -MEM, katkılı MG63 sıvı besi yeri ve PBS içerisinde ıslatılmıştır. Doku iskeleleri ilk 5 saat içerisinde her 30 dakikada bir ve 24. saatte iki kere görüntülenmiştir. 24. saatte yapılan görüntülemenin hemen akabinde, doku iskeleleri yeni kuyucuklara transfer edilmiştir ve hemen sonrasında tekrardan görüntülenmiştir. Böylece, hücre ekiminin 2 saat sonrasında gerçekleşen doku iskelesi transferinin malzeme bütünlüğünü etkileyip etkilemediğine bakılmıştır.

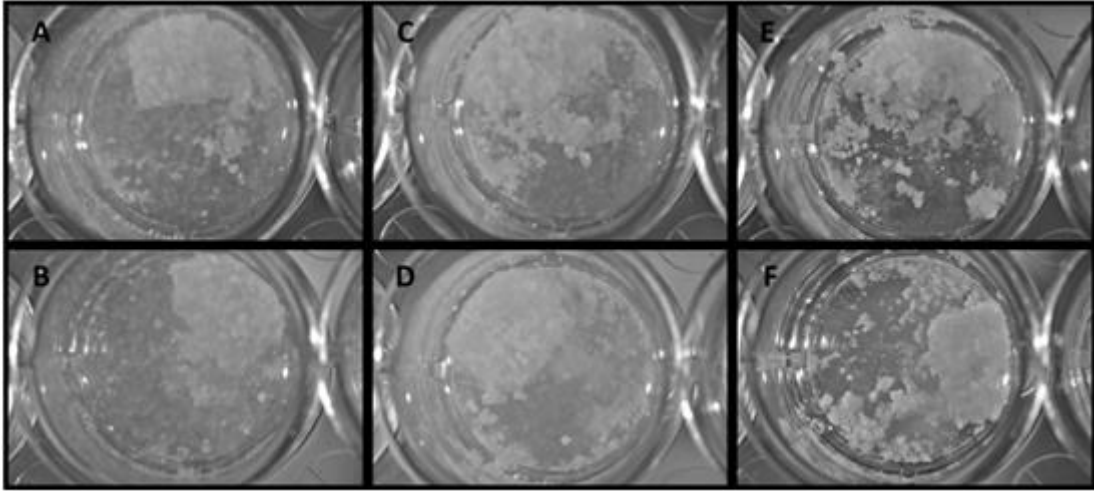
Analiz sonucunda her dört besi yerinde de malzemeleri ıslatmadan 1 saat sonrasında dağılma görülmüştür. 5 saat içerisinde, doku iskelelerinden β -TCP partiküllerinin besin ortamına dağıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. Farklı sıvı besi yerlerinde ıslatılan doku iskelelerinin morfolojisi. A-D) Islatılmadan 1 saat sonra. E-H) Islatılmadan 5 saat sonra. I-L) Islatılmadan 24 saat sonra. M-P) Transferden sonra (24 saat). A, E, I, M) Alpha-MEM. B, F, J, N) DMEM. C, G, K, O) MG63 katkılı besiyeri. D, H, L, P) PBS

Bu çalışmaların sonucunda osteojenik geliştirmeyi hızlandırıp artırması düşünülen üç boyutlu, kolajen ve β -TCP'den oluşan sentetik kemik greftinin hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını artırdığı ve biyoyumlu olduğu görülmüştür. 2 saatlik inkübasyon sonrasında oluşturulan doku iskelelerinden β -TCP partikülleri ayrılmaya ve ekimi yapılan hücrelerin bir kısmı besin ortamına geçmeye başlamıştır. Başlangıçta yapılan hücre ekiminin etkisini ölçmek için doku iskeleleri 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına aktarılmış ve yapının bütünlüğünde dağılmalar görülmüştür. Oluşturulan yapıya bağlanamamış hücreler enkazlar arasında kalmış; böylece bu hücrelerin yapıya bağlanacak zamanlarının olmadığı anlaşılmıştır. Katkılı besi yerinin pH'sı ise ölçüldüğünde normal aralıkta çıkmıştır (pH 7,3). Ayrıca her bir kuyucuğa konulan besi yeri miktarının doku iskelesi dağılmasıyla ilişkisini ölçmek için de 1 mL ve 2 mL besi yeri ile doldurulan kuyucuklarda bir

farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Doku iskelesi bütünlüğünün değişik ortamlarda değişimini incelemek için ise farklı bir deney yapılmış ve hücre konulmadan 30 dakikada bir gözlem yapılmıştır. 60 dakika içinde ise dağılma gözlemlenmiş ve bu süreç 24 saate kadar devam etmiştir. Test edilen besi yerlerinin pH'ları ise normal aralıklarda çıkmıştır ve böylece kullanılan besi yeri varlığının bozunma ile ilişkisinin olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca 24. saatte dağılma gözlenen doku iskelelerinin başka bir hücre kültür kabına aktarılması yapılamadığından ve hücre ekiminin 2 saat sonrasında da dağılma gerçekleştiğinden transfer işleminin de doku iskelesinin dağılmasını tetikleme ihtimalleri elemine edilmiştir. Fakat yine de analizler sonucunda oluşturulan doku iskelelerinin hücre etkileşimlerini etkilemediği görülmüştür. Önceki analizde olduğu gibi aynı ölçülerde kesilen doku iskeleleri hemen 24 kuyulu hücre kültür kabına alınmış ve üzerlerine yine önceki çalışmada kullanılan besi ortamından 1'er mL ilave edilmiştir ve 12., 24., 36. saatlerde gözlem yapılmıştır. Analize ilişkin görüntüler Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. 12 Saat (A ve B), 24. Saat (C ve D), 36. saatlerde (E ve F) doku iskelesinin bozunma davranışı. (X6.3 büyütme)

Sitotoksosite ölçümü için 6 mm x 6 mm boyunda kesilen doku iskelesinin üzerine MG63 osteosarkoma hücre hattı ekilmiştir. Besin ortamı olarak %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu içeren α -MEM kullanılmıştır. 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 0.5×10^6 hücre olacak şekilde yerleştirilen doku iskelelerinin üzerine hücre solüsyonunun eşit dağıldığından emin olmak için her bir

göze toplamda 100 µL MG63 olacak şekilde 5 kez 20µL besin ortamı eklenmiştir. Böylece ekimi yapılan doku iskelesinden hücre süspansiyonunun sızması da önlenmiş olmaktadır. Ekimi yapılan doku iskeleleri 2 saat boyunca inkübasyon için 37°C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılmış ve süre sonunda MTT analizi için toplam hacim 1 mL olacak şekilde üzerlerine MG63 besin ortamı ilave edilmiştir. 45. ve 70. saatlerde (n=4x3) MTT protokolü uygulanmış ve standart eğri aynı metotla oluşturulmuştur. MTT analizi sonuçlarında standart eğriye (R²=0.99) karşın herhangi bir kantitatif sonuç çıkmamıştır. Standart eğri hesaplaması için 0.2x10⁶ sayıda en düşük hücre sayısına sahip numune kullanılmıştır ve bu değer başlangıç hücre yoğunluğunun %40 kadardır. 45 saat içerisinde hücre canlılığı bu değer altına düşmüş ve 70. saatin sonuna kadar da düşmeye devam etmiştir.

Sonuç olarak dağılma testi ve MTT analizi sonucunda sentetik kemik doku iskelelerinin bütünlüğünde hücre kültür ortamında dağılmalar olduğu görülmüş fakat doku iskelelerinde hücre canlılığının korunduğu not edilmiştir. Ayrıca doku iskelelerine yapılan canlı/ölü hücre boyama görüntülerine bakıldığında 192 saatlik kültür boyunca hücre canlılığı fazla olmasına karşın MTT analizinde boyama sonuçlarına göre canlılık daha az çıkmaktadır. Bunun nedeni ise MTT analizinde toplam canlılığa bakılırken canlı/ölü boyama analizinde hücre içeren doku iskelesi enkazı da hesaba katılmaktadır.

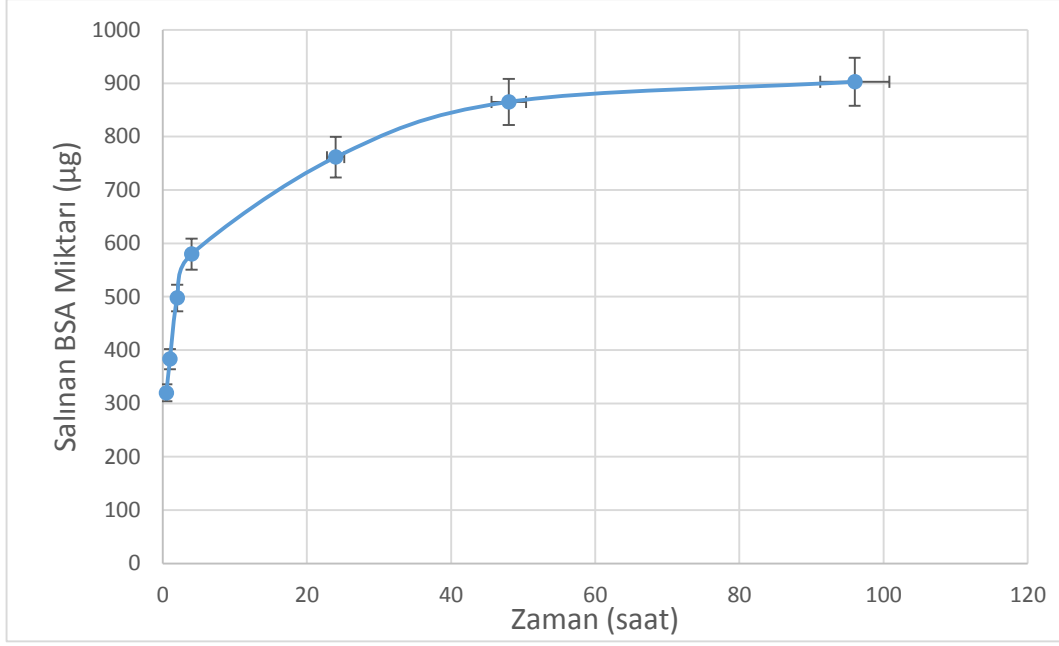
Hücre kültürü çalışmalarına paralel olarak doku iskelelerinin aynı zamanda vücut içerisinde bozunma davranışını öngörebilmek için Ringer çözeltisinde bozunma deneyine tabi tutulmuşlardır. Bozunma ortamı olarak %1 antibiyotik-antimikotik (penisilin-streptomisin & amfoterisin) içeren Ringer çözeltisi seçilmiştir. Bu amaçla hazırlanan Ringer çözeltisi otoklavlanarak steril edilmiş ve pH değeri 7,38 değerinde çıkmıştır. Solüsyonun pH değerinin vücut içi pH değeri olan 7,4'e yakın olması oldukça önemlidir. Steril ortamda yaklaşık 10x12 mm boyutunda kesilen doku iskelelerinin kuru ağırlıkları ölçülmüş ve her erlen için iki numune olacak şekilde taksim edilmiştir. Her bir ay için toplamda 6 erlen hazırlanarak, seçilen zaman noktaları sonunda bir erlendeki malzemelerin kuru ağırlıklarının ölçümünün

yapılması planlanmıştır. 37°C de çalkalamalı su banyosunda çok düşük hızda deney devam ettirilmiştir.

Çalışmalar sırasında, bir hafta içerisinde sentetik kemik greftinin Ringer çözeltisi içerisinde tamamen disintegre olduğu ve parçalara ayrıldığı görülmüştür. Doku iskelesini oluşturan seramik kısım (β -TCP) solüsyon içerisinde çözünmezken; polimerik kısım olan kolajen ise ayrılmış ve malzemenin bütünlüğü kaybolmuştur. Böylece çalışma bir süre daha devam ettirilmiş fakat kuru ağırlık ölçülemeyeceğinden analiz sonlandırılmıştır. Malzemenin *in vivo* implantasyonunda tamamen çevre dokuyla sarılacağı ve bu deneydeki gibi çok yüksek miktarlarda sıvılarla temasta olmayacağı düşünülmektedir. Ayrıca malzemenin bu davranışının vaskülerizasyona yardımcı olacak boşluklar oluşturacağı ve daha etkin bir iyileşme sağlayabileceği ön görülmektedir.

4.3 Kontrollü BSA Salım Çalışması

Kolajen/ β -TCP doku iskelelerine hayvan çalışmalarında BMP-2 ve TGF- β 1 büyüme faktörleri emrilerek verilecektir. Büyüme faktörlerinin hazırlanan doku iskelelerinden salımını incelemek amacıyla model protein olan sığır serum albümini (BSA) doku iskelelerine yüklenmiş ve belirli zaman noktalarında örnekler alınarak incelenmiştir. Önceden hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak doku iskelelerinden salınan BSA miktarları belirlenmiştir. Şekil 4.27.'de verildiği üzere doku iskelelerine yüklenen BSA'nın (her bir doku iskelesi için 1200 μ g) yaklaşık %63'ü ilk 24 saat içinde salınmış ve 4. günün sonunda denge durumuna gelmiştir. Gözenekliliğin yüksek oluşu nedeniyle kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin kontrollü salım için uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.27. Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinden BSA salım grafiği (n=5)

4.4 *In vivo* Hayvan Çalışmaları

Hayvan çalışmalarında kullanılan 120 sıçan, kranyum ve femur olmak üzere iki farklı çalışma grubuna bölünmüştür. Femur çalışmalarında her grupta 12 hayvan olacak şekilde 5 grupta çalışılırken (Şekil 4.28.); kranyum defekti çalışmalarında her grupta 10 hayvan olacak şekilde 6 grupta çalışılmıştır. Gruplar sırasıyla; kontrol (1), otogreft (2), doku iskelesi (3), doku iskelesi+BMP-2 (4), doku iskelesi+TGF- β 1 (5), doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1 (6) şeklindedir.

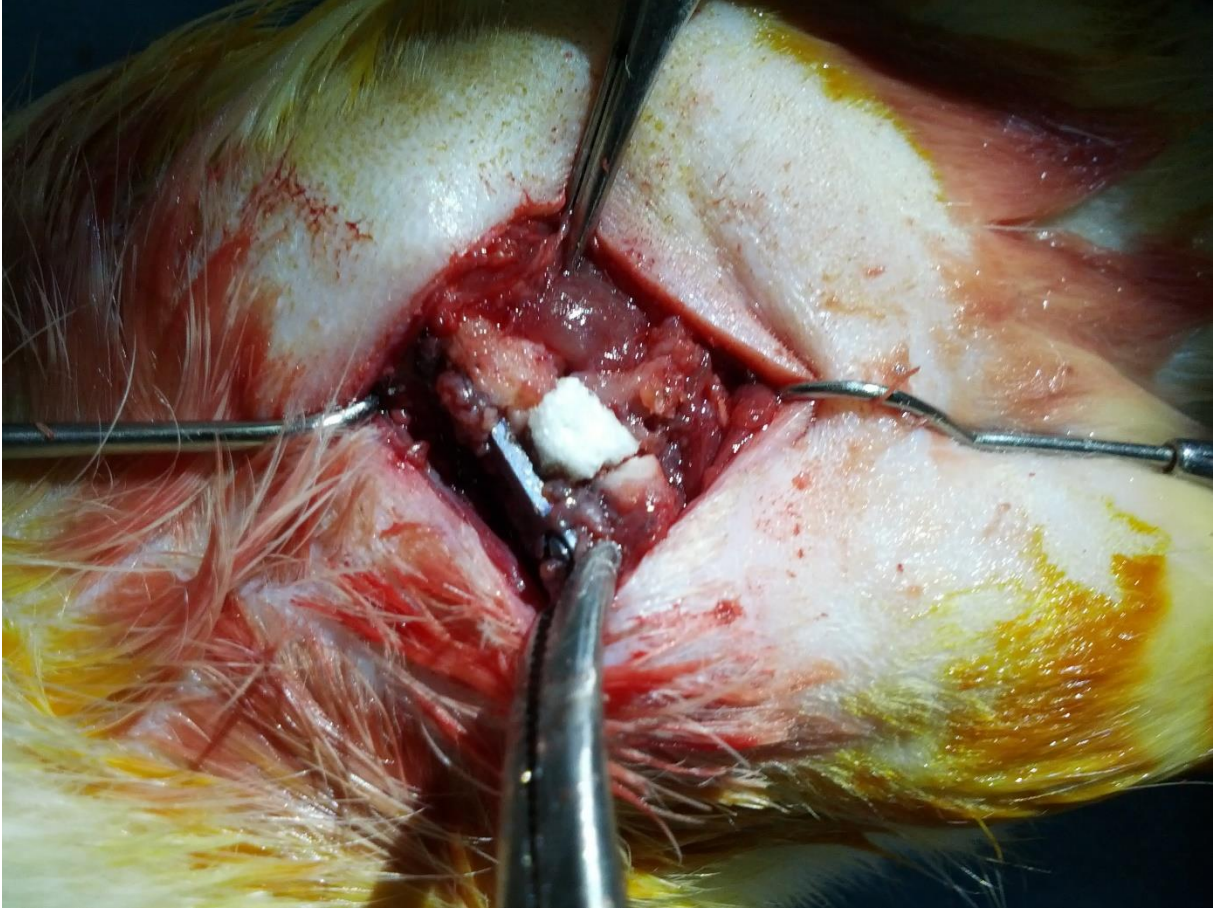
Femur çalışmasında, kranyum çalışmasında bulunan otogreft grubu bulunmamaktadır. Oluşturulan gruplar, kullanılan hayvan sayısı ve ortalama ağırlıkları Çizelge 4.7.' verilmiştir. Çalışmada kullanılan büyüme faktörü operasyon esnasında doku iskelesine emdirerek uygulanmıştır. Kranyum modelinde çalışmanın 4. ayında; femur modelinde ise 6. ayında hayvanlar CO₂ inhalasyonu ile sakrifiye edilmiştir. Defekt bölgesi tekrardan açılarak alınan numuneler formol çözeltisinin içine konulmuştur. Çalışmaya başlamadan önce ve sonra hayvanların ağırlıkları not edilmiştir.

Çizelge 4.7. Hayvan deneylerinde kullanılan hayvanlar ve sakrifikasyon sonrası özellikleri

Çalışma Türü	Gruplar	Kalan Hayvan Sayısı	Ortalama Ağırlık (g)
Femur	Kontrol	5	413
	Doku iskelesi	7	368
	Doku iskelesi+BMP-2	6	366
	Doku iskelesi+TGF- β 1	10	443
	Doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1	8	400
Kranyum	Kontrol	4	390
	Otogreft	5	385
	Doku iskelesi	7	358
	Doku iskelesi+BMP-2	10	397
	Doku iskelesi+TGF- β 1	8	386
	Doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1	8	392

Femur gruplarında sakrifikasyon öncesi dönemde hayvan ölümü kranyum grubuna göre daha fazla gözlenmiştir. Kontrol grubunun tamamında kemik fragmanları hareketli olup, bacağın üst ve alt kısmı birbirinden bağımsız hareket etmektedir. Hayvanların çoğunda inguinal (kasık) bölgede ve defekt alanında apse oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca kemikleri sabitlemek için yerleştirilen plak ekspozelmiştir. Doku iskelesi grubunda yine apse oluşumu, osteomyelit ve osteoporoz oluşumu

gözenmiştir. Doku iskelesi+BMP-2 grubunda hayvan ölümü daha fazla gerçekleşmiş ve istatistiksel hesaplamalar için yeterli sayıya ulaşmak adına ex olan hayvanların femurları alınıp saklanmıştır. Histolojik analizlerinde deney süresi hesaba katılacaktır. Sadece bir hayvanda plak dışarıdan görünür durumda olup, genel olarak doku iskelesi ve kontrol grubuna göre hayvanların durumu daha iyidir. Doku iskelesi+TGF- β 1 grubunda sadece bir hayvanda plak ekspozedir ve yeni kemik oluşan denek sayısı daha fazladır. Doku iskelesi BMP-2+TGF- β 1 grubunda ise sorun gözlenmemiştir. Sıçanların çok hareketli hayvanlar olması, kafesteki diğer hayvanların dikişlerini kemirmeleri, kan kokusuna hassas olup saldırımları ve dokularının rejenerasyon hızlarının fazla oluşu gibi nedenler femur çalışmasında yukarıda belirtilen aksaklıkların oluşmasını etkilemiştir.



Şekil 4.28. Femur çalışmasında doku iskelesi yerleşimi

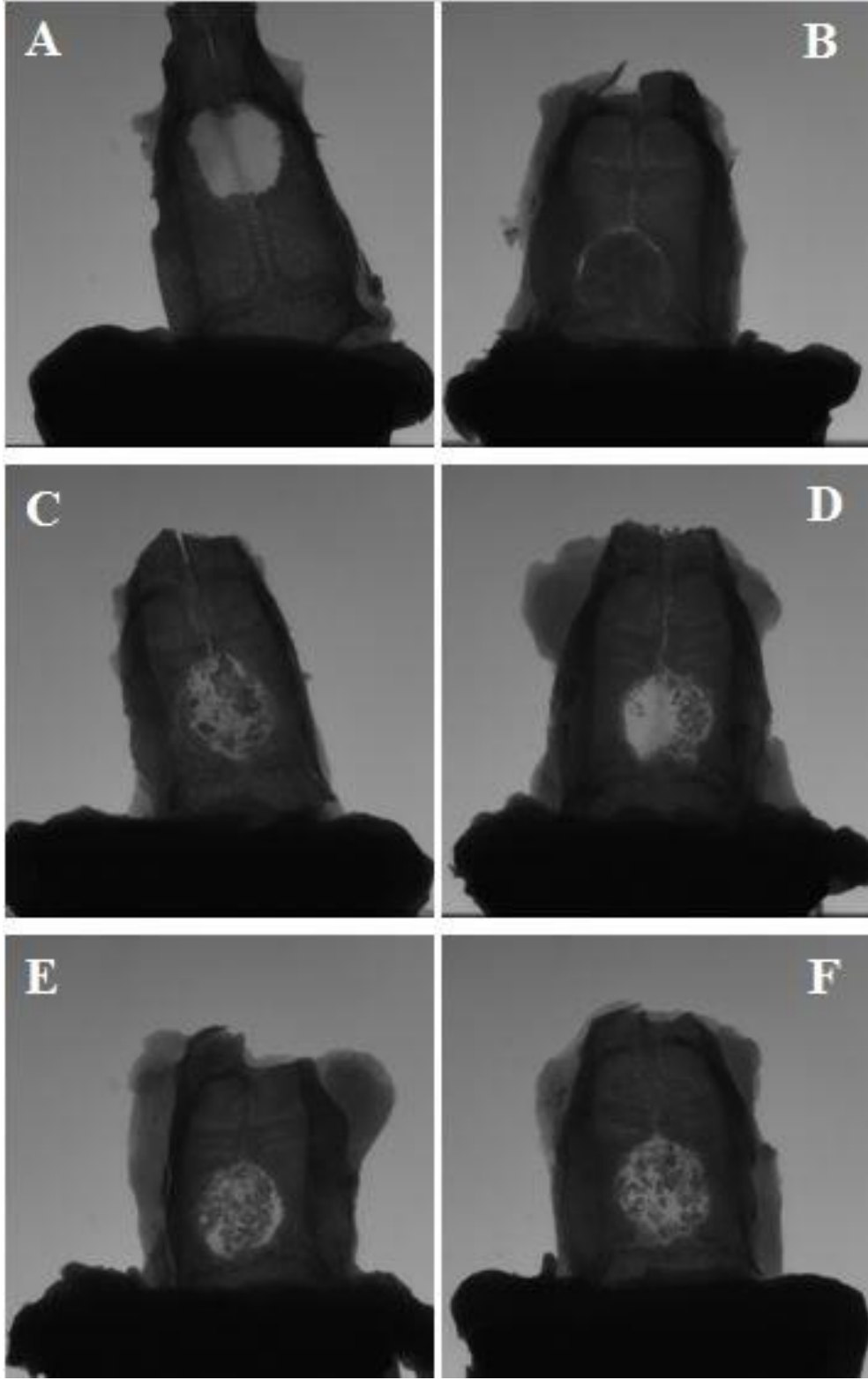
Kranyum grubunda ise sakrifikasyon öncesi hayvan ölümü çok nadir olup, hayvanlar ex edildikten sonra spesimenler formol çözeltisi içerisinde saklanmıştır. Hayvanların ex edilmesinden sonra yapılan genel gözlemler sonucunda kontrol grubunda bir iyileşme görülmemiştir. Defekt alanı çalışma başlangıcındaki büyüklüğünü korumuştur. Altın standart olarak nitelendirilen otogreft uygulamasında ise en iyi gelişme gözlenmiştir ve defekt alanı kapanmıştır, yine de defekt sınırları halen belli olmaktadır. Diğer doku iskelesi kullanılan gruplarda ise doku iskelesi defekti doldurmuş ve orta kısımdan bozunmaya başlamıştır. β -TCP granülleri belirgin bir şekilde gözükmemektedir. Sagittal sinüs intakt olup, kafatası konkavlığı normaldir. Beyne yapışma spesimenlerin çoğunda görülmüştür (Şekil 4.29.).



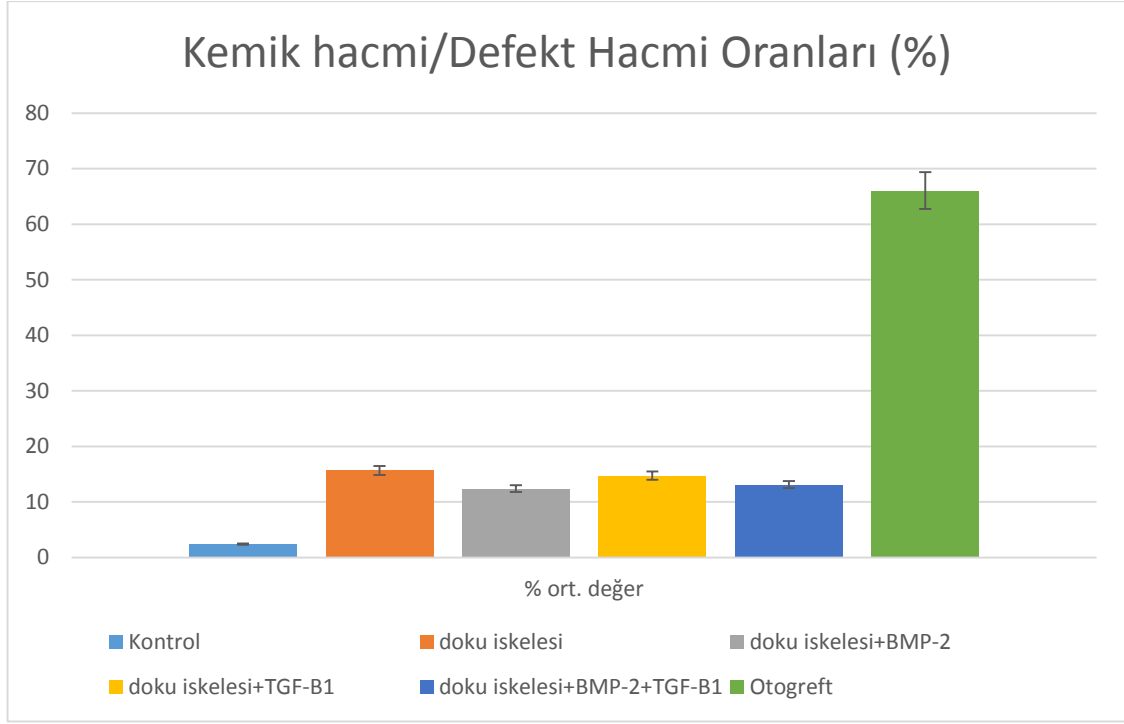
Şekil 4.29. Kranyum çalışması sonrası spesimen örnekleri. (A) doku iskelesi ve (B) otogreft grubu

Spesimenlere μ -CT analizi yapılmış olup analiz görüntüleri Şekil 4.30.'da verilmiştir. Ayrı bir yazılımla sadece defekt bölgesindeki kemik hacmi ölçülmüş ve çalışma başında oluşturulan 8 mm çapında ve 1 mm yüksekliğindeki silindirik defekt hacmine oranlanmıştır. İstatistiksel hesaplamalarda ($p < 0,05$) değerine bakılarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Böylece yeni oluşan kemik yüzdesi

kemik hacmi/defekt hacmi oranı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.31.'da gruplara göre kemik rejenerasyonu en fazla otoplast grubunda (%66) görülürken; doku iskelesi içeren gruplar benzer özellikler sergilemiş ve %15 dolaylarında kalmışlardır ($p < 0,05$). Kontrol grubunda ise %2 oranında değer elde edilmiştir.

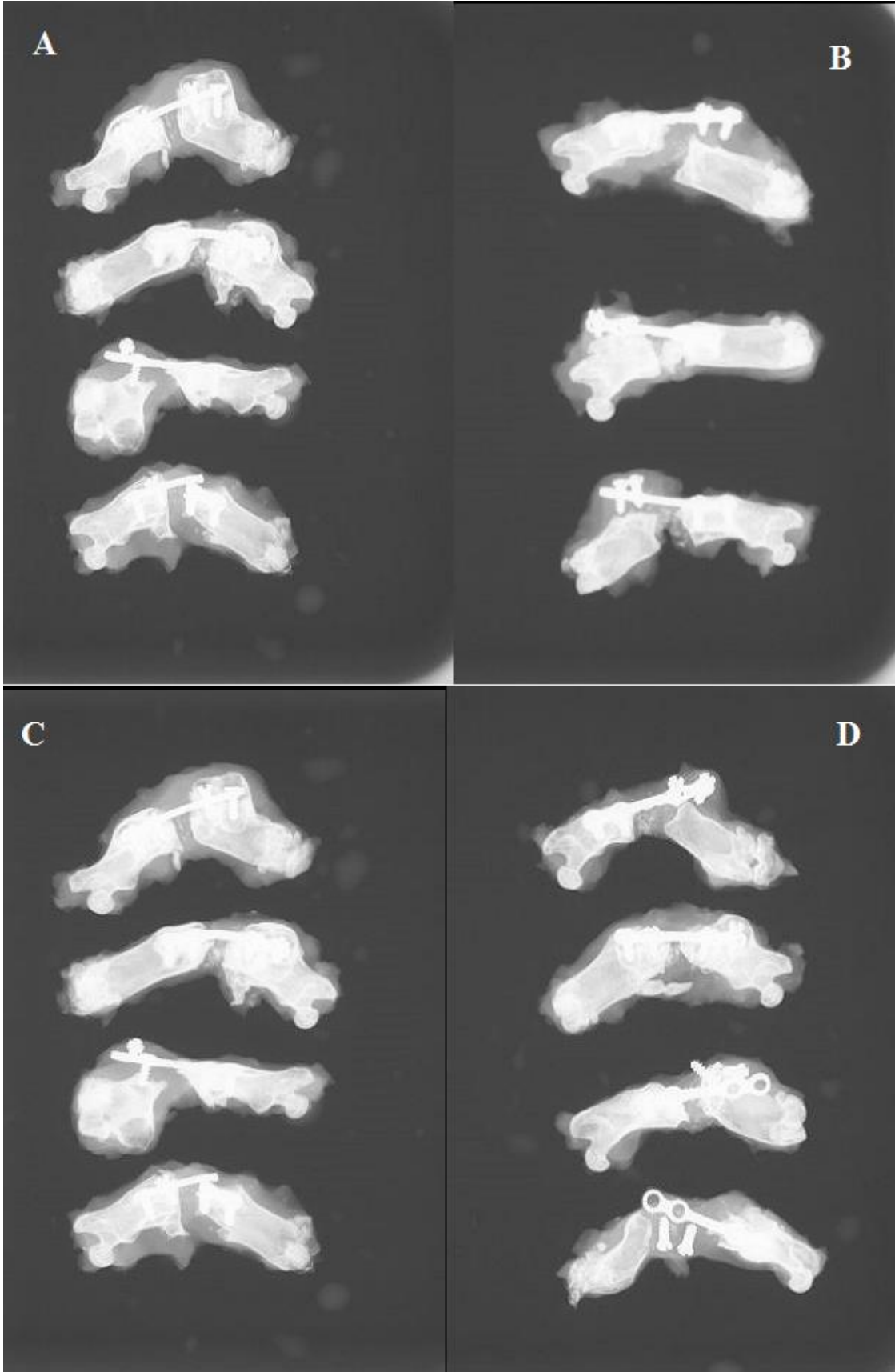


Şekil 4.30. Kranyum çalışması sonrası μ -CT görüntüleri (A) kontrol, (B) otoplasti, (C) doku iskelesi, (D) doku iskelesi+BMP-2, (E) doku iskelesi+TGF- β 1, (F) doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1

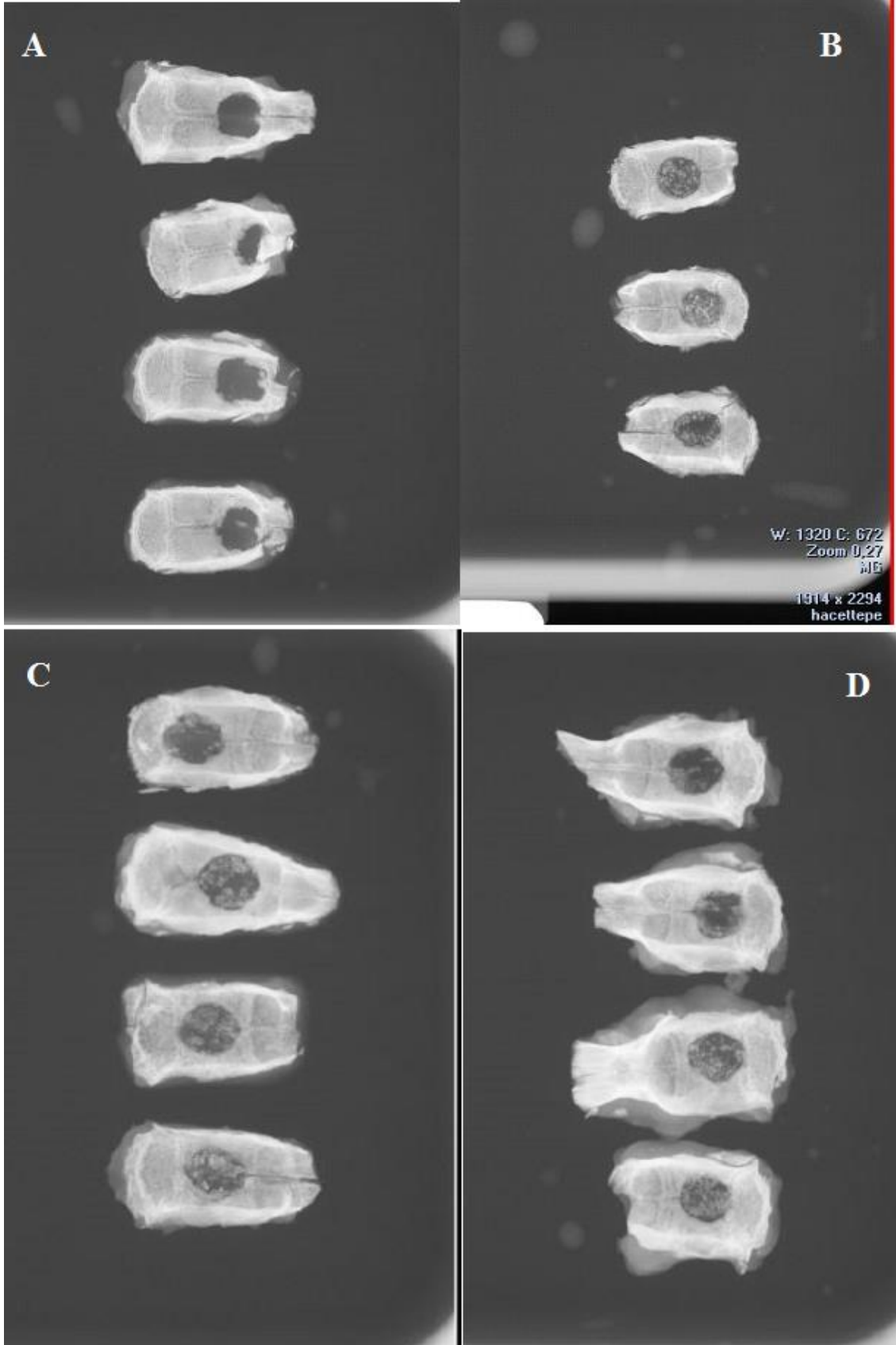


Şekil 4.31. Kranyum çalışmasında μ -CT analizi sonuçlarına göre defekt bölgesinde yeni kemik oluşum oranları ($p < 0,05$)

Hayvan deneyleri sonunda elde edilen spesimenlere mamografi analizi uygulanmıştır. Femur modeli için mamografi görüntülerinde, plak kırığı, vida çıkması, düzensiz kemik gelişimi gözlemlenmiştir. Kranyum modeline ait görüntüler ise μ -CT analizine benzer çıkmıştır. (Şekil 4.32, Şekil 4.33)



Şekil 4.32. Femur modelinde mamografi görüntüleri (A) kontrol, (B) doku iskelesi, (C) doku iskelesi+BMP-2, (D) doku iskelesi+TGF- β 1



Şekil 4.32. Kranyum modelinde mamografi görüntüleri (A) kontrol, (B) doku iskelesi, (C) doku iskelesi+BMP-2, (D) doku iskelesi+TGF-β1

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Çalışmada kemik dokusunu en iyi şekilde taklit edebilmek amacıyla kemik matriksinde en çok bulunan malzemeler olan kolajen Tip-I ve kalsiyum fosfat bileşiği olan β -TCP ana girdi olarak belirlenmiştir. Kolajen çözücüsü olarak sitotoksik etki yaratmayacak, oldukça seyreltik 0,1 N asetik asit solüsyonu kullanılmıştır. Hazırlanan bu kolajen çamuruna 0,5-1 mm partikül büyüklüğünde β -TCP (80/20 w/w) eklenerek karışım hazırlanmıştır. Gözenekli yapılar dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilmiştir. Çapraz bağlanma ise DHT yöntem kullanılarak düşük basınç altında ve 110°C'de gerçekleştirilmiştir. DHT süresi 5 gün olarak belirlenen çalışmada aynı zamanda 1 ve 3 günlük DHT süresi olan doku iskeleleri de incelenmiştir. Ayrıca hazırlanan doku iskelelerinin bir kısmı gama radyasyonu ile steril edilirken, bir kısmı sterilizasyonunun çapraz bağlanmaya olan etkisini belirlemek amacıyla steril edilmemiştir.
- SEM analiz sonuçlarında kolajen/ β -TCP doku iskelesinin tipik yüzey topografyası gösterdiği tespit edilmiştir. Doku iskelesinin oldukça gözenekli ve bu gözeneklerin açık yapıya sahip olduğu, β -TCP partiküllerinin çapraz bağlanma sonrası kolajen yüzeyine yapıştığı ve oldukça homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek büyütmelelerde ise β -TCP partiküllerinin agregasyona uğradığı belirlenmiş ve bunun nedeninin dondurarak kurutma işleminden kaynaklanabileceği düşünülmüştür [80]. Steril edilmeyen örneklerde ise β -TCP partiküllerinin daha az bağlanma gösterdiği bulunmuştur. Doku iskelelerine uygulanan doz (25kGy) malzemenin daha ileri şekilde çapraz bağlanmasını sağlamıştır.
- μ -CT analizi ile hazırlanan doku iskelelerinin gözenekliliği hesaplanmış ve toplam gözeneklilik %65,63 olarak bulunmuştur. Açık gözeneklilik oranı ise %65,54'tür. Bu veri kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin gözeneklerinin tamamen açık ve birbiriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Kansellöz ya da trabeküler kemiğin gözeneklilik oranı yaşa, bulunduğu anatomik bölgeye göre değişse de ortalama %30-90 arasında değişmektedir [81]. Doku

iskelelerinin gözenekliliği ise oldukça optimal olup, hem hücre göçünü ve çoğalmasını sağlayabilecektir hem de çok yüksek (~%90) gözenekliliğe sahip olmadığından mekanik dayanımı da yeterli olacaktır. Bunlara ek olarak, μ -CT radyografilerinde de yapının oldukça homojen dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

- XRD analizi ile hazırlanan doku iskelelerinin minerolojik analiz yapılmış ve β -TCP partiküllerinin saflığı belirlenmiştir. Elde edilen pikler literatür ve JCPDS (9-169) veri tabanı ile karşılaştırıldığında malzemenin içeriğinde sadece β -TCP'in olduğu ve hidroksiapatit ya da α -TCP gibi başka kalsiyum fosfat içeriklerinin olmadığı belirlenmiştir [80-86]. Standart ile çalışmada kullanılan β -TCP arasında başka bir faz ya da kayma görülmemiş ve β -TCP partiküllerinin tamamen saf olduğu sonucuna varılmıştır. Gama sterilizasyonunun ise XRD spektrumlarında fark oluşturmadığı ve böylece gama radyasyonu ile sterilizasyonun malzemenin minerolojik yapısını etkilemediği bulunmuştur.
- FT-IR analizi kolajen/ β -TCP doku iskelesinin içerdiği bileşikler test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarında sadece kolajen ve β -TCP partiküllerine ait bantlar elde edilmiştir. Literatür taramalarıyla eşlecek şekilde 3324 cm^{-1} 'de Amid A (N-H gerilimi), 3100 cm^{-1} 'de su içeriğine ait O-H bandı, 1630 cm^{-1} 'de Amid I (C=O gerilimi), 1543 cm^{-1} 'de Amid II (C-N gerilimi ve N-H bükülmesi), 1452 cm^{-1} 'de Amid III (CH₂ bağı) bantları elde edilmiştir. Saf kolajenin ve doku iskelelerinin FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında aynı noktalarda pikler verdikleri görülmüştür, fakat çapraz bağlanma etkisiyle amide A ve OH bantlarının alanları çapraz bağlanma esnasında su kaybından dolayı azalmıştır. Aynı şekilde sterilizasyon öncesi ve sonrası FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında gama radyasyonunun çapraz bağlayıcı etkisinin olduğu yine pik altında kalan alanlardan anlaşılmıştır [83, 87-89].

- TG-DTA analizinde ise kolajenin denatürasyon sıcaklığı 50°C civarında bulunmuştur. Vücut sıcaklıklarının üzerinde kolajenin üçlü heliks yapısının bozulması ile denatürasyon gerçekleşmiş, kovalent bağların tamamen yıkımı ile de kolajen 130°C'de degradasyona uğramıştır. Steril örneğin denatürasyon sıcaklığının steril olmayan örneğe göre daha düşük çıkmasının nedeni gama sterilizasyonunun kolajenin yapısını etkilemiş olmasından kaynaklanabilmektedir [90]. Kolajenin izolasyon tekniği, kolajenin tipi ve su içeriği gibi özellikler denatürasyon sıcaklığını etkilemektedir [91]. Termogravimetrik analiz sonuçlarına göre de kolajen/ β -TCP doku iskeleleri toplamda en fazla %33,3 lük bir ağırlık kaybı yaşanmıştır. İlk aşamada yapıdaki su uzaklaşırken, ikinci aşamada polimer kısmı olan kolajen degradasyona uğramış ve üçüncü aşamada ise malzeme karbonizasyona uğramış, tamamen yanmıştır. Hazırlanan doku iskelesinin diğer çapraz bağlanmış kolajenlere göre erime sıcaklığı daha düşük olsa da doku iskeleleri termogravimetrik analizde daha az ağırlık kaybetmiştir [92,93].
- Dehidrotermal yöntem ile muamele süresi 1, 3, 5 gün olan kolajen/ β -TCP doku iskelelerine yapılan basma analizleri sonuçlarına göre basma mukavemeti en iyi olan örnek 3,07 MPa basma modülüs ile 3 günlük DHT uygulanan doku iskelesi olmuştur. Trabeküler kemiğin basma modülüne (2-12 MPa) oldukça uygun [81] çıkan sonuçlarda 5 gün DHT uygulanan örneğin basma modülüsü 2,22 MPa olmak üzere 3 gün DHT uygulanan örneğe göre daha düşüktür. Araştırmalara göre DHT yöntem sıcaklığının artışı malzemenin çapraz bağlanmasını artırırken, sürenin artışı ters etki oluşturmakta ve kolajen denatürasyonunu sağlamaktadır [88]. Buna rağmen doku iskelelerinin mekanik dayanımı diğer çalışmalara göre oldukça yüksektir [94-96].
- ESR analizi ile gama radyasyonunun (25 kGy) doku iskelelerinde serbest radikal oluşturmadığı 3500 Gauss bölgesinde dalgalanma olmamasından belirlenmiştir. Gama radyasyonu ile sterilizasyonu yapılmayan örneklere de ESR analizi uygulanmış ve steril örneklerle arasında bir fark

görülmendiğinden uygulanan dozun olumsuz bir etki oluşturmadığı sonucuna varılmıştır [97].

- Şişme testi 1, 3, 5 gün boyunca DHT yöntemine tabi tutulan doku iskelelerine uygulanmış ve şişme davranışı 2 gün sonunda dengeye gelmiştir. Şişme kapasitesi hücre büyümesi ve farklılaşması için oldukça büyük önem taşımaktadır ve çapraz bağlanma yoğunluğuna, kolajen ve β -TCP içeriğine bağlı olmaktadır [98]. 1 gün DHT uygulanan doku iskelesinin şişme kapasitesi en yüksek sonucu vermiş (%74,5) ve DHT süresi arttıkça bu oran bir miktar düşmüştür (3 gün için %74, 5 gün için %72). Çapraz bağlanan yapıların gözenek genişliği bir miktar azalacağından daha az su tutabilmektedirler.
- Hazırlanan doku iskelelerinden BSA salımı incelenmiştir ve patlama etkisi olduğu belirlenmiştir. Yüklenen BSA miktarının büyük bir bölümü 24 saatin sonunda salınmış olsa da 4. günün sonunda hala ortamda başlangıç miktarının %25'i bulunmaktadır. Doku iskelelerinin yüksek gözenekliliğe sahip oluşu ve bu gözeneklerin birbiriyle bağlantı olmasından dolayı yüklenen BSA proteininin ortama salınmak için uzun yol alması gerekmekte ve böylece salım süresi uzamaktadır. Bu yüzden kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin hayvan çalışmalarında kullanılacak olan büyüme faktörlerinin salımı için uygun olduğu bulunmuştur.
- Kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin *in vitro* ortamda hücre kültürü analizleri ile sitotoksitesi, dağılma davranışı incelenmiş ve hayvan çalışmaları için ön bilgiler elde edilmiştir. Analizlerde 5 gün boyunca DHT yöntemiyle çapraz bağlanan örnekler kullanılmıştır. Dağılmayı test etmek için numuneler farklı besin ortamlarına konulmuş ve 1 gün sonunda malzemede dağılmalar, kopmalar olduğu gözlenmiştir. Doku iskelelerinde dağılma, büyüme faktörlerinin salımı, damarlanmanın artması, yüzey alanının artışı gibi süreçlerde olumlu etki yapacağından sorun teşkil etmemektedir. Aynı zamanda doku iskelelerine sitotoksite analizini gerçekleştirebilmek için MG63 osteosarkoma hücre hattı ekilmiş ve MTT analizi ile sitotoksik etki

oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir. Yapılan analizler neticesinde kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin sitotoksik etki oluşturmadığı tespit edilmiştir.

- Üzerlerine hücre ekilen kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin 8 gün içerisinde dağıldığı gözlenmiştir. 8 günün sonunda doku iskelelerine canlı/ölü boyama yapılmış ve her ne kadar doku iskelesinde dağılmalar olsa da hücre canlılığı yüksek bulunmuştur. Doku iskelelerinin erken dağılma göstermelerinin birincil nedeni hücre kültüründe, vücut içerisine göre daha fazla miktarda sıvıya maruz bırakılmalarıdır. Hayvan çalışmalarında kranyum ya da femur kemiklerinde açılacak defektlere yerleştirilecek olan doku iskeleleri hücre kültüründeki miktarlarda kan akışına maruz kalmayacak, hatta hemostatik özellikleri sayesinde fazla kan akışını engelleyebileceklerdir. İkincil neden olarak doku iskelelerinin çapraz bağlanma yoğunluklarının fazla oluşu β -TCP partiküllerinin dağılmasına neden olabilmektedir.
- Çalışmanın son aşamasında hazırlanan kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin 120 adet Sprague Dawley cinsi sıçanın kranyum ve femur kemiklerinde kritik boyutta açılan defektlere implantasyonu gerçekleştirilmiştir. Kranyum çalışmasında 1 mm yüksekliğinde 8 mm genişliğinde kritik boyutta defekt oluşturulurken; femur çalışmasında 4 mm genişliğinde ve 3 mm yüksekliğinde defekt oluşturulmuştur. Femur grubunda kontrol (1), doku iskelesi (2), doku iskelesi+BMP-2 (3), doku iskelesi+TGF- β 1 (4), doku iskelesi+BMP-2+TGF- β 1 (5) grupları çalışılırken, kranyum çalışmasında bunlara ek olarak otogreft grubu da çalışılmıştır.
- Femur çalışmasında 6 ay; kranyum çalışmasında 4 ay sonra sakrifiye edilen sıçanların spesimenleri alınıp, %10'luk formol solüsyonunda saklanmıştır. Spesimenlere μ -CT analizi yapılarak yeni oluşan kemik hacmi belirlenmiş ve mamografi analizi ile deney sonrası görüntüler elde edilmiştir. Makroskopik izlenimlere göre kranyum çalışması oldukça başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. İmplant edilen doku iskeleleri defekt alanını tamamen doldurmuş ve yeni kemik oluşumu dışarıdan başlamıştır.

Kontrol grubunda iyileşme gözlenmezken, otogreft grubunda ise defekt alanının büyük bir kısmı kapanmıştır. Doku iskelesi içeren gruplarda yeni kemik oluşmu başlamıştır. Sagital sinüs intakttır.

- Femur çalışmasında kranyum çalışmasına göre daha fazla hayvan ölümü gerçekleşmiştir. Çalışılan gruplarda kemiği sabitlemek için kullanılan plağın ekspoze olması, apse varlığı, osteomyelit ve osteoporoz oluşumu belirlenmiştir. Büyüme faktörü içeren gruplarda daha sağlam spesimenler alınabilmiştir. Femur çalışmasında iyileşmez kemik defekti oluşturulması böylece rejenerasyonun daha zor olması, sıçanların çok hareketli hayvanlar olması nedeniyle femurlarının atele alınıp sabitlenememesi ve bazı hayvanlarda plağın kırılması ya da vidanın dışa doğru oluşan kuvvetler nedeniyle yerinden çıkması gibi aksaklıklar oluşmuştur.
- Femur çalışmasından alınan spesimenlere yapılan μ -CT analizinde plak ve vidanın çıkarılmamasından dolayı düzgün görüntü elde edilememiştir. Kranyumdan alınan spesimenlere uygulanan μ -CT analiz sonuçlarına göre yeni kemik dokusu oluşumu en fazla otogreft grubunda gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise iyileşme olmamıştır. Doku iskelesi ve doku iskelesi+büyüme faktörü içeren gruplara bakıldığında ise kemik rejenerasyon oranları benzer çıkmıştır.
- Yukarıda bahsedilen sonuçlar ve çıkarımlar doğrultusunda tez kapsamında oluşturulan kolajen/ β -TCP doku iskelelerinin belirlenen amaç ve hedeflere uygun olduğu bulunmuştur. Doku iskeleleri oldukça biyouyumlu olup, gözeneklilik oranı ve gözenek yapısı, mekanik dayanımı gibi özellikler bakımından hedef kemik dokusuna uygundur. DHT yöntemi kullanılarak yapılan çapraz bağlanma sayesinde malzeme sitotoksik etki oluşturmamıştır. Fakat şişme ve basma testi sonuçları birleştirildiğinde DHT uygulama süresinin azaltılabileceği düşünülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda, karakterizasyonu yapılan doku iskeleleri hücrelerle desteklenebilir, PRP, hormon, sitokin ya da başka büyüme faktörleri

mikroküre, nanoküre gibi ayrı bir taşıyıcı sistem kullanılarak kemik rejenerasyonu artırılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L., Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743–765, **2004**
- [2] Sachlos, E., Reis N., Ainsley, C., Derby, B., Czernuszka, J. T., Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication, *Biomaterials*, 24, 1487–1497, **2003**
- [3] Bergmann, C. P., Stumpf, A., *Dental Ceramics, Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*, 7.Baskı, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg,1-13, **2013**
- [4] Ratner, B. D., Bryant, S. J., Biomaterials: Where We Have Been And Where We Are Going, *Annual Reviews*, 6, 41–75, **2004**
- [5] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, E. J., *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, London, 64-73, **1996**
- [6] Langer, R., Tirrell, D. A., Designing materials for biology and medicine, *Nature*, 428, 487-492, **2004**
- [7] Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A., Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology*, Cell Press, Cambridge, 30, 10, 546-554, **2012**
- [8] Williams, D. F., On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials*, 29, 2941-2953, **2008**
- [9] Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y., Kaufman M. J., Douglas, E. P., Gower, L. B., Bone structure and formations: A new perspective, *Material Science and Engineering*, 343, 1-40, **2007**
- [10] Murphy, C. M., Haugh, M. G., O'Brien, F. J., The effect of mean pore size on cell attachment proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 31, 461-466, **2010**

- [11] Dong, J., Uemura, T., Shirasaki, Y., Tateishi, T., Promotion of bone using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells, *Biomaterials*, 23, 4493-4502, **2002**
- [12] Schmelzeisen, R., Schimming, R., Sittlinger M., Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation—a preliminary report, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 31, 34–39, **2003**
- [13] Baran, E. T., Tuzlakoğlu, K., Salgado, A. J., Reis, R. L., Multichannel mould processing of 3D structures from microporous coralline hydroxyapatite granules and chitosan support materials for guided tissue regeneration/engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 161-165, **2004**
- [14] Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L., Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression, *Tissue Engineering*, 10, 465-474, **2004**
- [15] Taboas J. M., Maddox, R. D., Krebsbach, P. H., Hollister, S. J., Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds, *Biomaterials*, 24, 181-194, **2003**
- [16] Washburn, N. R., Simon, C. G., Tona, A., Elgendy, H. M., Karim, A., Amis, E. J., Co-extrusion of biocompatible polymers for scaffolds with co-continuous morphology, *Journal of Biomedical Materials Research* 60, 20–29, **2002**
- [17] Park, H., Guo, X., Temenoff J. S., Tabata, Y., Caplan, A. I., Kasper, F. K., Mikos, A. G., Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro, *Biomacromolecules*, 10(3), 541-546, **2009**
- [18] Tanahashi, K., Jo, S., Mikos A. G., Synthesis and Characterization of Biodegradable Cationic Poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) Copolymer Hydrogels Modified with Arginine for Enhanced Cell Adhesion, *Biomacromolecules*, 3, 1030-1037, **2002**
- [19] Middleton, J. C., Tipton, A. J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21, 2335-2346, **2000**

- [20] Uhrich, K.E., Ibim, S.E.M., Larrier, D.R., Langer, R., Laurencin, C.T., Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices, *Biomaterials*, 19, 2045-2050, **1998**
- [21] Nair, L. S., Laurencin, C. T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 32, 762-798, **2007**
- [22] Seitz, H., Rieder, W., Irsen, S., Leukers, B., Tille, C., Three-Dimensional Printing of Porous Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74(2), 782-788, **2005**
- [23] Borenstein, J. T., Terai, H., King, K. R., Weinberg, E. J., Kaazempur-Mofrad, M. R., Vacanti, J. P., Microfabrication technology for vascularized tissue engineering, *Biomedical Microdevices*, 4(3), 167-175, **2002**
- [24] Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Xu Fu Lam, C., Tan, K. C., Lim, T. C., State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 245-260, **2007**
- [25] Liu, X., Ma, P. X., Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477-486, **2004**
- [26] Karageorgiou, V., Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, 26, 5474–5491, **2005**
- [27] Hutmacher, D. W., Scaffold design and fabrication Technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12(1), 107-124, **2001**
- [28] Hutmacher, D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, **2000**
- [29] Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E., Horch, R.E., Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(1), 7-19, **2006**
- [30] Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P. R. H., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D., Cell differentiation by mechanical stress, *The FASEB Journal*, 16(2), 270-282, **2002**

- [31] Kim, S. S., Park, M. S., Jeon, O., Choi, C. Y., Kim, B. S., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 1399-1409, **2006**
- [32] Anselme, K., Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials*, 21, 667-681, **2000**
- [33] Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., Quarto, R., Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone, *Matrix Biology*, 22, 81–91, **2003**
- [34] Caplan, A. I., Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine, *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341-347, **2007**
- [35] Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P., Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro, *Journal of Cellular Biochemistry*, 64, 295–312, **1997**
- [36] Webster, T. J., Siegel, R. W., Bizios, R., Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 20, 1221-1227, **1999**
- [37] Lutolf, M. P., Hubbell, J. A., Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature Biotechnology*, 23(1), 47-55, **2005**
- [38] Caplan, A. I., Mesenchymal stem cells, *Journal Orthopaedic Research*, 9, 641-650, **1991**
- [39] Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H., Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279–4295, **2002**
- [40] Prockop, D. J., Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues, *Science*, 276, 71-74, **1997**
- [41] Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keenek, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, 418, 41-49, **2002**

- [42] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science*, 284, 143-147, **1999**
- [43] Nauth, A., Ristevski, B., Li, R., Schemitsch, E. H., Growth factors and bone regeneration: How much bone can we expect?, *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 42(6), 574–579, **2011**
- [44] Patel, Z. S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J. A., Wong, M. E. K., Mikos, A. G., Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model, *Bone*, 43, 931–940, **2008**
- [45] Ronga, M., Fagetti, A., Canton, G., Paiusco, E., Surace, M. F., Cherubino, P., Clinical applications of growth factors in bone injuries: Experience with BMPs, *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 44(1), 34-39, **2013**
- [46] Aryal, R., Chen, X. P., Fang, C., Hu, Y. C., Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Tissue Regeneration: New Insight and Perspectives, *Orthopaedic Surgery*, 6(3), 171-177, **2014**
- [47] Malafaya, P. B., Silva, G. A., Baran, E. T., Reis, R. L., Drug delivery therapies I General trends and its importance on bone tissue engineering applications, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 283–295, **2002**
- [48] Govinden, R., Bhoola K. D., Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β , *Pharmacology & Therapeutics*, 98, 257– 265, **2003**
- [49] Samorezov, J. E., Alsberg, E., Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 45-67, **2015**
- [50] Santos, M. I., Reis, R. L., Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges, *Macromolecular Bioscience*, 10, 12-27, **2010**
- [51] Gorustovich, A. A., Perio, C., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences, *Tissue Engineering: Part B*, 16(2), 199-207, **2010**

- [52] Lynch, M. E., Fischbach, C., Biomechanical forces in the skeleton and their relevance to bone metastasis: Biology and engineering considerations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79-80, 119-134, **2014**
- [53] Downey, P. A., Siegel, M. I., Bone biology and the clinical implications for osteoporosis, *Physical Therapy*, 86(1), 77-91, **2006**
- [54] Jee, S. S., The past, present, and future of bone morphometry: its contribution to an improved understanding of bone biology, *J Bone Miner Metab*, 23, 1-10, **2005**
- [55] White, T. D., Black, M. T., Folkens, P. A., *Human Osteology*, 3rd ed., Academic Press, London, 25-42, **2011**
- [56] Lopez, M. J., Markel, M. D., Chapter 74 Musculoskeletal System, *Bone Biology and Fracture Healing*, (eds: Auer, J. A., Stick, J. A.), Elsevier Science, St-Louis Missouri, 1025-1039, **2006**
- [57] Wahl, D. A., Czernuszka J. T., Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair, *European Cells and Materials*, 11, 43-56, **2006**
- [58] Brickley, M., Ives, R., Background to Bone Biology and Mineral Metabolism, *The Bioarchaeology of Metabolic Bone Disease*, Academic Press, Oxford, 21-41, **2008**
- [59] Rho, J. Y., Spearing, L. K., Zioupos P., Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical Engineering & Physics*, 20, 92–102, **1998**
- [60] He, L., Theato, P., Collagen and collagen mimetic peptide conjugates in polymer science, *European Polymer Journal*, 49, 2986–2997, **2013**
- [61] Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., Collagens—structure, function, and biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531– 1546, **2003**
- [62] Kwansa, A. L., De Vita, R., Freeman, J. W., Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I, *Matrix Biology*, 34, 161–169, **2014**

- [63] Makareeva, E., Leikin, S., Collagen Structure, Folding and Function, *Osteogenesis Imperfecta A Translational Approach to Brittle Bone Disease*, Academic Press, Oxford, 71-84, **2014**
- [64] Geiger, M., Li, R. H., Friess, W., Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1613– 1629, **2003**
- [65] Zeugolis, D. I., Paul, G. R., Attenburrow, G., Cross-linking of extruded collagen fibers—A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(4), 895-908, **2009**
- [66] Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J., Gawron, M., Kozłowska, J., Planecka, A., Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 570–577, **2010**
- [67] Takitoh, T., Bessho, M., Hirose, M., Ohgushi, H., Mori, H., Hara, M., Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(2), 217-225, **2015**
- [68] Yang, X., Guo, L., Fan, Y., Zhang, X., Preparation and characterization of macromolecule cross-linked collagen hydrogels for chondrocyte delivery, *International Journal of Biological Macromolecules* 61, 487–493, **2013**
- [69] Madaghiele, M., Piccinno, A., Saponaro, M., Maffezzoli, A., Sannino, A., Collagen- and gelatine-based films sealing vascular prostheses: evaluation of the degree of crosslinking for optimal blood impermeability, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20,1979–1989, **2009**
- [70] Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., Heiland, M., Wolff, K. D., Smeets, R., Current trends and future perspectives of bone substitute materials e From space holders to innovative biomaterials, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40, 706-718, **2012**
- [71] Finkemeier, C. G., Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes, *The Journal Of Bone And Joint Surgery*, 84(3), 454-464, **2002**
- [72] Bhatt, R. A., Rozental, T. D., Bone Graft Substitutes, *Hand Clinics*, 28, 457-468, **2012**

- [73] Bohner, M., Galea, L., Doebelin, N., Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes, *Journal of the European Ceramic Society*, 32, 2663-2671, **2012**
- [74] Barrere, F., Blitterswijk, C. A., Groot, K., Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 317-332, **2006**
- [75] Manolagas, S. C., Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis, *Endocrine Reviews*, 21, 115–137, **2000**
- [76] Kraus, K. H., Kirker-Head, C., Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration, *Veterinary Surgery*, 35, 232–242, **2006**
- [77] Pérez-Sánchez, M. J., Ramírez-Glendon, E., Lledó-Gil, M., Calvo-Guirado, J. L., Pérez-Sánchez, C., Biomaterials for bone regeneration, *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 15 (3), 517-522, **2010**
- [78] Regi, M. V., Gonzalez-Calbet, J. M., Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 1–31, **2004**
- [79] Karageorgiou, V., Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, 26, 5474–549, **2005**
- [80] Ibara, A., Miyaji, H.,Fugetsu, B., Nishida, E., Takita, H., Tanaka, S., Sugaya, T., Kawanami, M., Osteoconductivity and Biodegradability of Collagen Scaffold Coated with Nano- β -TCP and Fibroblast Growth Factor 2, *Journal of Nanomaterials*, 06/2013, 11 pages, **2013**
- [81] Ebrahimi, M., Pripatnanont, P., Monmaturapoj, N., Suttapreyasri, S., Fabrication and characterization of novel nano hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate scaffolds in three different composition ratios, *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 100A, 2260–2268, **2012**
- [82] Baspınar, M. S., Ozsoy, S., Colak, F., Gorhan, G., Kara, R., Farklı mineral yapıya sahip kalsiyum fosfat tozlarının sinterlenme özelliklerinin karşılaştırılması, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, Özel Sayı, 69-75, **2009**

- [83] Zhang, S., Zhang, X., Cai, Q., Wang, B., Deng, X., Yang, X., Microfibrous β -TCP/collagen scaffolds mimic woven bone in structure and composition, *Biomedical Materials*, 5, 10 pages, **2010**
- [84] Oprita, E. I., Moldovan, L., Craciunescu, O., Buzgariu, W., Tardei, C., Zarnescu, O., A bioactive collagen- β tricalcium phosphate scaffold for tissue engineering, *Central European Journal of Biology*, 1(1), 61-72, **2006**
- [85] Rangavittal, N., Landa-Canovas, A. R., Gonzales-Calbet, J. M., Vallet-Regi, M., Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: Two important bioceramics, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 51(4), 660-8, **2000**
- [86] Seidenstuecker, M., Mrestani, Y., Neubert, R. H. H., Bernstein, A., Mayr, H. O., Release Kinetics and Antibacterial Efficacy of Microporous β -TCP Coatings, *Journal of Nanomaterials*, volume 2013, 8 pages, **2013**
- [87] Lee, H., Kim, G. H., Three-dimensional plotted PCL/ β -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and in vitro evaluation for bone tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 6305, **2011**
- [88] Haugh, M. G., Jaasma, M. J., O'Brien, F. J., The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(2), 363-369, **2009**
- [89] Safadowska, M., Pietrucha, K., Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 32–37, **2013**
- [90] Salvatore, L., Madaghiele, M., Parisi, C., Gatti, F., Sannino, A., Crosslinking of micropatterned collagen-based nerve guides to modulate the expected half-life, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12), 4406-4414, **2014**
- [91] Madaghiele, M., Piccinno, A., Saponaro, M., Maffezzoli, A., Sannino, A., Collagen- and gelatine-based films sealing vascular prostheses: evaluation of the degree of crosslinking for optimal blood impermeability, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1979-1989, **2009**

- [92] Jithendra, P., Rajam, A. M., Kalaivani, T., Mandal, A. B., Rose, C., Preparation and Characterization of Aloe Vera Blended CollagenChitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications, *Applied Material Interfaces*, 5, 7291-7298, **2013**
- [93] Shanmugasundaram, N., Ravikumar, T., Babu, M., Comparative Physico-chemical and In vitro Properties of Fibrillated Collagen Scaffolds from Different Sources, *Journal Of Biomaterials Applications*, 18, 247-264 , **2004**
- [94] Arahira, T., Todo, M., Effects of Osteoblast-Like Cell Seeding on Mechanical Properties of Porous Composite Scaffolds, *The International Federation for Medical and Biological Engineering* ,31, 1234-1237, **2010**
- [95] Arahira, T., Todo, M., Effects of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Compressive Mechanical Behavior of Collagen/ β -TCP Composite Scaffold, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 39, 218-230, **2014**
- [96] Hao, W., Pang, L., Jiang, M., Lv, R., Xiong, Z., Hu, Y., Skeletal Repair in Rabbits Using a Novel Biomimetic Composite Based on Adipose-Derived Stem Cells Encapsulated in Collagen I Gel with PLGA-b-TCP Scaffold, *Journal Of Orthopaedic Research*, 28, 252-257, **2010**
- [97] Montanari, L., Costantini, M., Signoretti, E. C., Valvo, L., Santucci, M., Bartolomei, M., Fattibene, P., Onori, S., Faucitano, A., Conti, B., Genta, I., Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres, *Journal of Controlled Release*, 56, 219-229, **1998**
- [98] Park, S. N., Lee, H. J., Lee, K. H., Suh, H., Biological characterization of EDC-crosslinked collagen–hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration, *Biomaterials*, 24, 1631-1641, **2003**

EK-I

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kemik_degeri

	(I) gruplar	(J) gruplar	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	cr_kontrol	bmp	- 57,59262611*	15,62259416	,001	-89,3081784	-25,8770738
		cr_scaf	-,37648214	16,29483818	,982	-33,4567623	32,7037980
		otograft	- 63,96614900*	17,43969888	,001	-99,3706200	-28,5616780
		tgft+bmp2	- 57,75041875*	15,92019412	,001	-90,0701311	-25,4307064
		tgf	- 36,49136500*	15,92019412	,028	-68,8110773	-4,1716527
	bmp	cr_kontrol	57,59262611*	15,62259416	,001	25,8770738	89,3081784
		cr_scaf	57,21614397*	13,10154285	,000	30,6185979	83,8136900
		otograft	-6,37352289	14,50075070	,663	-35,8116118	23,0645661
		tgft+bmp2	-,15779264	12,63254743	,990	-25,8032273	25,4876421
		tgf	21,10126111	12,63254743	,104	-4,5441736	46,7466958
	cr_scaf	cr_kontrol	,37648214	16,29483818	,982	-32,7037980	33,4567623
		bmp	- 57,21614397*	13,10154285	,000	-83,8136900	-30,6185979
		otograft	- 63,58966686*	15,22261719	,000	-94,4932227	-32,6861110
		tgft+bmp2	- 57,37393661*	13,45501980	,000	-84,6890790	-30,0587942
		tgf	- 36,11488286*	13,45501980	,011	-63,4300252	-8,7997405
	otograft	cr_kontrol	63,96614900*	17,43969888	,001	28,5616780	99,3706200
		bmp	6,37352289	14,50075070	,663	-23,0645661	35,8116118
		cr_scaf	63,58966686*	15,22261719	,000	32,6861110	94,4932227
		tgft+bmp2	6,21573025	14,82089415	,677	-23,8722845	36,3037450
		tgf	27,47478400	14,82089415	,072	-2,6132307	57,5627987
tgft+bmp2	cr_kontrol	57,75041875*	15,92019412	,001	25,4307064	90,0701311	
	bmp	-,15779264	12,63254743	,990	-25,4876421	25,8032273	

		cr_scaf	57,37393661*	13,45501980	,000	30,0587942	84,6890790
		otograft	-6,21573025	14,82089415	,677	-36,3037450	23,8722845
		tgf	21,25905375	12,99878407	,111	-5,1298808	47,6479883
	tgf	cr_kontrol	36,49136500*	15,92019412	,028	4,1716527	68,8110773
		bmp	-	12,63254743	,104	-46,7466958	4,5441736
			21,10126111				
		cr_scaf	36,11488286*	13,45501980	,011	8,7997405	63,4300252
		otograft	-	14,82089415	,072	-57,5627987	2,6132307
			27,47478400				
		tgft+bmp2	-	12,99878407	,111	-47,6479883	5,1298808
			21,25905375				
Dunnett t (2-sided) ^b	bmp	cr_kontrol	57,59262611*	15,62259416	,003	17,3210294	97,8642228
	cr_scaf	cr_kontrol	,37648214	16,29483818	1,000	-41,6280112	42,3809755
	otograft	cr_kontrol	63,96614900*	17,43969888	,003	19,0104577	108,9218403
	tgft+bmp2	cr_kontrol	57,75041875*	15,92019412	,004	16,7116750	98,7891625
	tgf	cr_kontrol	36,49136500	15,92019412	,093	-4,5473787	77,5301087

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

Ek-II



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06/00
Sayı: 52338575 - 117

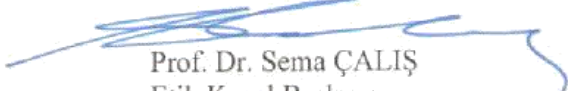
03 Eylül 2013

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 03.09.2013 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2013/07
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2013/51
KARAR NUMARASI : 2013/51-08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
HAYVAN DENEYLERİNDEN
SORUMLU ARAŞTIRMACI : Doç. Dr. İbrahim VARGEL
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Burcu SARIKAYA
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 120 adet Sprague dawley sıçan

Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Halil Murat AYDIN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2013/51 kayıt numaralı "*Kolajen/Beta-Trikalsiyum Fosfat Bazlı Sentetik Kemik Graftlerinin Geliştirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Ek-III ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Burcu Sarıkaya

Doğum yeri : Balıkesir

Medeni Hali : Bekar

E-posta : brcsarikaya@gmail.com

Adresi : Hacettepe Üni. Beytepe Öğrenci Evleri N Blok Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi seviye

İş Deneyimi

2015- Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

2014- Araştırma Görevlisi, Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

Deneyim Alanları

Kemik doku mühendisliği, hücre kültürü

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

7120905 nolu TÜBİTAK projesi, 500.000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

2015 - TERMIS World Congress, Boston, ABD, Sözlü Sunum

2015 – Biomed 2015, Antalya, Türkiye, Sözlü Sunum

2014 – TERMIS EU, Genova, İtalya, Poster Bildirimi