

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİŞİYE ÖZEL DOKU YAMASI OLARAK KULLANILMAK ÜZERE
UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE YÜKLÜ POLY(3-
HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYHEXANOATE) BAZLI
MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI**

Meryem YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş Danışman

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Aralık, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİŞİYE ÖZEL DOKU YAMASI OLARAK KULLANILMAK ÜZERE
UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE YÜKLÜ POLY(3-
HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYHEXANOATE) BAZLI
MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI**

Meryem YILDIRIM tarafından hazırlanan tez çalışması 25.12.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Hacettepe Üniversitesi

Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK, Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU ve eş danışmanım Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan 'Kişiyi Özel Doku Yaması Olarak Kullanılmak Üzere Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Yüklü Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyhexanoate) Bazlı Membranların Hazırlanması' başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Meryem YILDIRIM

İmza



Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Programı 2018/2 - 1649B021805531 başvuru numarası ile desteklenmiştir.



Fatih'e

ve

Birlikte Güzel Yarınlara...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince engin bilgi ve deneyimi ile ilerlememdeki en büyük yardımcım olan danışman hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇIN'e,

Yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, ilgi ve anlayışını eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK'e,

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Programı 2018/2 - 1649B021805531 başvuru numarası ile destek ve teşviklerini sağlayan TÜBİTAK'a,

Laboratuvarda beni hiç yalnız bırakmayan, başım sıkıştığında yanlarına koştuğum, bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli ekip arkadaşlarım Hanife Sevgi VARLI, Fatma Ceren KIRMIZITAŞ, Nevra Pelin CESUR ve Volkan YALMAN'a,

Beni bugünlere getiren, hayatı öğreten, destekleyen, vicdanlı olmanın her şeyden daha değerli olduğunu bana öğreten canım aileme,

Kocaman adam olsa da hala benim küçük kardeşim olarak kalacak olan Süleyman AKKURT'a,

Hayatıma anlam, sevgi, saygı, içtenlik ve anlayış katan, her koşulda destek olan, beni sürekli mutlu etmeye çalışan, isteklerime ve hayallerime ulaşmaya çalışırken yanımda yürüyen, kendimi bulmamı sağlayan, beni ben yapan Fatih YILDIRIM'a,

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürü borç bilirim.

Meryem YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	VIII
KISALTMA LİSTESİ	IX
ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
TABLO LİSTESİ.....	XIII
ÖZET.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez.....	3
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Doku Mühendisliği.....	4
2.2 Biyomalzemeler	5
2.2.1 Tanım ve Tarihçe.....	5
2.2.2 Biyomalzemelerin Özellikleri	7
2.2.3 Doku Mühendisliğinde Biyomalzemelerin Sınıflandırılması.....	11
2.2.4 Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx).....	15
2.3 Kök Hücreler ve Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	17
2.3.1 Kök Hücrelerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması.....	20
2.3.2 Kök Hücreler Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması.....	23
3 MATERYAL- METOD.....	29
3.1 Materyal.....	29
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler	29

3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.1.3	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	30
3.2	Metod	34
3.2.1	PHBHHx Bazlı Membranların Hazırlanması.....	34
3.2.2	Membranların Karakterizasyonu.....	34
3.2.3	Hücre Kültürü Çalışmaları	43
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	51
4.1	Membranların Hazırlanması.....	51
4.2	Membranların Karakterizasyon Çalışmaları	52
4.2.1	Yüzey Morfoloji Analizi.....	53
4.2.2	Serbest Yüzey Enerjisi ve Su temas açısı (WCA) ölçümü.....	54
4.2.3	Yüzey Alanı Analizi	55
4.2.4	Termogravimetrik Analiz.....	57
4.2.5	Dinamik Mekanik Analiz	58
4.2.6	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	59
4.2.7	Raman Spektroskopisi	60
4.2.8	Şişme Analizi.....	61
4.2.9	Biyodegradasyon Analizi.....	62
4.3	Hücre Kültür Çalışmaları.....	63
4.3.1	Sitotoksosite Çalışmaları	64
4.3.2	Hücre Adezyon Çalışmaları.....	65
4.3.3	Antioksidan Kapasite Çalışmaları.....	68
4.3.4	Membranın Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi	69
4.3.5	Membrana UPK Hücrelerin Yüklenmesi	71
	Kaynakça.....	74
	Tezden Üretilmiş Yayınlar	83

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakikada Dönme Hızı
λ	Dalgaboyu
g	Gram
CO ₂	Karbondioksit
kV	Kilovolt
L	Litre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
n	Mol
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
W	watt

KISALTMA LİSTESİ

BET	Brunauer Emmett ve Teller
CD1	Yüzey farklılaşma antijenleri
DMA	Dinamik Mekanik Analiz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Extra Cellular Matrix
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EtOH	Etil Alkol
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
HB	Hidroksibütirat
L929	Fare fibroblast hücre hattı
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PBS	Fosfat Buffered Saline
PGA	PoliglikolikAsit
PHA	Polihidroksialkonat
PHB	Poli (3-hidroksibütirat)
PHBHHx	Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat)
PLA	Polilaktik Asit

PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TAS	Total antioksidant status
TG/DTA	Termogravimetrik/ Diferansiyel termal analiz
TOS	Total oksidant status
UPKH	Uyarılmış Pluripoten Kök Hücre
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Doku mühendisliği elemanları	4
Şekil 2. 2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması.....	11
Şekil 2. 3 PHBHHx kimyasal yapısı	16
Şekil 2.4 Embriyonik kök hücre eldesi	21
Şekil 2.5 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	23
Şekil 2.6 Pluripotent Kök Hücre Kaynakları.....	25
Şekil 3.1 Taramalı elektron mikroskobu	30
Şekil 3.2 Bet yüzey alanı cihazı.....	30
Şekil 3.3 FTIR Spektrofotometresi.....	31
Şekil 3.4 Raman Spektrofotometresi.....	31
Şekil 3.5 TG/DTA Cihazı	31
Şekil 3.6 Elisa reader	32
Şekil 3.7 İverted mikroskop	32
Şekil 3.8 CO ₂ inkübatörü.....	32
Şekil 3.9 Çalkalamalı su banyosu.....	33
Şekil 3.10 Flow kabin	33
Şekil 3.11 Santrifüj	33
Şekil 3.12 SEM çalışma prensibi	35
Şekil 3.13 DMA çalışma prensibi	38
Şekil 3.14 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) şematik gösterimi.....	40
Şekil 3.15 Raman spektrofotometresi	41
Şekil 3.16 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	43
Şekil 3.17 L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı.....	44
Şekil 4.1 A) 5% (w/v) PHBHHx, B) 5% (w/v) PHBHHx/ 0.5% (w/v) Parafin Mum membran görüntüleri.....	51
Şekil 4.2 A) 5% (w/v) PHBHHx/ 1% (w/v) Parafin mum, B) 5% (w/v) PHBHHx/ 3% (w/v) Parafin mum, C) 5% (w/v) PHBHHx/ 5% (w/v) Parafin mum membran görüntüleri.....	52
Şekil 4.3 A) PHBHHx ve B) PHBHHx/ Paraffin Mum doku yamalarının SEM görüntüleri (1000x)	53
Şekil 4.4 Membranların yüzey alanları.....	56
Şekil 4.5 Membranların sıcaklığa bağlı kütle kaybı	57

Şekil 4.6 Membranlara ait Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektrumu.....	59
Şekil 4.7 Membranlara ait Raman spektrumu.....	61
Şekil 4.8 Membranlarının su tutma kapasitelerinin değerlendirilmesi.....	62
Şekil 4.9 Membranların bozunma oranlarının değerlendirilmesi	63
Şekil 4.10 PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde in vitro sitotoksiteleri	64
Şekil 4.11 PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum Hücre Tutunma Görüntüleri.....	65
Şekil 4.12 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 1. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi	66
Şekil 4.13 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 3. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi	66
Şekil 4.14 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 5. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi	67
Şekil 4.15 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde Total Antioksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi	68
Şekil 4.16 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde Total Oksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi	69
Şekil 4.17 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde CD1 aktivitesine etkisi	70
Şekil 4.18 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde p53/ TP53 aktivitesine etkisi.....	71
Şekil 4.19 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri.....	72
Şekil 4.20 Membranlara tranfekte edilmiş L929 hücrelerin tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların su temas açıları.	54
Tablo 4.2	Hazırlanan membranların serbest yüzey enerjileri	55
Tablo 4.3	Mekanik Test Sonuçlarının değerlendirilmesi.....	58
Tablo 4.4	Piklere karşılık gelen bağ yapıları	60



KİŞİYE ÖZEL DOKU YAMASI OLARAK KULLANILMAK ÜZERE UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE YÜKLÜ POLY(3- HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYHEXANOATE) BAZLI MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI

Meryem YILDIRIM

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş-Danışman: Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Günümüzde uygulama alanı ve önemi gittikçe artan biyoyumlu, güvenilir ve etkin olan biyomalzemeler, insan vücudunda hasar gören/ kaybedilen organ veya dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan malzemelerdir. Doku mühendisliğinde biyomalzemelerin fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri, onarımı hedeflenen dokunun özellikleri ile uyumlu olacak şekilde tasarlanmalıdır. Hedef dokuya uygun olarak tasarlanan biyomalzemeler uygun bozunma hızına, yeterli mekanik dayanıma, hücrelerin üremesi ve göç edebilmesinin yanı sıra, besin/atık maddelerin difüzyonunu sağlayacak gözenekli yapıya ve hücre üremesi/farklılaşmasını sağlayacak yüzey özelliklerine sahip olması istenen üç boyutlu yapılardır. Biyomalzeme üretiminde kullanılan malzemeler vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmayacak şekilde biyoyumlu olmalı ve toksik özellik göstermemelidir.

Sunulan tez çalışmasında, doku mühendisliğinde kullanılmak üzere kişiye özel doku yaması olarak kullanılmak üzere biyoyumlu ve yeterli mekanik dayanıma sahip yapıda PHBHHx bazlı yamaların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen doku yamasında ana iskeleti olarak Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx) kullanılmıştır. Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx) polihidroksialkanoat (PHA) ailesine ait bir bakteriyel polyesterdir. Diğer, PHA ailesi üyeleri ile karşılaştırıldığında, PHBHHx daha iyi mekanik özelliklere sahiptir. PHBHHx biyolojik olarak parçalanabilir ve diğer bakteriyel polyesterlere göre daha düşük kristallik değerine sahiptir. Sunulan tez çalışmasında PHBHHx' in bu özelliklerinden dolayı doku yaması olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında PHBHHx/ Parafin mum blend yapıda membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan yamaları karakterize etmek için; yamaların şişme profili, biyodegradasyon profili incelenmiştir. Yamaların morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak görüntülenmiştir. Hazırlanan yamaların yüzey alanı Yüzey Alanı Ölçüm cihazı (BET) kullanılarak belirlenmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum yamaların termal özelliklerinin belirlenmesi için termogravimetrik analizleri yapılmıştır. Mekanik dayanımı Dinamik Mekanik Analiz cihazı (DMA) kullanılarak incelenmiştir. Membranların kimyasal yapı analizi Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kalitatif olarak belirlenmiştir. Raman spektrofotometresi kullanılarak FTIR sonuçları doğrulanmıştır. Hazırlanan malzemenin fare fibroblast hücreleri (L929 hücre hattı) üzerine sitotoksitesini incelenmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla mitokondriyal canlılık analizi (MTT) yapılmıştır. Membranlara hücre tutunma kapasitelerini belirlemek için 1, 3 ve 5 günlük hücre adezyon deneyleri yapılmıştır. Membranların antioksidan- oksidan kapasiteleri L929 hücre hattı kullanılarak tespit edilmiştir. Doku yaması olarak kullanılmak üzere hazırlanan malzemelerin hücre döngüsüne etkisi değerlendirilmiştir. Laboratuvarımızda önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) hazırlanan doku yamaları üzerinde kültüre edilmiş ve kişiye özel hale getirilmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyomalzeme, biyoyumlu, doku yaması, PHBHHx, UPKH (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre)

Preparation of PHBHHx Based Tailor -Made Tissue Patches

Meryem YILDIRIM

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Murat DEMİRBILEK

Biocompatible, reliable and effective biomaterials are an increasing demand d to fulfill or support the functions of damaged/lost organs for the human body. The physical, mechanical and biological properties of biomaterials are critical for tissue engineering applications. Biomaterials designed in accordance with the target tissue are three-dimensional structures that are desirable to have appropriate degradation rate, adequate mechanical strength, cell proliferation and migration, as well as the porous structure for the diffusion of nutrients/wastes, and surface properties for cell reproduction/differentiation. The materials obtained should be biocompatible and non-toxic to prevent undesired reactions.

In this thesis, we aimed to develop PHBHHx based biomaterials which are porous, non-toxic, biocompatible and have sufficient mechanical strength for use as tissue patch to use in tissue engineering. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) was used as the main skeleton of the synthesized tissue patch. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) is a bacterial polyester of the polyhydroxyalkanoate (PHA) family. PHBHHx has stronger mechanical properties among other PHA family members. Besides,

PHBHHx is biodegradable and has a lower crystallinity compared to other bacterial polyesters. Thanks to these properties, PHBHHx is intended to be used as an ideal tissue patch. In this study, PHBHHx / Paraffin wax blend membranes were prepared. The swelling profile and biodegradation profile of the biomaterials were evaluated. The morphological properties of the material were visualized using Scanning Electron Microscopy (SEM). The surface area and pore structures of the biomaterials were determined using Brunauer-Emmett- Teller (BET) surface area. Thermogravimetric analyzes were performed to determine the thermal properties of PHBHHx and PHBHHX / Paraffin wax membranes. The mechanical strength of the material was evaluated using the Dynamic Mechanical Analyzer (DMA). Young modulus and elongation at break values were compared. The chemical structure analysis of the membranes was carried out qualitatively by FTIR spectrophotometer. FTIR results were confirmed using Raman spectrophotometer. In addition, cell viability of PHBHHx was determined in studies. The cytotoxicity of the material on fibroblast cells (L929) was examined by mitochondrial viability analysis (MTT). Cell adhesion experiments for 1, 3 and 5 days were performed. The antioxidant-oxidant capacities of the membranes were determined using the fibroblast cell line (L929). The induced pluripotent stem cells (iPSc) obtained from our previous studies in our laboratory were loaded on the PHBHHx-based membranes .

Keywords: Biomaterials, biocompatible, tissue patch, PHBHHx, iPSC (Induced Pluripotent Stem Cell)

1.1 Literatür Özeti

İnsanın kendi doğasını anlama ve meydana gelen sorunlara yönelik çözüm getirme arayışındaki yaklaşımlardan biri olan “doku mühendisliği”, son 30 yıldır üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı multidisipliner bir bilimsel alanıdır. Kalıcı ve etkili tedavi yöntemleri geliştirmeyi amaçlayan doku mühendisliği, yaşam kalitesinin arttırılmasını sağlamada önemli bir rol almaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin yerini alacak yenilikçi, kalıcı ve etkili çözümler söz konusu insan sağlığı olduğu için birçok değerlendirme faktörü göz önüne alınarak hayata geçirilmeye çalışılmaktadır. Bu değerlendirme faktörlerinin temelinde doku mühendisliği yaklaşımlarının ana bileşeni olan biyomalzeme seçimi yatmaktadır. Geçici olarak hasarlı bölgeyi dolduran, üzerinde bulunan hücreler çoğalırken bir yandan bozunan, doku rejenerasyonunu sağlayan doku iskelelerinin üretiminde yapılan tüm çalışmalara rağmen biyomalzemedeki kaynaklanan sorunlar bulunmaktadır. Malzemelerin morfolojik, fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin hedeflenen hasarlı dokunun özellikleriyle uyuşması gerekmektedir. Günümüzde sıklıkla çalışılan doğal polimerler, sentetik polimerler, seramikler ve kompozit biyomalzemeler bu açıdan eksik kalmaktadır, çalışmalar bu özelliklerin hedef dokuya uygun olarak iyileştirmeye yönelik devam etmektedir. Dokuyu taklit edebilen biyomalzemelerin geliştirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. İnsan vücudu kompozit bir yapıda olduğu için tek başına bir malzeme grubunun hedef dokuyu taklit edebilmesi pek mümkün gözükmemektedir. Bu sorunun çözümüne yönelik hedef dokuya uygun kompozit malzemeler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Elde edilen polimer malzemelerin özelliklerinin iyileştirilebilmesi amacıyla polimerlere fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal çeşitli modifikasyonlar da yapılarak hedef dokuya uygun özellikler daha iyi hale getirilmeye çalışılmaktadır.

Biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilme özelliklerine sahip olan Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx), son yıllarda doku mühendisliği uygulamalarında üstün özellikleri nedeniyle sıklıkla karşımıza çıkan polihidrokdialkonat ailesine ait bakteriyel polyesterdir[1]. PHBHHx'in doku mühendisliği uygulamaları açısından olumsuzluk oluşturacak özelliklerinin iyileştirilebilmesi için PHBHHx, aynı ya da farklı malzeme grupları ile veya çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle modifiye edilmelidir. Sunulan tez çalışmasında PHBHHx, daha önce hiçbir çalışmada tek başına biyomalzeme olarak kullanılmamış olan ve ilk defa PHBHHx ile blend edilen Parafin mum kullanılarak PHBHHx'in olumsuz özelliklerinin giderilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen membran üzerine laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz uyarılmış pluripotent kök hücre yüklenerek kişiye özel doku yaması olarak kullanımı amaçlanmıştır. Kök hücreler hasarlı/ kaybedilen doku veya organların tedavi sürecinin hızlanmasında etkili olacaktır. Böylece, yapılan çalışma birçok kalıtsal hastalık, diyabet, kardiyolojik hastalıklar, sinir doku mühendisliği gibi biyomühendislik ve tıp alanlarında karşılaşılan ciddi problemlere çözüm olma potansiyeli taşıyacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen çalışmada amacımız, doku yaması olarak kullanılmak üzere daha iyi özelliklere sahip PHBHHx bazlı biyomalzeme geliştirmek, karakterizasyon-sitotoksosite çalışmalarını yapmak ve hazırlanan membranlara UPK hücrelerini yükleyerek hem kişiye özel hale getirmek hemde tedavi süreçlerini hızlandırmaya çalışmaktır.

Biyomalzeme bilimi günümüzde büyük ve önemli adımların atıldığı bilim dallarından biridir. Bu bilim dalında insan veya hayvan biyolojik sistemlerinde, canlı doku ile uyum içinde etkileşim gösteren yeni malzemelerin geliştirilmesi için aşırı bir çaba bulunmaktadır. Biyolojik sistemlerde bulunan canlı dokuların görevlerini yerine getirmek veya onları desteklemek için kullanılan, sentetik veya doğal malzemeler ile yapılmış malzemeler, biyomalzemelerdir. Bu alanda çok farklı hedef dokuların onarımına yönelik farklı malzeme sınıfları kullanılarak çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir. Hedef dokuya en uygun özellikte biyomalzemeler

geliştirmeye amaçlanmaktadır. Biyomalzemelerin geliştirilmesi için disiplinlerarası çalışmalar yapılmaktadır.

Çalışmanın genel amacı PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum blend membranların doku yaması olarak kullanılmak üzere hazırlanması ve tedavi sürecini hızlandırmak amacıyla kök hücre yüklenmesidir. Çalışmanın amaçları aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

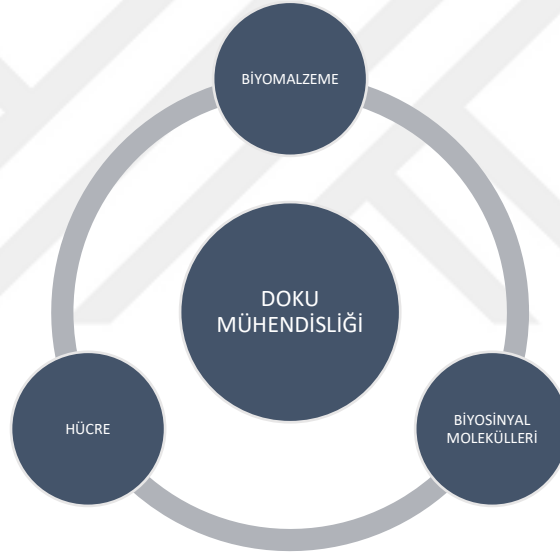
- 1.PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum membranların hazırlanması
- 2.Hazırlanan membranların şişme, degradasyon profilinin, morfolojik özelliklerinin belirlenmesi
- 3.Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik dayanım özelliklerinin belirlenmesi
- 4.Hazırlanan membranların L929 hücre hattı üzerine sitotoksitelerinin belirlenmesi
- 5.Hazırlanan membranların hücre tutunma kapasitelerinin belirlenmesi
- 6.Hazırlanan membranların Antioksidan- Oksidan kapasitesi üzerine etkisinin incelenmesi
- 7.Hazırlanan membranların hücre siklusu üzerine etkisinin incelenmesi
8. Hazırlanan membranlara uyarılmış pluripotent kök hücrelerin yüklenmesi
- 9.Hazırlanan membranlara uyarılmış pluripotent kök hücrelerin tutunma kapasitelerinin belirlenmesi

1.3 Hipotez

Sunulan tez çalışması ile birlikte PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranlar hazırlanarak, hazırlanan membranlar üzerine uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) tutunma kapasitesi değerlendirilecektir ki, sonraki çalışmalarda kişiye özel doku yaması olarak kullanılabilme potansiyeli değerlendirilebilsin. Böylece, yapılan tez çalışmasının, yumuşak doku onarımı alanlarında karşılaşılan ciddi problemlere çözüm olacağı düşünülmektedir.

2.1 Doku Mühendisliği

Kaza, kanser veya travma sonucu kaybedilen/ hasar gören organ ya da dokuların tedavisinde transplantasyon cerrahisi başarılı sonuçlar veren yöntemdir. Fakat her dokunun naklinin mümkün olmaması, donör eksikliği, nakledilen organı vücudun kabul etmemesi ve enfeksiyon riskinin yüksek olması gibi dezavantajları bulunmaktadır[2], [3].



Şekil 2. 1 Doku mühendisliği elemanları

Doku mühendisliği; kaybedilmiş veya hasarlı dokuların işlevlerini yerine getiren, doku veya organların canlılığının sürdürülebilirliğini sağlayan ve yeniden modellemeyi hedefleyen multidisipliner bir uygulama alanıdır[4]. Temelinde transplantasyon cerrahisi bulunan doku mühendisliği çalışmaları hedeflenen hücrelerin biyopsi yoluyla hastadan alınarak, kontrollü kültür ortamlarında biyomalzemelerden oluşan yapay destek materyalleri üzerinde, biyosinyal

moleküller varlığında kültüre edilmesi ve sonrasında elde edilen yapının vücuttaki hasarlı bölgeye yerleştirilmesi sonucu doku rejenerasyonunun gerçekleştirilmesi prensibine dayanmaktadır[5], [6]. Hastanın kendisinden elde edilen hücrelerin kullanıldığı yapay doku transplantasyonu, doğrudan gerçekleşen transplantasyonun bir çok sınırlayıcılığına cevap verebilmekte ve vücudun organı kabul etmemesini ve enfeksiyon riskini engelleyebilmektedir. Bu nedenle in vitro olarak yeni dokunun oluşturulabilmesi ve vücuttaki hasarlı bölgenin iyileştirilebilmesi doğrudan gerçekleşen organ transplantasyonuna önemli bir alternatif oluşturmaktadır[3]. Doku mühendisliği kavramına dayanarak organların ya da dokuların başarılı bir şekilde tedavilerinin gerçekleştirilebilmesi için, anahtar görevi gören üç faktörün bir arada düşünülmesi gerekmektedir[2] (Şekil 2.1). Bu faktörlerden birincisi doku oluşumunu sağlayacak olan hücrelerdir (hedef dokuya uygun hücreler). Hücre dışı ortam koşulları hücre fonksiyonları ve hücrelerin morfolojik yapılarını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle hücre- biyomalzeme etkileşimini sağlayacak biyosinyal moleküllerin (büyüme faktörleri, doku uyarıcı moleküller, sitokinler) kullanımı da gerekmektedir. Doku veya organların in vitro ortamda yapay olarak meydana getirilmesindeki diğer önemli faktör, hücreler için hücre dışı matris görevi göreceği yapı oluşturularak hücrelerin yapışması ve üremesi için yapısal destek sağlayan biyomalzemelerdir (destek görevi göreceği ve 3B büyüme ortamı sağlayacak)[7].

2.2 Biyomalzemeler

2.2.1 Tanım ve Tarihçe

Doku mühendisliğinde hasarlı doku veya organların görevlerini yerine getirmek veya hasar görmüş dokuları desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelere "biyomalzeme" denir [8], [9]. Avrupa Biyomalzeme Topluluğu biyomalzemeleri, biyolojik sistemler ile etkileşim içerisinde olan, doku ile ara yüzey oluşturup, vücut içinde organ, doku veya diğer vücut bileşimlerinin yerini alarak tedavi etmeye, güçlendirmeye, onarmaya ve büyümeye teşvik eden malzemeler olarak tanımlamışlardır[10].

Bilimsel anlamda yeni bir kavram olarak karşımıza çıkmasına rağmen biyomalzemelerin klinik uygulamalarda kullanımı tarihin çok eski zamanlarına dayanmaktadır. Mısır mumyalarında tespit edilen yapay göz, burun ve dişler biyomalzemelerin en eski kanıtlarından biridir. Altının diş hekimliğinde kullanımı 2000 yıl kadar eskiye uzanmaktadır. Bronz ve bakırın kemik protezi olarak kullanımı milattan önceye kadar gitmektedir. Bakır iyonunun zehirleyici etkisine rağmen 19. yüzyıl ortalarına kadar yerine geçecek daha uygun malzeme bulunamadığı için vücutta bu protezlerin kullanımı devam etmiştir.

19. yüzyıl ortasından itibaren farklı malzemelerin vücut içerisinde farklı amaçlar için kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır [11], [12]. Kemik implantları herhangi bir kaza sonucu veya hastalık sebebi ile hasar gören ve işlevini kaybeden iskelet sisteminde başarı gösteren ilk çalışmadır, kemik doku mühendisliği çalışmalarının başlangıcı olarak kabul edilir. Bu çalışmaları 1950'lerde kan damarlarının geliştirilmesi ve 1960'larda kalça protezlerinin gelişimi gibi yapılan çalışmalar takip etmiştir. Poliüretan, sentetik bir polimerdir ve elastik özelliği ile yumuşak doku mühendisliğinde kullanılan cihazlarda rol oynarken, paslanmaz çelik sert yapısından dolayı daha çok kemik doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Bu çalışmalara ek olarak diş akriliği olarak da bilinen polimetilmetakrilat ilk defa 1937'de diş hekimliği çalışmalarında kullanılmıştır. Vinyon N olarakta poliamidden yapılmış paraşüt bezleri de II. Dünya Savaşı'ndan sonra damar protezi olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1970'lerde poliglikolik asitten sentetik ve bozunabilir yapıda ameliyat ipliği oluşturulmuştur. Bu çalışmalar sayesinde metal, polimer, seramik ve kompozit olan 40'dan fazla malzeme özellikle son 30 yılda biyolojik sistemin 50'den fazla çeşitli bölümlerinde onarım, destek ve tedavi edilmesinde kullanılmıştır ve gelecek çalışmalara öncelik etmiştir. Biyomalzemelerin kullanım alanı sadece protezlerle sınırlı kalmamıştır, vücut dışına yerleştirilen ama vücutla etkileşimi devam eden cihazlarda, eczacılık ürünlerinde, teşhis kitlerinde ve biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır [13]. Kullanım amaçlarına ve hedeflenen doku veya organa uygun olarak çeşitli biyomalzemeler üretilir.

2.2.2 Biyomalzemelerin Özellikleri

Biyomalzemeler üretildikleri malzemeler sayesinde çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bir malzemenin vücuda yerleştirilebilmesi için hedef dokuya uygun olarak belirli özelliklere sahip olması gerekir. Vücutta kullanıldıkları bölgeye ve kullanım amaçlarına göre değişik koşullara sahip olan ortamlara uyum sağlayabilen yapıya sahip olmaları gerekmektedir. Kullanılacak hedef dokuya göre vücut içerisindeki gerilimlere karşı uygun mekanik dayanıma sahip olacak şekilde tasarlanmaları gerekmektedir. Bunun yanı sıra vücutta farklı amaçlara yönelik kullanılan farklı özellikteki biyomalzemelere karşı verdiği cevaplar farklılık gösterebilmektedir. Kullanılan bazı malzemeler vücut tarafından kabul edilirken, aynı malzemeler farklı ortam koşullarında vücutta enflamasyona neden olabilmekte ve reddedilebilmektedir [14].

In vitro doku onarımını, oluşumunu, iyileştirilmesini desteklemek amacıyla tasarlanan biyomalzemelerin sahip olması gereken özellikler temel olarak aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir: Kullanımı için hedeflenen dokuya benzer şekilde üç boyutlu yapıya sahip olması gerekmektedir [15]. Hedeflenen dokuya göre hücre üremesi ve göçünün yanında besinlerin/ hücre atıklarının difüzyonunun sağlanması için yüksek gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir [16]. Gözenek boyutu, onarımı hedeflenen hasarlı dokuya uygun olarak tasarlanmalıdır [15].

Biyomalzemeler kullanım amacına göre (kemik, kıkırdak, yumuşak doku, sinir doku vb.) hedef dokuya uygun mekanik özelliklerine sahip olması beklenmektedir [17]. Biyomalzeme kullanım işlemi sırasında hedef dokuya uygun mekanik dayanım göstermeli ve sonrasında stabilitesini kaybetmemelidir [18]. Hücrelerin vücutta hasarlı dokuyu onarması ve tekrar meydana getirebilmesi için dokuya eklendikten sonra kullanım amacına göre biyomalzemenin vücutta bozunması gerekebilir, kullanılacak biyomalzemenin biyobozunur olması [17] ve hedef dokuda biyomalzemenin bozunma ürünlerine ve yapıdaki çözücü kalıntısına bağlı olarak enflamatuar yanıtın oluşmaması gerekmektedir [3].

Biyomalzeme hücreler için toksik olmamalı, kanserojen etki göstermemeli ve hücre yapışmasını, büyümesini, göçünü ve farklılaşmasını desteklemelidir [15].

Bu özelliklerin sağlanabilmesi için biyomalzemenin üretiminde kullanılan malzemeler ve biyomalzemenin üretim tekniği önemlidir. Biyomalzemelerin toksik olmaması, kanserojen etki göstermemesi, kimyasal açıdan inert, stabil ve mekanik dayanımının yüksek olması, kullanılacak malzemenin en önemli ve temel özellikleri arasında olmalıdır.

2.2.2.1 Biyomalzemelerin biyoyumluluğu

Biyoyumluluk, biyomalzeme ve parçalanma ürünlerine karşı vücut dokularının fiziksel, kimyasal, biyolojik uyumu ve vücudun mekanik davranışına sağladığı optimum uyumdur [19]. Biyoyumluluk, malzemenin vücuda uygun cevap verebilme, toksik etki meydana getirmeme özelliğidir. Biyomalzeme ise; biyoyumluluk gösteren malzeme olarak tanımlanmaktadır. Biyoyumluluk, bir biyomalzemenin mekanik dayanımınıyla birlikte en önemli özelliklerinden biridir. Biyomalzemenin vücuda biyoyumlu olmasıyla birlikte vücutta kontrol edilebilir bir oranda biyolojik olarak çözünebilir olması ve çözünme sonucu meydana gelen parçalanma ürünlerinin toksik etki göstermemesi gerekmektedir [7]. Bu nedenle, sadece malzemelerin parçalanma ürünlerinin değil artık reaksiyona girmemiş çapraz bağlama maddelerinin, polimerler üzerindeki reaktif grupların ve benzeri sorunların potansiyel toksisitesinin farkında olmak ve bu sorunlara karşı önlem almak gerekmektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan birçok malzeme biyodegrede olabilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilecek şekilde tasarlanmış biyomalzelerin, ilaç dağıtımında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, biyomalzemenin kısmen veya tamamen bu özelliğe sahip olması kullanıldığı dokulara göre gerekli olmayabilmektedir [20].

Biyoyumlu bir malzeme, etrafını çevreleyen dokular üzerinde enflamasyon, pıhtı oluşumu gibi olumsuz bir durum meydana getirmeyen malzemedir. Vücudun kullanılan farklı malzemelere karşı verdiği tepkiler son derece farklı olabilmektedir [21]. Biyomalzemelerden; hedef dokuya uygun mekanik dayanım göstermesi, biyoyumluluk, göstermesi istenmektedir. Ayrıca, alerjik reaksiyonlara neden olmaması, zehirli ürünler salgılamaması, kolay şekillendirilebilir olması ve sterilizasyon işlemlerinde mevcut özelliklerini bozulmaması da büyük önem arz

etmektedir. Biyomalzemelerin, mekanik dayanıma ve biyouyumluluğa sahip olmaları gerektiğinden, kullanıldıkları dokulara uygun özellikleri taşıması açısından malzeme seçimleri büyük önem arz etmektedir [22]. Son yıllarda, biyomalzeme/doku etkileşimleri üzerine önemli çalışmalar yapılmıştır ve çalışmalar devam etmektedir. Doku ve organların yeniden yapılanmasını sağlayan (ECM görevi gören) ve vücut sıvıları ile uyum gösteren biyomalzemeler geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Biyolojik uyumluluk, vücudun biyomalzemeyi kabul edebilirliği olarak değerlendirildiği için; hem biyomalzeme, hem biyomalzemenin kullanıldığı doku veya organların özellikleri gözönünde bulundurulmalıdır. Seramikler, metaller, polimerler ve kompozit biyomalzemeler doku yaması olarak kullanılabilen ve insan sağlığına zararlı etkileri olmayan biyomalzemeler olarak geliştirilebilmektedir. Yeni biyomalzemeler klinik çalışmalarda kullanımında önce, vücut içerisinde immün yanıtı neden olup olmadıklarını değerlendirmek amacıyla detaylı biyolojik testlere tabi tutulmaktadır. İlk olarak in vitro daha sonra da in vivo testler yapılmalı, bunu takiben klinik denemelerle malzemenin biyolojik güvenilirliği ve performansı değerlendirilmelidir. Biyomalzemenin kullanıldığı dokudan alınan örneklerin morfolojik incelemesi, biyomalzemenin biyouyumluluğunu değerlendirmemizi sağlamaktadır. Hedef dokuda kullanılacak biyomalzemeler birçok testten geçtikten ve biyouyumluluğu onaylandıktan sonra vücut içerisinde hedef dokuda kullanılmaya başlanabilmektedir. Tüm bu testlere rağmen biyomalzemelerin allerjik, immün, nonimmün, mutajenik, kanserojenik ve enflamatuar etkileri gözlemlenebilir. Bu yüzden, kullanılacak biyomalzemenin yapılan her test sonuçları çok önemlidir. Biyomalzemelerin toksik olmaması, kansorejen etki göstermemesi, enflamatuar tepki ortaya çıkarmaması, kimyasal açıdan inert, stabil ve ömür boyu tekrarlanabilen hareketlere karşı mekaniksel olarak güçlü olması, kullanılan malzemenin en önemli ve temel özellikleri arasındadır [23], [24].

Hedef dokuya uygun şekilde gerçekleşen biyolojik bozunma süreci, doku mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır. Biyomalzemelerin bozunma hızı, hücre büyümesini ve hücre canlılığını etkilemektedir. Hedef dokuya biyomalzeme amacını gerçekleştirdikten sonra, vücut tarafından tamamen parçalanabilir, emilimi

sağlanabilir ya da destek görevi görüyorsa mekanik dayanımını tamamen koruyabilmektedir [25].

2.2.2.2 Biyomalzemelerin mekanik özellikleri

Malzemenin biyouyumluluk, biyoaktivite veya dokuya olan uyumu gibi özelliklerinin olması o malzemeyi biyomalzeme olarak kabul etmek için yeterli olmamaktadır. Tüm bunların yanı sıra başka özelliklerinin de bulunması beklenmektedir [26].

Bir malzemenin biyomalzeme olarak kullanılabilmesinin ilk ve en önemli şartı "biyouyumlu" olmasıdır. İkinci önemli şart ise mekanik özelliğinin kullanılacak dokuya uygun olmasıdır. Kullanılacak dokuya uygun olmayan biyomalzemelerin kullanımı sırasında veya hücrelerin büyümesi sırasında çökme yaşanabilir [24]. Bu gibi zorluklar malzemelerin diğer özelliklerinin uygun olmaması durumunda da görülebilir [27].

Biyomalzemeler "tasarlanırken kullanılacak doku ile mekanik özellikleri uyuşmalıdır. Örneğin: örneğin, kemikte nispeten sert yapıda biyomalzemeler, esnek dokularda ise yumuşak yapıda biyomalzemeler kullanılmalıdır [20]. Daha açık ifadeyle, kemiğin elastisite modülünden çok değil sadece bir kat fazla elastisite (young) modülüne sahip olan malzemeler gerilme ile karşılaşırlarsa, meydana çıkacak elastik tepkime uyuşma göstermez. Bu gibi malzemelerin kemik ile kıyaslandığında enerji emme kapasitelerinin düşük olduğu görülecektir. Bu yüzden biyomalzeme ve doku arasında bir uyum olmalıdır. Bu uyum ancak aynı mekanik değerlere sahip olmak ile mümkün olabilir. Kullanılacak biyomalzemenin mekanik özelliklerinin diğer fiziksel değerler içinde benzer olması gereklidir [23].

2.2.2.3 Biyomalzemelerin tasarım özellikleri

Hedeflenen dokuya uygun tasarım biyomalzemelerin üretimi sırasında önem arz eder. Uygun tasarımı sağlanmış bir malzeme, hedef doku için gerekli olan tüm fiziksel ve kimyasal özellikleri sağlamış mükemmel bir malzeme olarak tarif edilebilir. Fakat bu planlanan mükemmel malzeme bile in vivo şartlarında

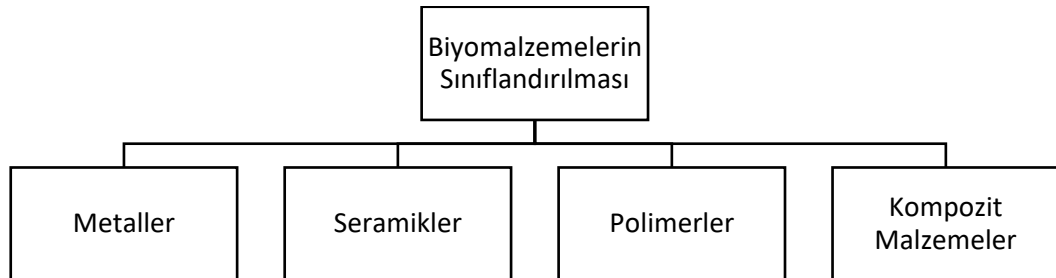
beklenmedik hasarlara neden olabilmektedir. Bundan dolayı tasarlanan malzemenin yapısal özellikleri ve ne amaçla hangi bölümde kullanılacak ise ona göre uygun olacak bir tasarım yapmak önem arz eder [28]. Bu amaçla kullanılacak malzemeler doku ile en iyi uyumlu olacak şekilde tasarlanmalıdır [29].

Biyomalzemedan beklenen bir diğer tasarım özelliği de biyolojik ortamda kullanıldığında malzemenin aşınmalara karşı dirençli olması ve yükler karşısında yorulma dayanımının yüksek olmasıdır. Bu yüzden biyosisteme uyum söz konusu olunca aşınma dayanımı ile yorulma dayanımı tasarım sırasında iki önemli parametre olarak ön plana çıkmaktadır [28].

Hedef dokuya uygun olarak tasarlanan maddenin dokuda enflamasyona neden olmaması, toksik etki göstermemesi, kanserojen olmaması gerektiğinden kullanılacak malzemelerin buna uygun seçilmesi gerekmektedir [23], [24].

2.2.3 Doku Mühendisliğinde Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Biyomalzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

2.2.3.1 Polimerler

Çok sayıda aynı veya farklı atomik grupların kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli veya dallanmış yapıda yüksek molekül ağırlıklı bileşikler, polimerler olarak adlandırılmaktadır. Bu uzun zincirler çapraz bağlar, Van der

Waals bağları, hidrojen bağları veya kovalent bağ kuvvetleriyle bir arada tutulmaktadır [4].

Polimerik yapıdaki biyomalzemeler, doku mühendisliğinin temel taşlarından biridir. Doku mühendisliğinde çok çeşitli polimerik biyomalzemeler kullanılmıştır. İlaç dağıtımı, mikro kaplama, mikro akışkanlar ve diğer teknolojiler kullanılarak son yıllarda çok fazla çalışma yapılarak gelişmişlik göstermiştir [20].

Polimerik biyomalzemelerin diğer malzeme sınıflarına göre avantajları (i) üretim kolaylığı, (ii) işlenebilme kolaylığı, (iii) istenen mekanik ve fiziksel özelliklere sahip olma ve (iv) uygun maliyette olmasıdır. Çeşitli uygulamalarda kullanılan polimerler sentetik ve doğal olarak iki kategoriye ayrılabilir. Nişasta, selüloz, doğal kauçuk, albümin, jelatin, aljinat, kitosan, kollajen, fibrin, glikozaminoglikan, hyaluronik asit ve DNA (genetik materyal) doğal polimerler grubuna girerler ve toksik etki yaratmazlar [30]. Polilaktitler (Polilaktik asit (PLA) Poliglikolik asit (PGA) Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)), Polihidroksialkonatlar (Poli 3-hidroksibutirat (P3HB), Poli 3-hidroksivalerat (PHBV)), Polietilen glikol (PEG), Poliamitler, Polianhidritler ve Polikaprolakton (PCL) doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan sentetik polimerlere örnek olarak verilebilir. Öngörülebilir, kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir özelliklerinin bulunması, kolay işlenebilirliği, yüksek mekanik dayanımı, modifiye edilebilirliği sentetik polimerlerin tercih sebepleri arasında gösterilebilmektedir. Sentetik polimerler sıklıkla kullanılmasına rağmen sıklıkla rastlanan dezavantajı biyoyumluluk eksikliğidir ve bu nedenle bu malzemelerin kullanımı genellikle meydana getirdikleri enflamatuvar etkileriyle ilişkilidir. Bu sorun sentetik polimerlerin doğal polimerle karıştırılarak veya çeşitli ECM bileşeni proteinlerle yüzey modifikasyonu yapılarak kullanılmasıyla yok edilebilir [31].

Sunulan tez çalışmasında kişiye özel doku yaması üretiminde biyomalzeme olarak biyoyumlu sentetik bir polimer olan Polihidroksialkonat ailesinin üyesi olan bakteriyel polyester PHBHHx (Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat)) kullanılmıştır.

2.2.3.2 Metaller

Biyomalzemelerin hazırlanabileceği başka malzeme sınıfları olmasına rağmen, mühendisler gerekli biyomalzemeyi tasarlamak için hedef dokuya uygun olarak daha çok metalleri tercih etmektedir. Metal ve metal alaşımlarının, özellikle işlevini kaybetmiş veya kaybetmekte olan sert dokuların yerine, sahip oldukları güçlü metalik bağlar ve kristal yapıları sayesinde biyomalzeme olarak kullanımı oldukça yaygındır. Örneğin, metalik biyomalzemeler, ortopedik uygulamalarda yapay kalça eklemleri, yapay diz eklemleri, kemik yenilenmesi amacıyla kullanılırken, kalp-damar cerrahisinde yapay kalp kapakçıkları, kateterler ve vana ya da yüz-çene cerrahisinde diş implantları olarak kron, köprü ve protez tedavisinde de kullanılmaktadır. Metallerin, teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan cihazlarda metalik kısımlarını oluşturmak için biyomalzeme olarak kullanımı yaygındır. Metalik biyomalzeme olarak demir (Fe), krom (Cr), kobalt (Co) ve kobalt-bazlı alaşımlarının, nikel (Ni), titanyum (Ti) ve alaşımlarının, tantalyum (Ta), niyobyum (Nb), molibden (Mo), tungsten (W) ve magnezyumun (Mg) belirli bir süre vücut içerisinde kullanımı uygundur [32]. Bu malzemelerin mekaniksel özellikleri, korozyon direnci, biyouyumluluk ve düşük maliyet gibi birçok avantajları olmasına rağmen, vücut içerisinde kısa vadede kullanımıyla birlikte iltihaplanma; uzun vadede kullanımıyla ise kromozomal bozukluk, toksisite, kanserojen etki, mekaniksel dayanımın zayıf olması nedeniyle implantın dayanıksızlığı, alerjik doku reaksiyonlarına sebep olabilecek metal iyonu salınımı ve kemik ile implant arasındaki elastisite modülü uyumsuzluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır [33].

2.2.3.3 Seramikler

Vücudun zarar gören veya işlevini yitiren organlarının onarımı, yeniden yapılandırılması veya yerini alması amacıyla özel olarak tasarlanan bir diğer malzeme grubu da seramiklerdir. Seramik, biyomalzemeleri tasarlamak için kullanılan başka bir malzeme sınıfıdır. Seramik malzemeler polikristal yapılı, sert ve kırılğan, korozyona karşı dayanıklı, düşük yoğunluklu, elektriksel ve termal olarak yalıtkan malzemelerdir. Yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması avantaj

sağlamasına rağmen metal ve polimer malzemelere göre daha az tercih edilmektedir [23]. Seramikler, kas iskelet sistemi, kalça protezleri, yapay dizler, kemik greftleri, diş ve ortopedik implantlar, orbital ve orta kulak implantları, kalp kapakçıkları ve metal implantların biyouyumluluğunu artırmak için kaplamalar olarak kullanılır. Seramikler biyomalzemelerin tasarımında kullanılmasına rağmen, metallere veya polimerlerden daha az yaygın olarak tercih edilmiştir. Bazı durumlarda seramik malzemelerin kullanımı, kırılabilirlik ve zayıf çekme dayanımı nedeniyle sınırlandırılmıştır. Seramikler arasında, apatitler önemli bir rol üstlendi. Kalsiyum fosfat esaslı biyomalzemeler, iskeletin tüm alanlarını kapsayan, vücutta birçok farklı uygulamada kullanılır [20].

Biyoseramikler; doku ile etkileşimlerine göre biyo inert (Alümina (Al_2O_3), Zirkonya (ZrO_2), Pirolitik karbon, zirkonyum oksit ($ZrO_2/zirkonia$) ve titanyum oksit (TiO_2)), biyoaktif (biyocam, kalsiyum fosfat (CP), hidroksiapatit (HA) ve cam seramikler) ve biyobozunur (kalsiyum fosfat seramikler) olarak üç grupta sınıflandırılabilir. Biyo inert malzemeler, doku ile etkileşimi metalik bağ şeklinde olup vücut yapısını muhafaza eden ve hiç bir doku ile immünolojik reaksiyon vermeyen malzemelerdir. Dokuyla biyolojik olarak etkileşime girmezler ve bozunmazlar. Yüksek mekanik dayanım ve korozyon direnci, düşük sürtünme katsayısına sahiptirler. Genellikle kalça ve diz implantlarında kullanılmaktadırlar. Biyoaktif malzemeler ise kemik ya da canlı organizma yumuşak dokusuyla direk olarak kimyasal bağ ile etkileşirler. Doku ile etkileşime giren biyouyumlu, yüksek osteointegrasyon kapasitesine sahip seramiklerdir. Biyobozunur malzemelerde ise heterolitik parçalanma sonucu biyolojik olarak bozunarak zamanla doku ile yer değiştirmektedir [34].

2.2.3.4 Kompozit malzemeler

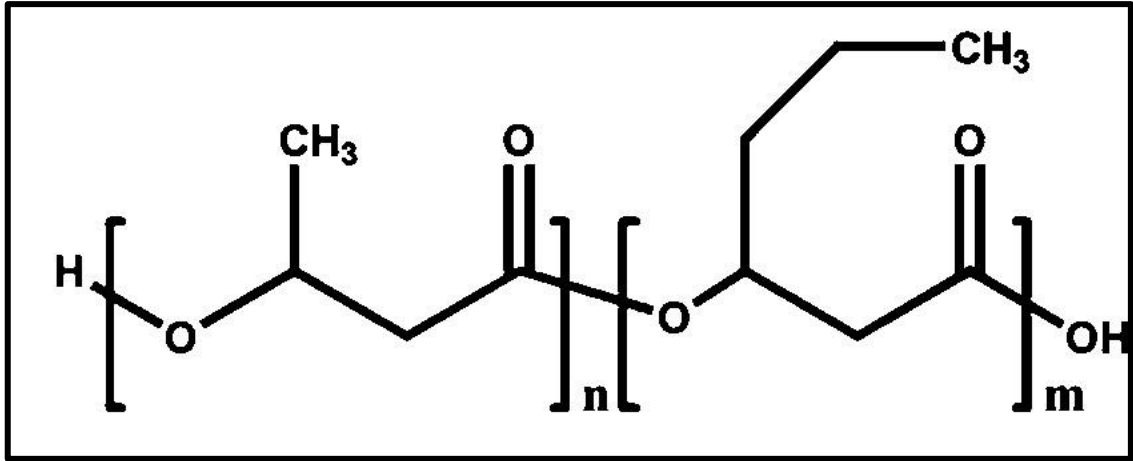
Kompozitler, belirli bir amaca yönelik ayrı ayrı bileşenlerin özelliklerinden farklı fiziksel özelliklere sahip iki veya daha fazla fiziksel ve/veya kimyasal olarak farklı, uygun şekilde biraraya getirilmesiyle veya dağıtılmasıyla oluşan malzemelerdir. Kompozit malzemelerin avantajı, bir araya gelen malzemelerin kendi özelliklerini kaybedip malzemeye yeni özellikler kazandırmasıdır [16]. Kompozit malzemeler,

matriks ve dolgu bileşenlerinden oluşur. Bu bileşenler birbirleri içinde çözünmezler. Böylece kompozit malzeme, kendisini oluşturan bileşenlerden, birinin tek başına sahip olmadığı özelliklere sahiptir. Kompozit malzeme, 'matriks' olarak adlandırılan bir malzeme içerisine çeşitli güçlendirici malzemelerin katılmasıyla hazırlanmaktadır. Matriks olarak çeşitli polimerler, güçlendirici olarakta çoğunlukla cam karbon ya da polimer lifler, bazen de mika ve çeşitli toz seramikler kullanılmaktadır [35].

2.2.4 Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx)

Polihidroksialkananoatlar (PHA'lar), dengesiz büyüme koşulları altında hücre içi karbon ve enerji depolama polimerleri olarak toprak bakterileri, mavi-yeşil algler ve bazı genetiği değiştirilmiş bitkiler gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu, toksik olmayan termoplastik biyolojik polyester sınıfıdır [25], [36]. Son zamanlarda, PHA'lar rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde yaygın olarak uygulanmaktadır [37], [38]. PHA'lar doku mühendisliği iskelesi, ilaç verme sistemi, emilebilir cerrahi dikişler vb. dahil olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada kullanılmıştır ve çeşitli çalışmalarda kullanılmaya devam etmektedir [39].

Poli (3-hidroksibutirat) (PHB), PHA ailesinin ilk ve en kapsamlı araştırılan üyesidir ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle ticari uygulamalarda büyük potansiyele sahiptir [40]. Adrenokortikal hücrelere, osteoblastlara ve epitel hücreler ile iyi biyoyumluluk gösterir. Bununla birlikte, yüksek kırılabilirliği ve düşük bozunması uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır [25].



Şekil 2. 3 PHBHHx kimyasal yapısı

Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx), polihidroksialkanoat (PHA) familyasına ait doğal biyolojik polyester malzemedir [41]. Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx), mükemmel biyobozunur, biyoyumlu, elastomerik mekanik yapısı sayesinde doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir malzemedir [37]. Diğer polyhidroksialkanoat üyeleri ile karşılaştırıldığında, düz kas hücreleri, fibroblastlar, kondrositler, osteoblastlar ve kemik iliği hücreleriyle daha iyi biyoyumluluk göstermiştir [25], [42]. Uzun alkil yan zinciri sayesinde, PHBHHx, poli (3-hidroksibutirat) (PHB) ile karşılaştırıldığında düşük kristallilik ve geniş bir işleme performansı sergiler (Şekil 2.3) [40]. Mekanik olarak performansı, PHB'den tamamen farklıdır, yani, PHBHHx, nispeten daha yüksek bir kopma uzamasına, düşük gerilme mukavemetine ve modülüne sahip olan yumuşak ve esnek bir polimerdir. Bu nedenle, bu iki polimer hem biyolojik olarak parçalanabilir hem de mekanik özellikler açısından tamamlayıcı potansiyellere sahiptirler [39]. Poli (hidroksibutirat-ko-hidroksiheksanoat) (PHBHHx) 'in PHB'ninkinden daha iyi bir esnekliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen biyomalzemedeki PHBHHx içeriği arttıkça hücre canlılığının da arttığı görülmüştür. Ayrıca malzemede PHBHHx içeriğinin artması, malzeme yüzeyindeki gözeneklerin boyutunu azaltmış ve düz bir yüzey haline getirmiştir [43].

PHBHHx, uygun mekanik özellikleri, biyo-uyumluluk ve biyo-bozunabilirliği sayesinde umut verici bir doku mühendisliği malzemesi olarak kullanılmaya devam etmektedir. PHBHHx, antikanser tedavilerinde hedefleyici ilaç taşıyıcı partiküller olarak kullanılmıştır. Kemik- kırıkta rejenerasyonu, sinir- beyin doku onarımı, yumuşak doku- kas onarımı ve biyobozunur ilaç taşıyıcıları olarak kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur [41].

2.3 Kök Hücreler ve Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, farklılaşmamış halde bulunan, kendini yenileme özelliğine sahip ve başka hücelere dönüşebilme kapasitesinde hücrelerdir. İlk kök hücre çalışmaları 1960'lı yıllarda hematopoietik kök hücrenin keşfedilmesiyle başlamıştır, sonrasında mezenkimal kök hücreler keşfedilerek çalışmalar devam edilmiştir. 1990'larda memeli beyinde, karaciğer ve epidermis gibi farklı doku ve organlarda kök hücrenin varlığı tespit edilmiştir [44]. İnsan vücudundaki organlar, olgunlaşmış ve özelleşmiş hücelere sahip dokulardan ve özelleşmiş kök hücrelerden meydana gelmektedirler. Organa özgü kök hücreler doku homeostazının korunmasını sağlayan özellikler taşırlar.

Kök hücreler kendini yenileme yeteneğine sahip hücrelerdir [45]. Bu hücreler vücuttaki birçok farklı hücre türüne dönüşebilme yeteneği göstermektedirler. Bu hücreler birçok dokuda onarım sistemi görevi görerek travma yada yaralanma durumlarında dokuları yenilemek için bölünüp çoğalabilirler.

Kök hücreler sahip oldukları sınırsız bölünebilme, çeşitli hücelere farklılaşabilme, doku onarımını sağlama ve kolay elde edilebilmeleri gibi özellikler sayesinde bilimsel çalışmalarda büyük bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Klinik uygulamalarda ve rejeneratif tıpta çokça tercih edilmekte ve kullanım alanını genişletmek amacıyla çalışmalar devam etmektedir [44].

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanması için sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Farklılaşma Meydana Gelmeden Çoğalma Ve Kendini Yenileme

Kök hücrelerin sahip olduğu en önemli özelliklerden birisi, farklılaşma meydana gelmeden sınırsız olarak çoğalabilme ve kendini yenileme işlevidir. Kök hücreler farklılaşmadığı dönemde sayılarını korumak ve farklılaşacağı hücrenin öncüsünü elde etmek için çoğalmasına kendini yenileme işlevi denir [46]. Kök hücreler sınırsız olarak kendilerini yenileyebilirler. Bu özelliği sebebiyle kanser hücresine benzer olsa da kök hücrelerin yenilenmesi ile kanser hücrelerinin çoğalma mekanizmaları farklıdır. Kanser, hücrenin kendini anormal şekilde çoğaltma ve yenileme hastalığı olarak kabul edilirken, kök hücrenin kendini çoğaltmasını ve yenilemesini büyüme faktörleri, hücreler arası etkileşim, mikro çevre, ekstraselüler matriks bileşenleri kontrol ederek sınırlandırmaktadır [47].

Kök hücrelerin sınırsız olarak kendini yenileme özellikleri embriyonik dönemin erken safhasında en yüksek seviyede görülmektedir. Kök hücrelerin kendini yenileme ve sınırsız çoğalma özelliği sonraki nesillere aktarılabilmektedir. Bu özellik kök hücrelerde farklılaşmanın meydana gelmesiyle kaybedilmeye başlamaktadır [48].

- Kök Hücrelerin Bölünme Yeteneği

Kök hücrelerde simetrik ve asimetric olmak üzere iki çeşit hücre bölünmesi meydana gelmektedir. Uzun vadede büyümeyi sağlamak, kendini yenileme yeteneğinin korumak ve sayılarını arttırmak amacıyla kök hücreler bölünmektedir [49].

Kök hücrelerin simetrik bölünmesi: Hasarlı bir dokunun onarılması gibi yeni hücrelere ihtiyaç duyulan durumlarda kök hücreler yeni hücreler meydana getirmek amacıyla simetrik olarak bölünmektedir. Simetrik bölünme ile birlikte kaynak hücreyle aynı iki hücre yada iki eş progenitor hücre meydana gelmektedir [50].

Kök hücrelerin asimetric bölünmesi: Asimetric hücre bölünmesi, farklı yollara sahip iki kardeş hücre oluşumuna neden olan bir bölünmedir. Kök hücreler kendilerini yenilerken aynı zamanda farklılaşacağı hücrenin öncüsünü oluşturmak için asimetric hücre bölünmesi geçirirler. Asimetric hücre bölünmesi ile kaynak

hücreye özdeş bir hücre ve özelleşerek farklı bir hücreyi oluşturacak öncül hücre meydana gelmektedir [51]. Öncül hücre birkaç bölünme geçirerek ve çeşitli farklılaşmalara uğrayarak özelleşmiş olgun hücreyi oluşturmaktadır [50]. Kök hücreler kendini yenilemek ve farklılaşmak arasındaki dengeyi sağlamak için asimetric olarak bölünür. Çevresel koşullar (pH), ortam şartları (iyonik ortam), hücreler arası ilişkiler, büyüme faktörleri, sitokinler asimetric bölünmeyi etkileyen iç ve dış faktörlerdir [44].

- Farklı Tip Hücrelere Özelleşebilme (Plastisite) Ve Farklanma

Farklanma, bir kök hücrenin hangi özelleşmiş hücreyi oluşturacağı ile ilgili olan süreçtir. Farklanma sürecinde önce hücre kararlanma aşamasına girmektedir ve daha sonra özelleşeceği kök hücreye göre transkripsiyon faktörlerinin devreye girmesi ile hedeflenen hücreye farklanmaktadır. Plastisite ise bir hücrenin farklı bir doku veya organdan başka bir hücreye dönüşebilme yeteneğidir [52]. In vivo ya da in vitro koşullar altında uygun sinyallerle uyarılmaları sonucu kök hücreler başka tip hücrelere farklılaşabilmektedir. Farklılaşma hücrenin asimetric bölünmesi, gen metilasyonlarının olması, epigenetik kontrol mekanizmalarındaki değişimler gibi meydana gelen biyokimyasal olayların sonucunda gerçekleşmektedir [46]. Kök hücrelerin farklılaşmasında çevresel koşullarında etkisi de bulunmaktadır [52].

- Pluripotensi

Kök hücrelerin bir canlıyı oluşturan özelleşmiş hücre tiplerinden ne kadarına farklılaşabileceği ile ilgili sayısal değerdir. Kök hücreleri, normal hücrelerden ayıran en önemli özelliklerdendir. Pluripotensi özelliği transkripsiyon faktörleri ve epigenetik düzenleyiciler ile kök hücrede meydana gelmektedir [53].

- Telomeraz Enzim Aktivitesine Sahip Olma

Telomeraz enzimi, DNA'da üretilen ve kromozom uçlarında bulunan telomerlerin boyunun ayarlanmasında görevli enzimdir. Somatik hücrelerde hücreler yaşlandıkça telomeraz aktivitesi azalmaktadır ve hücrenin her bölünmesinde telomer uzunluğu kısalmaktadır. Kök hücreler hücre bölünmesinin meydana gelme sırasında telomer uzunluğunu koruyan bir mekanizmaya sahiptir. Kök hücre ve

kanser gibi sürekli bölünebilen hücreler yüksek telomeraz enzim aktivitesi ile sınırsız çoğalma potansiyeline sahiptir [54].

- Dokunun İn Vivo Fonksiyonel Yapılanmasını Ve Devamlılığını Sağlama Yeteneği
Kök hücreler hedefe yönelik bölünmeler gerçekleştirerek dokularda meydana gelen hasarın onarılması, doku hücrelerinin yenilenerek doku devamlılığının sağlanması ve dokunun fonksiyonel özelliklerini tekrar kazanmasını sağlayan hücrelerdir.

- Dokuda Sessiz Fazda Bulunurken Bir Sinyal Geldiğinde Aktifleşme

Sessiz faz, kök hücrelerin bazal aktivite gösterdiği fazdır. Yetişkin kök hücreler uzun süre sessiz fazda kalabilirler. Uyarıcı sinyallerle uyarılma gelene kadar sessiz faz devam edebilir. Uyarıcı sinyallere yanıt olarak hücre döngüsüne tekrar girerek kök hücreler kendilerini yenilerler veya öncül hücrelere farklılaşabilirler [55].

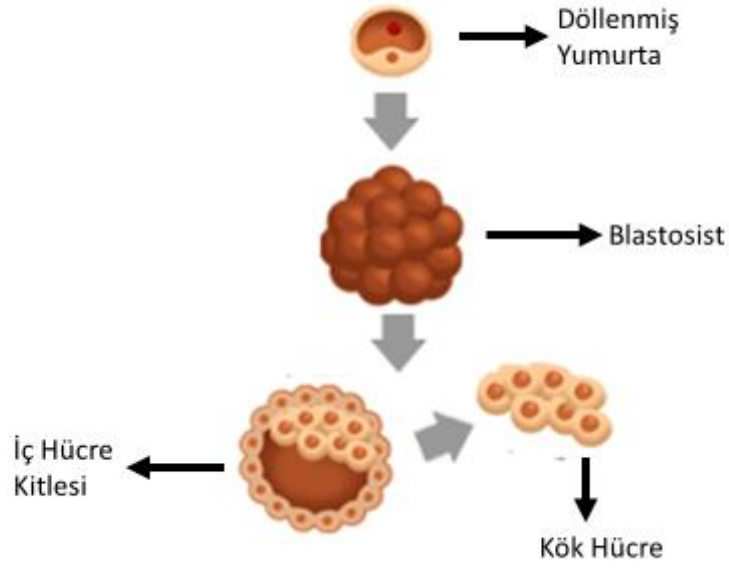
2.3.1 Kök Hücrelerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler için çeşitli kategorilerde sınıflandırmalar yapılmıştır. Elde edildiği gelişim aşamasına bağlı olarak kaynaklarına göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.3.3.1 Embriyonik Kök Hücreler

Zigotun arka arkaya bölünme geçirmesiyle blastokist oluşur. Blastokist embriyoyu oluşturan iç hücre kitlesi ve plasentayı oluşturan trofoektoderm olmak üzere 2 hücre tabakasından meydana gelir.

Embriyonik kök hücre, blastokist safhasında sınırsız yenilenme özelliğindeki hücrelere verilen isimdir. Bu hücreler sahip oldukları yüksek farklılaşma yeteneği ile ektoderm, endoderm ve mezoderm kaynaklı tüm hücre tiplerine kaynak oluşturabilmekte ve çeşitli doku ve organlara farklılaşabilmektedir [56].



Şekil 2.4 Embriyonik kök hücre eldesi

Embriyonik kök hücreler ile ilgili yapılan ilk çalışmalar 1970'li yıllara dayanmaktadır. Kahan ve arkadaşları farede meydana gelen testis kanserinden embriyo karsinoma hücreleri elde etmişlerdir [57]. Evans ve arkadaşları 1981 yılında fare blastokist iç hücre kütesinden elde edilen hücreleri in vitro ortamda fare fibroblastları üzerinde çoğaltılarak embriyonik kök hücre elde etmişlerdir [58]. Thomson ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile embriyonik kök hücrelerin morfolojisini ve pluripotent genlerin ekspresyonunu belirlemişlerdir [59]. Embriyonik kök hücreler kültür ortamında farklılaşmalarını engelleyen bir faktör olmadığında sırasıyla ektodermal ve nöral hücre hatlarına farklılaşabilirler. Kültür ortamına çeşitli büyüme faktörleri ve serum ilave edildiğinde hücreler endodermal veya mezodermal kaynaklı hücrelere de farklılaşabilmektedir [60]. Embriyonik kök hücreler, gelişimden sorumludur bu nedenle embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği ve kendini yenilemesinde rol oynayan moleküler mekanizmaları anlamak, hücrelerin temel biyolojisi anlamayı ve gelişim hatalarıyla meydana gelen birçok farklı hastalığa yeni tedavi yöntemleri bulunmasını sağlayabileceği düşünülmektedir [61].

Embriyonik kök hücrelerin elde edilmesinde günümüzde üç farklı kaynak kullanılmaktadır (Şekil 2.4).

- Tüp bebek merkezlerinde in vitro fertilizasyon sonrası kullanılmayan, düşük gebelikler sonucu meydana gelen veya bilimsel araştırmalar için bağışlanan embriyonik kök hücreler birinci kök hücre kaynağını oluşturmaktadır. Bu yolla elde edilen embriyonik kök hücreler birçok etik problemi de beraberinde getirmektedir[48], [62].
- İkinci kök hücre kaynağı ise somatik nükleer transfer metoduyla üretilen embriyonik kök hücrelerdir. Bu metotta nukleusu çıkarılmış yumurta hücresine gelişim potansiyeli engellenmiş somatik hücre nukleusu yerleştirilerek bir embriyo elde edilmektedir [63]. Farklı memelilerin yumurta kaynağı olarak kullanılmasıyla meydana gelecek insan-hayvan kimerik yapısı ve bu yapıdan meydana getirilecek insan embriyonik kök hücrelerin ne derece güvenli olabileceği sorun teşkil etmektedir.
- Üçüncü kaynak ise sperm ile döllenme yapılmadan yumurta hücrelerinden doğrudan elde edilen embriyonik kök hücrelerdir [48]. Günümüzde bu yöntem ile elde edilen embriyonik kök hücrelerde homozigotluk sebebiyle sorunlar meydana gelebileceği düşünülmektedir.

2.3.3.2 Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücrenin tanımı, embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler için kullanılmaktadır. Yetişkin kök hücreler olgun dokularda sessiz fazda bulunmaktadır fakat kök hücre sayısını arttırmak ve öncüsü olduğu dokularda meydana gelen hasar sonucu hasarlı bölgenin onarılması için seyrek olarak bölünmektedirler [64].

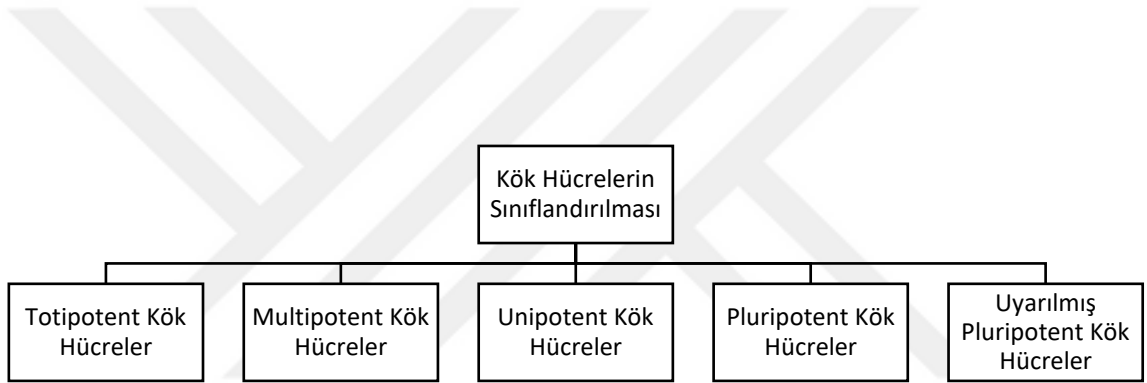
Hematopoietik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH), bağırsak kök hücreler (BKH) ve epitel kök hücreler günümüzde bilimsel araştırmalarda en çok ve sık çalışılan yetişkin kök hücre türleridir [46].

En iyi karakterize edilmiş yetişkin kök hücreler hematopoietik kök hücrelerdir. Kanda bulunan bu hücre grubu kan üretiminden sorumludur. Kendi kendini

yenileyebilmektedirler ve uygun koşullarda tüm kan dokusuna farklılaşabilmektedir [65]. Somatik dokulardaki yetişkin kök hücreler kolaylıkla erişilebilen kök hücre kaynağıdır. Embriyonik kök hücreye kıyasla etik kısıtlama bulundurmaması ve dokuya spesifik olması nedeniyle araştırmalarda ve klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır [66].

2.3.2 Kök Hücreler Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler fonksiyonel olarak farklılaşma yeteneğine göre totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent ve uyarılmış pluripotent olarak 5 grupta sınıflandırılır (Şekil 2.5) [67].



Şekil 2.5 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

2.3.2.1 Totipotent Kök Hücreler

Yumurtanın döllenmesinden sonra meydana gelen zigot ve zigotun bölünmesiyle oluşan tüm hücreler totipotent hücre olarak isimlendirilmektedir. Totipotent hücreler canlı bir organizma vücudunda bulunan tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip oldukları için, en önemli kök hücre tiplerinden biridir [68].

Totipotent hücreler özellikle gen ve hücre terapilerinde, doku mühendisliğinde en çok tercih edilen kök hücre grubudur. Bölünme sürecinin araştırılmasıyla hastalığın hangi aşamada meydana geldiği anlaşılabilir böylece hastalıklı hücrenin

bölünmesi ve çoğalması engellenebilmektedir [69]. Uygun koşullar, büyüme faktörleri ve destek materyali sağlandığında her bir totipotent kök hücre sahip olduğu sınırsız farklılaşma yeteneği ile embriyoyu meydana getirebilir [46].

2.3.2.2 Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler in vitro koşullarda farklılaşma yetenekleri sınırlı olan fakat ex vivo koşullarda gerekli sinyaller verildiğinde çeşitli hücre tipine farklılaşan, yenileme özelliğine sahip hücrelerdir. Multipotent kök hücreler, birçok hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir [70].

Kemik iliği ve plasenta multipotent kök hücrelerini içermektedir. Multipotent kök hücreler, ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiştir, daha sonraki çalışmalarda kemik, kas, kıkırdak, yağ gibi birçok yetişkin dokudan elde edilmeye başlanmıştır. Kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücreler tüm kan hücresi tiplerini meydana getirebilen ancak diğer hücreleri üretmeyen kök hücrelerdir [71].

Multipotent kök hücreler, farmakolojik çalışmalarda ve tıpta kullanılabilen kök hücre kaynaklarıdır. Birçok araştırmada kullanılan hematopoetik (kan kök hücreleri) ve mezenkimal kök hücreler multipotent kök hücre grubuna girmektedir [72].

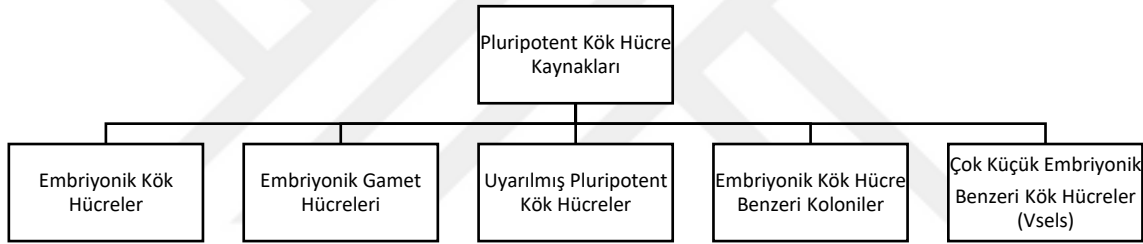
2.3.2.3 Unipotent Kök Hücreler

Unipotent kök hücreler, yetişkin dokularda bulunan ve sadece bir hücre türüne farklılaşabilen kök hücre grubudur. Diğer kök hücre gruplarının geniş farklılaşma seçenekleriyle kıyaslandığında çok daha düşük farklılaşma yeteneğine sahiptir [73]. Farklılaşma kapasitesinin sınırlı olmasına rağmen sahip olduğu önemli ölçüdeki terapötik potansiyel ile hastalıkların tedavisi ve yaralanmalarda kullanılmak üzere yapılan çalışmalarla geliştirilebilirler. Bununla birlikte, her kök hücrenin sahip olduğu kendini yenileme özelliği ile unipotent kök hücreler organ nakilleri için sağlıklı ve canlı doku meydana getirme amacıyla kullanılabilir [74].

2.3.2.4 Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, embriyo farklılaşmasının başlangıç aşamasında meydana gelen endoderm, mezoderm ve ektoderm germ tabakalarına ve bu tabakalardan meydana gelen neredeyse tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan kök hücre türüdür [69].

Embriyonik kök hücreler olarak bilinen pluripotent kök hücreler, gelişen embriyonun 5-6. gününde hücrenin blastosist evresine gelmesiyle iç hücre kitlesinden meydana gelmektedir [56]. Sınırsız çoğalma yeteneği sayesinde doku yenilenmesi ve geniş doku hasarının tamir edilmesinde kullanılırlar. Bu özellikleri bu hücre tipinin rejeneratif tıpta yaygın kullanımını sağlamaktadır [48].



Şekil 2.6 Pluripotent Kök Hücre Kaynakları

Pluripotent kök hücreler gelişmekte olan embriyodaki tüm somatik ve germ hattı hücrelerin kökenini oluşturmaktadır. İlk pluripotent kök hücreler Hogan ve arkadaşları tarafından 1976 yılında teratokarsinom olarak bilinen gamet hücrelerinde meydana gelen bir tür tümörden izole edilerek elde edilmiştir [64]. Thomson ve arkadaşlarının insan embriyonik kök hücrelerini (hESCs) başarılı bir şekilde kültüre etmesi ve çoğaltmasının ardından bu hücrelerin rejeneratif tıpta birçok iyileşme süreci zorlu hastalıkların tedavi edilmesinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Embriyonik kök hücreler, kök hücre türleri arasında en yüksek farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu özellikleri sayesinde rejeneratif tıpta sıklıkla kullanılan hücre kaynağı olmuşlardır. Ancak embriyonik kök hücre izolasyonu esnasında canlı blastosistlere zarar verilmesiyle ilgili etik ve dini kaygılar araştırmaları kısıtlamıştır. Araştırmalar bu etik sorunları ortadan kaldırmaya ve alternatif kaynaklardan pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi yönünde ilerlemeye odaklanmıştır (Şekil 2.6).

Yamanaka ve arkadaşları 2006 yılında yayınladığı çalışmada 4 transkripsiyon faktörle somatik hücrelerin embriyonik duruma yeniden programlanması ve embriyonik kök hücre elde edilmesi çalışması ile Nobel ödülüne layık görülmüştür. Günümüzde Yamanaka faktörleri adlandırılan bu 4 faktör, hücrelerin yeniden programlanması kullanılmaktadır.

2.3.2.5 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Embriyoların iç hücre kütesinden elde edilen embriyonik kök hücreler sahip oldukları yüksek farklılaşma yeteneği ile hücre bazlı tedavilerle birçok hastalığa umut olmuştur fakat embriyonik kök hücre teknolojisinde gelişmeler oldukça yavaştır ve klinik denemelerin başlayabilmesi için birçok teknik ve etik sorunun ortadan kaldırılması gerekmektedir [75].

Embriyonik kök hücrelerle karşılaşılan etik sorunlara karşı kullanılacak alternatif kaynak bulabilmek amacıyla araştırmalar yapılmıştır. Dölleniş yumurtadan meydana gelen embriyonik kök hücreler çeşitli somatik hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptir fakat somatik hücreler, diğer somatik hücre tipilerine ayrılmamakta ve farklılaşmamaktadır. Bunu açıklamak için araştırmacılar tarafından iki ihtimal gözönüne alınmıştır. Birincisi, somatik hücreler, gelişme sırasında başka türdeki hücrelere farklılaşma yeteneklerini tamamen kaybedebilir veya ikinci ihtimal olarak potansiyellerini koruyabilirler fakat bu potansiyel gelişme sonrasında bastırılabilir [76].

2006'da yapılan çalışmalar sonrası keşfedilen indüklenmiş pluripotent kök hücre tekniği, yetişkin hücre pluripotensine yönelik araştırmalarda dönüm noktası olmuştur. Bu alanda ilk çalışma Yamanaka ve Takahashi tarafından yapılmıştır.

Japon bilim adamları yaptıkları çalışmada embriyonal dönemde önemli olan dört transkripsiyon faktörünün genlerini (Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc) erişkin somatik hücrelere aktarmış, erişkin hücreleri tekrar programlayarak embriyonik kök hücre benzeri fonksiyonlara sahip olan hücreler elde etmişlerdir [77].

Pluripotent hücreler, canlıyı oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelere verilen isimdir. Uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) olarak adlandırılan bu hücreler embriyonik kök hücreler gibi kendini çoğaltma (self renewing), farklı dokulara değişebilme (pluripotensi) ve üç embriyonik germ tabakasına (ektoderm, endoderm ve mezoderm) farklılaşma yeteneğine sahiptir [78]. Pluripotent kök hücreler temel olarak insan embriyo (embriyonik kök hücreler) ya da indüklenen somatik hücrelerden (uyarılmış pluripotent kök hücreler) köken alabilmektedirler. Uyarılmış pluripotent kök hücreler insan ya da hayvan somatik hücrelerinin genetik olarak yeniden programlanmasıyla elde edilen kök hücrelerdir. Etik sorun oluşturmayan bu hücreler kişiye özel tedavi geliştirmede ve hastalık modellemesi çalışmalarında önemli bir kaynak oluşturmaktadır [79].

Somatik hücrelerin programlanarak uyarılmış pluripotent kök hücreye farklılaşmasını sağlayan programlama faktörleri sahip oldukları aktiviteye göre seçilmektedir:

Nanog protein: Nanog proteini embriyonik kök hücrelerin, pluripotent özelliğini etkileyen, in vitro olarak farklılaşmanın engellenmesinde önemli rolü olan transkripsiyon faktörüdür.

Oct4: Embriyonik kök hücrelerin, pluripotensi özelliğinin korunmasını sağlayan proteindir. Oct-4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasında etkili olmaktadır.

Sox2: En önemli görevlerinden birisi Oct4 ekspresyonunu düzenlemesidir. Yapılan çalışmalar Sox2 ve Oct4'ün birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotent karakterinin oluşturulmasında görev aldıklarını göstermiştir.

Klf: Klf ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişimi ve apoptozisi olmak üzere pek çok biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlamaktadır. Klf gen ailesi

embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme yeteneklerinde önemli rol oynamamaktadır. Ancak diğer transkripsiyon faktörlerinin (Nanog, Myc, Oct4) ekspresyonlarını düzenleyerek pluripotensi de dolaylı olarak görev alır.

Myc ailesi: V-Myc, genomda bazı bölgelere bağlanıp genomun gevşemesini sağlayarak diğer transkripsiyon faktörlerinin genoma bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. UPKH çalışmalarında transfeksiyon verimliliğini arttırmak amacıyla aktarılan gen bölgeleri arasına dahil edilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda farklı hücre kaynakları ve farklı kombinasyonlarda yeniden programlama faktörleri kullanılarak UPKH çalışmaları yapılmıştır.

Hücreleri yeniden programlamak ve pluripotens özellik kazandırmak amacıyla transkripsiyon faktörü genlerinin hücrelere aktarılması gerekmektedir. Gelişen teknoloji ile beraber gen aktarımı yöntemleri kullanılarak erişkin somatik hücrelerinden kök hücre özelliklerine sahip uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) elde edilebilmektedir [77].

Rejeneratif tıpta, uyarılmış pluripotent kök hücre kullanımının önemli bir yeri vardır. Yaralanmış veya hasar görmüş dokuların tedavisi, uyarılmış pluripotent kök hücrelerin laboratuvar koşullarında üretimi ve hasarlı dokuya verilmesi ile sağlanabilmektedir. Bağışçıların azlığı ve uygun donör bulunamaması sebebiyle birçok hasta nakil beklerken yaşamını kaybetmektedir. Günümüzde artan organ nakli bekleyen hasta sayısı karşısında uyarılmış pluripotent kök hücre teknolojisinin kullanımı birçok organ nakli bekleyen hastaya umut olmaktadır. Organ nakli bekleyen hastanın vücuduna nakledilecek hücreler, hastanın kendi somatik hücrelerden üretilen onarılmış uyarılmış pluripotent kök hücrelerden farklılaşacağından uyum sorunu yaşanmadan hastaya tam uyumlu sağlıklı doku nakli gerçekleştirilebilecektir [80]. Liu ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada insan uyarılmış pluripotent kök hücrelerden türetilen hepatik hücrelerin çeşitli farklılaşma aşamalarda karaciğer dokusunda rejeneratif potansiyelini göstermişlerdir. Suziki ve arkadaşları 2013 yılında uyarılmış pluripotent kök hücrelerin hematolojik ve immünolojik hastalıkların tedavisinde uygulanması için yararlı bir araç olacağını çalışmalarıyla göstermişlerdir.

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- L929 hücre hattı
- DMEM-F12 besi yeri
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- Fetal bovine serum (FBS)
- Ethanol
- Tripsin EDTA
- Tripan blue
- 75 cm² flask
- 25 cm² flask
- 96 kuyulu hücre kültür plakaları
- 24 kuyulu hücre kültür plakaları
- Nitril eldiven
- Falkon Tüp
- Fosfat Buffered Saline (PBS) Tablet
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Steril pipetler tek kullanımlık - 2 ml
- Steril pipetler tek kullanımlık - 5 ml

- Steril pipetler tek kullanımlık - 10 ml
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Total Antioxidant Status (TAS) Test Kiti
- Total Oxidant Status (TOS) Test Kiti
- CD1 Human Elisa Kit
- TP53/P53 Elisa Kit

3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, EVO® LS 10)



Şekil 3.1 Taramalı elektron mikroskobu

- Bet yüzey alanı cihazı (Quantachrome, QuadraSorb SI)



Şekil 3.2 Bet yüzey alanı cihazı

- FTIR Spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum 100)



Şekil 3.3 FTIR Spektrofotometresi

- Raman Spektrofotometresi



Şekil 3.4 Raman Spektrofotometresi

- TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300)



Şekil 3.5 TG/DTA Cihazı

- Elisa reader (Thermo Scientific, Multiskan GO)



Şekil 3.6 Elisa reader

- Inverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)



Şekil 3.7 Inverted mikroskop

- CO₂ inkübatörü (Esco, CelCulture CO₂ INCUBATOR)



Şekil 3.8 CO₂ inkübatörü

- Çalkalamalı su banyosu(Memmert WNB 29)



Şekil 3.9 çalkalamalı su banyosu

- Flow kabin (Esco, Sentinel PLATINUM, Class II)



Şekil 3.10 Flow kabin

- Santrifüj (Hermle, Z 206 A)



Şekil 3.11 Santrifüj

3.2 Metod

Sunulan tez çalışmasının metod kısmı PHBHHx bazlı malzemelerin sentezlenmesini, malzemelerin karakterizasyon çalışmalarını, hücre kültürü çalışmalarını ve membranlara kök hücre yüklenmesini kapsamaktadır.

3.2.1 PHBHHx Bazlı Membranların Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda parafin mum içeren PHBHHx bazlı membranlar hazırlanmıştır. PHBHHx membranının hazırlanması için kloroform içerisinde %5 (w/v) PHBHHx (Kaneka, Japonya) çözülecektir. Homojenizasyonu sağlamak için 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda bir gece bekletilecektir ve hazırlanan karışım cam petrilere dökülecektir. Çeker ocakta üç gün süre ile bekletilerek kuruması sağlanacaktır.

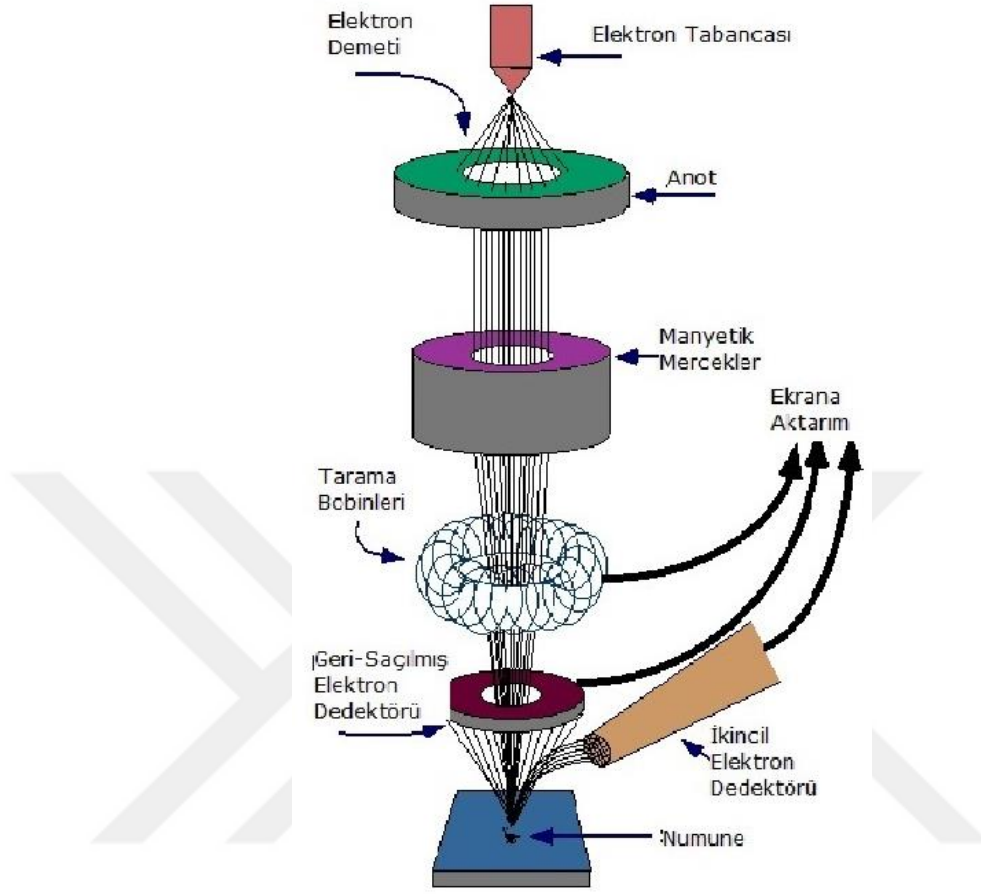
PHBHHx/ Paraffin wax membranların hazırlanması için kloroform içerisinde % 5 (w/v) PHBHHx ve % 0,5, %1, %3 ve %5 (w/v) paraffin mum çözülmüştür. Homojenizasyonu sağlamak için 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda bir gece bekletilecektir ve hazırlanan karışım cam petrilere dökülecektir. Çeker ocakta üç gün süre ile bekletilerek kuruması sağlanacaktır.

3.2.2 Membranların Karakterizasyonu

3.2.2.1 Yüzey morfoloji analizi

Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) hazırlanan membranları görüntülemek için elektronlar kullanılmaktadır. Elektron kullanımı sayesinde SEM en güçlü ışık mikroskopundan 250 kat daha fazla büyütme oranına sahip olmaktadır. SEM örneğe yüksek enerjili demet elektronları yollayarak numune yüzeyindeki atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları ve yüzey elektronları ya da yüksek enerjili demet elektronlarından enerjisi düşüp yüzeyde toplanan ikincil elektronlar olarak adlandırılan elektronların oluşumuna neden olmaktadır. İkincil elektronlar numune haznesinde bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektronlar görüntü sinyaline çevrilmektedir. İkincil elektronlar

numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesini sağlamaktadır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 SEM çalışma prensibi

PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin mum membranın yüzey morfoloji analizi SEM (Zeiss, EVO® LS 10) ile yapılmıştır (Şekil 3.1). Membranlara 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanıp 'Spotter coater' cihazı kullanılarak altın kaplanması sağlanmıştır. Yüksek basınç koşulları altında ikincil elektron saptayan dedektör kullanılarak yüzey analizi yapılmıştır. İkincil elektron kaynağı olarak LaB₆ flaman kullanılmıştır. 1000x ve 5000x büyütme oranları arasında çalışılmıştır. SEM kullanılarak membranların yüzey morfolojileri ve gözenek yapıları değerlendirilmiştir [81].

3.2.2.2 Su temas açısı (WCA) ölçümü ve Serbest Yüzey Enerjisi

Hazırlanan membranların hidrofobisitesi su temas açısı ölçümü ile değerlendirilmiştir. Su teması açısı, bir malzeme yüzeyinin hidrofobikliğinin bir ölçüsüdür. Hidrofobik malzemeler tipik olarak $> 70^\circ$ temas açısına sahiptir ve hidrofilik malzemeler tipik olarak $< 70^\circ$ temas açısına sahiptir [82]. Su temas açısının ölçülmesi, bir biyomateryal yüzeyin hidrofilikliğini incelemek için kullanılan standart bir yöntemdir ve bir biyomalzemenin hücre yapışması ve büyümesi üzerindeki olası etkisini değerlendirmede yardımcı olabilir. Yüzey hidrofilitesi, temas açısının suyla ölçülmesiyle belirlenmiştir.[83] PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum blend membranların su temas açısı, durgun damla (sessile drop) yöntemi ile oda koşullarında ölçülmüştür.

Yüzey enerjisi doğrudan deneysel bir ölçümle belirlenmesi mümkün olmayıp ancak temas açısı, ıslanma ısısı vb. veriler kullanılarak dolaylı yoldan bazı hesaplamalarla belirlenir. Temas açılarından elde edilen veriler cihaz tarafından Fowkes-geometrik ortalama yaklaşımı kullanılarak otomatik olarak (mJ/m^2) olarak hesaplanmıştır. Fowkes tarafından önerilen geometrik ortalama yaklaşımında, katı yüzey enerjisi iki bileşen halinde incelenmiştir. Bu bileşenler, dispersive (γ) ve polar (γ) enerji bileşenleridir. Fowkes tarafından önerilen, katı yüzey enerjilerinin hesabında kullanılan denklem, Young eşitliğinden türetilmiştir.

3.2.2.3 Yüzey alanı analizi

BET analiz yöntemi 1938 yılında Brunauer, Emmett ve Teller tarafından geliştirilmiştir. 1960 yılında ise Haul ve dümbgen tarafından geliştirilen cihazla beraber bugün kullanılan metod ortaya çıkmıştır. Metod gaz basıncından yararlanarak katı maddelerin yüzey alanının ölçülmesine dayanmaktadır. Numunenin gaz basıncına uğratıldığı ve numunenin gözenekli yapısı tarafından gaz absorbe edildikten sonraki gaz basıncı P olarak adlandırılmaktadır. Numuneye uygulanan gazın ilk basıncı ise P0 olarak adlandırılmaktadır. P/P0 kullanılarak katı numunenin yüzey alanı hesaplanmaktadır.

PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin mum membranın yüzey alanı BET yüzey alanı cihazı(Quantachrome, QuadraSorb SI) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). Membranları BET analizine hazırlamak amacıyla 75°C ' de 18 saat boyunca degas işlemine maruz bırakılmıştır. Membranlar yüksek saflıkta azot kullanılarak yüzeylerinin azotu

fiziksel olarak absorblaması ölçülmüştür. Analiz 191 dakika boyunca devam etmiştir. P/P_0 değerinin 0,05 – 0,3 olduğu aralıkta analiz yapılmıştır [84].

3.2.2.4 Termogravimetrik analiz

Termogravimetrik (TG) ölçümler bir malzemenin zamanla ısıtılması ve ısınmayla beraber gelen kütle kaybının ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Malzemenin ısınmayla meydana gelen kütle kaybı, maddenin dekompozisyon (bozulma) sıcaklığını göstermektedir [85]. Termal olarak kararlı olmayan malzemeler üretim prosesi sırasında uygulanan ısıl işlemler ya da uzun-sürelili depolama sonrasında degradasyona uğrayabilir ve malzemenin mekanik özelliklerini etkileyebilir [86].

Diferansiyel termal analiz (DTA) maddeye enerji verilerek maddenin sıcaklık artışının gözlenmesine dayanan bir metoddur. Verilmekte olan enerji miktarına göre malzemenin sıcaklığı takip edilmekle beraber madde ısı almaya devam ederken sıcaklık değişimi göstermiyor ise membranın hal değişim sıcaklığı ve enerjisi de bu yöntem ile hesaplanabilmektedir [87].

TG/DTA cihazı aynı anda bir numunenin hem termogravimetrik (TG) hem de diferansiyel termal analizinin (DTA) yapılabildiği bir cihazdır. İki analizin sonuçları aynı grafik üzerinde gösterilerek membranların TG/DTA sonuçlarına ulaşılmaktadır [88].

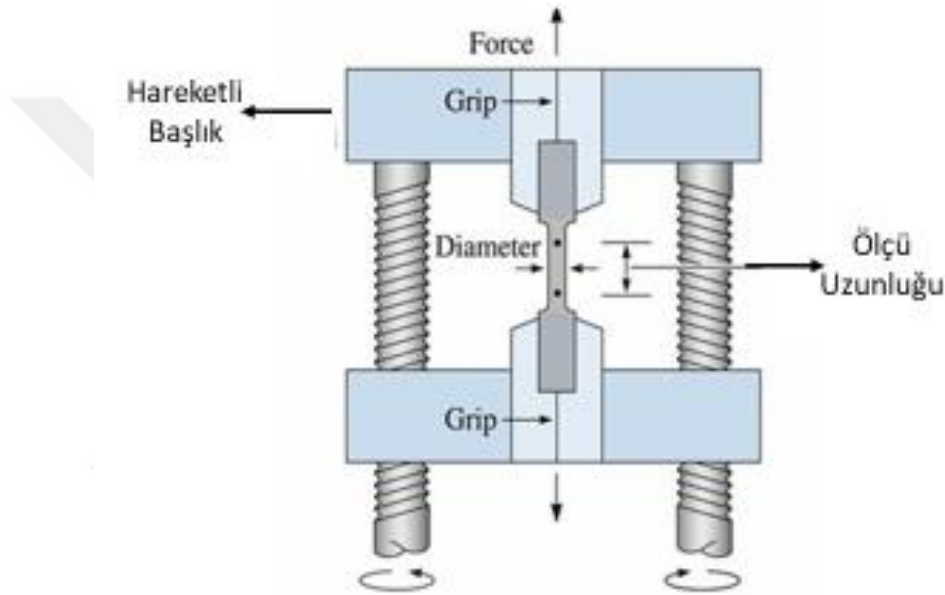
PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin mum membranının termal özellikleri termogravimetrik (TG)/ diferansiyel termal analizinin (DTA) ölçümler ile belirlenmiştir (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300) (Şekil 3.5). Alüminyum penlere yerleştirilen malzemeler dinamik bir hava ve azot atmosferi altında, 10 °C/ dk ısıtma hızlarında ısıtılmış ve kütle kaybı takip edilmiştir. Analiz 25°C-1000°C aralığında 90 dakika sürmüştür.

3.2.2.5 Dinamik Mekanik Analiz

Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hazırlanan membranlar *in vivo* ya da klinik çalışmalarda kullanılmaya sırasında çeşitli kuvvetlere maruz kalırlar. Bu nedenle mekanik açıdan maruz kaldıkları kuvvetlere karşı dayanıklı olmaları gerekmektedir. Aynı zamanda manipülasyonun kolaylaştırılması için optimum dayanım değerlerinin de belirlenmesi

gerekmektedir. Bu nedenle doku mühendisliğinde kullanılacak membranın üretimi sırasında malzemelerin mekanik özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir [89].

Doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelelerinin mekanik özellikleri onarımı hedeflenen doku oluşumu için uygun desteği sağlaması gerekmektedir. Doku mühendisliğinde kullanım amacına göre (kemik, kıkırdak doku vb) hedef dokunun mekanik özelliklerine benzer özelliklere sahip olması gerekmektedir [17]. Ayrıca hedef dokuya eklenme sırasında yeterince dayanıklı olması ve sonrasında mekanik dayanıklılığını kaybetmemesi gerekmektedir [18].



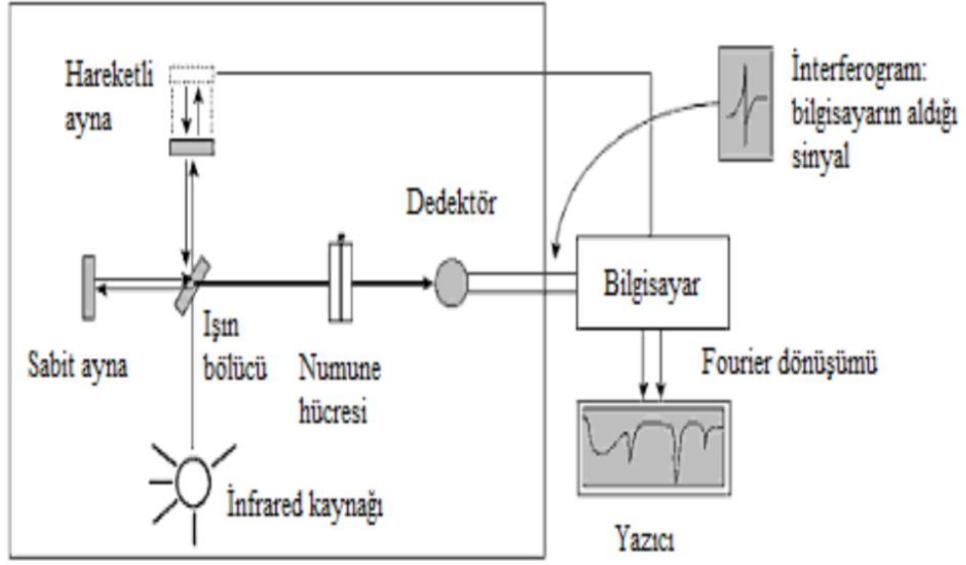
Şekil 3.13 DMA çalışma prensibi

Membranların mekanik özellikleri çekme- uzama eğrisi çizilerek belirlenmiştir (Şekil 3.13). Bu amaçla 1cm eninde 3 cm uzunluğunda membranlar kullanılmıştır. Gripler arası mesafe 10 mm, preload değeri 0.01N , çekme hızı 10 mm/ dk olacak şekilde analiz yapılmıştır. Test sonucunda elde edilen verilerle young's modulus ve elongation at break değeri belirlenmiştir. Dinamik Mekanik Analizi (Devotrans- GPUG/R) tension modunda 30° C sıcaklıkta ölçüm yapıldı. Tüm ölçümler her örnek grubu için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi, matematiksel Fourier dönüşüm yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal analitik yöntemdir (Şekil 3.14). FT-IR spektroskopisi; infrared ışık kaynağı, ışın bölücü ve dedektörden meydana gelmektedir. Işık kaynağından çıkan ışın, ışın bölücü ve sabit-hareketli aynalardan oluşan interferometreden geçerek ikiye ayrılmaktadır ve aynalar yardımıyla tekrar ışın bölücüye gelen ışının bir kısmı numuneden geçerek absorplanmaktadır. Absorplanma sonrası numuneden çıkıp dedektöre ulaşan ışın, numune tarafından absorplanan kısmın belirlenmesi amacıyla referans olarak kullanılan bir lazer ışınıyla karşılaştırılmaktadır ve sonuç olarak elde edilen interferograma bilgisayar aracılığıyla Fourier dönüşümü uygulanarak numuneye ait FT-IR spektrumu elde edilir [90].

Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden meydana gelmektedir. Kızılötesi bölgede kimyasal olarak belirgin ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin tanımlanmasını sağlayan MIR bölgesinde $3600\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığına 'fonksiyonel gruplar bölgesi', $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ aralığı ise 'parmak izi bölgesi' olarak isimlendirilmektedir. Böylece bu bölgede meydana gelen bantlar ile protein, nükleik asit gibi makromoleküller ve hücre duvarına ait bileşenler tespit edilebilmektedir [91].

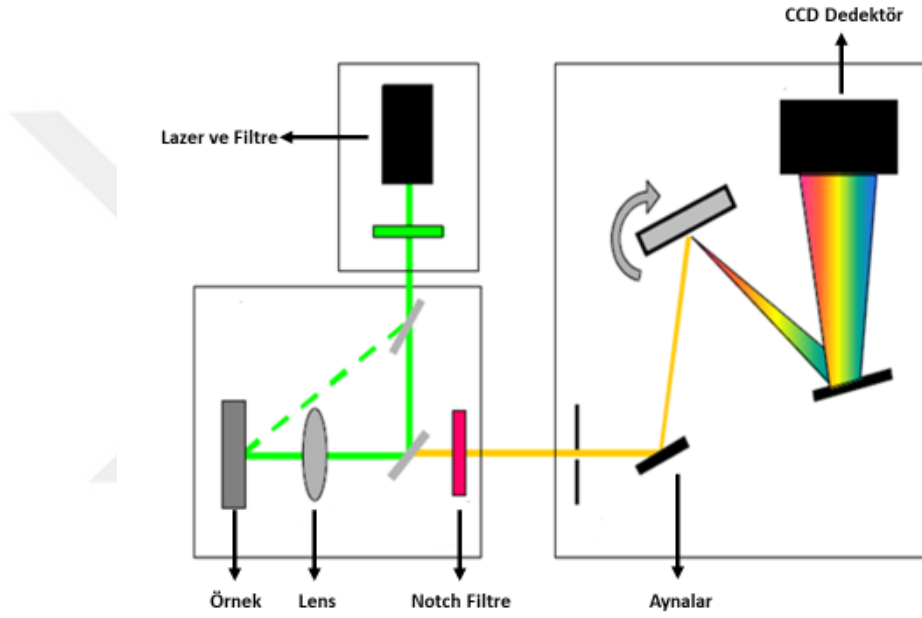


Şekil 3.14 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FTIR) şematik gösterimi

1200–700 cm^{-1} aralığındaki parmak izi bölgesi moleküllere ait küçük yapıları ve yapıda meydana gelen küçük değişiklikleri tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Yapıda meydana gelen küçük değişiklikler, bu bölgede görülen absorpsiyon piklerinin büyük oranda yer değiştirmesine neden olduğu için bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğunu gösterir. Tekli organik bağların büyük bir kısmı bu bölgede absorpsiyon bantlarını oluşturmaktadır. Parmak izi bölgesinin oldukça dar olması ve enerjilerinin birbirine çok yakın olmasından sebebiyle bu bölgedeki titreşim frekansları birbirini oldukça fazla etkilemektedir. Bu etkileşimler nedeniyle maddelerin ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları kompozit bantlar olduğu için sadece tek bir bağ frekansından kaynaklanan absorpsiyon bandı değildir. Işık dizisinin en karmaşık kısmı olmasına rağmen FT-IR analizinde kullanılan malzemeye ait karakteristik bilgi yine bu bölgeden sağlanır. MIR bölgesi ile birlikte infrared bölgenin tamamına bakılarak FT-IR'da membranların bağ yapısı hakkında detaylı bilgi sağlanabilmekte, ayrıca madde miktarlarıyla orantılı olarak kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu değiştiği için kantitatif analiz de yapılabilmektedir [92].

3.2.2.7 Raman Spektrofotometresi

Doku iskelelerinin yüzey kimyasının incelenmesi için raman spektroskopisi (Renishaw InVia, United Kingdom) analizi yapılmıştır. 532 nm lazer kullanılarak 500- 3000 nm tarama aralığında analiz gerçekleştirilmiştir. Titreşim spektroskopisi, maddenin infrared ışınlarını absorplaması veya ışınların saçılması üzerine kurulmuş bir spektroskopi dalıdır. Homonükleer moleküller (N₂, O₂ ve Cl₂ gibi) hariç bütün moleküller infrared ışınlarını absorplar ve infrared spektrumu verirken homonükleer moleküller ve simetrik bağlar Raman'da pik verirler (Şekil 3.15) [93].



Şekil 3.15 Raman spektrofotometresi

Moleküller, üzerine aktarılan elektromanyetik enerjiyi absorplar. Bu arada moleküller arası bağın gerilmesi sonucu atomlar birbirine yaklaşabilir veya uzaklaşabilir. Atom sayısı ikiden fazla ise bağlar arasındaki açı da farklı olmaktadır. Moleküldeki bağlar, açılar ve kütleler (atomlar) farklı olduğu için her birinin titreşim enerjileri de farklıdır. Raman, FT-IR yönteminin tamamlayıcısı olabilmektedir ve IR 'de gözlenmeyen zayıf titreşimler Raman spektroskopisinde gözlenir. Ayrıca analiz edilecek malzeme açısından sınırlama olmayışı, UV, görünür ve yakın IR ışınlarının kullanılabilmesi, optik olarak ölçüm

kolaylığının olması, sulu ortamda rahatlıkla çalışılabilmesi gibi IR' ye göre avantajları bulunmaktadır [94].

3.2.2.8 Şişme analizi

PHBHHx ve PHBHHx/Paraffin mum membranların su çekme performanslarının belirlenmesi için şişme testi yapılmıştır. Kuru ağırlıkları tartılan membranlar distile su içerisinde bekletilmiştir. 1, 24 ve 48. saatlerde membranların ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. Membranların su çekme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Denklem 3.1 Su tutma yüzdelerinin hesaplanması

$$\% \text{ Şişme} = (W_f - W_o / W_{Xo}) \times 100$$

Wf: son, ıslak ağırlık, Wo başlangıç, kuru ağırlık.

3.2.2.9 Biyodegradasyon analizi

Biyodegradasyon analizi için lizozim içeren PBS çözeltisi kullanılmıştır. PBS çözeltisi içine 1,5 µg/ ml olacak şekilde lizozim enzimi eklenmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin mum membranın boyutları 10 mm X 10 mm olacak şekilde küçük parçalara ayrılmıştır. Membranların kuru ağırlıkları ölçüldü ve sterilizasyon için %70 etanol içerisinde UV altında 1 saat bekletilmiştir. Ardından PBS çözeltisi ile etanol uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan membranlar, 1,5 µg/ mL olarak hazırlanan lizozim içeren PBS çözeltisini içerisine bırakılmıştır. Örnekler hafif mekanik hareket altında 37 °C'de bir ay boyunca lizozim çözeltisine maruz bırakılmıştır. Örneklerin kuru ağırlıkları 7, 14, 21 ve 28. günlerde ölçülmüştür. Lizozim çözeltisi ölçümün yapıldığı günlerde tazelenmiştir. Kütle kaybı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Denklem 3.2 Kütle kaybının hesaplanması

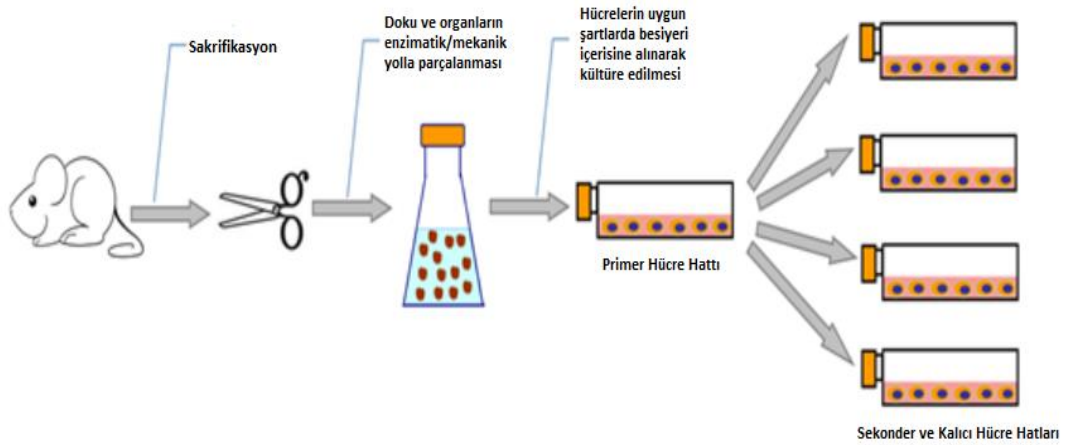
$$\% \text{ Degradasyon (Kütle Kaybı)} = (W_f - W_o / W_o) \times 100$$

Wf: son, ıslak ağırlık, Wo: başlangıç, ıslak ağırlık.

3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Belirli bir hücrenin bir organ veya dokudan izole edilerek *in vitro* ortamda, uygun şartlara adapte edilip çoğaltılmasına hücre kültürü denilmektedir (Şekil 3.16). Canlı türlerinin farklı dokularından elde edilen dokular parçalanarak hücreler açığa çıkarılır ve içerisinde temel aminoasitler, mineraller ve proteinler bulunan özel besiyerlerinde, steril şartlarda, 37 °C'de yüzeylere tutunarak üremesi sağlanır. Hücre kültürü çalışmalarında amaç, izole edilen hücrelerde canlılık devamını sağlayarak hücreleri çoğaltmak ve çeşitli araştırmalarda kullanabilmektir.

Hücre kültüründe kullanılan hücre hatları primer, sekonder ve devamlı hücre hatları olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Primer hücre hatları, doku ya da organdan enzimatik ya da mekanik yollarla izole edilen ilk hücrelerdir. Elde edilen hücreler içerisinde besiyeri bulunan şişelere inoküle edilir ve şişe yüzeyine yapışarak hücreler çoğalmaya başlanmaktadır. Bu hücrelerde metabolik aktivite oldukça yavaş olmaktadır ve maksimum 8-9 pasaj kadar hücre üretimi olabilmektedir. Ayrıca doğrudan taze dokudan alındıkları için kontaminasyon riskinin en yüksek olduğu hücre hattıdır.



Şekil 3.16 Hücre Kültürü Çalışmaları

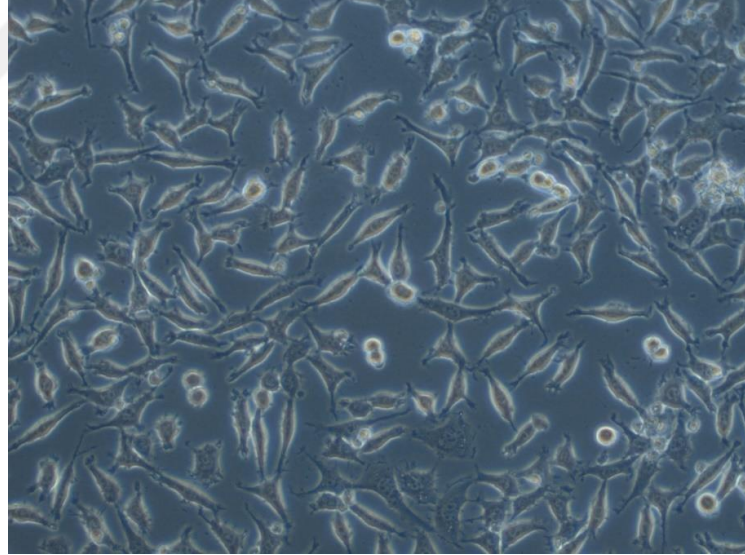
Sekonder hücre hatları, primer hücre kültüründen elde edilip 50 ila 100 pasaj kadar çoğaltılabilen ancak belli bir pasaj sayısından sonra üreme yeteneğini kaybeden hücre

hatlarıdır. Bu hücre hatları genellikle fibroblastoid hücre tiplerinden meydana gelmektedir.

Devamlı hücre hatları ise bölünme yeteneğini kaybetmeyen, sonsuz bölünebilme yeteneğine sahip hücreler hatlarıdır. Genellikle tümör dokusundan veya kimyasal olarak transformasyona uğramış hücrelerden elde edilerek kültüre edilirler ve bu nedenle normal hücrelere ait genotip ve fenotip özelliklerini göstermezler. Normal hücre kültürünün en az elli alt kültürü yapıldıktan sonra devamlı hücre kültürü hatları oluşturulabilmektedir [95].

L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı

Ana L suşu, 1948 yılında 100 günlük erkek C3H fare areolar ve yağ dokusundan türetilen L929 fare fibroblast hücre hattı (Şekil 3.17), ana suşun 95. alt kültür üretiminden oluşturulmuştur. Yumuşak doku kültürü olan bu hücreler, fibroblast olarak günümüzde *In vitro* çalışmalarda en çok kullanılan hücre hattı modelidir. Sunulan tezde yapılan hücre kültürü çalışmaları L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.17 L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı

Sentezlenen PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranın hücre kültürü çalışmaları sitotoksikite, oksidan- antioksidant kapasite çalışmaları, hücre adezyon çalışmaları ve membranın hücre siklusuna etkisinin incelenmesi olmak üzere 4 çalışma başlığına ayrılmıştır.

3.2.3.1 Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite çalışmalarının amacı test edilecek malzemenin kullanılan hücre hatları için toksik bir etki gösterip göstermediğini belirlemektir. Günümüzde kullanılmakta olan birçok sitotoksisite testleri bulunmaktadır. Örneğin; MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilide), INT (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorit), Nötral red (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorür) [96], [97].

MTT en çok kullanılan sitotoksisite testlerinden bir olup çeşitli hücre hatlarında geçerliliği test edilmiştir. Ayrıca ISO (10993.5) standartları içinde bulunmaktadır. MTT (3- [4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür), suda çözünür bir tetrazolyum tuzu olup, mitokondri içerisinde sukinat dehidrojenaz ile tetrazolyum halkasının ayrılmasıyla çözünmez bir mor formazana dönüştürülmektedir. Formazan ürünü, hücre zarları için geçirimsizdir ve bu nedenle sağlıklı hücrelerde birikmektedir. Biriken formazan ürünleri uygun solventte çözdürüldükten sonra optik yoğun eliza reader yardımıyla belirlenmektedir. Formazan ürünlerin optik yoğunluğu hücre canlılık oranının gösteren bir araç olarak kullanılmaktadır [98].

L929 hücre hattı kullanılarak yapılacak sitotoksisite analizi için hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37 °C'de, %5 CO₂ atmosferinde kültüre edilmiştir. Sitotoksisite çalışmaları aseptik ortamda yürütülmektedir. Membranların sterilizasyonu %70 etanol içerisinde 1 saat UV ışık altında bekletilerek yapılmıştır. Daha sonra membranlardan etanolü uzaklaştırmak için PBS ile yıkanmıştır. Hazırlanan membranların sitotoksisitesi direkt test ile belirlenmiştir. L929 hücre hattı 37 °C'de, %5 CO₂ atmosferinde 24 saat inkübe edildikten sonra üzerine membranlar eklenerek 37 °C'de, %5 CO₂ atmosferinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan ekstrakt atılmış ve kuyucuklara 50 µL MTT çözeltisi (25mg/mL, PBS ile) içeren 500µL taze vasat pipetlenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki vasat atılarak kuyucuklara 100µL DMSO çözeltisi (distile su içerisinde %10 DMSO) ilave edilmiştir. DMSO ile çözülen formazan kristallerinin optik yoğunluğu 570 nm'de absorbansına bakılarak hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

3.2.3.2 Hücre Adezyon Çalışmaları

Hücre yapışma çalışmaları membranlara hücrelerin yapışma kapasitelerinin belirlenmesi ve hücrelerin membranlar üzerindeki proliferasyonunun tespiti için yapılmaktadır. L929 hücre hattı % 10 FBS, % 1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besiyerinde ; 37 °C'de, %5 atmosferinde kültüre edilmiştir. 1cm uzunluğunda ve 1 cm genişliğinde kesilen membranlar üzerine inkübe edilen L929 hücreleri 500 hücre/ membran konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Membranlar 37 °C'de, % 5 atmosferinde inkübe edilmiştir. Hücre ekiminden 1, 3 ve 5. gün sonra membranlara yapışan ve kültüre olan hücrelerin konsantrasyonunu belirlemek için amacıyla plate üzerinden membranlar alınarak başka bir 24 kuyucuklu plaklara alınmıştır. Kuyucuklara 50 µL MTT çözeltisi (25mg/mL, PBS ile) içeren 500µL taze vasat pipetlenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki vasat atılarak kuyucuklara 100µL DMSO çözeltisi (distile su içerisinde %10 DMSO) ilave edilmiştir. DMSO ile çözülen formazan kristallerinin optik yoğunluğu 570 nm'de absorbansına bakılarak hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

3.2.3.3 Antioksidan Kapasite Çalışmaları

Oksidan moleküllerin üretimi sonucundan oksidatif stres meydana gelir. Oksidan moleküller genel olarak reaktif oksijen ürünleri [99] ve reaktif azot ürünleridir (NOS). Oksidan ürünleri inaktive etmek için bir anti-oksidan sistem mevcuttur. Oksidanlar bu sisteme üstünlük sağladığında lipid ve proteinlerde oksidasyon görülür. Bu durum nörodejeneratif [100], kardiyovasküler [101], kanser [102], inflamasyon [103] veya yaşlanma [6] gibi birçok problemi beraberinde getirir. ROS'ların inflamasyon sürecinde lökositlerin ve makrofajların fonksiyonlarının regülasyonunda görev aldığı görülmüştür [104]. Biyomalzeme veya degradasyon ürünleri immün sistem hücrelerince oksidanların salımına neden olabilir. Bu durum kronik enfeksiyona, biyomalzeme kaybına veya implante edilen bölgede fonksiyon kaybına neden olabilir [99]. Bununla birlikte yara iyileşmesinde inflamasyon olmazsa olmazdır. Biyomalzeme vücut etkileşiminde oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge olmalıdır. Bir biyomalzemenin karakterizasyonunda bu denge de irdelenmelidir. İmplantasyon sonrası inflamasyon meydana gelir. Makrofajlar inflamasyonda lökositlerden sonra operasyon bölgesinde toplanır. Makrofajlar inflamasyon bölgesinde patojenlerin, ksenobiyotik materyallerin,

apoptorik hücrelerin eliminasyonunda etkin rol oynarlar. Makrofajlar sitokin, kemokinler aracılığı ile inflamasyonu şiddetlendirebilir (M1 fenotip makrofaj) veya baskılayabilir (M2 fenotip makrofaj). Saldıkları sitokin ve kemokinler vasıtasıyla rejenerasyonda etkilidirler. Oksidatif stres ürünleri makrofajların polarizasyonunda etkilidir. Metalik nanopartiküllerin ROS'lara sebep olduğu bilinmektedir [105]. Hsiao-Hua Chang ve arkadaşları 2-Hydroxy-ethyl methacrylate'nın diş gingival epitel hücrelerinde ROS seviyesini artırdığını belirtmiştir.[106] Wei-Wu Jiang ve arkadaşları farelerde poly-L-glycolic acid (PLLA) degradasyon ürünlerinin fagositik aktiviteyi artırdığı ve süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığını bulmuştur [107].

L929 hücre hattı kullanılarak oluşturulacak stres modelinde oksidant- antioksidant performansı belirlenmesi için L929 hücreleri % 10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37 °C'de, %5 CO₂ atmosferinde kültüre edilmiştir. İnkübe edilen L929 hücre hattı 24 kuyulu plakaya 100.000 hücre/ mL olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat hücreler inkübe edilmiştir. 10 mm x 5 mm olacak şekilde membranlar L929 hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranlar ile inkübe edildikten membranlar ile inkübe edilen membranlar -80 °C' de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış L929 hücreleri TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status Kit) kiti ve TOS (Relassay Total Oksidant Status Kit) kiti kullanarak membranların oksidan ve antioksidant performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplanmıştır.

3.2.3.4 Membranın hücre siklusuna etkisinin incelenmesi

Normal doku hücrelerinde büyüme ve gelişme, büyümeyi teşvik edici ve büyümeyi inhibe edici yolakların arasındaki dengeye bağlıdır. Biyomalzemeler veya degradasyon ürünleri büyümeyi teşvik edici veya inhibe edici yolları uygun olmayan şekilde aktive etmemelidir. Biyomalzemelerin hücre döngüsüne etkisinin incelenmesi, biyomalzeme kaynaklı inflamasyonun, kanserojen veya proliferatif etkinin belirlenmesinde önemlidir. Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşur. Evreler arası kısıtlayıcı, kontrol noktalar vardır. Hücrede bir evresinden diğerine geçişi, evreye göre konsantrasyonları değişen siklin proteinleri, siklin-bağımlı kinaz kompleksinin (CDK) oluşumu ve bu

komplekslerin fosforilasyonu ile denetler [108]. Dört farklı siklin vardır; G1, G1/S, S ve M. G1 siklinler (siklin D); geç G1'de özel CDK'lara (Cdk2, Cdk4 ve Cdk6) bağlanarak kısıtlama noktasından geçişi sağlar. G1/S siklinler (Siklin E); G1 sonunda daha geç sentezlenir ve CDK2'ye bağlanarak G1'den S fazına geçişi ve DNA sentezine karar verilmesi için gereklidir. S Siklinler (Siklin A); CDK2'ye S fazında bağlanarak replikasyonun başlaması, hücrenin S fazında ilerlemesi için gereklidir. M-Siklinler (Siklin B); G2'den M evresine geçiş için CDK1'e bağlanarak mitoz olaylarını başlatır [109].

Hücre G1 sınırlama noktasını geçerse geri dönüşümsüz S fazına geçer ve DNA replike olur. D tipi siklinler, spesifik CDK ve retinoblastoma (Rb) proteini hücrenin G1-S geçişini kontrol ederler. D tipi siklinler farklı uyaranlar sonucunda aktive olurlar ve CDK4/CDK6 ile birleşerek aktif siklin-CDK kompleksini oluşturur. Siklin - CDK4 ve siklin - CDK6 kompleksleri Rb proteinlerini fosforile ederek onu inaktive eder. İnaktif Rb, aktifken kendisine bağlı olan transkripsiyon uzama faktörü-2 (E2F)'yi serbest bırakır. E2F de, G1/S geçişi ve S evresine giriş için gerekli siklin A, E ve CDK1, myb, dihidrofolat redüktaz, timidin kinaz gibi genlerin ifade edilmesini sağlar. E2F, diğer döngü düzenleyiciler gibi DNA sentezi, DNA onarımı ve apoptozis olaylarında rol oynamaktadır [110].

Hücre döngüsünün diğer önemli bir düzenleyicisi, tümör baskılayan p53 genidir. p53 normal hücrelerde çok düşük konsantrasyondadır ve oldukça kararsızdır. Radyasyon, UV, ısı, düşük oksijen gibi stres koşullarında serin kinazlar olan ATM (Ataxia Telangiectasia Mutant kinaz) ve ATR (Ataxia Telegiectasia mutant) aktive olur. Aktive olan serin kinazlar p53'ü fosforilleyerek kararlı hale getirir ve hücrede birikmesini sağlar. Kararlı hale gelen p53, p21CIP proteininin sentezlenmesini uyarır. p21CIP G1-CDK kompleksine bağlanarak onları inaktive eder. Hücre döngüsü durur. DNA onarımı veya apoptozis olayları başlatılır [111]. p53 G1-S geçişinde görev alır. p21CIP aynı zamanda G2-M geçişinde görev alan CB-CDK1'i bloke eder ve hücreyi G2 fazında tutar. G2 fazında DNA hasarı olursa p53, G2 fazında topoizomerez II'yi bloke eder.

Stres koşulları altında ATM kinazlar Chk2'yi fosforilleyerek aktive eder. Chk2 bir protein kinazdır. Aktive olmuş Chk2, Cdc25A'nın parçalanmasını hızlandırır. Cdc25A'nın konsantrasyonundaki azalma hücreyi S fazında tutar.

Mdm2 proteinine p53'ün aşırı birikimini engelleyen bir geri bildirim gibi çalışır. Mdm2 proteini p53'e düşük düzeyde bağlanır. Oluşan kompleks ubiquitinler tarafından

proteozomal olarak parçalanır. Böylelikle p53'ün aşırı birikimi engellenmiş olur. ATM veya ATR kinazların fosforillenmesi p53- Mdm2 kompleksini bozar ve p53'ün aktive olmasını sağlar.

CDK inhibitörü (CDKI) ailesinden biri olan Cip/Kip ailesi, çoğunlukla siklin/CDK komplekslerine bağlanarak etki gösterir. Örneğin p21, CDK2 ile etkileşir (p21, p27 ve p57 bu ailedendir) [112]. CDKI ailesinin bir başka üyesi ise INK4/ARF'dir. INK4 yalnızca CDK4 ve CDK6 ile etkileşir ve bunların siklin D ile birleşmelerini engeller (p15, p16, p18 ve p19 bu ailedendir). ARF ise p53'ün regülatörü olan Mdm2 aktivitesini inhibe ederek p53 seviyesini arttırır (p14 bu ailedendir). Tüm CDKI molekülleri, hücrede fazla sentezlendiklerinde ve CDK moleküllerini etkisizleştirdiklerinde hücre döngüsünü G1 evresinde durdururlar. G1 düzenleyicilerinden siklin D1, CDK4 ve p16, over kanser gelişiminde önemli rol oynarlar. Miktarı artan siklin D1, Rb proteinini fosforilasyonla inaktive etmek için CDK4 ve CDK6 ile birleşir. Siklin D1'in ifade edilmesinin, bazı hücre tiplerinde hücre-hücre dokunmasının ortadan kalkmasıyla azaldığı ve bu döngü düzenleme etkisinin integrinler ve fokal adezyon kinazlar aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir [113].

L929 hücre hattı kullanılarak oluşturulacak stress modelinde CD1 ve p53/ TP53 kantitatif değerlerinin tespiti için L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37 °C'de, % 5 CO₂ atmosferinde kültüre edilmiştir. İnkübe edilen L929 hücre hattı 24 kuyulu plakaya 100.000 hücre/ mL olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat hücreler inkübe edilmiştir. 10 mm x 5 mm olacak şekilde membranlar L929 hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranlar ile inkübe edildikten membranlar ile inkübe edilen membranlar -80 °C' de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış L929 hücreleri Human Cyclin D1 ELISA Kit ve Human p53/Tumor Protein ELISA Kit kullanılarak membranların performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplanmış ve çıkan değerler sayesinde membranların hücre siklusuna etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.3.5 Membrana UPK Hücrelerin Yüklenmesi

Çalışmanın bu bölümünde, laboratuvarımızda önceden elde edilen UPK hücrelerinin membrana yüklenmesi ve çoğalma oranlarının incelemesini hedeflenmiştir. PHBHHx bazlı membranlara UPK hücrelerinin yüklenmesi ve in vitro hücre proliferasyon değerlendirmesi MTT yöntemi kullanılarak yapılacaktır. Bu çalışma için UPK hücreleri %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik içeren (Dulbecco's modified Eagle's) mediumda 10 ng / ml bazik fibroblast büyüme faktörü, 13 GlutaMAX, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve 100 mM b-merkaptetanol içerecek ve %10 Fetal Bovin Serum (FBS), 100 ug/mL streptomisin, 100 U/ mL penisilin ve 2 mM L-Glutamik asit içeren RPMI-1640 besiyeri içinde kültüre edilecektir. Hücreler, steril koşullar altında 37°C'de, %5 CO₂ ihtiva eden etüvlerde konflue oluncaya kadar kültüre edilmiştir. Hücre proliferasyon çalışması için PHBHHx bazlı biyobozunur membranlar 1 cm çapında daire şeklinde kesilmiş, 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilecektir. Membranların sterilizasyonu için plaklar 2 saat süre ile UV ışık altında bekletilecektir. Membranların üzerine 100 µl hacimde yaklaşık 500 UPK hücre ekilecektir. Membranlar 2 saat süre boyunca hücreler ile inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri 500 µl'ye tamamlanacaktır. Hücrelerin ekiminden sonra 1, 3 ve 5. günlerde membranların üzerine steril PBS ile yıkanmış ve MTT çözeltisi içeren taze besi yeri (1:9) pipetlenmiştir. 24 kuyucuklu plaklar MTT boyası ile 4 saat süre ile etüvde inkübe edilecek, DMSO eklenerek formazon kristalleri çözüldükten sonra 24 kuyucuklu plaklardan 96 kuyucuklu plaklara pipetlenmiştir ve 570 nm' de optik yoğunlukları elisa okuyucusu kullanılarak canlılığı tespit edilecektir.

4

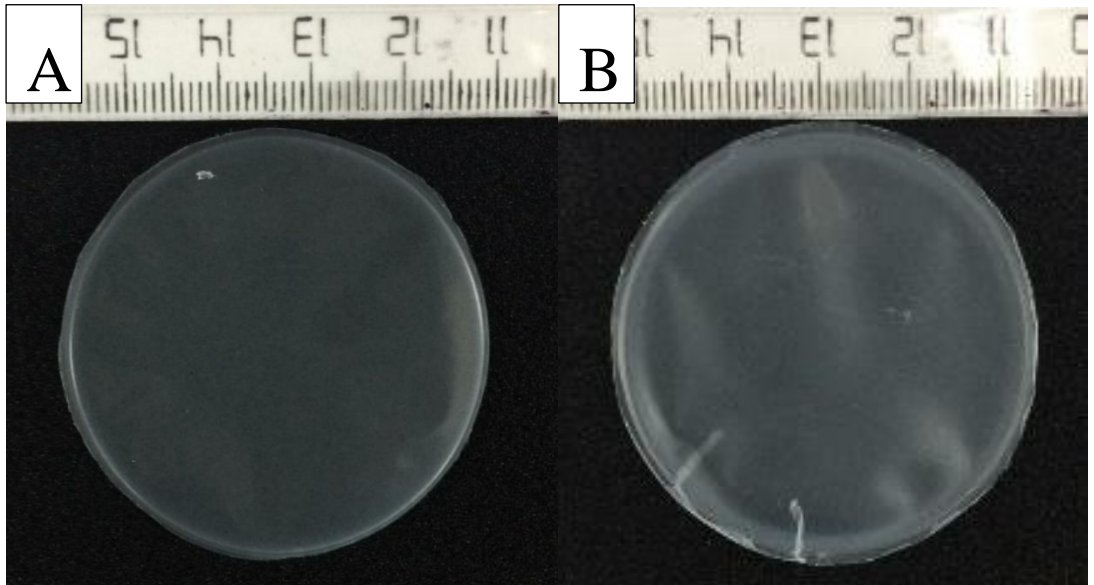
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Membranların Hazırlanması

PHBHHx membranının hazırlanması için kloroform içerisinde %5 (w/v) PHBHHx (Kaneka, Japonya) çözülmüştür. Homojenizasyonu sağlanan çözelti cam petrilere dökülerek kloroformun uzaklaştırılması için çeker ocakta üç gün süre ile bekletilmiştir.

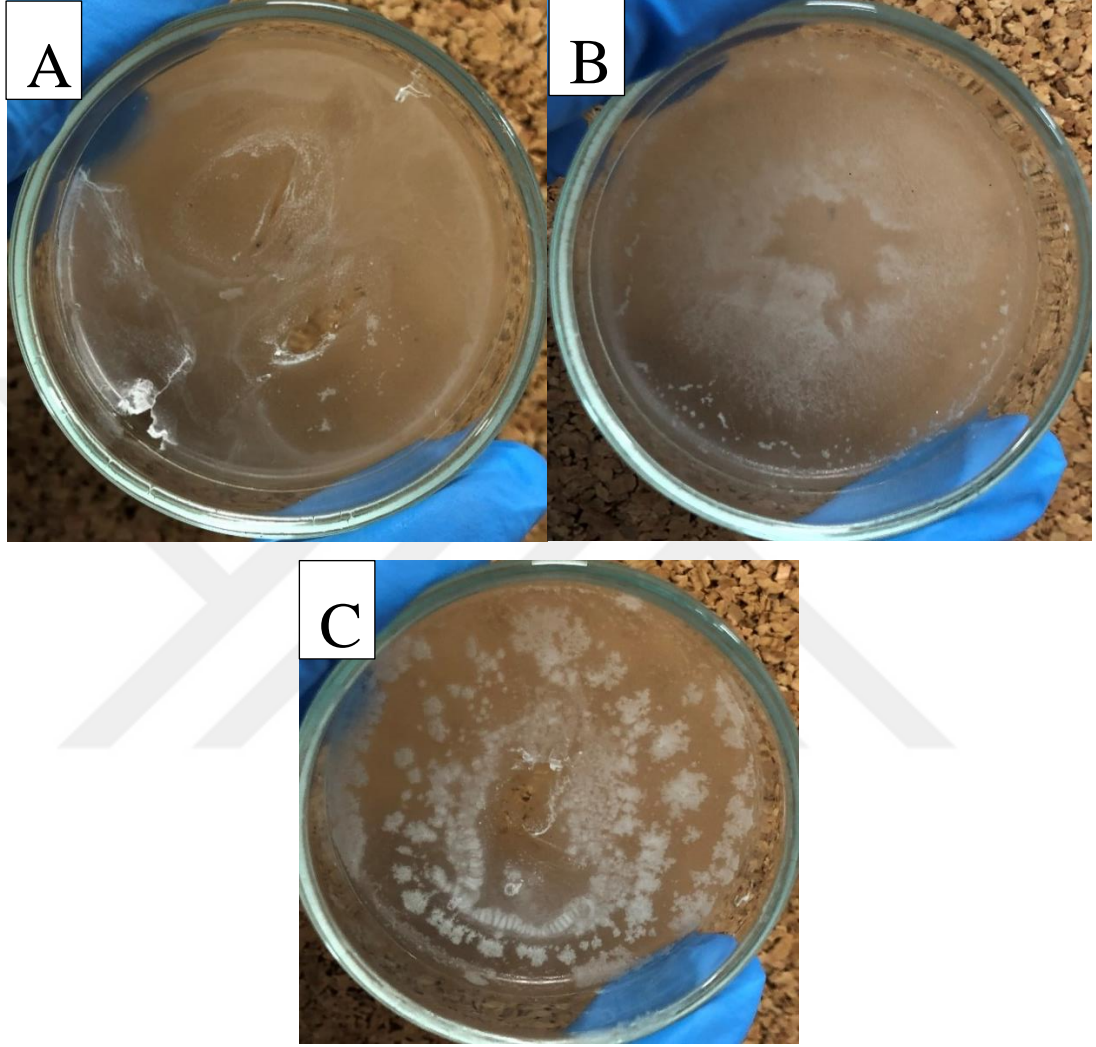
PHBHHx/ Paraffin wax blend membranının hazırlanması için kloroform içerisinde % 5 (w/v) PHBHHx ve % 0,5, %1,%3 ve %5 (w/v) paraffin wax çözülmüştür. Homojenizasyonu sağlanan çözelti cam petrilere dökülerek kloroformun uzaklaştırılması için çeker ocakta üç gün süre ile bekletilmiştir.

%0,5 parafin mum içeren PHBHHx membran homojen bir yapı ve bütünlük sağlamıştır ve çalışmalar bu konsantrasyondaki membranlar ile devam etmiştir ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 4.1). Hazırlanan membranların sterilizasyonunun sağlanması amacıyla % 70 etanol içerisinde uv altında bir saat bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından membranlar PBS ile yıkanarak etanol uzaklaştırılmıştır.



Şekil 4.1 A) 5% (w/v) PHBHHx, B) 5% (w/v) PHBHHx/ 0.5% (w/v) Parafin Mum membran görüntüleri

PHBHHX ve PHBHHx/ Parafin mum blend membranlardan kloroform uzaklaştırılarak kuruması sağlanmıştır. Fakat %1, %3 ve %5 parafin mum içeren membranlarda homojenizasyonun sağlanamadığı, bütün bir yapının elde edilemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 A) 5% (w/v) PHBHHx/ 1% (w/v) Parafin mum, **B)** 5% (w/v) PHBHHx/ 3% (w/v) Parafin mum, **C)** 5% (w/v) PHBHHx/ 5% (w/v) Parafin mum membran görüntüleri

4.2 Membranların Karakterizasyon Çalışmaları

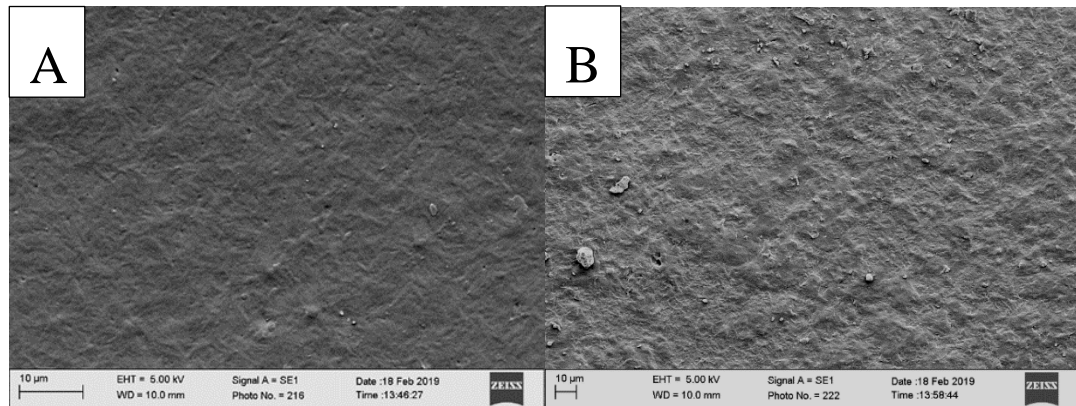
Doku yaması olarak kullanılmak üzere hazırlanan PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların karakterizasyonu için yüzey morfoloji analizi (SEM) , serbest yüzey enerjisi ölçümü, su temas açısının ölçümü (WCA) , yüzey alanı analizi (BET), termogravimetrik analizi (TG/ DTA), dinamik mekanik analizi (DMA), FTIR

spektrofotometresi, Raman spektrofotometresi, şişme ve biyodegradasyon analizleri yapılmıştır.

4.2.1 Yüzey Morfoloji Analizi

Yapılan bir araştırmaya göre farklı malzemelerden yapılan doku yamalarının farklı gözenek çapları hücre canlılığını etkilemektedir. Bu iki değişken birbirinden bağımsız olarak hücre canlılığına etki etmektedir [114]. Gözenek çapı ile hücre canlılığı arasında belirli bir korelasyon bulunmamaktadır. Gözenek çapı ile su tutma kapasitesi arasında belirli bir korelasyon görülmektedir [115].

Membranlar 75 saniye boyunca altın ile kaplanmıştır. SEM kullanılarak membranların yüzey morfolojileri 1000x- 5000x büyütme oranlarında incelenmiştir (Şekil 4.3). Düşük kristalliteye sahip PHBHHx düzenli ve kısmen pürüzsüz bir yüzeye sahip, hücre eklenmesi ve büyümesini mümkün kılan yapıya sahiptir ve bu yapısı sayesinde biyoyumluluk özelliğini arttırmaktadır [38], [43]. PHBHHx yüzeyinin bazı kısımlarında bulunan küçük boşluklar kloroform çözücüsünün buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür [116]. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda PHBHHx' in düşük kristallenme derecesi yüzünden kloroformun uzaklaştırılması sırasında polimerin kristallendiğini ve bu yüzden yüzeyde küçük boşluklar oluştuğu tespit edilmiştir. Aynı çalışma kloroformun ne kadar yavaş uzaklaştırılırsa küçük boşlukların oluşumunun o kadar azaltılabileceğini belirtmiştir [117]. Literatürdeki çalışmalarda PHBHHx miktarı membranda arttıkça membran daha düz yapı aldığı görülmüştür [43].



Şekil 4.3 A) PHBHHx ve B) PHBHHx/ Paraffin Mum doku yamalarının SEM görüntüleri (1000x)

PHBHHX/ Parafin mum membranının yüzeyinde çıkıntılar görülmüştür. Parafin mum eklenmesi PHBHHx'in kısmen düz yapısını pürüzlü hale getirmiştir. Membranların gözenek çapı açısından homojen bir dağılım bulunmadığı görülmüştür.

Yüzey pürüzlülüğü, hidrofilitik ve yüzey enerjisi içeren bir biyomateryalin yüzey özellikleri hücre yapışmasında, yayılmasında ve çoğalmasında önemli rol oynar. Yüzey pürüzlülüğü hücre tepkileri etkileyebilir. Önceki bir çalışma, hücre yapışması, çoğalması, farklılaşması ve ayrılma kuvvetinin yüzey morfolojisine duyarlı olduğunu göstermiştir. Çalışmalar ayrıca hidrofobik yüzeyin, malzeme yüzeyine hücre yapışmasını arttırabileceğini göstermiştir, örneğin, blok kopolimerlerin artan hidrofobik poli (dimetilsiloksan) alanı nedeniyle yapışan hücrelerin sayısının artmış olduğunu göstermiştir. Hidrofilik maddeler, proteinlerin zayıf geri dönüşümsüz adsorpsiyonunu indüklerken, hidrofobik maddeler, proteinlerin geri dönüşümsüz adsorpsiyonunu teşvik eder [118].

4.2.2 Serbest Yüzey Enerjisi ve Su temas açısı (WCA) ölçümü

Biyomalzemelerin yüzeylerinin hidrofilitik veya hidrofobik özellikleri yüzeylerinin su teması açılarının ölçümüyle ve serbest yüzey enerjileri ile belirlenebilmektedir. Su temas açısı, bir malzeme yüzeyinin hidrofobikliğinin bir ölçüsüdür. Serbest yüzey enerjisi ise, polar ve polar olmayan bileşenlerin toplamıdır. Biyomalzemenin yüzey özelliği, yüzeye adsorbe edilen proteinlerin miktarını, türünü ve konformasyonunu belirleyebilir ve membranlara hücre bağlanmasını ve proliferasyonunu etkileyebilmektedir [119].

Tablo 4.1 PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların su temas açıları

Doku Yaması	Su Temas Açısı (°)
PHBHHx	77,77
PHBHHx/ Parafin Mum	80,94

Membranların Wu'ya göre ve OWRK/Fowkes'e göre serbest yüzey enerjisi ve distile suya karşı temas açısı değeri verilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Serbest yüzey enerjisi sonuçları incelendiğinde parafin mumun PHBHHx membranların Wu'ya göre ve OWRK/Fowkes'e göre serbest yüzey enerjisini azalttığı görülmüştür. Wu'ya göre ve OWRK/Fowkes'e göre dispers etkileşimlerin azaldığı, polar etkileşimlerin de azaldığı görülmüştür. Parafin mum ilavesi membranlara daha hidrofobik özellik kazandırdığı için temas açısını artırmıştır. Alkali koşullar altında blend edilmiş PHBHHx membranın, blend edilmemiş PHBHHx ile karşılaştırıldığında azalan polar bileşene sahip olduğu gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Hazırlanan membranların serbest yüzey enerjileri

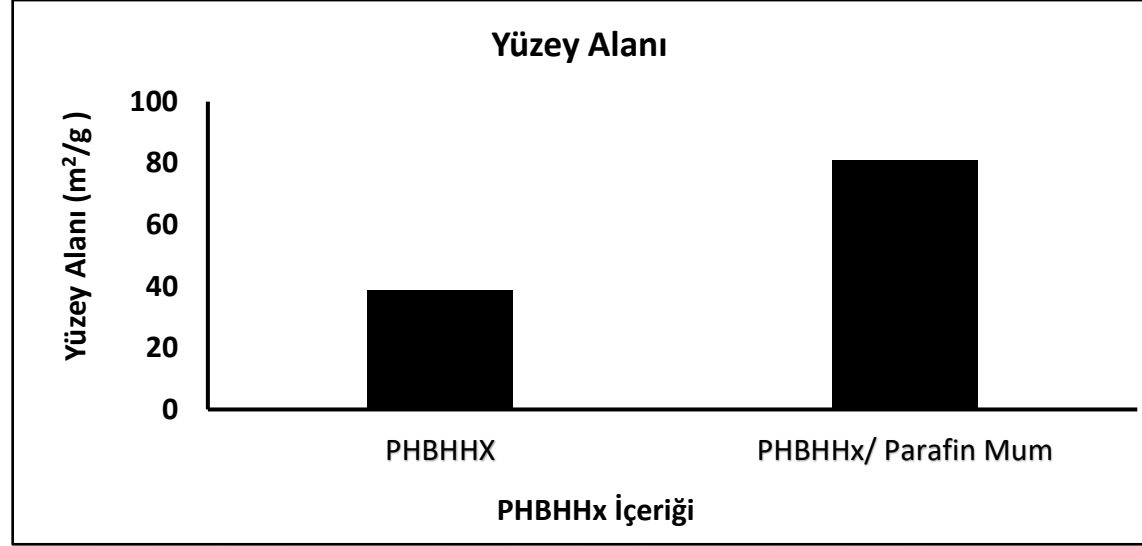
Doku Yaması	Serbest Yüzey Enerjisi					
	Wu			OWRK/Fowkes		
	γ_{tot} [mN/m]	γ_d [mN/m]	γ_p [mN/m]	γ_{tot} [mN/m]	γ_d [mN/m]	γ_p [mN/m]
PHBHHx	41,85	36,12	5,74	39,12	36,29	2,84
PHBHHx/ Parafin Mum	39,37	34,74	4,63	36,55	34,32	2,22

Daha önceki çalışmalarda hazırlanan PHBHHx filminin hidrofobik özellikleri nedeniyle diğer PHA' lara göre daha yüksek su temas açısına sahip olduğu belirlenmiştir [120].

4.2.3 Yüzey Alanı Analizi

Yüzey alanının belirlenmesi için yapılan Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizinin sonuçlarına göre; PHBHHx membranın yüzey alanı $38,79 \text{ m}^2/\text{g}$ ve PHBHHx/ Parafin mum membranın yüzey alanı $81,108 \text{ m}^2/\text{g}$ olduğu tespit (Şekil 4.4) edilmiştir. Elden edilen bu sonuçlara göre parafin mum kullanımının PHBHHx membranda yüzey alanını arttırdığı gözlemlenmiştir. PHBHHx membrana parafin mum eklenmesiyle yüzey alanı %209,09

arttırdığı tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında parafin mum içeren PHBHHx örnekleri olmadığı tespit edilmiştir.



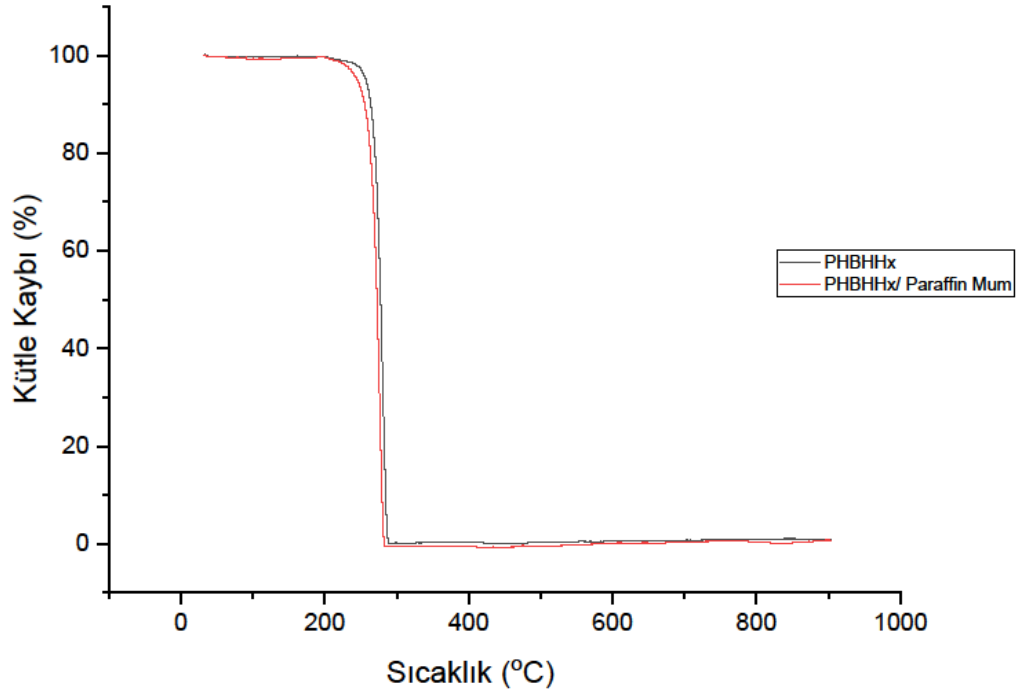
Şekil 4.4 Membranların yüzey alanları

Hazırlanan membranın istenilen yüzey alanına, protein adsorpsiyon kapasitesine ve uygun bir mekanik mukavemete sahip olan doğal ECM'nin fiziksel yapısını taklit etmesi ile ilgilidir [121]. PHBHHx'in farklı kimyasallarla muamele edilmesiyle membranların yüzey alanı arttırılabilir olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [83], [122]. PHBHHx membran ile yapılan farklı çalışmalar hücrelerin tutunması ve hücrelerin bol miktarda ECM sentezlediğini göstermiştir [25].

4.2.4 Termogravimetrik Analiz

Hazırlanan PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum blend membranların termal bozunma davranışlarının belirlenmesi için termogravimetrik analizi yapılmıştır.

PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların kütle kaybının tek basamakta gerçekleştiği görülmüştür. PHBHHx doku yamasının literatürdeki çalışmalara benzer şekilde 224 °C'de kütle kaybı (%1) başlamıştır. Sıcaklık 281 °C'ye geldiğinde membranın kütle kaybının % 99,64 olduğu tespit edilmiştir [117]. Literatürdeki çalışmalarda PHBHHx membranın %5 kütle kaybının meydana geldiği sıcaklık 229.1 olduğu tespit edilmiştir [83] (Şekil 4.5). PHBHHx/ Parafin mum doku yamasının 214 °C'de kütle kaybı (%1) başlamıştır. Sıcaklık 276 °C'ye geldiğinde membranın kütle kaybının %99,54 olduğu tespit edilmiştir. İki doku yamasının kütle kaybı birlikte incelendiğinde parafin mumun PHBHHx membrana eklenmesiyle termal dayanımının azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.5 Membranların sıcaklığa bağlı kütle kaybı

4.2.5 Dinamik Mekanik Analiz

Doku yamalarının, *in vivo* ya da klinik çalışmalarda hedef dokuya eklenmesi sonrasında çeşitli kuvvetlere dayanımının dokuya uygun olarak yeterli seviyede olması gerekmektedir. Aynı zamanda manipülasyonun kolaylaştırılması için kullanılacak membranların optimum dayanım değerlerinin de bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle doku yaması üretimi sırasında malzemelerin mekanik özelliklerinin tespit edilmesi kullanımı açısından önemlidir [123].

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında yapıda PHBHHx varlığının artmasıyla malzemenin esnekliğinin arttığı görülmüştür. PHBHHx, düşük kristallenme derecesi nedeniyle PHB'ye kıyasla oldukça düşük bir gerilme stresine ve elastikiyet modülüne sahiptir, bu, PHBHHx'in PHB'den daha yumuşak olduğu anlamına gelir [39], [43]. PHBHHx'in diğer PHA' lardan daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Çekme kuvvetlerine karşı daha iyi mukavemet gösterdiği tespit edilmiştir [124].

Tablo 4.3 Mekanik Test Sonuçlarının değerlendirilmesi

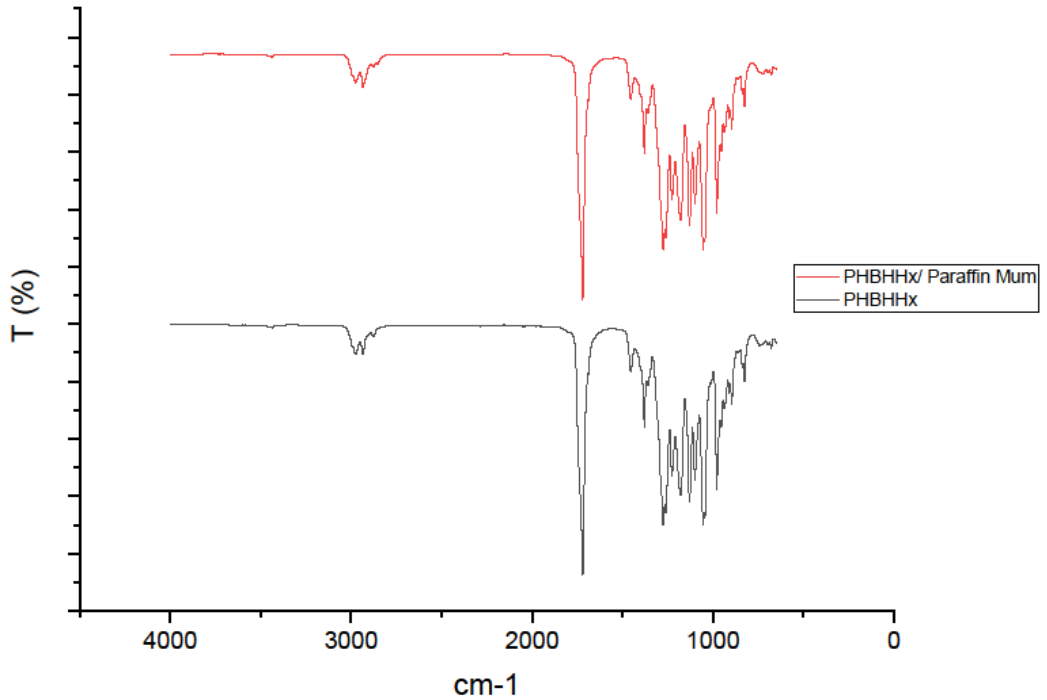
Doku Yaması	Kopma Uzaması ϵ_k (%)	Elastisite Modülü E (N/mm ²)
PHBHHx	22,46333 ± 2,476	142,8973333 ± 10,564
PHBHHx/ Paraffin Mum	30,03833 ± 7,228	0,827333333 ± 0,159

Mekanik test sonucunda PHBHHx doku yamasının kopma uzaması % 22,463 (standart hata= ± 2,476) iken parafin mum eklenmesiyle bu değer % 30,038' e (standart hata= ± 7,228) çıktığı belirlenmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum blend membranlar mekanik dayanımı karşılaştırıldığında parafin mumun PHBHHx'in membranın kopma uzaması yüzdesini %7,6 artırdığı tespit edilmiştir.

Parafin mumun kopma sırasında dayanımı artırdığı tespit edilmiştir. Elastisite modülü değerleri karşılaştırıldığında PHBHHx doku yamasının modülü 142,89 N/mm² (standart hata= ± 10,564) iken parafin mum eklenmesiyle bu değer 0,827 N/mm² (standart hata= ± 0,159) olarak hesaplanmıştır. Parafin mum kullanımı PHBHHx membranın elastisite modülünü azaltmıştır. Elastisite modülü gerilme durumlarında meydana gelen şekil değişiklikleri hakkında bilgi vermektedir.

4.2.6 Fourier Dönüümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Spektrum incelendiğinde PHBHHx'e ait karakteristik pikler görülmektedir. Bunlar sırasıyla; 2921 cm⁻¹ ve 2867 cm⁻¹ dalga sayısında alifatik C-H gerilmesi, 1721 cm⁻¹ de C=O gerilmesi, 1600 cm⁻¹ de simetrik COO⁻ gerilmesi, 1413 cm⁻¹ 'de asimetrik COO⁻ gerilmesi, 1230 cm⁻¹ 'de C-O-C bağ gerilmesi, 1162 cm⁻¹ ve 1470 cm⁻¹ de CH₂ gruplarına ait eğilme ve gerilmeyi göstermektedir [125], [126].



Şekil 4.6 Membranlara ait Fourier Dönüümlü Kızılötesi (FTIR) spektrumu

4.2.7 Raman Spektroskopisi

FTIR spektroskopisini doğrulamak amacıyla yapılan Raman spektroskopisi sonuçları incelendiğinde PHBHHx' in karakteristik pikleri görülmektedir. PHBHHx'in parafin mum ile blend edilmesi sonucunda bağ yapılarında deformasyonlar ve gerilmeler meydana geldiği Raman spektroskopisinde daha iyi tespit edilmiştir. Raman spektroskopisinde FTIR'da belirlenemeyen bağ yapılarıyla karşılaşılmıştır [127][128].

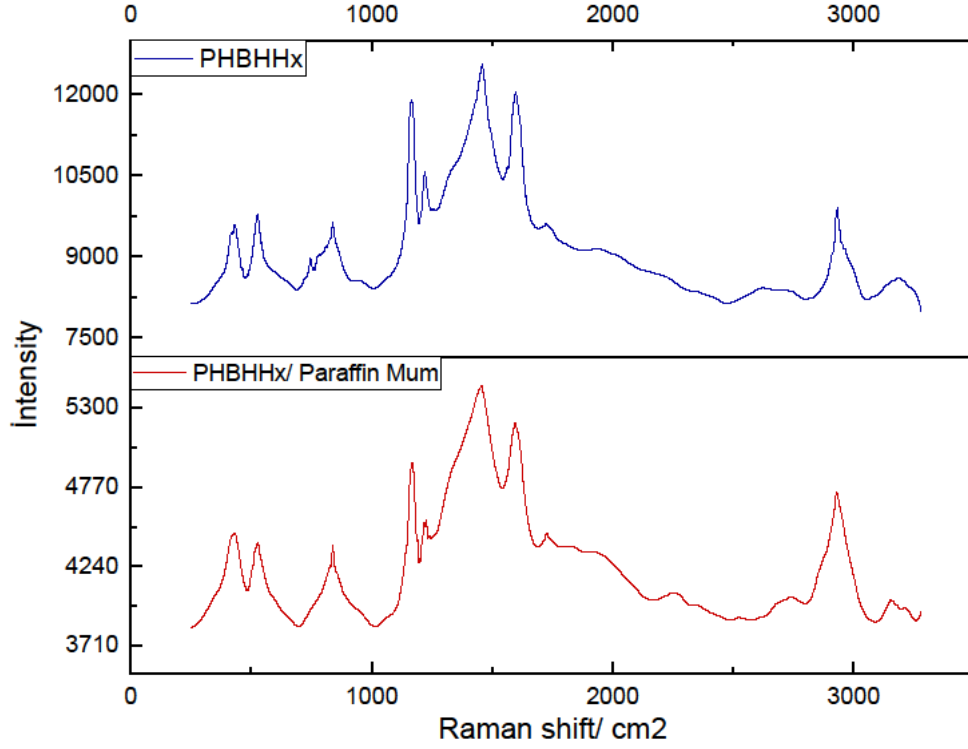
Tablo 4.4 Piklere karşılık gelen bağ yapıları

Pikler (cm ⁻¹)	Kimyasal Bağ
2921	Alifatik C-H gerilmesi
1721	C=O gerilmesi
1600	Simetrik COO ⁻ gerilmesi
1460	CH ₂ gruplarına ait eğilme ve gerilme
1413	Asimetrik COO ⁻ gerilmesi
1230	C-O-C bağ gerilmesi

PHBHHx'in 2921 cm⁻¹ ve 2867 cm⁻¹ dalga sayısında alifatik C-H gerilmesi, 1721 cm⁻¹ de C=O gerilmesi, 1600 cm⁻¹' de simetrik COO⁻ gerilmesi, 1413 cm⁻¹ 'de asimetrik COO⁻ gerilmesi, 1230 cm⁻¹ 'de C-O-C bağ gerilmesi, 1162 cm⁻¹ ve 1470 cm⁻¹ de CH₂ gruplarına ait eğilme ve gerilmeyi göstermektedir. 830 cm⁻¹ de görülen pik epoksi gruplarının halka deformasyonlarını göstermektedir [127](Tablo 4.4).

Parafin mum ile blend edilmiş membranda 1063 cm⁻¹ de C-C bağ gerilmesi, 1418cm⁻¹ de CH₃ deformasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. 1296- 1441 cm⁻¹ de görülen pik CH₂ deformasyonunun arttığını göstermektedir [129]. 2850 ve

2890 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla simetrik ve asimetrik CH_2 bağ gerilmesini göstermektedir. Simetrik ve asimetrik CH_3 gerilmesi sırasıyla 2931 ve 2959 cm^{-1} 'de piklerin görülmesini sağlamaktadır [130](Şekil 4.7).



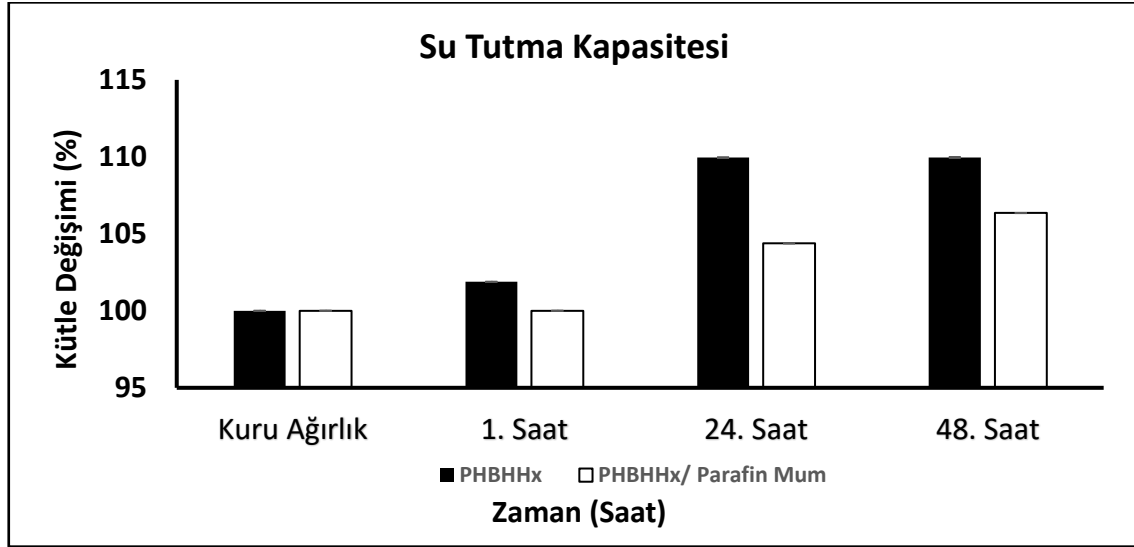
Şekil 4.7 Membranlara ait Raman spektrumu

4.2.8 Şişme Analizi

Doku yamalarının yapılarına su alabilmeleri, gözeneklilik ve gözeneklerin içsel bağlantılı oluşu hakkında bilgi veren bir özelliktir [123]. Doku yamalarının sulu ortamlardaki değişimlerinin tespiti, doku iskelelerinin uygulama alanları belirlenirken önemli olmaktadır. Hazırlanan malzemenin su alım kapasitesinin belirlenmesi degradasyon özelliklerinin bilinmesi içinde önemli olmaktadır [131].

PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların su tutma kapasitelerini değerlendirmek amacıyla su içerisinde bekletilmiştir. Deney altı tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kuru ağırlıkları ölçülen membranlar su içerisinde bekletilerek 1, 24 ve 48. saatlerde tekrar ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda

membranların su tutma kapasiteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.8). PHBHHx membran 1. saatte %2 (standart hata = $\pm 0,00008$) oranında su tutmuştur. Bu oran 24. saatte %9'a (standart hata = $\pm 0,00035$) çıkmıştır 48. saatte (standart hata = $\pm 0,00035$) herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



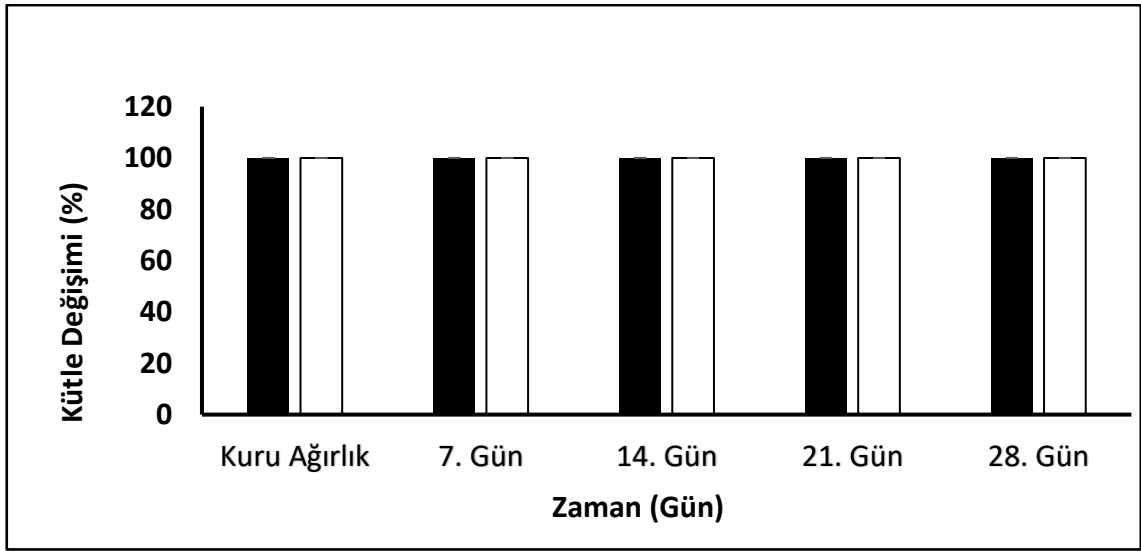
Şekil 4.8 Membranlarının su tutma kapasitelerinin değerlendirilmesi

Parafin mum ile blend edilmiş PHBHHx membran ise parafin mumun hidrofobik özelliği nedeniyle PHBHHx membranın su tutma oranını düşürmüştür. 1. saatte (standart hata = $\pm 0,000146$) herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. 24. saatte % 4 (standart hata = $\pm 0,00008$) oranında, 48. saatte %6 (standart hata = $\pm 0,000146$) oranında kütlede artış görülmüştür.

4.2.9 Biyodegradasyon Analizi

Bir biyomalzemenin biyo-bozunmasının doku formunun sağlıklı bir şekilde oluşabilmesi için çok önemlidir. Biyodegradasyon çalışmaları, 28 gün boyunca lizozim içeren PBS çözeltisi (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ile muamele edilen doku yamalarında kütle kaybı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.9). Literatürde, lipaz içeren PBS çözeltisi (0.1 g/ L) ile muamele edilen PHBHHx membranlarının 30. Günde % 4'lük bir kütle kaybına meydana geldiği görülmüştür [132]. Yapılan bir çalışma da PDLLA ile farklı konsantrasyonlarda blend edilen PHBHHx'in biyobozunma oranının azalttığı

görülmüştür [40]. Başka bir çalışmada PLA membrana PHBHHx eklenmesiyle biyobozunmayı azalttığı tespit edilmiştir [39]. Hem kristallik hem de yüzey morfolojisi, PHBHHx'in bozulmasında önemli roller oynar. PHA'nın hidroliz oranının, hidrolize maruz kalan polimerin yüzey alanına bağlı olduğu bulunmuştur. Hidroliz, yüzeyde ve polimer üzerindeki fiziksel lezyonlarda başladı ve malzemenin iç kısmına ilerledi. PHB filmlerin biyobozunması yüzey erozyon mekanizmalarıyla ilerler. PHB filmleri, deniz mikroplarının bağlandığı yüzeyde homojen olmayan bir şekilde çözünerek, gözenek oluşumuna neden oldu. Yüzey morfolojisi, su, enzim molekülleri veya bakteriler ve polimer zincirleri arasındaki temas yoluyla bozulmayı etkiledi [132].



Şekil 4.9 Membranların bozunma oranlarının değerlendirilmesi

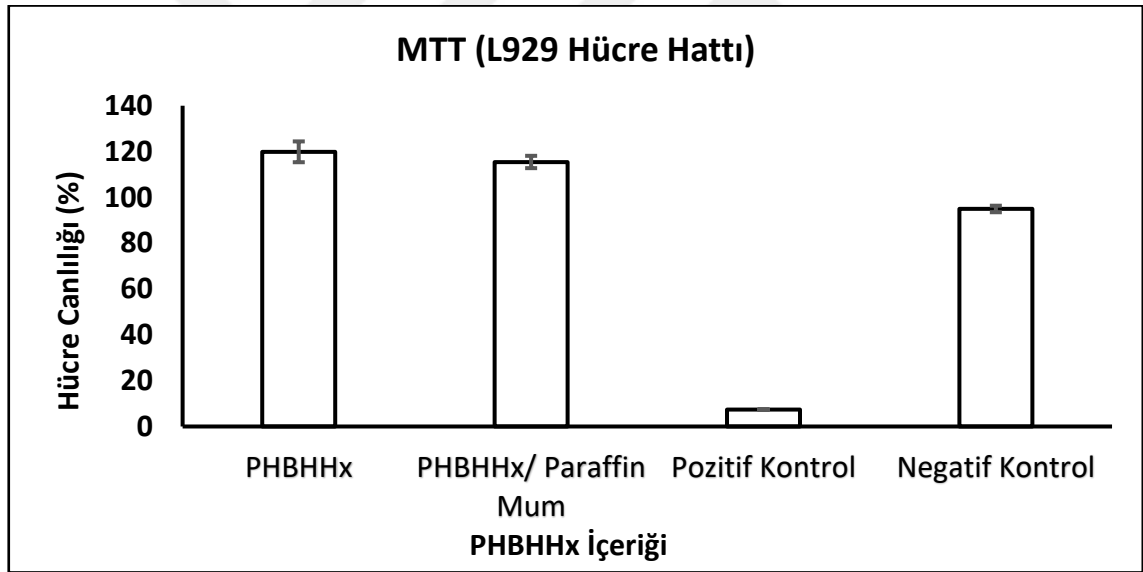
4.3 Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında membranların sitotoksiteleri, hücre tutunma kapasiteleri, antioksidant kapasiteleri ve hücre siklusuna etkileri incelenmiştir. Doku yaması olarak sentezlenen PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların hücre canlılığına olan etkisini belirlemek için fare fibroblast hücre hattı kullanılarak (L929) mitokondriyal aktivite testi (MTT) yapılmıştır. Membranların hücreleri tutma ve hücreler üzerindeki proliferasyon etkisine bakmak için adezyon deneyleri yapılmıştır. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranların antioksidant-

oksidan kapasitelerini değerlendirmek amacıyla in vitro oksidatif strese maruz bırakılmış hücresel ile antioksidant- oksidan kapasite modellemesi yapılmıştır. Membranların hücre siklusuna etkisini incelemek amacıyla hücrelerin CD1 ve p53/Tp53 aktivitesine bakılmıştır.

4.3.1 Sitotoksosite alışmaları

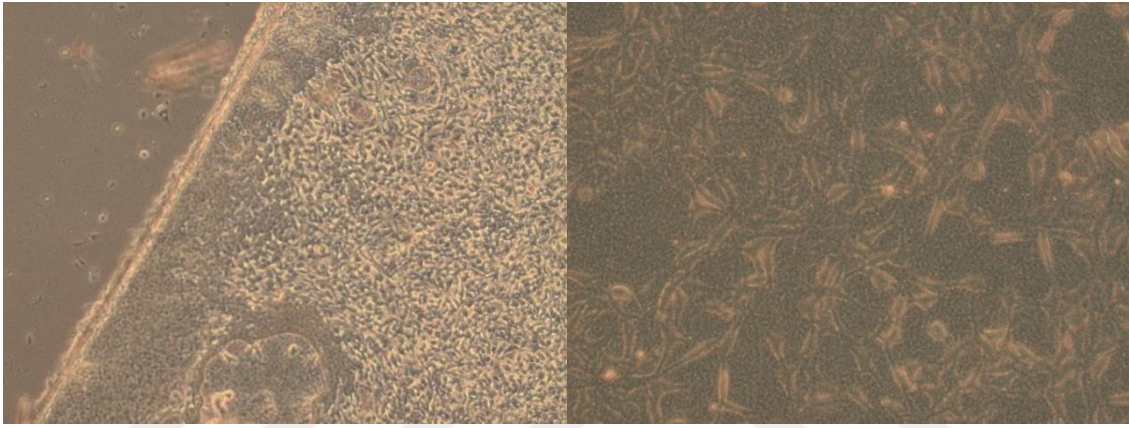
L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT testi sonuçlarına (şekil 4.10) göre; PHBHHx membranda hücre canlılığı % 119,87 (standart hata= $\pm 4,53$), PHBHHx/ Paraffin mum membranda ise hücre canlılığı % 115,44 (standart hata = $\pm 2,68$) olarak tespit edilmiştir. PHBHHx membranda hücre canlılığı paraffin mum bulunan membrana göre % 4,43 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki alışmalar PHBHHx bazlı kompozit malzemeler ile farklı hücre hatları arasında iyi biyoyumluluk olduğu görülmüştür [25].



şekil 4.10 PHBHHx ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde in vitro sitotoksisiteleri

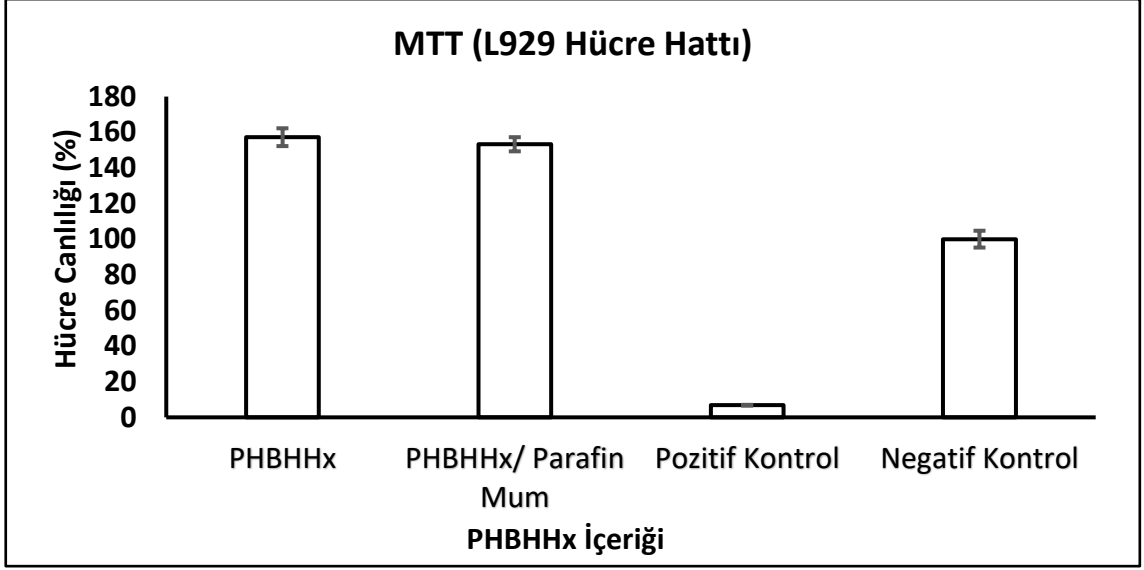
4.3.2 Hücre Adezyon Çalışmaları

L929 hücre hattı kullanılarak yapılan hücre tutunma çalışmaları membranlara hücrelerin yapışma kapasitelerinin belirlenmesi ve hücrelerin membranlar üzerindeki proliferasyonunun tespiti için yapılmıştır. 1cm uzunluğunda ve 1 cm genişliğinde kesilen membranlar üzerine inkübe edilen L929 hücreleri 500 hücre/membran konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Membranlar 37 °C'de, % 5 atmosferinde inkübe edilmiştir. 1, 3 ve 5. günlerde MTT testi yapılarak membranların hücre tutma kapasiteleri değerlendirilmiştir.



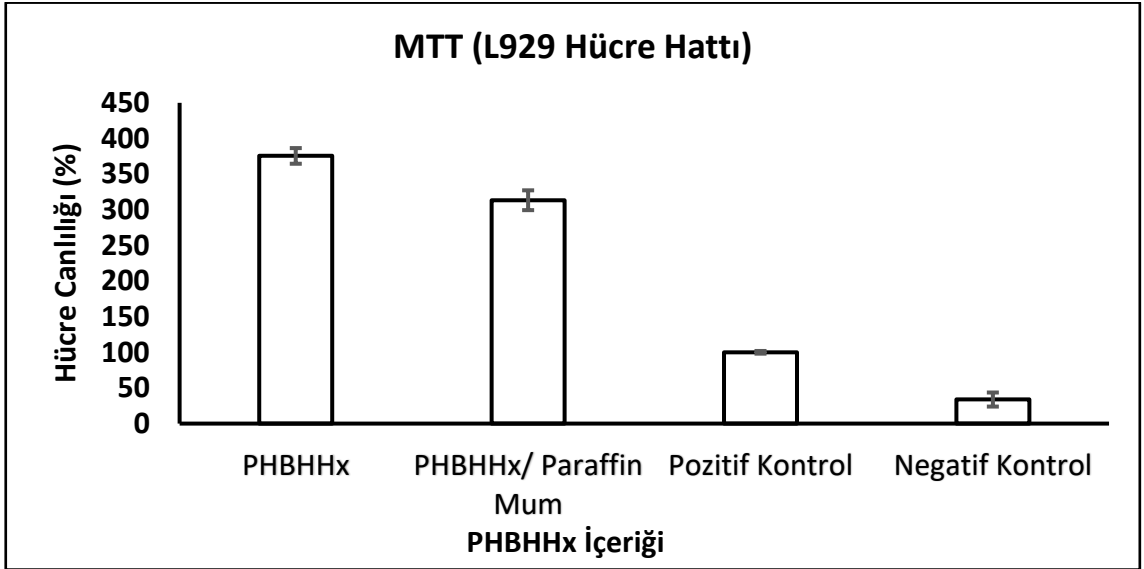
Şekil 4.11 PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin Mum Hücre Tutunma Görüntüleri

Membranlara hücre ekildikten 24 saat sonra mikroskopta çekilen görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.11). Yapılan MTT sonuçlarına (Şekil 4.12) göre; PHBHHx membranda hücre canlılığı % 157,21 (standart hata = $\pm 4,99$), PHBHHx/ Parafin mum membranda ise hücre canlılığı % 153,25 (standart hata = $\pm 3,96$) olarak tespit edilmiştir. PHBHHx membranda hücre canlılığı parafin mum bulunan membrana göre % 3,96 daha fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 1. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi

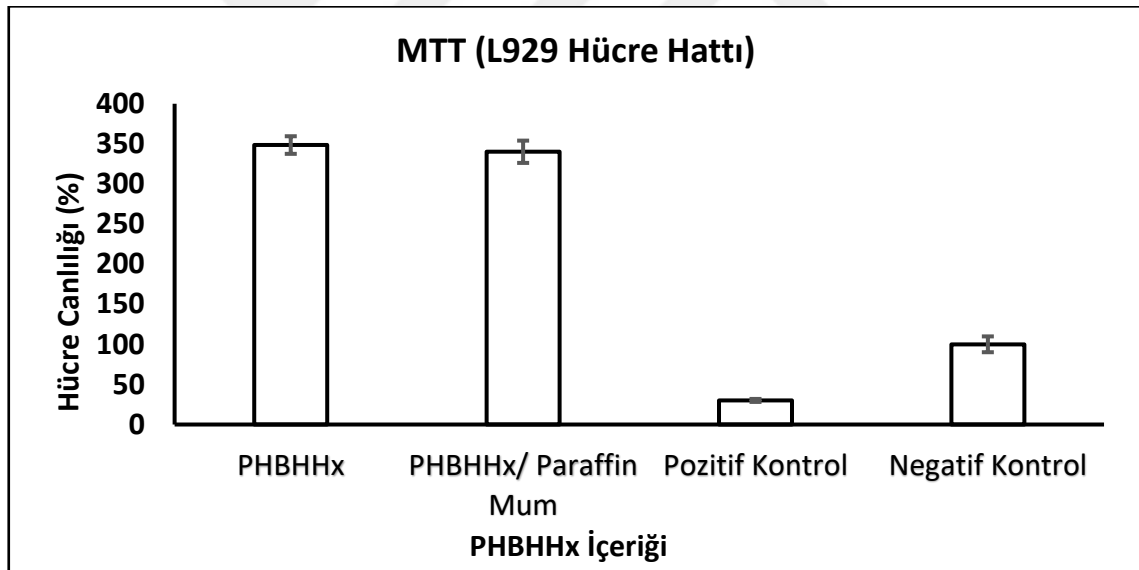
Membranlara L929 hücrelerinin ekilmesinin 3. gününde yapılan MTT sonuçlarına (Şekil 4.13) göre; PHBHHx membranda hücre canlılığı % 375,5 (standart hata = $\pm 5,56$), PHBHHx/ Parafin mum membranda ise % 313,33 (standart hata = $\pm 6,98$) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.13 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 3. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi

Membranlara L929 hücrelerinin ekilmesinin 5. gününde yapılan MTT sonuçlarına (Şekil 4.14) göre; PHBHHx membranda hücre canlılığı % 348,49 (standart hata = \pm 4,98), PHBHHx/ Parafin mum membranda ise % 340,11 (standart hata = \pm 5,68) olarak tespit edilmiştir.

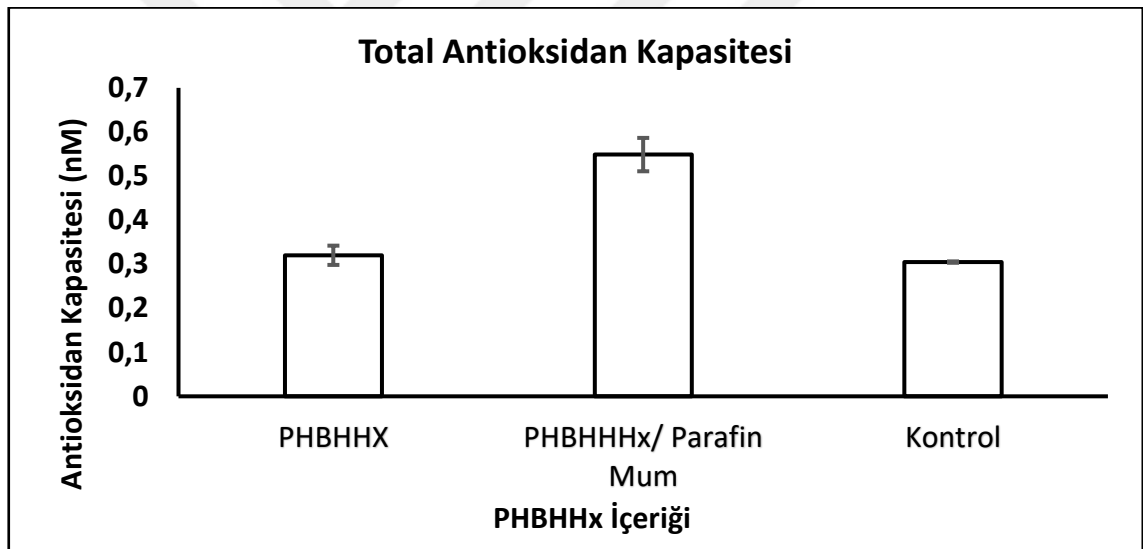
Bu çalışma, PHBHHx üzerinde yetiştirilen L929 hücrelerinin hızlı çoğalmasını açıklamaktadır. PHBHHx'in hücre proliferasyonunu arttırdığı daha önce yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Proliferasyon arttırmasına yönelik iki mekanizma düşünülmektedir: PHBHHx bozunma ürünleri doğrudan hücreyle etkileşime girer veya PHBHHx hücre içinde sinyal iletim yoluna bağlı reseptörü aktive eder. Bu olasılıklar değerlendirilmiş ve PHBHHx'in uzun zincirli yapısının hücrenin ölümünü durduğu ve bu sayede proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir.[133] Farklı hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda (fibroblast[116], [122], osteoblast[42], [134], chondrocyte[124], kemik iliği hücreleri[25], [37]) membrandaki PHBHHx varlığının hücre tutunmasını ve proliferasyonu arttırdığı görülmüştür.



Şekil 4.14 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde 5. günde tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi

4.3.3 Antioksidan Kapasite Çalışmaları

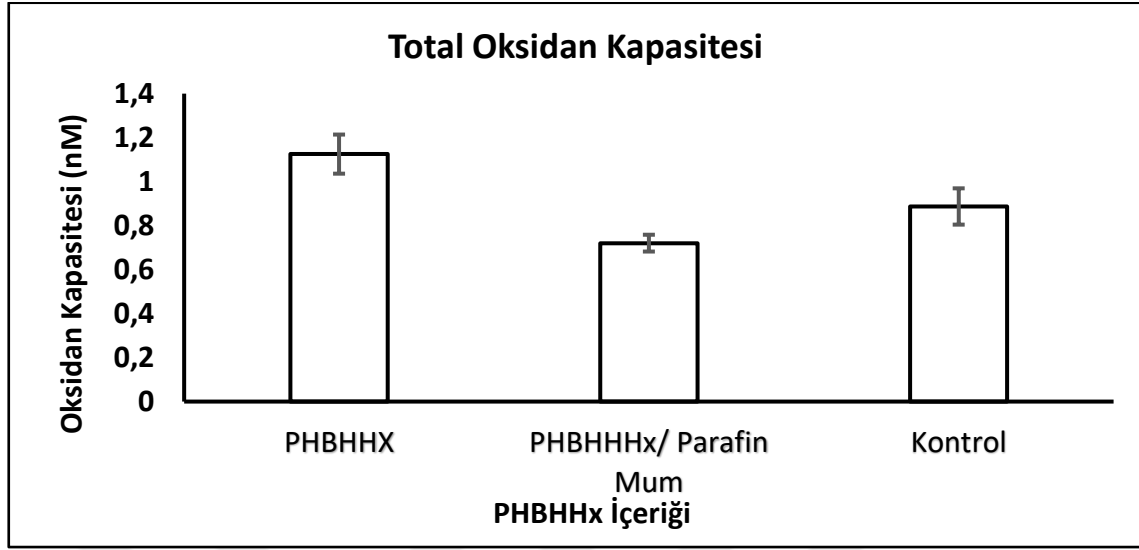
L929 hücre hattı kullanılarak oluşturulan stres modelinde oksidant- antioksidant performansı belirlenmesi için inkübe edilen L929 hücre hattı 24 kuyulu plakaya 100.000 hücre/ mL olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat hücreler inkübe edilmiştir. 10 mm x 5 mm olacak şekilde membranlar L929 hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranlar ile inkübe edildikten membranlar ile inkübe edilen membranlar -80 °C' de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış L929 hücreleri TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status Kit) kiti ve TOS (Relassay Total Oksidant Status Kit) kiti kullanarak membranların oksidan ve antioksidant performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 4.15 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde Total Antioksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi

PHBHX membranlar üzerinde kültüre edilen hücrelerin total antioksidan seviyesinde, kontrol grubuna göre, istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artış görülmüştür ($P>0.05$) Bununla birlikte parafin mum eklenmiş PHBHX membran grubu ile kontrol grubu arasında total antioksidan seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$). Parafin mum eklenmiş membranın

PHBHHx membrana göre total antioksidan seviyesinde istatikselsel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($P<0.05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.16 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde Total Oksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi

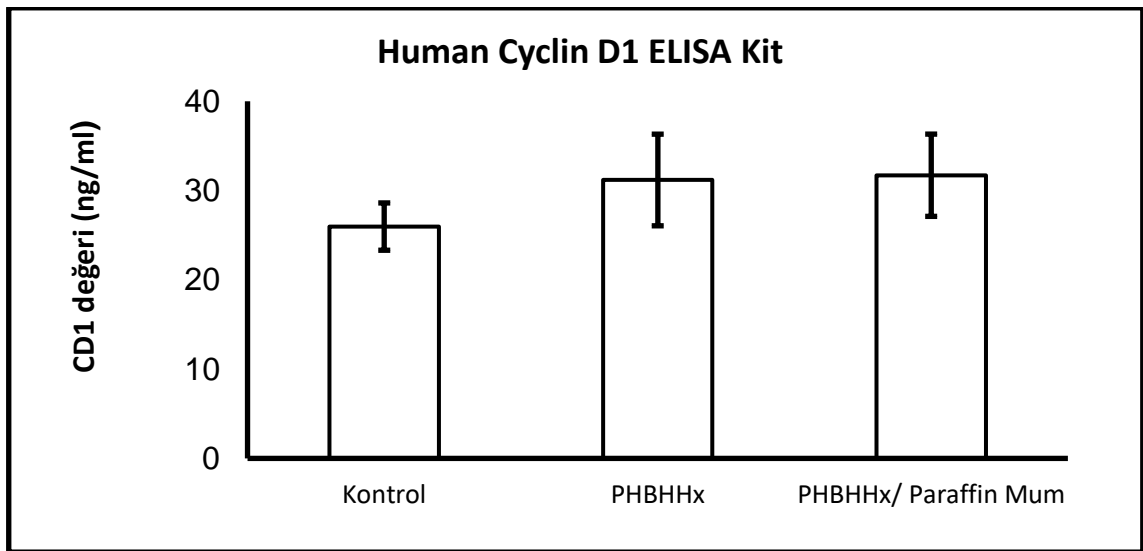
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PHBHHX membranların hücrelerde total oksidan seviyesini istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte parafin mum eklemenin total oksidan seviyesini düşürdüğü görülmüştür ($P<0.05$). Parafin mum eklenmiş membranın PHBHHx membrana göre total oksidan seviyesinde istatikselsel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($P<0.05$) (Şekil 4.16).

4.3.4 Membranın Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi

L929 hücre hattı kullanılarak oluşturulacak stres modelinde CD1 ve p53/ TP53 kantitatif değerlerinin tespiti için L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37 °C'de, % 5 CO₂ atmosferinde 24 kuyucuklu plakada 10 mm x 5 mm şeklinde membranlar ile 72 saat inkübe edilmiştir. PHBHHx ve PHBHHx/ Parafin mum membranlar ile inkübe edilen hücreler -80 °C' de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış L929 hücreleri Human Cyclin D1 ELISA Kit ve

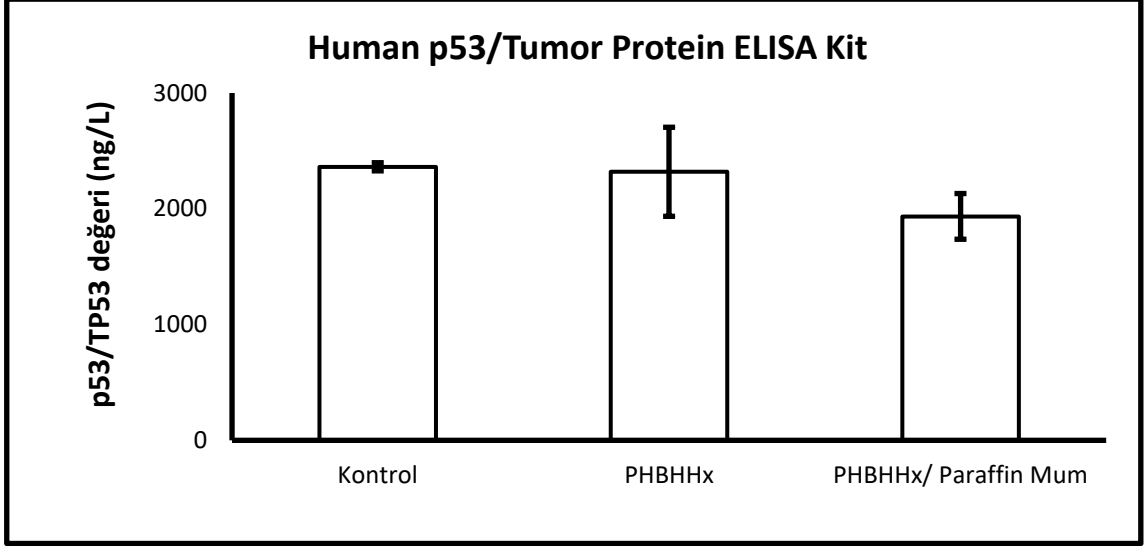
Human p53/Tumor Protein ELISA Kit kullanılarak membranların performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplanmış ve çıkan değerler sayesinde membranların hücre siklusuna etkisi değerlendirilmiştir.

PHBHX membranlar üzerinde kültüre edilen hücrelerin siklin D1 seviyesinde, kontrol grubuna göre, istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artış görülmüştür ($P>0.05$) Bununla birlikte parafin mum eklenmiş PHBHX membran grubunun siklin D1 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir ($P>0.05$) (Şekil 4.17) . Elde edilen membranlar siklin D1 seviyesini artırdığı yapılan deneyde tespit edilmiştir.



Şekil 4.17 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde CD1 aktivitesine etkisi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PHBHHX membranların hücrelerde p53/TP53 seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde arttırdığı görülmüştür ($P>0.05$). Bununla birlikte parafin mum eklemenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde p53/TP53 seviyesini düşürdüğü görülmüştür ($P>0.05$) (Şekil 4.18).



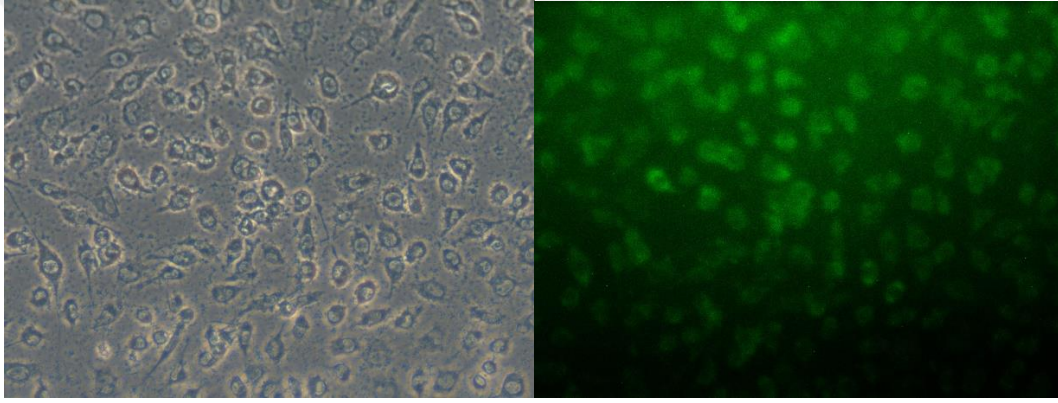
Şekil 4.18 PHBHHX ve PHBHHx/ Paraffin Mum membranların L929 hücre hattı üzerinde p53/ TP53 aktivitesine etkisi

Daha önce yapılan çalışmalarda PHBHHx'in yapısında bulunan hidroksi bütiratın(HB) hücre döngüsünü uyararak değil, özellikle yüksek hücre yoğunluğunda hücre ölümünü baskılayarak hücre büyümesini desteklediği tespit edilmiştir. Bu çalışma HB monomerini içeren polimerlerin hücre büyümesinin desteklemesini sağlar ve PHBHHx'in doku mühendisliğinde kullanımı için uygun, elverişli özelliklerinden biridir [133].

4.3.5 Membrana UPK Hücrelerin Yüklenmesi

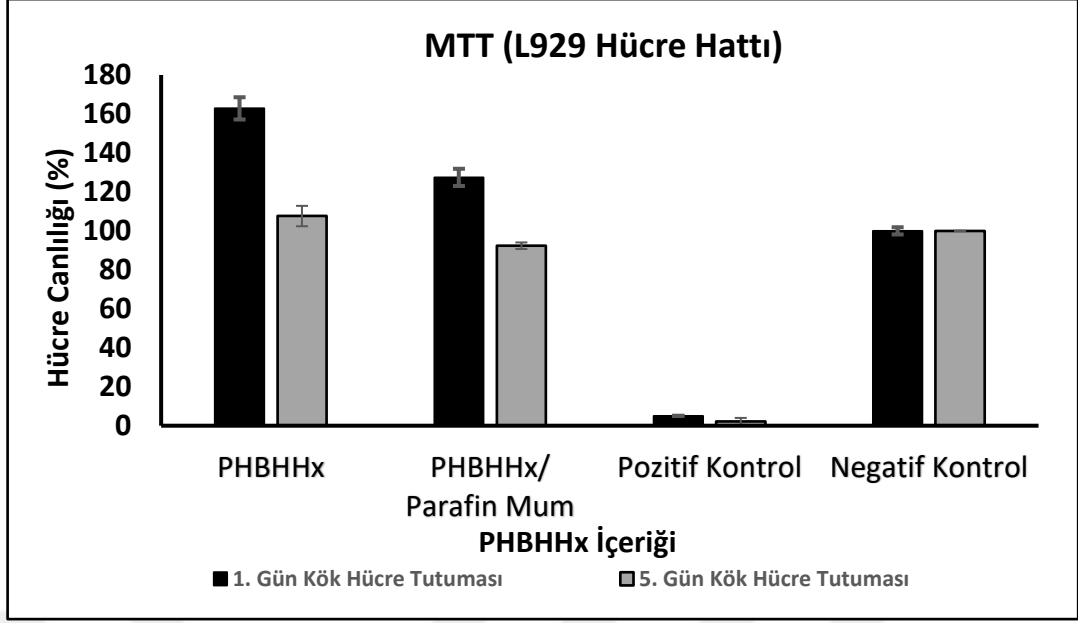
Laboratuvarımızda önceden elde edilen UPK hücrelerinin membrana yüklenmesi ve çoğalma oranlarının incelemesini hedeflenen çalışmanın bu bölümünde canlılıkları ve proliferasyon değerlendirilmesi MTT yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma için UPK hücreleri %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik içeren (Dulbecco's modified Eagle's) mediumda 10 ng/ ml bazik fibroblast büyüme faktörü, 13 GlutaMAX, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve 100 mM b-merkaptotanol içeren ve %10 Fetal Bovin Serumu (FBS), 100 ug/mL streptomisin, 100 U/ mL penisilin ve 2 mM L-Glutamik asit içeren RPMI-1640 besiyeri içinde kültüre edilmiştir. Hücreler, steril koşullar altında 37°C'de, %5 CO2 ihtiva eden etüvlerde konflue oluncaya kadar kültüre edilmiştir. Hücre proliferasyon çalışması için PHBHHx bazlı biyobozunur membranlar 1 cm çapında daire şeklinde kesilmiş, 24

kuyucuklu plaklara yerleştirilmiştir. Membranların sterilizasyonu için plaklar % 70 etanol içerisinde 2 saat süre ile UV ışık altında bekletilmiştir ve etanolü uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapılmıştır. Membranların üzerine 100 µl hacimde yaklaşık 500 UPK hücre ekilerek 2 saat süre boyunca hücreler ile inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri 500 µl'ye tamamlanmıştır. Hücrelerin ekiminden sonra 1. ve 5. günlerde membranların üzerine steril PBS ile yıkanmış ve MTT çözeltisi içeren taze besi yeri (1:9) pipetlenmiştir. 24 kuyucuklu plaklar MTT boyası ile 4 saat süre ile etüvde inkübe edilerek, DMSO eklenerek formazon kristalleri çözüldükten sonra 24 kuyucuklu plaklardan 96 kuyucuklu plaklara pipetlenmiştir ve 570 nm' de optik yoğunlukları elisa okuyucusu kullanılarak canlılığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.19 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin görüntüleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Membranlara eklendikten sonra yapılan canlılık ve tutunma deneyleri çalışmalarında PHBHHx membrandaki hücre canlılığı % 162 (standart hata = $\pm 5,71$) olarak belirlenmiştir.(Şekil 4.20) Parafin mum bulunan membranda ise hücre canlılığı % 127 (standart hata = $\pm 5,42$) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.20 Membranlara tranfekte edilmiş L929 hücrelerin tutunma kapasitelerinin değerlendirilmesi

PHBHHx ile ilgili literatür verileri, PHBHHx'in diğer hücre tipleri ve dokular gibi mezenkimal kök hücrelerle de iyi biyouyumluluğa sahip olduğunu göstermektedir. Mezenkimal kök hücrelerin PHBHHx üzerindeki büyümesini ve farklılaşmasına bakılan çalışmada PHBHHx' in iyi afiniteye sahip olduğu bildirilmiştir [135].

- [1] X.-H. Qu, Q. Wu, K.-Y. Zhang, and G. Q. Chen, "In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3540–3548, 2006.
- [2] J. P. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *Lancet*, vol. 354, pp. S32–S34, 1999.
- [3] E. Reverchon and S. Cardea, "Supercritical fluids in 3-D tissue engineering," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 69, pp. 97–107, 2012.
- [4] G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, and H. B. Lee, "Biomaterials: tissue engineering and scaffolds," *Encycl. Med. devices Instrum.*, 2006.
- [5] B. E. Chaignaud, R. Langer, and J. P. Vacanti, "The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells," in *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*, Springer, 1997, pp. 1–14.
- [6] E. Lavik and R. Langer, "Tissue engineering: current state and perspectives," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–8, 2004.
- [7] S. Yi, F. Ding, L. Gong, and X. Gu, "Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine," *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 12, no. 3, pp. 233–246, 2017.
- [8] Ş. GÜVEN, "Biyouyumluluk ve Biyomalzemelerin Seçimi," *Mühendislik Bilim. ve Tasarım Derg.*, vol. 2, no. 3, pp. 303–311, 2014.
- [9] A. Pasinli, "Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler," *Makine Teknol. Elektron. Derg.*, vol. 4, pp. 25–34, 2004.
- [10] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, "An introduction to materials in medicine," *Biomater. Sci.*, vol. 484, 1996.
- [11] Y. D. Siraparapu, S. Bassa, and P. D. Sanasi, "A review on recent applications of biomaterials," *Intl J Sci Res*, vol. 1, pp. 70–75, 2013.
- [12] Ö. Kümbüloğlu and O. Oral, "Biyomateryaller," *Ege Üniversitesi Dışhekimliği Fakültesi Derg.*, vol. 34, no. 1, pp. 27–33, 2013.
- [13] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, and T. Jayaramudu, "Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications," in *Nanotechnology applications for tissue engineering*, Elsevier, 2015, pp. 21–44.
- [14] T. T. Demirtas, A. Karakeçili, and M. Gümüşderelioğlu, "Preparation and characterization of hydroxyapatite containing superporous hydrogels composites for bone tissue engineering" 5th Biomedical Symposium University of Patras, Patras, Greece 7-9 July, 2006.
- [15] P. X. Ma, "Scaffolds for tissue fabrication," *Mater. Today*, vol. 7, no. 5, pp. 30–40, May 2004.
- [16] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny,

- "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 11, pp. 2126–2146, 2010.
- [17] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [18] F. J. O'brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [19] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, and C.-K. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 6, pp. 679–689, 2001.
- [20] D. S. Kohane and R. Langer, "Polymeric biomaterials in tissue engineering," *Pediatr. Res.*, vol. 63, no. 5, p. 487, 2008.
- [21] B.-S. Kim, C. E. Baez, and A. Atala, "Biomaterials for tissue engineering," *World J. Urol.*, vol. 18, no. 1, pp. 2–9, 2000.
- [22] R. Langer and N. A. Peppas, "Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology," *AIChE J.*, vol. 49, no. 12, pp. 2990–3006, 2003.
- [23] N. R. Patel and P. P. Gohil, "A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance," *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 91–101, 2012.
- [24] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431, 2006.
- [25] C. Ye, P. Hu, M.-X. Ma, Y. Xiang, R.-G. Liu, and X.-W. Shang, "PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 26, pp. 4401–4406, 2009.
- [26] H. M. Başar, "Organik Kökenli Doğal Adsorbanlarla Kontrollü İlaç Salınımı." Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- [27] D. Toykan, "Biyomedikal Uygulamalar İçin Titanyum Takviyeli Hidroksiapatit Kompozitlerinin Geliştirilmesi." Fen Bilimleri Enstitüsü, 2003.
- [28] A. O. Keskin, "Hidroksiapatit Seramiklerinin Mekanik Özelliklerinin Zirkonya İlavesiyle Geliştirilmesi." Fen Bilimleri Enstitüsü, 2000.
- [29] İ. A. Kıyıcı, "Plazma püskürtme yöntemiyle üretilen hidroksiapatit-cam kompozit kaplamaların karakterizasyonu." Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul-Türkiye, 2011.
- [30] R. Toddywala and Y. W. Chien, "Evaluation of silicone-based pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery. I. Effect of penetrant hydrophilicity," *J. Control. Release*, vol. 14, no. 1, pp. 29–41, 1990.
- [31] M. E. Gomes and R. L. Reis, "Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 1 Available systems and their properties," *Int. Mater. Rev.*, vol. 49, no. 5, pp. 261–273, 2004.
- [32] M. Niinomi, "Recent metallic materials for biomedical applications," *Metall.*

- Mater. Trans. A*, vol. 33, no. 3, p. 477, 2002.
- [33] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, 2009.
- [34] V. A. Dubok, "Bioceramics—yesterday, today, tomorrow," *Powder Metall. Met. Ceram.*, vol. 39, no. 7–8, pp. 381–394, 2000.
- [35] E. Salernitano and C. Migliaresi, "Composite materials for biomedical applications: a review," *J. Appl. Biomater. Biomech.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–18, 2003.
- [36] B.-Y. Yu, S.-W. Hu, Y.-M. Sun, Y.-T. Lee, and T.-H. Young, "Modulating the activities of human mesenchymal stem cells (hMSCs) and C3A/HepG2 hepatoma cells by modifying the surface characteristics of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHx)," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 20, no. 9, pp. 1275–1293, 2009.
- [37] B.-Y. Yu, P.-Y. Chen, Y.-M. Sun, Y.-T. Lee, and T.-H. Young, "The behaviors of human mesenchymal stem cells on the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHx) membranes," *Desalination*, vol. 234, no. 1–3, pp. 204–211, 2008.
- [38] G.-Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578, 2005.
- [39] Q. Zhao *et al.*, "Phase morphology, physical properties, and biodegradation behavior of novel PLA/PHBHHx blends," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 100, no. 1, pp. 23–31, 2012.
- [40] M.-L. Cheng, P.-Y. Chen, C.-H. Lan, and Y.-M. Sun, "Structure, mechanical properties and degradation behaviors of the electrospun fibrous blends of PHBHHx/PDLLA," *Polymer (Guildf.)*, vol. 52, no. 6, pp. 1391–1401, 2011.
- [41] H. M. Chang *et al.*, "Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 47, no. 7, pp. 533–539, 2014.
- [42] Y.-W. Wang, Q. Wu, and G.-Q. Chen, "Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds," *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 669–675, 2004.
- [43] Z. Kai, D. Ying, and C. Guo-Qiang, "Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates," *Biochem. Eng. J.*, vol. 16, no. 2, pp. 115–123, 2003.
- [44] S. Tekeli *et al.*, "Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları," *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant. Derg.*, vol. 1, no. 2, pp. 72–83, 2016.
- [45] L. R. Oliveira, A. de Castilho Fernandes, and A. Ribeiro-Silva, "Stem cells and cancer stem cells," in *Cancer Stem Cells-The Cutting Edge*, IntechOpen, 2011.
- [46] C. A. K. H. Biyolojisi, "Türleri ve Tedavide Kullanımları," *Ankara Ankara*

Üniversitesi Tıp Fakültesi. Akad. A, 2014.

- [47] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *Nature*, vol. 414, no. 6859, p. 105, 2001.
- [48] H. Avcılar, B. Saraymen, O. Ö. Özturan, and M. Y. Köker, "Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells," *Asthma Allergy Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [49] M. Zabala *et al.*, "Overview: cancer stem cell self-renewal," in *Cancer Stem Cells*, Academic Press, 2016, pp. 25–58.
- [50] U. Ateş, "Kök hücreyi tanıyalım," *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant. Derg.*, vol. 1, no. 1, pp. 19–28, 2016.
- [51] J. A. Knoblich, "Mechanisms of asymmetric stem cell division," *Cell*, vol. 132, no. 4, pp. 583–597, 2008.
- [52] E. Martin-Rendon and S. M. Watt, "Stem cell plasticity," *Br. J. Haematol.*, vol. 122, no. 6, pp. 877–891, 2003.
- [53] R. Strauss, P. Hamerlik, A. Lieber, and J. Bartek, "Regulation of stem cell plasticity: mechanisms and relevance to tissue biology and cancer," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 5, pp. 887–897, 2012.
- [54] E. Hiyama and K. Hiyama, "Telomere and telomerase in stem cells," *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 7, pp. 1020–1024, 2007.
- [55] T. H. Cheung and T. A. Rando, "Molecular regulation of stem cell quiescence," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 14, no. 6, p. 329, 2013.
- [56] G. Kolios and Y. Moodley, "Introduction to stem cells and regenerative medicine," *Respiration*, vol. 85, no. 1, pp. 3–10, 2013.
- [57] B. W. Kahan and B. Ephrussi, "Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 44, no. 5, pp. 1015–1036, 1970.
- [58] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, vol. 292, no. 5819, p. 154, 1981.
- [59] J. A. Thomson *et al.*, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," *Science (80-.)*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 1998.
- [60] B. L. K. Coles-Takabe *et al.*, "Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies," *Stem Cells*, vol. 26, no. 11, pp. 2938–2944, 2008.
- [61] R. A. Young, "Control of the embryonic stem cell state," *Cell*, vol. 144, no. 6, pp. 940–954, 2011.
- [62] A. McLaren, "Ethical and social considerations of stem cell research," *Nature*, vol. 414, no. 6859, p. 129, 2001.
- [63] W. B. Hurlbut, "Ethics and Embryonic Stem Cell Research," *BioDrugs*, vol. 21, no. 2, pp. 79–83, 2007.
- [64] T. K. Ng, D. Pelaez, V. R. Fortino, J. Greenberg, and H. S. Cheung, "Pluripotent Adult Stem Cells: A Potential Revolution in Regenerative Medicine and Tissue

- Engineering," *Pluripotent Stem Cells*, p. 25, 2013.
- [65] M. Kondo *et al.*, "Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 759–806, 2003.
- [66] C. Ramathal, R. R. Pera, and P. Turek, "Embryonic stem cells and the germ cell lineage," in *Embryonic Stem Cells-Basic Biology to Bioengineering*, IntechOpen, 2011.
- [67] E. Kansu, "Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar," *Hacettepe Tıp Derg.*, vol. 36, pp. 191–197, 2005.
- [68] L. A. Fortier, "Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications," *Vet. Surg.*, vol. 34, no. 5, pp. 415–423, 2005.
- [69] K. Kalra and P. Tomar, "Stem cell: basics, classification and applications," *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.*, vol. 2, no. 7, pp. 919–930, 2014.
- [70] A.-M. Rodriguez, C. Elabd, E.-Z. Amri, G. Ailhaud, and C. Dani, "The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells," *Biochimie*, vol. 87, no. 1, pp. 125–128, 2005.
- [71] D. G. Phinney and D. J. Prockop, "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views," *Stem Cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2896–2902, 2007.
- [72] T. Miki and S. C. Strom, "Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells," *Stem Cell Rev.*, vol. 2, no. 2, pp. 133–141, 2006.
- [73] A. J. Wagers and I. L. Weissman, "Plasticity of adult stem cells," *Cell*, vol. 116, no. 5, pp. 639–648, 2004.
- [74] K. Ko *et al.*, "Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 87–96, 2009.
- [75] H. J. Rippon and A. E. Bishop, "Embryonic stem cells," *Cell Prolif.*, vol. 37, no. 1, pp. 23–34, 2004.
- [76] M. S. Kallos, *Embryonic Stem Cells: Differentiation and Pluripotent Alternatives*. BoD–Books on Demand, 2011.
- [77] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, 2006.
- [78] K. TÜRKŞEN, "İnsan Embriyonik Kök Hücreleri İzolasyon, İdame ve Farklılaşma (diferansiyasyon)."
- [79] Y. Piao, S. S.-C. Hung, S. Y. Lim, R. C.-B. Wong, and M. S. H. Ko, "Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 787–791, 2014.
- [80] V. K. Singh, M. Kalsan, N. Kumar, A. Saini, and R. Chandra, "Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery," *Front. cell Dev. Biol.*, vol. 3, p. 2, 2015.

- [81] D. McMullan, "Scanning electron microscopy 1928–1965," *Scanning*, vol. 17, no. 3, pp. 175–185, 1995.
- [82] G. Peschel *et al.*, "Growth of keratinocytes on porous films of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan," *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 85, no. 4, pp. 1072–1081, 2008.
- [83] Y.-J. Hu, X. Wei, W. Zhao, Y.-S. Liu, and G.-Q. Chen, "Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1115–1125, May 2009.
- [84] F. Güzel and Z. Tez, "B.E.T. Tek Nokta ve Çok Nokta Yönteniyle Yüzey Alanı," Jan. 1988.
- [85] P. Gabbott, *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons, 2008.
- [86] B. Derkuş, "Apta-sensör teknolojisinde kullanılmak üzere doğal kaynaklardan biyomalzemelerin izolasyonu, karakterizasyonu, elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve biyolojik uygulamaları." .
- [87] P. J. Haines, *Thermal methods of analysis: principles, applications and problems*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [88] E. Charsley *et al.*, *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Royal society of chemistry, 2019.
- [89] M. Arıcıoğlu, B. Mert, and Y. Soydan, "Polimer Malzemelerin Mekanik Analiz Yöntemleri," *Sak. Univ. J. Sci.*, vol. 4, no. 1–2, pp. 51–58, 2000.
- [90] T. Büyüksırt and H. Kuleaşan, "Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Gıda Analizlerinde Kullanımı," *GIDA*, vol. 39, no. 4, pp. 235–241.
- [91] G. B. Kılıç and A. G. Karahan, "Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması," *GIDA*, vol. 35, no. 6, pp. 445–452, 2010.
- [92] F. R. Van de Voort, "Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis," *Food Res. Int.*, vol. 25, no. 5, pp. 397–403, 1992.
- [93] I. M. Ward and M. A. Wilding, "Infra-red and Raman spectra of poly (m-methylene terephthalate) polymers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 18, no. 4, pp. 327–335, 1977.
- [94] J. Štokr, B. Schneider, D. Doskočilová, J. Lövy, and P. Sedláček, "Conformational structure of poly (ethylene terephthalate). Infra-red, Raman and nmr spectra," *Polymer (Guildf.)*, vol. 23, no. 5, pp. 714–721, 1982.
- [95] A. Helmrich and D. Barnes, "Animal cell culture equipment and techniques," in *Methods in cell biology*, vol. 57, Elsevier, 1998, pp. 3–17.
- [96] G. Fotakis and J. A. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH,

- neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicol. Lett.*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177, 2006.
- [97] J. Weyermann, D. Lochmann, and A. Zimmer, "A practical note on the use of cytotoxicity assays," *Int. J. Pharm.*, vol. 288, no. 2, pp. 369–376, 2005.
- [98] E. Borenfreund, H. Babich, and N. Martin-Alguacil, "Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests," *Toxicol. Vitr.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 1988.
- [99] T. Lin *et al.*, "Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- κ B as a therapeutic target," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2014.
- [100] M. Pohanka, "Oxidative stress in Alzheimer disease as a target for therapy," *Bratisl. Lek. List.*, vol. 119, pp. 535–543, 2018.
- [101] A. Bastani, S. Rajabi, A. Daliran, H. Saadat, and F. Karimi-Busheri, "Oxidant and antioxidant status in coronary artery disease," *Biomed. reports*, vol. 9, no. 4, pp. 327–332, 2018.
- [102] K. Zabłocka-Słowińska *et al.*, "Systemic redox status in lung cancer patients is related to altered glucose metabolism," *PLoS One*, vol. 13, no. 9, p. e0204173, 2018.
- [103] W. M. A. M. de Moraes *et al.*, "Oxidative stress, inflammatory, psychological markers and severity of respiratory infections are negatively affected during the pre-contest period in amateur bodybuilders," 2018.
- [104] N. B. Fakouri *et al.*, "Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging," *FEBS J.*, vol. 286, no. 6, pp. 1058–1073, 2019.
- [105] W. Tao, D. Pan, Z. Gong, and X. Peng, "Nanoporous platinum electrode grown on anodic aluminum oxide membrane: Fabrication, characterization, electrocatalytic activity toward reactive oxygen and nitrogen species," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1035, pp. 44–50, 2018.
- [106] W. Jiang, S. Su, R. C. Eberhart, and L. Tang, "Phagocyte responses to degradable polymers," *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 82, no. 2, pp. 492–497, 2007.
- [107] H.-H. Chang *et al.*, "Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA," *Biomaterials*, vol. 26, no. 7, pp. 745–753, 2005.
- [108] J. Liang and J. M. Slingerland, "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression," *Cell cycle*, vol. 2, no. 4, pp. 336–342, 2003.
- [109] D. G. Johnson and C. L. Walker, "Cyclins and cell cycle checkpoints," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, no. 1, pp. 295–312, 1999.
- [110] C. Giacinti and A. Giordano, "RB and cell cycle progression," *Oncogene*, vol. 25, no. 38, p. 5220, 2006.
- [111] P. H. Shaw, "The role of p53 in cell cycle regulation," *Pathol. Pract.*, vol. 192,

- no. 7, pp. 669–675, 1996.
- [112] M. A. Dickson and G. K. Schwartz, “Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy,” *Curr. Oncol.*, vol. 16, no. 2, p. 36, 2009.
- [113] W. Y. Kim and N. E. Sharpless, “The regulation of INK4/ARF in cancer and aging,” *Cell*, vol. 127, no. 2, pp. 265–275, 2006.
- [114] Q. L. Loh and C. Choong, “Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, 2013.
- [115] A. W. Chan and R. J. Neufeld, “Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 6119–6129, 2009.
- [116] J. Li, H. Yun, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, “Effects of surface modification of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHx) on physicochemical properties and on interactions with MC3T3-E1 cells,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 75, no. 4, pp. 985–998, 2005.
- [117] Y. Gao *et al.*, “Improvement of mechanical properties of poly(dl-lactide) films by blending of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate),” *Eur. Polym. J.*, vol. 42, no. 4, pp. 764–775, Apr. 2006.
- [118] L.-P. Wu, M. You, D. Wang, G. Peng, Z. Wang, and G.-Q. Chen, “Fabrication of carbon nanotube (CNT)/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHx) nanocomposite films for human mesenchymal stem cell (hMSC) differentiation,” *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 16, pp. 4490–4498, 2013.
- [119] L. Luo, X. Wei, and G.-Q. Chen, “Physical Properties and Biocompatibility of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Blended with Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate),” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 20, no. 11, pp. 1537–1553, Jan. 2009.
- [120] X.-H. Qu, Q. Wu, J. Liang, X. Qu, S.-G. Wang, and G.-Q. Chen, “Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHHx),” *Biomaterials*, vol. 26, no. 34, pp. 6991–7001, 2005.
- [121] L. He *et al.*, “Microstructure and properties of nano-fibrous PCL-b-PLLA scaffolds for cartilage tissue engineering,” *Eur Cell Mater*, vol. 18, pp. 63–74, 2009.
- [122] Y.-W. Wang, Q. Wu, and G.-Q. Chen, “Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4621–4629, 2003.
- [123] I. Gerçek, R. S. Tıǧlı, and M. Gümüşderelioǧlu, “A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 86, no. 4, pp. 1012–1022, 2008.

- [124] Y. Deng, K. Zhao, X. Zhang, P. Hu, and G.-Q. Chen, "Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds," *Biomaterials*, vol. 23, no. 20, pp. 4049–4056, Oct. 2002.
- [125] M. Sun, P. Zhou, L.-F. Pan, S. Liu, and H.-X. Yang, "Enhanced cell affinity of the silk fibroin-modified PHBHHx material," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 8, pp. 1743–1751, 2009.
- [126] K. Phillipson, J. N. Hay, and M. J. Jenkins, "Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly (ϵ -caprolactone)," *Thermochim. Acta*, vol. 595, pp. 74–82, 2014.
- [127] J. Ramier, M. Ben Boubaker, M. Guerrouache, V. Langlois, D. Grande, and E. Renard, "Novel routes to epoxy functionalization of PHA-based electrospun scaffolds as ways to improve cell adhesion," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 52, no. 6, pp. 816–824, 2014.
- [128] J. M. García-García, L. Garrido, I. Quijada-Garrido, J. Kaschta, D. W. Schubert, and A. R. Boccaccini, "Novel poly (hydroxyalkanoates)-based composites containing Bioglass® and calcium sulfate for bone tissue engineering," *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 5, p. 54105, 2012.
- [129] E. Ó. Faoláin *et al.*, "Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 53, no. 1, pp. 121–129, 2005.
- [130] M. Zheng and W. Du, "Phase behavior, conformations, thermodynamic properties, and molecular motion of multicomponent paraffin waxes: A Raman spectroscopy study," *Vib. Spectrosc.*, vol. 40, no. 2, pp. 219–224, 2006.
- [131] V. E. Santo, A. R. C. Duarte, M. E. Gomes, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Hybrid 3D structure of poly (d, l-lactic acid) loaded with chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles to be used as carriers for biomacromolecules in tissue engineering," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 54, no. 3, pp. 320–327, 2010.
- [132] Y.-W. Wang, W. Mo, H. Yao, Q. Wu, J. Chen, and G.-Q. Chen, "Biodegradation studies of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 85, no. 2, pp. 815–821, 2004.
- [133] S. Cheng, G.-Q. Chen, M. Leski, B. Zou, Y. Wang, and Q. Wu, "The effect of D, L- β -hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells," *Biomaterials*, vol. 27, no. 20, pp. 3758–3765, 2006.
- [134] J. Xi, L. Kong, Y. Gao, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, "Properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films modified with polyvinylpyrrolidone and behavior of MC3T3-E1 osteoblasts cultured on the blended films," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 16, no. 11, pp. 1395–1408, 2005.
- [135] M. Yang *et al.*, "Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)," *Biomaterials*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1365–1373, 2004.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: meryem.akkurt@outlook.com

Konferans Bildirileri

1. M. Akkurt, N. Türkoğlu, “Kişiyeye Özel Doku Yaması Olarak Kullanılmak Üzere PHBHHx Bazlı Membranların Hazırlanması”, 31. Ulusal Kimya Kongresi, pp. 419-419, 2019.

Ödüller

1. 2210/C Yüksek Lisans Öncelikli Alanlar Bursu/ TÜBİTAK (2018/2)