

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TENDON-KEMİK ARAYÜZÜ İÇİN SÜREKLİ KADEMELİ KOMPOZİT
HÜCRE İSKELESİ ÜRETİMİ VE UYGULAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece BAYRAK

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Cevat ERİŞKEN

Nisan 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 141711004 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ece BAYRAK**'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**TENDON-KEMİK ARAYÜZÜ İÇİN SÜREKLİ KADEMELİ KOMPOZİT HÜCRE İSKELESİ ÜRETİMİ VE UYGULAMASI**" başlıklı tezi **10.04.2017** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Cevat ERİŞKEN
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU
(Başkan)
Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet MUTLU
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Ece BAYRAK

ÖZET

Yüksek Lisans

TENDON-KEMİK ARAYÜZÜ İÇİN SÜREKLİ KADEMELİ KOMPOZİT HÜCRE İSKELESİ ÜRETİMİ VE UYGULAMASI

Ece BAYRAK

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cevat ERİŞKEN

Tarih: Nisan 2017

Tendon yaralanmaları en yaygın travma çeşitleri arasında yer almaktadır ve sadece A.B.D.'de yılda 250.000'den fazla rotator manşet tendon onarımının yapıldığı bilinmektedir. Türkiye'de ise bu tür yaralanmalar yetişkin popülasyonun %26'ya varan kısmında görülen omuz rahatsızlıklarının %70'ini oluşturmaktadır. Tendon dokusu, damarlanmanın zayıf olması ve geniş ölçekli hareket kabiliyeti sebebiyle kendi kendini rejenere etmede yetersiz kalmaktadır. Problemin giderilebilmesi için güncel klinik yaklaşım, tendon greftlerini mekanik olarak kemiğe tutturmak olup, bu uygulamada, ameliyat sonrası %90'a varan tekrarlama görülmektedir. Ayrıca bu uygulamalar, gerçek dokuda var olan hiyerarşik yapıyı yeniden oluşturamamaktadır. Bulgulara göre, doğal tendon-kemik arayüzü yapısal olarak tendon, fibrokıkırdak ve kemik olmak üzere farklı türdeki üç dokunun birinden diğerine sürekli kademeli olarak geçişinden oluşmaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmanın amacı elektro eğirme yöntemiyle, içinde hidroksiapatit ve büyüme hormonlarının kademeli olarak değiştiği polikaprolakton bazlı hücre iskeleleri üretmek ve bu hücre iskeleleri üzerinde insan kemik iliğinden elde edilecek kök hücre davranışlarını incelemek olarak belirlenmiştir. Bileşenleri kademeli olarak değişen hücre iskelesi, geleneksel katmanlı hücre iskelesi

yaklaşımından belirgin bir farklılık göstermektedir. Bulgular incelendiğinde, bu çalışmada üretilen hücre iskelelerinin, aynı tendon-kemik arayüzünde olduğu gibi fiber mat kalınlığı boyunca doğrusal değişen hidroksiapatit konsantrasyonuna sahip olduğu görülmektedir. Hidroksiapatit, polikaprolakton fiberler içine ağırlıkça %20 oranında yedirildiğinde, fiber çapı 361 ± 9 nm'den, 459 ± 21 nm'ye çıkmış, temas açısı $120\pm 3^\circ$ 'den $115\pm 1^\circ$ 'ye düşmüştür. Yapılan mekanik testler sonucunda ise sadece polikaprolakton içeren hücre iskelesinin dayanabileceği maksimum yük $7,5\pm 1,7$ N, %16 hidroksiapatit içeren hücre iskelelerinin dayanabileceği maksimum yük ise $11,6\pm 1,3$ N olarak ölçülmüştür. Kopma gerinimleri de sırasıyla $0,12\pm 0,02$ mm/mm, $0,18\pm 0,02$ mm/mm bulunmuştur. Kontrollü salım çalışmaları sonuçları, bağ doku büyüme faktörünün (CTGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta 3$ (TGF $\beta 3$)'ün 28.gün sonunda sırasıyla $\%27\pm 7$ ve $\%81\pm 25$ salındığını göstermektedir. Hücre proliferasyonu ve kolajen üretiminde ise hücre iskelesi tipine bağlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu bulguların, biyolojik greft fiksasyonunu hedeflemiş biyomimetik doku mühendisliği teknolojileri için *in-vitro* düzeyde faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tendon-kemik arayüzü, Doku mühendisliği, Rejenerasyon, Elektro eğirme, Büyüme faktörleri, Nanohidroksiapatit, Polikaprolakton, Hücre iskelesi.

ABSTRACT

Master of Science

CONTINUOUSLY GRADED COMPOSITE SCAFFOLDS FOR TENDON-BONE INTERFACE REGENERATION

Ece BAYRAK

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Programme

Supervisor: Assist. Prof. Cevat ERİŞKEN

Date: April 2017

Rotator cuff tears are the most common injuries of the shoulder, with over 250,000 repairs performed annually in the U.S., only. In Turkey, up to 26% of the adult population suffer from shoulder related problems, and rotator cuff tears constitute %70 of this population. Tendon tissue has limited self-regenerative capacity due to poor vasculature and wide range of motion ability. Tendon injuries generally exist at the tendon-bone interface, and current clinical approach for tendon repair is mechanical fixation, which leads to as high as 90% recurrence rates. In addition, repaired tendon site is unable to form the hierarchical physical and biological structure of the native tissue. Native tendon-bone interface is composed of three different yet continuous layers of tendon, fibrocartilage (unmineralized and mineralized) and bone tissues.

Therefore, this study aims at i) fabricating electrospun polycaprolactone scaffolds also enriched with hydroxyapatite and growth hormones in a graded manner, and ii) investigating human stem cell behavior on these scaffolds. This type of graded scaffold demonstrates significant deviation from conventional multi-layered scaffold approach. Graded scaffolds fabricated in this study were demonstrated to contain linearly changing hydroxyapatite concentration as a function of scaffold thickness, a

distribution typically observed in native tendon-bone interface. Mixing polycaprolactone and hydroxyapatite nanoparticles (20% by weight) led to an increase in fiber diameter from 361 ± 9 nm to 459 ± 21 nm, and a decrease in contact angle from $120\pm 3^\circ$ to $115\pm 1^\circ$. In biomechanical tests, maximum loads were found as 7.5 ± 1.7 N for polycaprolactone only scaffolds, and 11.6 ± 1.3 N for scaffolds with 16% hydroxyapatite. Strain at break values were found to be 0.12 ± 0.02 mm/mm and 0.18 ± 0.02 mm/mm, respectively. Release studies showed a continuous release of connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) over a period of 28 days. At the end of day 28, $27\pm 7\%$ of CTGF and $81\pm 25\%$ of TGF- $\beta 3$ were released from nanofiber scaffolds. No effect of scaffold type was observed for proliferation of and collagen production by mesenchymal stem cells. These *in-vitro* findings are expected to provide significant inputs for biologic graft fixation.

Keywords: Tendon-bone interface, Tissue engineering, Regeneration, Electrospinning, Growth factors, Nanohydroxyapatite, Polycaprolactone, Scaffold.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Cevat ERİŞKEN'e, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine, bana burs sağlayarak eğitimime destek veren TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi'ne, çalıőmalarımda imkan ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY ve öğrencisi Nuh YILDIRIM'a, Prof. Dr. Vasıf HASIRCI'ya, Doç. Dr. Halil Murat AYDIN'a, Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a, Doç. Dr. Yıldırım KARSLIOęLU ve ekibine, değerli laboratuvar arkadaşım Burak ÖZCAN'a, yüksek lisans öğrenimim boyunca hep yanımda olan dostlarıma ve son olarak destekleriyle her zaman yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, beni bu yolda hiç yalnız bırakmayan başta canım annem Ebru BAYRAK ve babam Uęur BAYRAK olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez kapsamındaki çalıőmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na da (Proje No:115C001) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
KISALTMALAR.....	xiii
SEMBOL LİSTESİ	xiv
RESİM LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	9
2.1 PCL Nanolifler İçine Elektro Eğirme Yöntemiyle Katkı Maddesi Ekleme: Nanohidroksiapatit ile Proses Doğrulama	9
2.1.1 Malzeme ve cihazlar	9
2.1.2 PCL solüsyonu ve hidroksiapatit süspansiyonunun hazırlanması	9
2.1.3 Karşılıklı şiringalar ile çoklu elektro eğirme yöntemi	10
2.1.4 Fiber matların karakterizasyonu	12
2.1.4.1 nHA partiküllerinin kütle dağılımı.....	12
2.1.4.2 Fiber çapı ve yüzey özellikleri	12
2.1.4.3 Porozite ve por çapı.....	12
2.1.4.4 Temas açısı.....	13
2.1.4.5 Mekanik testler.....	13
2.1.5 İstatistik.....	13
2.2 Büyüme Hormonlu ve Sürekli Kademeli PCL Hücre İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	13
2.2.1 Malzeme ve cihazlar	14
2.2.2 PCL/CTGF ve PCL/TGF-β3 hücre iskelelerini üretimi ve karakterizasyonu	14
2.2.2.1 PCL solüsyonu ve büyüme faktörlerinin hazırlanışı.....	14
2.2.2.2 Elektro eğirme yöntemi ile hücre iskelesi üretimi	15
2.2.2.3 Fiber matların karakterizasyonu.....	15
2.2.2.4 CTGF ve TGF-β3 salım çalışmaları.....	15
2.2.3 PCL/nHA/CTGF/TGF-β3 içeren sürekli kademeli kompozit hücre iskelelerinin üretilmesi.....	16
2.2.3.1 PCL solüsyonu, hidroksiapatit süspansiyonu ve büyüme faktörlerinin hazırlanması	16
2.2.3.2 Üçlü elektro eğirme yöntemi ile hücre iskelesi üretimi	16
2.2.3.3 Fiber matın karakterizasyonu.....	18
2.3 İnsan Kemik İliğinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışları.....	18
2.3.1 Malzeme ve cihazlar	19
2.3.2 Hücre iskelelerinin hazırlanması ve sterilizasyonu.....	19
2.3.3 Hücre ekimi.....	20

2.3.4 Hücre proliferasyonu	21
2.3.5 Kolajen üretimi	21
2.3.6 Histoloji	22
2.3.7 İstatistik	23
3. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA	25
3.1 PCL/nHA Hücre İskelelerinin Karakterizasyonu.....	25
3.1.1 nHA partiküllerin hücre iskelesi içindeki kütleli dağılımı.....	25
3.1.2 Fiber çapı ve yüzey özellikleri	26
3.1.3 Porozite ve por çapı.....	30
3.1.4 Temas açısı.....	32
3.1.5 Mekanik testler.....	33
3.2 Büyüme Hormonlu ve Sürekli Kademeli Hücre İskelelerinin Karakterizasyonu.....	36
3.2.1 Fiber matların karakterizasyonu.....	36
3.2.2 Salım çalışmaları	39
3.3 Hücre Ekimi ve Karakterizasyonu	40
3.3.1 Hücre proliferasyonu.....	40
3.3.2 Kolajen üretimi.....	40
3.3.3 Histoloji çalışmaları	42
3.3.3.1 Giemsa boyama	42
3.3.3.2 Kolajen boyama.....	43
3.3.3.3 GAG boyama.....	44
4. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 :	Fiber mat kalınlığı boyunca nano-hidroksiapatit partiküllerinin konumsal olarak değişen bileşimi.....	25
Şekil 3.2 :	Kademeli üretilen fiber matların PCL-zengin ve nHA-zengin kısımlarından alınmış örneklerin SEM görüntüleri.....	27
Şekil 3.3 :	SEM görüntülerinde görünen nHA parçacıklarının çap dağılımı.....	27
Şekil 3.4 :	Farklı akış hızlarında ve farklı nHA konsantrasyonlarındaki PCL ve nHA fiber matların enerji dağılım spektroskopi spektrumu	28
Şekil 3.5 :	Fiber matların PCL-zengin yüzeyden ölçülen fiber çap dağılımları	29
Şekil 3.6 :	Fiber matların nHA-zengin yüzeyden ölçülen fiber çap dağılımları.....	29
Şekil 3.7 :	PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerden ölçülen ortalama fiber çaplarının karşılaştırması.....	29
Şekil 3.8 :	PCL-zengin yüzeylerin por büyüklük dağılımı.....	31
Şekil 3.9 :	nHA-zengin yüzeylerin por büyüklük dağılımı.....	31
Şekil 3.10:	PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerin por büyüklüklerinin karşılaştırılması.....	31
Şekil 3.11 :	Fiber matların PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerinin temas açısı karşılaştırması.....	33
Şekil 3.12:	nHA miktarının kopma yüküne etkisi.....	34
Şekil 3.13:	nHA miktarının maksimum yüke etkisi.....	34
Şekil 3.14:	nHA miktarının kopma gerinimine etkisi.....	34
Şekil 3.15:	Farklı miktarda nHA içeren hücre iskelelerinin yük-yer değiştirme grafiği.....	35
Şekil 3.16:	PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGF β 3 ve graded hücre iskelelerinin fiber çap karşılaştırması.....	38
Şekil 3.17:	PCL/TGF- β 3 ve PCL/CTGF hücre iskelelerinin dizilimi.....	38
Şekil 3.18:	PCL/TGF- β 3 ve PCL/CTGF hücre iskelelerinden büyüme hormonları salımları.....	39
Şekil 3.19:	Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli hücre iskelesi üzerindeki proliferasyonu.....	41
Şekil 3.20:	Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli hücre iskelesi üzerindeki kolajen üretimi.....	41
Şekil 3.21:	Giemsa ile hücre boyama deneylerinden mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre iskeleleri üzerindeki görüntüleri.....	42
Şekil 3.22:	Picrosirius Red ile kolajen boyama deneylerinden farklı hücre iskelelerinin görüntüleri.....	43
Şekil 3.23:	Safranin-O ile GAG boyama deneylerinden farklı hücre iskelelerinin görüntüleri.....	44

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1: Tendon-kemik arayüzünün kompozisyonu.....	2
Çizelge 2.1: Elektro eğirmede optimizasyon için kullanılan malzeme bileşenleri ve proses parametreleri.....	10
Çizelge 2.2: İşlem sırasında karşılıklı şırıngalardaki sıvıların akış hızları.....	11
Çizelge 2.3: İşlem sırasında şırıngalardaki sıvıların akış hızları ve hücre iskelesi içindeki teorik büyüme faktörü miktarları.....	18
Çizelge 3.1: PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGF- β 3 ve kompozit hücre iskelesinin SEM fotoğrafları ile fiber çap ölçümleri.....	37

KISALTMALAR

AMP-B	: Amfoterisin-B
CTGF	: Bağ Doku Büyüme Faktörü
DCM	: Diklorometan
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Besiyeri
DMF	: Dimetilformamid
EDS	: Enerji Dağılım Spektrometresi
FBS	: Fetal Bovin Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GM	: Gentamisin
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asitler
nHA	: Nano Hidroksiapatit
P/S	: Penisilin/Streptomisin
PBS	: Phospated buffered saline
PCL	: Polikaprolakton
PVA	: Polivinil alkol
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik Analiz
TGF-β3	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β3

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamalarına birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

\circ

Temas Açısı

ε

Porozite

μ

Mikron

ρ_a

Görünür yoğunluk

ρ_t

Gerçek yoğunluk

RESİM LİSTESİ

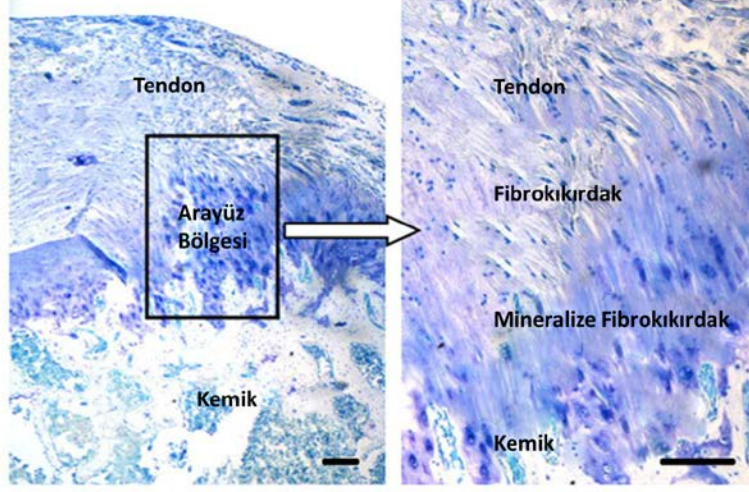
	<u>Sayfa</u>
Resim 1.1: Tendon-kemik arayüzünün histolojik yapısı.....	2
Resim 2.1: Karşılıklı şırıngalar ile çoklu elektro eğirme düzeneği.....	11
Resim 2.2: Sürekli kademeli hücre iskelesi elde etmek için kullanılan üçlü elektro eğirme düzeneği.....	17
Resim 2.3: Üçlü elektro eğirme sistemindeki şırıngalarda gözlemlenen Taylor konileri	17
Resim 2.4: Hücre ekimi için hücre iskelesi hazırlanması.....	20



1. GİRİŞ

Biyolojik olarak bozunabilen, porozitesi veya bileşenleri isteğe bağlı olarak konumlandırılmış, gerçek dokuların karmaşık yapısını ve işlevlerini taklit edebilecek hücre iskelesi veya greftlerin tasarımı ve üretilmesi doku mühendisliğinin amaçlarını gerçekleştirmeye yönelik en önemli araçlardandır. Her doku kendi içinde oldukça karmaşık yapıya sahip olmakla birlikte, farklı yapı ve özelliklerdeki birden fazla dokunun birleşme bölgeleri yani doku-doku arayüzleri göreceli olarak daha karmaşıktır ve rejenerasyonlarının zorluk derecesi de bu sebeple daha yüksektir. Vücüttaki en çok bilinen doku arayüzlerinden bazıları dizdeki kıkırdak-kemik ile ligament-kemik arayüzleri, omuzdaki ve ayaktaki tendon-kemik arayüzleri, omurgadaki kıkırdak-kemik arayüzleri, iskelet sistemindeki kas-tendon arayüzleri olarak adlandırılabilir. Bu arayüzler genel olarak sert doku yumuşak doku (kıkırdak-kemik, tendon/ligament-kemik, vb.) geçişlerinde yer alıp, geçiş bölgesi yüksek derecede zorlanmalara maruz kaldığında dokular arasındaki malzeme mekaniği uyumsuzluğundan dolayı yırtılmalara sebep olmakta ve klinik müdahale kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu tezde, tendon-kemik arayüzünün işlevsel rejenerasyonu için nanoteknoloji esaslı yeni bir kademeli hücre iskeleleri üretimi ve bu iskeleler üzerinde kemik iliğinden alınan mezenkimal kök hücre davranışlarının incelenmesi ele alınmıştır.

Vücut içerisinde tendon/ligament-kemik arayüzü yapısal olarak tendon/ligament, fibrokıkırdak ve kemik olmak üzere farklı türdeki üç dokunun birinden diğerine sürekli kademeli olarak geçişinden oluşmakta ve bu geçiş dokuları da sırasıyla fibroblast, fibrokondrosit ve osteoblast gibi çeşitli hücre fenotiplerini barındırmaktadır [1-3] (Resim 1.1, Çizelge 1.1) [4, 5].



Resim 1.1: Tendon-kemik arayüzünün histolojik yapısı (Tendon-kemik arayüzü skala uzunluğu: 200 μ m) [4].

Çizelge 1.1: Tendon-kemik arayüzünün kompozisyonu [5]

	Doku	Hücre tipi	Kompozisyon
1	Tendon	Fibroblast	Kolajen tip I, III
2	Mineralsiz fibrokıkırdak	Oval kondrosit	Kolajen tip I, II; proteoglikan
3	Mineralize fibrokıkırdak	Hipertrofik kondrosit	Kolajen tip I, X
4	Kemik	Osteosit, osteoklast, osteoblast	Kolajen tip I, mineral

Tendonların ve ligamentlerin ana bileşeni kolajendir ve tip I ile tip III kolajenlerin varlığı bu dokuların tipik belirleyicisidir. Fibrokıkırdak doku, arayüzdeki en kritik bölgedir ve tendon/ligament ile kemik dokusunun asıl kaynaşma bölgesidir. Tip I ve tip II kolajenlerden oluşmaktadır ve arayüze esneklik kazandırılması için proteoglikanlarla zenginleştirilmiştir. Kemik dokusunda ise çoğunlukla tip I kolajen yer almaktadır. Fibrokıkırdak dokusu tendon/ligament ve kemik dokuları arasındaki geçiş bölgesidir ve genel anlayış olarak mineralsiz fibrokıkırdak ve mineralize fibrokıkırdak olmak üzere iki tabaka halinde olduğu varsayılır (Çizelge 1.1) [1, 6]. Ancak son yıllarda yapılan mikroskopik düzeydeki incelemeler, bu arayüzün matris bileşenlerinin kompozisyonu açısından kademeli değişen hiyerarşik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir [7].

Doku mühendisliği, hasarlı dokuların iyileştirilmesi için hücre, sinyal molekülleri ve bunların barınabileceği ortamlar olan biyomalzemelerden oluşan hücre iskelesi bileşenlerinin bir araya getirilerek işlevsellik kazandırılması esasına dayanmaktadır [8]. Bu anlayıştan yola çıkarak, tendon/ligament-kemik arayüzünün tamiri için çeşitli hücre iskelesi modelleri ve greftler önerilmiştir. Ne var ki tendon/ligament arayüzleri için tasarlanmış hücre iskeleleri çoğunlukla mineral içeren ve içermeyen tabakalar halinde [9, 10] tasarlandığı için gerçek tendon/ligament-kemik arayüzündeki fizyolojik yapıyı temsil etmekten uzaktır. Diğer taraftan, günümüzde kabul görmüş olan rekonstrüksiyon greft malzemelerinin doğal dokuda var olan kademeli yapıyı oluşturmada tam başarı sağlayamadığı ve zamanla tekrar yırtılma oluştuğu da bilinmektedir [11-14]. Bu sebeple, yukarıda bahsedilen anatomik bölgelerde veya daha genel anlamda vücuttaki yumuşak doku-kemik arayüzlerindeki hasarların sadece mekanik olarak değil aynı zamanda biyolojik anlamda kaynaşmasına ve doğal dokudaki özelliklere sahip olacak biçimde tamirine olanak sağlayabilecek yeni takviye greft veya hücre iskelelerine gereksinim duyulmaktadır.

Bu ihtiyaçlardan yola çıkılarak, bu tezde, cerrahi yöntemlerle tamir gerektiren ve cerrahi operasyon sonunda tam olarak işlevlerine kavuşması sağlanamayan omuzdaki tendon yırtıklarının nanoteknoloji esaslı kompozit hücre iskelesi kullanılarak kaynaştırılması yaklaşımı benimsenmektedir. Çalışmanın temel hedefi, biyoaktif bileşenler kullanılarak işlevsel olarak kademelendirilmiş nanolifli kompozit salım sistemi geliştirmek ve sistem içindeki biyoaktif bileşenlerin kontrollü salımı desteğiyle mezenkimal kök hücrelerini uygun biyolojik faaliyetler için yönlendirerek tendon-kemik arayüzündeki fibrokıkırdak dokunun yapısını oluşturabilmektir.

Erişken ve grubunun daha önceki çalışmaları, polikaprolakton malzemesinin elastik olup biyolojik olarak bozunduğunu ve biyoaktif malzemelerin kontrollü salımına olanak sağladığını göstermiştir [15, 16]. Ek olarak, bu malzemenin nanolifli yapıda üretilirken içine mineral kristallerinin de kademeli artan veya azalan miktarlarda yerleştirilerek üç boyutlu kompozitin mekanik özelliklerinin değiştirilebileceği ve buna bağlı olarak kıkırdak-kemik arayüzleri uygulaması için oldukça elverişli olabileceği gösterilmiştir [17, 18]. Üretilen bu üç boyutlu kompozit malzemenin uygun biyoaktif maddelerle zenginleştirildiğinde, yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin dizdeki kıkırdak-kemik arayüzüne benzer bir yapı oluşturacak şekilde *in-vitro* stimüle ettiği gözlenmiştir [15].

Biyoaktif bileşenler grubunda yer alan büyüme hormonlarının tendon-kemik arayüzündeki yaralanma bölgesine enjekte edilmesi ile yapılan çalışmalar, hormonların yaralı bölgenin iyileşmesi ve anatomik olarak fonksiyonlarını yeniden kazanması yönünde destek sağladığını göstermiştir [19, 20]. Örnek olarak, TGF- β 3'ün tendon-kemik arayüzünün oluşması ve gelişimi esnasında bu bölgedeki hücreler tarafından salgılandığı [21] göz önüne alındığında, bu hormonun kompozit hücre iskelesinde yer alması gerektiği söylenebilir. TGF- β 3 aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerin kırık dokü hücrelerine dönüşmesinde de etkili bulunmuştur [22]. Benzer şekilde, CTGF hormonunun mezenkimal kök hücrelerin tendon hücrelerine dönüşmesi için tek başına yeterli olduğu bilinmektedir [23]. Ayrıca, kemik dokusunun inorganik bileşenlerinden olan hidroksiapatit kristallerinin kemiğe benzeyen yapıların oluşumuna destek verdiği, hücrelerin yaşaması ve çoğalması için elverişli bir ortam oluşturduğu gösterilmiştir [24, 25].

Bu bilgiler ışığında, bu tezde ortaya atılan hipotez, nanolifli polikaprolakton hücre iskelesi içine sürekli kademeli olarak yedirilecek olan nano hidroksiapatit partikülleriyle TGF- β 3 ve CTGF büyüme hormonlarının, mezenkimal kök hücrelerini fibrokırık dokü yapı oluşumu için yönlendireceği şeklindedir.

Bu çalışmada, hücre iskelelerinin üretimi için 1930 yılından beri polimer çözeltilerden fiber, nanofiber ve fiber kompozitler elde etme amacıyla kullanılan elektro eğirme yöntemi tercih edilmiştir [26, 27]. Yöntem, şırınga içine yerleştirilen iletken bir polimer çözeltisinin, elektriksel potansiyel farkı sonucu şırınganın ucundan toplayıcıya doğru çekilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Günümüzde bu yöntem farklı modifikasyonlar uygulanarak da kullanılabilir (geleneksel elektro eğirme, ekstrüzyon elektro eğirme, elektro püskürtme, vs.) ancak tüm bu modifikasyonlar kütle, momentum ve elektrik yüklerinin korunumu prensiplerine dayanmaktadır [28]. Bahsedilen farklı yöntemler içerisinde geleneksel elektro eğirme en çok kullanılan yöntemdir ve bu yöntem, bileşenlerin bir rezervuara yüklenmesi, ardından da oluşturulan potansiyel fark sonucu rezervuardan toplayıcıya doğru iletilmesi şeklinde tanımlanmaktadır [29]. Fiber elde etmek için kullanılan başka bir yöntem ise, geleneksel yöntemin aksine elektro eğirme düzeneğine ekstrüder eklenmesi ile geliştirilen bir hibrit sistem olan ekstrüzyon elektro eğirme yöntemidir [16]. Bu hibrit sistem, enjeksiyon ve diğer besleme girişlerinin varlığı sayesinde eş zamanlı olarak farklı sıvı/katı bileşenlerin sürece eklenmesine olanak sağlamaktadır.

Bileşenlerin, ortama zamana bağlı olarak ilave edilebilmesi, ekstrüzyon elektro eğirme yönteminin en büyük avantajlarından biridir. Bu da kompozisyonu fiber mat kalınlığı boyunca kademeli değişen fiber esaslı hücre iskeleleri üretmeye olanak sağlamaktadır. Bir başka hibrit sistem olan elektro püskürtme tekniğinde ise, hava püskürtücü ve elektro eğirme yöntemleri birlikte kullanılmaktadır [30, 31]. İğneden püskürtülen polimer solüsyonu ile birlikte, üretim kapasitesini arttırmak ve püskürtme yönünü kontrol etmek amacıyla, bu iğneyi saran bir gaz püskürtücü de bulunmaktadır.

Rejeneratif mühendislik bağlamında, elektro eğirme işlemi kemik, kırık, tendon, ligament ve deri gibi çeşitli doku rejenerasyonu uygulamalarında kullanılmaktadır [32]. Daha da önemlisi, elektro eğirme yöntemi, bileşenlerin konuma bağlı olarak değiştiği kırık-kemik, tendon-kemik, ligament-kemik ve tendon-kas gibi doku arayüzlerinin rejenerasyonu/onarımı için kademeli yapıda hücre iskeleleri üretilmesini sağlayabilmektedir [15, 18].

Deneysel araştırmalar birçok polimerik biyomalzemenin elektro eğirme işlemine uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, polikaprolakton (PCL), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından çeşitli biyomedikal ürünlerde kullanılmak amacıyla onaylanmış olup, doku mühendisliği uygulamalarında elektro eğirme işleminde kullanılmaktadır. Literatürde, osteokondral doku rejenerasyonu uygulamaları için PCL ve beta trikalsiyum fosfat (beta-TCP) nanopartiküllerinden elektro eğirme yöntemi ile kademeli kompozit fiber ağların elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır [18]. Yapılan testler, *in-vitro* hücre uyumunu (sitokompatibilite) ve adipöz kökenli kök hücrelerden doğal doku oluşumunu doğrulamaktadır [15].

Elektro eğirme ile oluşturulan yapılarda katmanlar arası kademe, süreç sırasında yapılan modifikasyonlarla sağlanabilmektedir. Ekstrüzyon elektro eğirme yönteminde, karıştırma ve basınçlandırma işlemleri döner vidalar ile gerçekleştirilmektedir [16]. Kademeli yapı ise her bileşenin besleme oranının kontrolüyle sağlanmaktadır. Başka bir modifikasyon ise solüsyon ve süspansiyonun iki farklı şırıngadan iğnenin bağlı olduğu tek bir kanala pompalanması ve elektrik alan uygulanması şeklinde gerçekleştirilmektedir [33] ve bu işlem sırasında kademeli yapı iki farklı şırınganın bağlı olduğu pompaların hızının ayarlanması ile elde edilmektedir. Üçüncü modifikasyon ise iki şırınganın paralel veya karşılıklı konumlandırılması ile elde edilmektedir (Ör: çoklu-iğneli elektro eğirme).

Bahsedilen iki modifikasyon da kompozit mat yapılar elde etmek için önceki çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğin, karşılıklı elektro eğirme sistemi proteaz-bozunur ve bozunmaz metakrilat peptit hiyalüronik asit bileşenlerinin kullanıldığı bir çalışmada uygulanmıştır [34]. Başka bir çalışmada ise ligament-kemik arayüz uygulamaları için, hidroksiapatit mineral nanopartiküllerinin kademeli bulunduğu fiber mat, PCL ve poliestereüretan malzemelerinin karışımı ile elde edilmiştir. Bu çalışmada, mineral partiküllerin varlığı, X-Ray kırınımı, enerji-dağılım spektroskopisi ile doğrulanmış, işlevselliği ise biyomekanik testler ve hücre çalışmalarıyla ölçülmüştür [35].

Bu tez kapsamındaki ilk çalışmada, model malzeme olarak belirlenen nanohidroksiapatit (nHA) konsantrasyonu %20 olacak şekilde, karşılıklı iki şırınga pompası kullanılarak, çoklu elektro eğirme yöntemi ile sürekli kademeli PCL-nHA kompozit yapılar üretilmiş olup, örneklere yedirilmiş olan nHA miktarı termogravimetrik analiz ile tayin edilmiş ve aynı zamanda mineral miktarının fiber çaplarına, hidrofiliteye ve gözeneklilik ile gözenek çapına olan etkisi araştırılmıştır. Daha sonra büyüme hormonu ve mineral içeren hücre iskeleleri üretilerek salım ve hücre çalışmaları yapılmıştır. Çalışma için PCL'in seçilmesinin sebebi ise Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylı olması ve tendon doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmış olmasıdır [36]. Kompozit yapıyı oluşturmak için nHA kullanılmasının sebebi ise kemik dokunun ana bileşenlerinden biri olmasıdır [37]. PCL ve nHA bileşenlerinin elektro eğirme yöntemi ile besleme hızları değiştirilerek oluşturulan sürekli kademeli yapı tendon-kemik arayüz uygulamaları için oldukça uygundur. Tendon-kemik arayüzündeki mineral içeriğinin arayüz boyunca kademeli olarak değiştiği literatürdeki çalışmalarda gösterilmiş ve kabul edilmiştir [7].

Arayüzlerin katmanlar arasındaki pürüzsüz geçiş göstermesi ve kompleks yapısı sebebiyle, arayüz doku mühendisliğinde kullanılacak biyomimetik hücre iskelelerinin tasarımı ve proses edilmesi oldukça zordur. Örneğin, Fisher sıçanının supraspinatus tendon-kemik arayüzündeki bir araştırma, mineral içeriğinin yaklaşık 120 µm çözünürlükte değiştiğini göstermiştir [7]. İki homojen malzeme arasındaki malzeme özelliklerinde ani bir değişiklik genellikle arayüzde biriken yüksek stres konsantrasyonları nedeniyle mekanik çökmeye yol açtığından, fizyolojik ölçekte

gradyanlara sahip yapıların üretimini, doğal dokuların yapılarını ve işlevlerini daha iyi taklit etmek için gereklilik olduğu kabul edilmektedir.

Bu bağlamda, tendon-kemik doku mühendisliği uygulamalarında hücre iskelesi üretmek için daha önce yapılmış olan girişimler, bileşenlerin konsantrasyonu bazında kademeli [38] veya iki-katmanlı (mineralize ve mineralize olmayan) yaklaşımlar olarak sınıflandırılabilir [9, 39]. Bununla birlikte, arayüzlerin rejenerasyonunda kullanılacak fizyolojik olarak ilişkili ölçekte, fonksiyonel biyomalzemeleri tasarlamak ve üretmek gerekmektedir ve bu çalışma, bu spesifik ihtiyacı karşılamayı amaçlamaktadır. Çalışmada oluşturulan kompozit matlar, tendon-kemik doku mühendisliği uygulamasında hücre iskelesi olarak kullanılabilir model sistemler olmakla birlikte, aynı zamanda, arayüz için hücre iskelesi üretiminde üretim proseslerini karşılaştırmak için kullanılabilir yöntemler havuzuna katkıda bulunacaktır. Daha geniş kapsamda düşünüldüğünde, bu çalışmanın, tendon-kemik arayüzüne ek olarak diğer arayüz doku mühendisliği uygulamaları için de yararlı olabilecek veriler ortaya çıkarması beklenmektedir.



2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 PCL Nanofiber İçine Elektro Eğirme Yöntemiyle Katkı Maddesi Ekleme: Nanohidroksiapatit ile Proses Doğrulama

2.1.1 Malzeme ve cihazlar

Polikaprolakton (PCL, Cat#440744), diklorometan (DCM, Cat#676853), dimetilformamid (DMF, Cat#D158550) ve hidroksiapatit (nHA, Cat#677418) Sigma-Aldrich, St Louis, MO, A.B.D.'den alınmıştır. Sonikatör (Cat#142-1130) Bandelin, Berlin, Almanya'dan alınmıştır. Vorteks karıştırıcı (Model VX14018092) Bio-Active, Bangkok, Tayland ürünüdür. Şırınga pompaları (Model NE-300) New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, A.B.D.'den alınmıştır. Termogravimetrik analiz cihazı (TGA-Q50) TA Instruments, New Castle, DE, A.B.D. ürünüdür. Taramalı elektron mikroskobu (Quanta 200) FEI, Hillsboro, OR, A.B.D.'den alınmıştır. Optik tensiyometre (Model T200KSV) Biolin, Stockholm, İsveç'den alınmıştır. ImageJ yazılımını NIH, Bethesda, MD, A.B.D.'den indirmek mümkündür.

2.1.2 PCL solüsyonu ve hidroksiapatit süspansiyonunun hazırlanması

Nanofiber yapılar elektro eğirme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Özetle, PCL solüsyonunu hazırlamak için, molekül ağırlığı 80,000 olan PCL, derişimi 20/100 (g/mL) olacak şekilde DMF ve DCM solventleriyle karıştırılmıştır. Solventlerin birbiri içindeki oranı ise (DMF/DCM) 2/3'tür. Hidroksiapatit süspansiyonunu hazırlamak için nHA partikülleri 200 µl DMF içerisine konularak 1 saat sonikatörde işlem görmüştür. Daha sonra, fiber matların içerisindeki mineral konsantrasyonunun kütlece %20 olması için, PCL solüsyonunu ile oranı 0,2/1,0 (g/g) olacak şekilde birleştirilmiştir. Solüsyon ve süspansiyon 5 saat boyunca vorteks mikserde işlem görmüştür. Hidroksiapatit miktarı polikaprolakton içine çok fazla miktarda yedirildiğinde elektro eğirme prosesinde düzensizliklere (tıkanma, heterojen kompozisyon gibi) sebep olabilmekte ve elde edilen fiber mat düzensiz yüzey özelliklerine sahip olabilmektedir. Bu sebeple bu bölümde ve hücre çalışmalarında

ağırlıkça %20 oranında hidroksiapatit kullanılmıştır. Mekanik test ölçümlerinde ise %16 oranı kullanılmıştır.

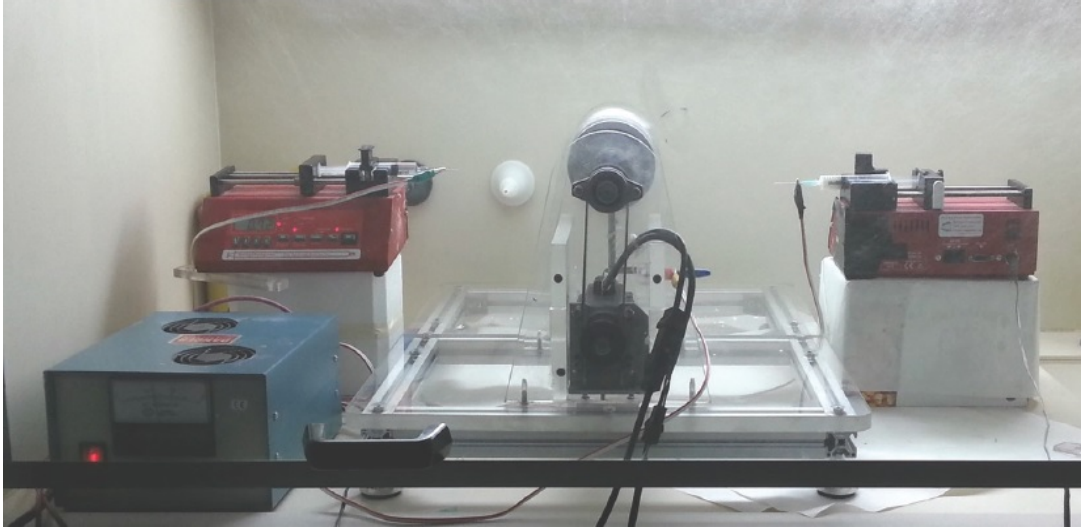
PCL hücre iskelesi üretimi polimerin konsantrasyonu, akış hızı, voltaj, iğne iç çapı, mandrelin dönme hızı gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Bu sebeple üst paragrafta belirtilen şekilde bir PCL çözeltisi hazırlanmadan önce optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon sonunda elde edilen hücre iskelesi malzeme bileşenleri ve proses parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 2.1). Çizelge 2.1'den görüldüğü gibi, elektro eğirme prosesinin gerçekleştirilmesi birçok parametreye bağlıdır. Bu parametrelerdeki küçük değişiklikler lif kalitesini (yüzey, çap, vb.) etkilediğinden, parametrelerin sıkı kontrol edilmesi gerekmektedir.

Çizelge 2.1: Elektro eğirmede optimizasyon için kullanılan malzeme bileşenleri ve proses parametreleri.

Malzeme bileşenleri				Proses parametreleri			
Numune	PCL (gr)	DMF (mL)	DCM (mL)	Akış hızı (mL/h)	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)	İğne iç çapı (mm)
%16	0,8	2,0	3,0	1,0	12	15	0,8
%20	1,0	2,0	3,0	1,0	12	15	0,8
%24	1,2	2,0	3,0	1,0	12	15	0,8
%30	1,5	2,0	3,0	1,0	12	15	0,8

2.1.3 Karşılıklı şırıngalar ile çoklu elektro eğirme yöntemi

PCL solüsyonu ve nHA süspansiyonu, iç çapı yaklaşık 0,8 mm ve 18 gauge olan iğnelerin bağlı olduğu şırıngalara aktarılmış ve bu şırıngalar iki farklı şırınga pompasına yerleştirilerek, ortada toplayıcı mandrel (mandrel çapı: 10cm, dönme hızı 2000 rpm) olacak şekilde karşılıklı konumlandırılmışlardır (Resim 2.1).



Resim 2.1: Karşılıklı şırıngalar ile çoklu elektro eğirme düzeneği

İğne uçlarıyla silindirin arasındaki mesafe deney boyunca 12 cm olarak ayarlanarak, sisteme 15 kV potansiyel fark uygulanmıştır. Pompaların hızı, PCL solüsyonu akış hızınının 1.0 mL/saat'ten 0.0 mL/saat'e kadar azalması, nHA süspansiyonunun akış hızınının ise PCL'in tersine 0.0 mL/saat'ten 1.0 mL/saat'e ulaşacak şekilde artırılması için saatte 0,14 birim değişecek şekilde ayarlanmıştır. Deney her örnek için toplam akış hızı 1.0 mL/h olacak şekilde tasarlanmış ve deneyin tamamlanması yaklaşık 8 saati bulmuştur (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 : İşlem sırasında karşılıklı şırıngalardaki sıvıların akış hızları.

PCL (mL/h)	PCL-nHA (mL/h)	Toplam Akış Hızı (mL/h)
1.00	0.00	1.00
0.86	0.14	1.00
0.72	0.28	1.00
0.58	0.42	1.00
0.44	0.56	1.00
0.30	0.70	1.00
0.16	0.84	1.00
0.00	1.00	1.00

2.1.4 Fiber matların karakterizasyonu

2.1.4.1 nHA partiküllerinin kütle dağılımı

Hücre iskelesi içindeki nHA partiküllerinin varlıkları ve miktarları, her bir hücre iskelesinin 8 eşit bölmesinden alınan numunelerden, termogravimetrik analiz yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. PCL-nHA hücre iskelelerinde bulunan nHA ağırlık fraksiyonu, 40°C/dak'da 25°C'den 660°C'ye ısıtıldıktan sonra geri kalan madde miktarı ile belirlenmiştir. Böylece, nHA partiküllerinin hücre iskelesi kalınlığı boyunca nasıl değiştiği gözlemlenebilmiştir.

2.1.4.2 Fiber çapı ve yüzey özellikleri

Fiber matların çap, şekil ve yüzey özellikleri SEM görüntüleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Yüzeydeki mineral varlığı EDS spektrumu ile doğrulanmıştır. Fiber çapları SEM görüntüleri kullanılarak, ImageJ programı ile hesaplanmıştır (n=3/grup). Kısaca, her görüntü 5 dikey çizgi ile bölünmüş ve bu çizgileri kesen fiberlerin çapları hesaplanmıştır (n=40fiber/görüntü). Bu fiberlerin çapları ImageJ ile ölçülmüş ardından ortalama fiber çapları hesaplanmıştır.

2.1.4.3 Porozite ve por çapı

Hücre iskelelerinin porozitesi görünür (yığın) yoğunluk değerleri kullanılarak aşağıdaki denklemden hesaplanmıştır (ρ_r : gerçek yoğunluk, ρ_a : görünür yoğunluk ve ε : porozite) :

$$\varepsilon = 1 - (\rho_a / \rho_r) \quad (2.1)$$

Görünür yoğunluk dikdörtgen prizma şeklindeki örneklerin ağırlıklarının hacimlerine bölünmesiyle elde edilmiştir.

Por büyüklüğü, porlar arasındaki en kısa ve en uzun mesafelerin ölçülmesi ve ortalamalarının alınmasıyla elde edilmiştir (n=3/grup). Ölçümler için ImageJ programı kullanılmış, her SEM görüntüsü için yaklaşık 30 değer kaydedilmiş ve çap dağılımı değerlendirilmiştir. Eldeki üçer örneğin ortalaması alınıp ortalama por çap dağılımı bulunmuştur.

2.1.4.4 Temas açısı

Fiber kompozitlerin PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerinin temas açısı teta optik tensiyometre kullanılarak sabit damla metodu ile ölçülmüştür. Bunun için, 2µl deiyonize su damlası yüzeylerin üzerine yerleştirilmiş ve 5 saniye içerisinde görüntü alınarak ImageJ programı ile temas açısı ölçümleri yapılmıştır (n=3/grup).

2.1.4.5 Mekanik testler

Hücre iskelelerinin farklı derinliklerinden numune almak mümkün olmadığından, kademeli hücre iskelesinin yüzeyden farklı derinliklerdeki durumu temsilen, farklı oranlarda nHA içeren hücre iskeleleri üretilmiş ve mekanik davranışları incelenmiştir. nHA içermeyen hücre iskelesi, kademeli hücre iskelesinin bir yüzeyini temsil ederken %16 nHA içeren hücre iskelesi de diğer yüzeyini temsil etmektedir. Kademeli hücre iskelelerine, Instron cihazı ile hızı 5 mm/dak olacak şekilde çekme uygulanmıştır (n=3).

2.1.5 İstatistik

Fiber kompozitlerin PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerinin gözenek büyüklüğü, temas açısı ve çap ölçümleri t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilen p değerleri 0,05 veya daha düşük olarak kabul edilmiştir.

2.2 Büyüme Hormonlu ve Sürekli Kademeli PCL Hücre İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu tezin amaçlarından biri de mezenkimal kök hücrelerin dönüşümünü sağlayan biyoaktif maddeleri (CTGF ve TGF-β3) PCL hücre iskelelerinin içerisine yedirmek ve nHA ile birlikte sürekli kademeli bir hücre iskelesi elde etmektir. CTGF'in mezenkimal kök hücrelerinin fibroblasta dönüşmesinde etkili olduğu, TGF-β3'ün de arayüz gelişimi esnasında fibrokıkırdak arayüz bölgesinde salgılandığı bilinmektedir. nHA ise kemikte en fazla miktarda bulunan mineraldir. Tezin bu bölümünde büyüme hormonu yedirilmiş sürekli kademeli hücre iskelesinin üretimi ele alınmış ve karakterizasyon çalışmaları sunulmuştur. Hücre iskeleleri karşılıklı elektro eğirme yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve büyüme hormonu içeren hücre iskelelerinin salım çalışmaları yapılmıştır.

2.2.1 Malzeme ve cihazlar

Polikaprolakton (PCL, Cat#440744), diklorometan (DCM, Cat#676853), dimetilformamid (DMF, Cat#D158550), bovin serum albümin (BSA, Cat#A9418-10G) ve hidroksiapatit (nHA, Cat#677418) Sigma-Aldrich, St Louis, MO, A.B.D.'den, bağ doku büyüme faktörü (CTGF, Cat#RGB10107020) Mediatek R&D, Ankara, Türkiye'den ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 3 (TGF- β 3, Cat#228-11497-2) RayBiotech, Norcross, Georgia, A.B.D.'den alınmıştır. CTGF (Cat#LS-F557) ve TGF- β 3 (Cat#LS-F657) ELISA kitler ise LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, A.B.D.'den temin edilmiştir. Sonikatör (Cat#142-1130) Bandelin, Berlin, Almanya'dan alınmıştır. Vorteks karıştırıcı (Model VX14018092) Bio-Active, Bangkok, Tayland ürünüdür. Şırınga pompaları (Model NE-300) New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, A.B.D.'den alınmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (Quanta 200) FEI, Hillsboro, OR, A.B.D.'den alınmıştır. Optik tensiyometre (Model T200KSV) Biolin, Stockholm, İsveç'den alınmıştır. ImageJ yazılımını NIH, Bethesda, MD, A.B.D.'den indirmek mümkündür.

2.2.2 PCL/CTGF ve PCL/TGF- β 3 hücre iskelelerini üretimi ve karakterizasyonu

2.2.2.1 PCL solüsyonu ve büyüme faktörlerinin hazırlanışı

Bağ doku ve dönüştürücü büyüme faktörlerini hazırlamak için, öncelikle molekül ağırlığı 80,000 olan PCL, derişimi 20/100 (g/mL) olacak şekilde DMF ve DCM solventleriyle karıştırılmıştır. Solventlerin birbiri içindeki oranı ise 2/3'tür. PCL solüsyonundan her bir büyüme faktörü için kullanılmak üzere 2 adet hazırlanmıştır. Daha sonra bu solüsyonlara, PCL solüsyonu ile oranı 0,1/1,0 (g/g) olacak şekilde, havanda öğütülmüş bovin serum albümin (BSA) eklenmiştir. BSA, büyüme faktörlerinin polimer yüzeylere tutunmasını engellemek amacıyla koruyucu olarak kullanılmıştır [40]. BSA eklendikten sonra solüsyonlar yarım saat boyunca vorteks mikserde işlem görmüştür. Daha sonra her bir solüsyona, net 10 μ g büyüme faktörü içerecek şekilde 40 μ l büyüme faktörü solüsyonu (10 μ g/40 μ L, %0.1 BSA içinde çözülmüştür) eklenmiş ve tekrar yarım saat vorteks mikserde karışma sağlanmıştır.

2.2.2.2 Elektro eğirme yöntemi ile hücre iskelesi üretimi

PCL ve büyüme faktörlerinden oluşan solüsyonlar iç çapı yaklaşık 0,8mm ve 18 gauge olan iğnelerin bağlı olduğu şırıngalara aktarılmış, şırıngalar şırınga pompasına yerleştirilmiş ve toplayıcı mandrel ortada olacak şekilde (yaklaşık 10 m/s, 2000rpm, ile dönen silindir) konumlandırılmışlardır. Her bir solüsyonun elektro eğirme süreci ayrı gerçekleştirilmiştir.

İğne uçlarıyla silindirin arasındaki mesafe deney boyunca 13 cm olarak ayarlanmış ve sisteme 10-15 kV arası potansiyel fark uygulanmıştır. Pompaların hızı, solüsyonların akış hızı 1.0 mL/saat olacak şekilde ayarlanmış olup deneylerin tamamlanması yaklaşık 6 saati bulmuştur.

2.2.2.3 Fiber matların karakterizasyonu

Fiber matların çap, şekil ve yüzey özellikleri SEM görüntüleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Fiber çapları SEM görüntüleri kullanılarak, ImageJ programı ile hesaplanmıştır (n=3/grup). Kısaca, her görüntü 5 dikey çizgi ile bölünmüş ve bu çizgileri kesen fiberlerin çapları hesaplanmıştır (n=40fiber/görüntü). Bu fiberlerin çapları ImageJ programı ile ölçülmüş ardından ortalama fiber çapları hesaplanmıştır.

2.2.2.4 CTGF ve TGF- β 3 salım çalışmaları

CTGF ve TGF- β 3 içeren hücre iskelelerinden, her gruptan n=3 olacak şekilde, 1cmx1cm büyüklüğünde parçalar kesilerek 1,5 mL PBS içerisinde bekletilmiştir. PBS içerisinde 3,7,14 ve 28. günlerde örnekler toplanmış ve toplanan miktar yerine yeni 1,5 mL PBS eklenmiştir. Toplanan numunenin yerine yeni PBS eklenmesi yöntemi dinamik salınım testi olarak bilinmektedir. Ticari ELISA kitleler ile üretici firmanın tavsiyesine göre büyüme faktörlerinin salımlarına bakılmıştır. Özetle açıklamak gerekirse, katı fazda yakalama antikorunun immobilize edildiği kuyucuklara örnekler konulmuş ve daha sonra yakalama antikoruna eklenmiştir. Bu basamaklar esnasında çoklu yıkama yapılarak bağlanmayan antikorlar ve antijenler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Son basamakta ise substrat, yakalama antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek örneklerde renk değişimine neden olmuştur. Bu renk değişimi (her iki büyüme hormonu için aynı protokol uygulanmıştır) plaka okuyucuda 450 nm'de okunmuş ve standart eğri bazında salım miktarları hesaplanmıştır. Sandviç ELISA, çok spesifik olması ve kullanılmadan önce antijen saflaştırılmasına gerek olmadığı için tercih edilmiştir.

2.2.3 PCL/nHA/CTGF/TGF-β3 içeren sürekli kademeli kompozit hücre iskelelerinin üretilmesi

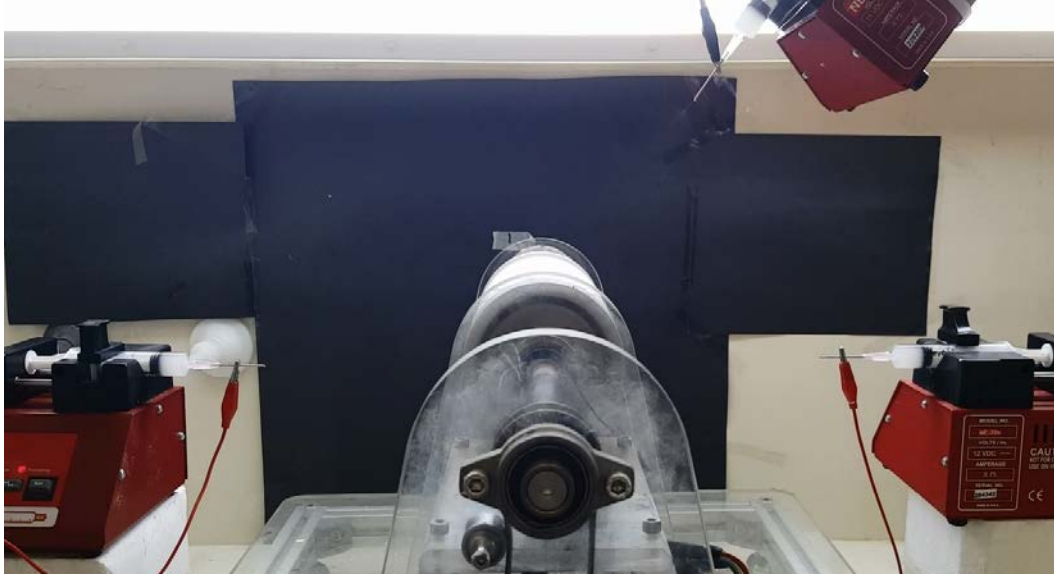
2.2.3.1 PCL solüsyonu, hidroksiapatit süspansiyonu ve büyüme faktörlerinin hazırlanması

Nanofiber yapılar elektro eğirme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Özetle, PCL solüsyonunu hazırlamak için, molekül ağırlığı 80,000 olan PCL, oranı 20/100 (g/mL) olacak şekilde DMF ve DCM solventleriyle karıştırılmıştır. Solventlerin birbiri içindeki oranı ise 2/3'tür. Hidroksiapatit süspansiyonunu hazırlamak için nHA partikülleri 200µl DMF içerisine konularak 1 saat sonikatörde işlem görmüştür. Daha sonra, fiber matların içerisindeki mineral konsantrasyonunun kütlece %20 olması için, PCL solüsyonunu ile oranı 0,2/1,0 (g/g) olacak şekilde birleştirilmiştir. Solüsyon ve süspansiyon 5 saat boyunca vorteks mikserde işlem görmüştür.

Bağ doku ve dönüştürücü büyüme faktörleri içeren hücre iskelesi hazırlamak için, molekül ağırlığı 80,000 olan PCL, oranı 20/100 (g/mL) olacak şekilde DMF ve DCM solventleriyle karıştırılmıştır. Solventlerin birbiri içindeki oranı ise 2/3'tür. PCL solüsyonundan her bir büyüme faktörü için kullanılmak üzere 2 adet hazırlanmıştır. Daha sonra bu solüsyonlara, PCL solüsyonu ile oranı 0,1/1 (g/g) olacak şekilde bovin serum albümin (BSA) eklenmiştir. BSA, büyüme faktörlerinin polimer yüzeylerine yapışmasını önlemek amacıyla koruyucu olarak kullanılmıştır. BSA eklendikten sonra solüsyonlar yarım saat boyunca vorteks mikserde işlem görmüştür. Daha sonra her bir solüsyona 10µg büyüme faktörü içerecek şekilde 40µl büyüme faktörü süspansiyonu (10µg/40µL, %0.1 BSA içinde çözülmüştür) eklenmiş ve tekrar yarım saat vorteks mikserde karışma sağlanmıştır.

2.2.3.2 Üçlü elektro eğirme yöntemi ile hücre iskelesi üretimi

PCL-nHA süspansiyonu ve büyüme faktörlerinin olduğu solüsyonlar, iç çapı yaklaşık 0,8 mm ve 18 gauge olan iğnelerin bağlı olduğu şiringalara aktarılmıştır. Bu şiringalar (PCL-nHA, PCL-CTGF ve PCL-TGF-β3 olmak üzere) üç farklı şiringa pompasına yerleştirilmiş ve bu pompalar ortada toplayıcı mandrel (~10m/s hızında, 2000rpm, dönen silindir) olacak şekilde karşılıklı konumlandırılmışlardır (Resim 2.2, Resim 2.3).



Resim 2.2: Sürekli kademeli hücre iskelesi elde etmek için kullanılan üçlü elektro eğime düzeneği



Resim 2.3: Üçlü elektro eğime sistemindeki şırıngalarda gözlemlenen Taylor konileri (a) PCL/CTGF solüsyonu içeren şırıngadaki Taylor konisi, (b) PCL/TGF- β 3 solüsyonu içeren şırıngadaki Taylor konisi, (c) PCL/nHA süspansiyonu içeren şırıngadaki Taylor konisi.

İğne uçlarıyla silindirin arasındaki mesafe deney boyunca 13 cm olarak ayarlanmış olup, sisteme 10-15 kV arası potansiyel fark uygulanmıştır. Pompaların hızı, PCL-nHA süspansiyonunun akış hızı 1.0 mL/saat'ten 0.0 mL/saat'e kadar azalacak, PCL-CTGF solüsyonunun akış hızının ise PCL-nHA tersine 0.0 mL/saat'ten 1.0 mL/saat'e ulaşacak şekilde saatte 0,11 birim değişecek biçimde ayarlanmıştır. Doğal dokudaki arayüz bölgesini mimik etmek amacıyla, hücre iskelesinin sadece orta kısmında bulunacak şekilde, deney düzeneğine yukarıdan monte edilen şırınga pompası yardımıyla PCL-TGF- β 3 solüsyonunun elektro eğime işlemi de gerçekleştirilmiştir. PCL-nHA ve PCL-CTGF solüsyonlarının bulunduğu şırınga pompaları PCL-TGF- β 3 solüsyonun elektro eğime işlemi sırasında durdurulmuştur. Deney, her örnek için toplam akış hızı 1.0 mL/saat olacak şekilde tasarlanmış ve deneyin tamamlanması yaklaşık 8 saati bulmuştur (Çizelge 2.3)

Çizelge 2.3 : İşlem sırasında şırıngalardaki sıvıların akış hızları ve hücre iskelesi içindeki teorik büyüme faktörü miktarları.

PCL-nHA (mL/h)	PCL-CTGF (mL/h)	PCL-TGF-β3 (mL/h)	nHA Miktarı (g $\times 10^{-6}$)	CTGF Miktarı (g $\times 10^{-6}$)	TGF-β3 Miktarı (g $\times 10^{-6}$)
0	1,00	0	0	9,09	0
0,11	0,89	0	21.530	8,01	0
0,22	0,78	0	42.150	6,95	0
0,22	0,45	0,33	42.150	4,13	3,06
0,30	0,37	0,33	56.600	3,37	3,02
0,37	0,30	0,33	68.900	2,72	2,98
0,67	0,33	0	118.170	2,83	0
0,78	0,22	0	134.950	1,87	0
0,89	0,11	0	151.100	0,93	0
1,00	0	0	166.670	0	0

2.2.3.3 Fiber matın karakterizasyonu

Fiber matların çap, şekil ve yüzey özellikleri SEM görüntüleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Fiber çapları ve dizilimleri SEM görüntüleri kullanılarak, ImageJ programı ile hesaplanmıştır (n=3/grup). Kısaca, her görüntü 5 dikey çizgi ile bölünmüş ve bu çizgileri kesen fiberlerin çapları ve dizilimleri hesaplanmıştır (40fiber/görüntü).

2.3 İnsan Kemik İliğinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışları

Bu bölümde PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGF-β3 ve süreki kademeli PCL/nHA/CTGF/TGF-β3 hücre iskelelerine hücre ekimi ve karakterizasyonu değerlendirilmiştir. Çalışmanın hipotezi, biyoaktif madde yedirilmiş PCL hücre iskelelerinin hücre dönüşümünü, çoğalmasını artıracak şekilde tanımlandığından, tezin en son çalışması hücre kültürü ve karakterizasyon üzerine yapılmıştır. Hücre ekildikten sonra hücre iskelelerinin karakterizasyonunda, SEM görüntülerine, hücre proliferasyonuna, Giemsa, Safranin-O ve Picrosirious kırmızısı ile sırasıyla matriks bileşenleri dağılımına, GAG üretimine ve kolajen üretimine bakılmıştır.

2.3.1 Malzeme ve cihazlar

Çalışmalarda kullanılan insan mezenkimal kök hücre hattı Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden (Hücre temini esnasındaki adı Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Doç.Dr. Yıldırım Karşlıoğlu ve ekibi tarafından, temin edilmiştir. Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri (D6046-500ML), tripsin-EDTA solüsyonu (T4049-100ML), etanol (32222-2.5L), formaldehit (252549-1L), sodyum fosfat monobasic (S5011-100G), Triton-X (T9284-100ML), cetylpyridinium chloride (C9002-25G), kakodilik asit (C0250-10G), polivinil alkol (P8136-250G), paraformaldehit (158127-5G), gluteraldehit (G6403-100ML) ve asetik asit (27225-2.5L), Sigma-Aldrich, St Louis, MO, A.B.D.'den alınmıştır. PBS (AIE-404-100) Amresco'dan temin edilmiştir. Esansiyel olmayan amino asitler (BIO1-340-1B), penisilin-streptomisin (BIO4-007-1B), gentamisin (41-503-1), amfoterisin-B (BIO3-028-1B) ve fetal bovine serum (BIO4-007-1B) Biological Industries, Cromwell, CT, USA'den alınmıştır. DNA proliferasyonu için kullanılan EZQuant dsDNA Quantitation Kit (K900-2000) ve kolajen üretimi için kullanılan Total Collagen Assay (K218-100) Biovision firmasından temin edilmiştir. Florasan okuyucu Molecular Devices (Spectramax M2), Kaliforniya, A.B.D.'den temin edilmiştir. Hücrelerin doğal ortamını sağlamakta kullanılan karbondioksit inkübatörü (Model: 371) ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan biyogüvenlik kabini (41679468, S2020) Thermo Scientific ürünüdür. Kantitatif DNA çalışmalarında örnek hazırlanması için kullanılan doku homojenizatörü (güç kaynağı: GM2070, baş kısmı: UW2070) Bandelin Sonoplus'tan temin edilmiştir. Hücre ekilmiş iskelelerinden alınan kesitlerin görüntülenmesi için Leica DM2500 mikroskop kullanılmıştır.

2.3.2 Hücre iskelelerinin hazırlanması ve sterilizasyonu

Hücre iskeleleri önce 2cmx2cm'lik plakalar halinde kesilmiş ve her şeridin 3 ayrı bölgesinden kalınlık ölçümü yapılmıştır. Daha sonra hücre iskeleleri alüminyum folyodan çıkartılmıştır. Her hücre iskelesinin ağırlığı da ölçülerek not edilmiştir. Hücre iskelelerinin her iki yüzü 20'şer dakika ultraviyole ışığa maruz bırakılarak sterilize edilirken, o-ring ve silindirik yuvalar ise %70'lik etanol içerisinde bekletilip ardından ultraviyole ışığa maruz bırakılarak sterilize edilmişlerdir. Akabinde, matlar o-ring ile silindirik yuvalara tutturulmuştur (Resim 2.4).



Resim 2.4: Hücre ekimi için hücre iskelesi hazırlanması

2.3.3 Hücre ekimi

Her çalışma grubu için 3 adet (1, 7 ve 14. günler için) 12'lik hücre plakası hazırlanmıştır. Plakaların üzerine, içlerine konulan hücre iskelelerinin ağırlık ve kalınlıkları yazılmıştır (n=10). Hücre ekiminden 1 gün önce plakalara 2'şer mL DMEM (%1 FBS) konulmuş ve ertesi gün besiyerleri vakum pompası vasıtasıyla çekilerek, hücreler 10 μ L süspansiyonda 20,000 hücre olacak şekilde hücre iskelelerine ekilmiştir. Kullanılan besiyeri %1 FBS, %1 P/S, %1 NEAA ve %0,1 AMP-B içermektedir. Hücrelerin hücre iskelesine tutunması için 20 dakika beklenmiş ve sonra plakalara 2mL besiyeri konulmuştur. Her iki günde bir besiyeri değiştirilmiş ve besiyeri örneği toplanmıştır. 1. 7. ve 14. günde ise plakalardaki hücre iskeleleri toplanarak hücre proliferasyonu, histoloji çalışmaları ve SEM çalışmaları için hazırlanmıştır. Hücre çalışmaları için 9 grup kullanılmıştır. PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGF- β 3 ve sürekli kademeli hücre iskeleleri ana gruplardır. Bunların yanında, CTGF ve TGF- β 3 büyüme hormonlarının harici olarak eklendiği kontrol grupları da oluşturulmuştur. Bu gruplarda hücre iskelesi olarak PCL hücre iskeleleri kullanılmış ancak gruplardan birinin besiyerine CTGF, birininkine TGF- β 3 ve son grubun besiyerine hem CTGF hem TGF- β 3 konulmuş ve hücre tutunumu, çoğalması ve dönüşümü incelenmiştir. Ayrıca, hücrelerin sadece plaka yüzeylerine ekildiği bir grup daha oluşturulmuştur.

2.3.4 Hücre proliferasyonu

Hücre proliferasyon çalışması ticari bir kit olan EZQuant dsDNA Quantitation Kit ile yapılmıştır. Ölçümler yapılmadan önce örnekler (n=5/grup) ölçüm için hazırlanmıştır. Hücre iskeleleri ve kontrol grubu (hücre iskelesi olmadan hücre plakasına ekilen grup) için farklı hazırlama protokoller uygulanmıştır.

Hücre iskelelerinin olduğu örneklerden öncelikle besiyerleri aspire edilmiş ve 1mL steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra örnekler o-ring ve silindirik yuvalardan ayrılmış, her iki tarafı yumuşak bir peçeteye emdirilerek kurutulmuş ve önceden boş olarak tartılan 1,5 mL sentrifüj tüplerine konularak tartılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 1mL %0,1 Triton X çözeltisini konulmuş, doku homojenizatöründe 10 saniye homojenize edildikten sonra ölçümler yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Kontrol grubunda (n=5) ise besiyeri aspire edilip, 1mL steril PBS ile yıkandıktan sonra kuyulara 500µl %0,1 Triton-X konulup 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra pipet ucu yardımıyla kuyunun dibindeki hücreler kazınarak hücre süspansiyonu 1,5 mL sentrifüj tüpüne aktarılmıştır. Mikroskop altında incelenen kuyuda hücre kalması durumunda işlem tekrarlanmış ve 500 µl daha %0,1 Triton-X konularak kazıma yapılmıştır. Tüm tüplerin içinde sonunda 1mL Triton-X olması sağlanmıştır. 1,5 mL sentrifüj tüpünde toplanan hücre süspansiyonu da ölçümlere kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Örnekler ölçüm için hazırlandıktan sonra deneyler kit protokolüne göre gerçekleştirilmiş ve florometrik okuyucuda okuma yapılmıştır. DNA proliferasyonu EzQuant dsDNA Kuantitatif Kit yardımı ile ölçülmüştür. %0,1 Triton-X içinde muhafaza edilen örnekler çözdürüldükten sonra üreticinin protokolüne göre ölçüme hazırlanmıştır. Florometrik okuma 480nm ve 530nm'de gerçekleştirilmiştir.

2.3.5 Kolajen üretimi

Kolajen üretimini ölçmek için ticari bir kit olan Total Collagen Assay (Biovision, Alfagen) kullanılmıştır. Hücre iskeleleri ve kontrol grubu (hücre iskelesi olmadan hücre plakasına ekilen grup) için farklı hazırlama protokolleri uygulanmıştır.

Hücre iskelelerinin olduğu örneklerden öncelikle besiyerleri aspire edilmiş ve 1 mL steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra örnekler o-ring ve contalardan ayrılmış, her iki tarafı yumuşak bir peçeteye emdirilerek kurutulmuş ve önceden boş olarak

tartılan 1,5 mL sentrifüj tüplerine konularak tartılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 1mL %0,1 Triton X çözeltisini konulmuş, doku homojenizatöründe 10 saniye homojenize edildikten sonra -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Kontrol grubunda (n=5) ise besiyeri aspire edilip, 1 mL steril PBS ile yıkandıktan sonra kuyulara 500µl %0,1 Triton-X konulup 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra pipet ucu yardımıyla kuyunun dibindeki hücreler kazınarak hücre süspansiyonu 1,5 mL sentrifüj tüpüne aktarılmıştır. Mikroskop altında incelenen kuyuda hücre kalması durumunda işlem tekrarlanmış ve 500 µl daha %0,1 Triton-X konularak kazıma yapılmıştır. Tüm tüplerin içinde sonunda 1mL Triton-X olması sağlanmıştır. 1,5 mL sentrifüj tüpünde toplanan hücre süspansiyonu -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Örnekler -80°C’den çıkartılıp çözdürüldükten sonra tekrar doku homojenizatöründen geçirilerek deneylere başlanmıştır. Örnekler ölçüm için hazırlandıktan sonra deneyler kit protokolüne göre gerçekleştirilmiş ve optik okuyucuda okuma yapılmıştır. Kolajen üretimi Total Collagen Assay yardımı ile ölçülmüştür. %0,1 Triton-X içinde muhafaza edilen örnekler çözdürüldükten sonra üreticinin protokolüne göre ölçüme hazırlanmıştır. Örneklerden plaka okuyucu da 560nm dalga boyunda okuma alınmıştır. Kolajen miktarı oluşturulan standart eğriler bazında hesaplanmıştır.

2.3.6 Histoloji

Histoloji çalışmaları için, öncelikle kuyulardaki besiyerler aspire edilmiş ve iki kere 1mL steril PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyulara 2mL %10 NBF + %1CPC çözeltisi konulmuştur. Çözeltinin hazırlık aşaması şu şekildedir:

1. 4g sodyum fosfat, monobasic
2. 6,5g sodyum fosfat, dibasic
3. 100 mL, %37 formaldehit 900 mL distile suya eklenmiştir.

Hazırlanan çözeltinin her 100mL’sine 1g cetylpyridinium klorür eklenmiş, pH 6,8’e ayarlanmış ve filtre edildikten sonra 1L’lik cam şişeye aktarılmıştır.

Ardından örnekler parafilmle sarılıp bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün kuyulardaki çözeltiler aspire edilerek, yerine 0,01M kakodilik asit solüsyonu konulmuştur. Daha sonra örnekler, PVA (polivinil alkol) içerisinde dondurularak kriyotom yardımıyla kesilmiştir. Kesit kalınlığı her örnek için 10µm’dir.

Hücre iskelelerinin kesim işlemi sırasında her gruptan (n=5/grup) 50 ila 60 adet kesit alınmış, kesitler Giemsa, Picrosirious kırmızısı ve Safranin-O ile boyanarak hücre varlığı, kolajen ve GAG üretimi tespit edilmiştir.

2.3.7 İstatistik

Bütün deneylerde beş grup arasındaki farklar çift yönlü varyans değişimi (Two-Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Grupların zamana bağlı değişimleri ve birbirileriyle kıyaslamaları Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilen p değerleri 0,05 veya daha düşük olarak kabul edilmiştir.



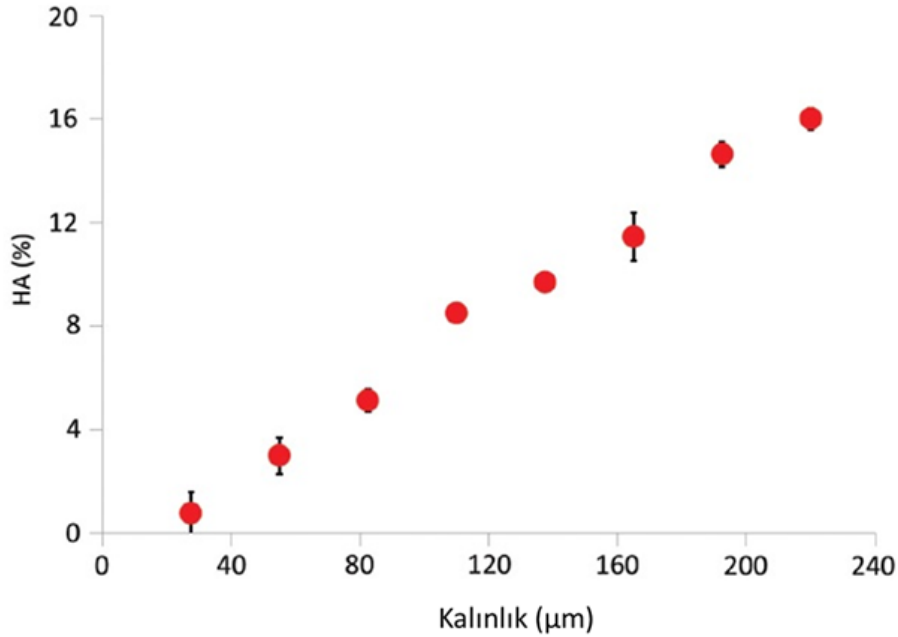


3. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 PCL/nHA Hücre İskelelerinin Karakterizasyonu

3.1.1 nHA partiküllerin hücre iskelesi içindeki kütleli dağılımı

Elektro eğirme tekniği ile kalınlığı $220,2 \pm 3,2$ μm olan fiber matlar üretilmiştir. Bu çalışmada, elektro eğirme işlemi, tendon-kemik arayüz uygulamalarında kullanılan kalınlığa ulaşmak adına, yaklaşık 8 saat sürmüştür. Literatürde, tendon-kemik arayüzü kalınlığı 100-200 μm olarak rapor edilmiştir [7]. Bütün fiber mat içindeki nHA mineral partiküllerin varlığı, sekiz farklı ve eşit mesafeli konumdan dolayı olarak örnek toplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, fiber mat kalınlığının bir fonksiyonu olarak nHA partiküllerinin konumsal dağılımını değerlendirmemizi sağlamıştır (Şekil 3.1). Şekil 3.1’de görüldüğü üzere, nHA partikülleri fiber mat içine yedirildiğinde doğrusal değişim gösteren bir dağılım oluşturmaktadır. Bu durum, fiber mat bileşenlerinin akış oranlarının yani PCL çözeltisi ve nHA süspansiyonunun doğrusal olarak değişen akışının sonucudur.



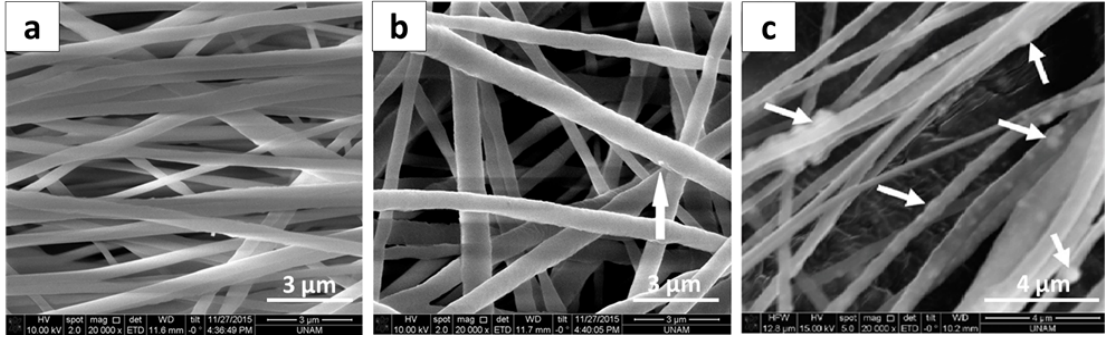
Şekil 3.1 : Fiber mat kalınlığı boyunca nano-hidroksiapatit partiküllerinin konumsal olarak değişen bileşimi (Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

Fiber mat içindeki en yüksek nHA konsantrasyonu süspansiyona yüklenen %20 konsantrasyona kıyasla % $16,02 \pm 0,41$ olarak hesaplanmıştır. Gerçek yüklenen miktar ile deneysel olarak bulunan sonuç arasındaki uyumsuzluk, partiküllerin prosesi için kullanılan geleneksel elektro eğirme yönteminin zayıflığı ile açıklanabilir. Elektro eğirme süreci yaklaşık 220 µm kalınlıkta bir fiber mat oluşturmak için 8 saat almaktadır. Bu zaman, şırıngada asılı kalan mineral partiküllerin yoğunluk farklılığına bağlı olarak çökmesi için yeterince uzundur (nHA yoğunluğu yaklaşık 3,16 g/ml; PCL yoğunluğu yaklaşık 1,45 g/ml). Erişken ve çalışma grubu önceki çalışmalarında ekstrüzyon elektro eğirme işlemi ile beta-TCP süspansiyonunu proses etmiş ve %35 gerçek yüklemeye karşılık $35 \pm 1,5$ deneysel konsantrasyon elde etmiştir [16]. Ekstrüder, proses süresince partiküllerin sürekli olarak dağılmasını sağladığı için gerçek ve deneysel verilerin yakın olması şaşırtıcı değildir. Sonuç olarak, Şekil 3.1 fiber mat kalınlığı boyunca nHA konsantrasyonunun doğrusal ve sürekli olarak değiştiğini göstermektedir ki bu sonuç doğal arayüz dokusundaki mineral konsantrasyon değişimiyle benzerlik göstermektedir [7].

3.1.2 Fiber çapı ve yüzey özellikleri

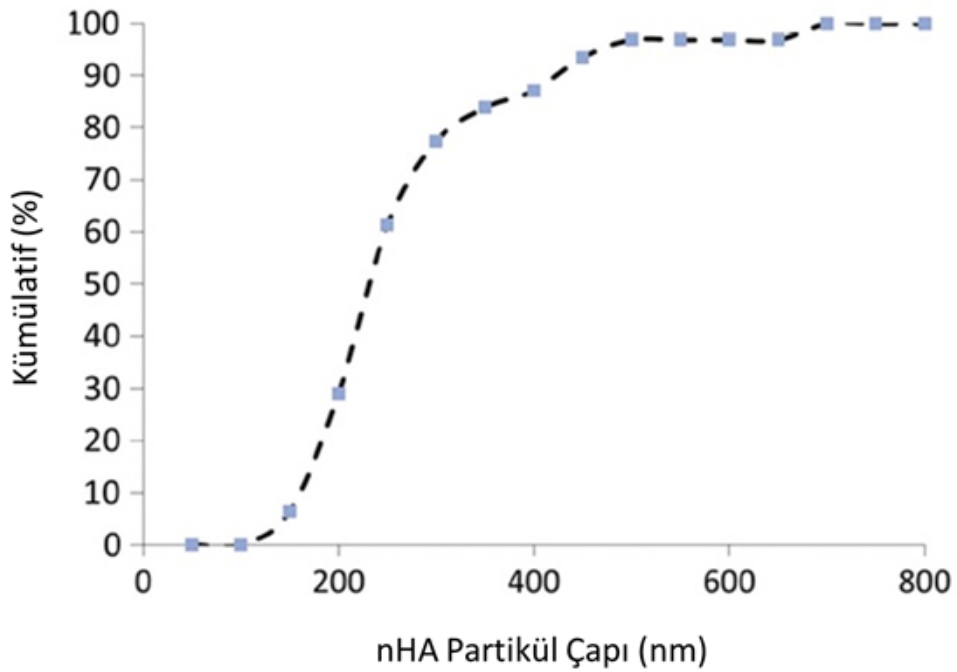
Oluşturulan fiber matlarda çapların aynı olması hücrelerin davranışlarını test ederken aynı şartların oluşturulması bakımından önemlidir. Çalışmanın bu bölümünde, PCL bakımından zengin ve nHA bakımından zengin yüzeyler oluşturulması ve özelliklerinin kıyaslanması daha sonraki hücre davranışı deneylerinde farklı hücre iskelesi gruplarındaki durumları temsil edecektir. PCL ve PCL-zengin ve nHA-zengin olan yüzeylerden alınan SEM görüntüleri Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Fiber matların yüzeyinin PCL açısından zengin tarafında üretilen nanofiberlerin yüzeylerinin düzgün ve homojen çapa sahip oldukları, benzer şekilde, nHA bakımından zengin tarafta toplanan nanofiberlerin, nanopartiküllerin yedirilmiş olmasından dolayı düzensiz çıkıntılara sahip oldukları gözlenmektedir (Şekil 3.2.B, C beyaz oklar). Şekilden de anlaşılacağı gibi nHA partikülleri ya nanofiber içine gömülü ya da fiber yüzeyine yerleşik durumdadır. Ayrıca, nanofiberlerin çapından daha büyük partikül aglomeratları mevcuttur. Bu aglomeratların fiberlerin içinde veya yüzeyinde bulunması, geleneksel elektro eğirme ile işlenmiş nanopartiküllerin karıştırma öncesi ve sonrasında oluşan elektrostatik kuvvetler nedeniyle aglomerasyona eğilimli olduklarını ortaya koymaktadır. Her ne kadar nHA

süspansiyonu elektro eğirme işlemi öncesinde sonikasyon işleminden geçmiş olsa da sonuçlara bakıldığında bu müdahalenin yetersiz kaldığı görülmektedir.



Şekil 3.2 : Kademeli üretilen fiber matların (a) PCL-zengin ve (b,c) nHA zengin kısımlarından alınmış örneklerin SEM görüntüleri. (Fotoğrafların ölçekleri a, b için 3 μ m, c için 4 μ m'dir.)

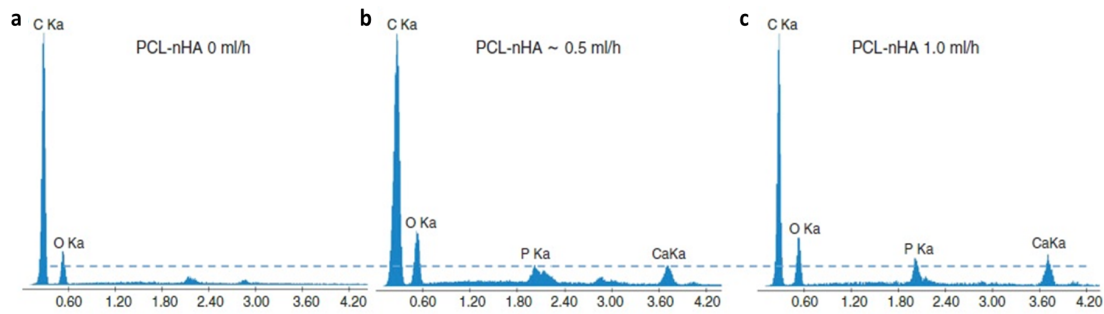
SEM görüntülerinde gözlemlenen nHA minerallerini temsil eden beyaz işaretlerin boyutunu ölçerek, bu parçacıkların aglomerat mı yoksa bireysel nHA nanopartikülleri mi olduğunu görmek için başka bir çalışma daha yapılmıştır.



Şekil 3.3 : SEM görüntülerinde görünen nHA parçacıklarının çap dağılımı.

Şekil 3.3'te gösterilen bulgular, partüküllerin yaklaşık %30'unun imalatçı tarafından belirtilen aralıkta (partikül boyutu <200 nm) olduğunu göstermektedir.

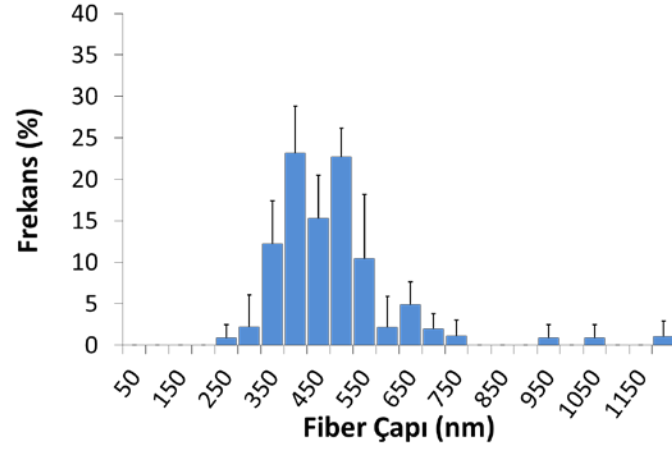
Bu nedenle, geleneksel elektro eğirme işleminin, işlem öncesinde veya süreç içerisinde oluşan aglomeratları etkili bir şekilde parçalayamadığını söylemek mümkündür. Burada gözlemlenenin aksine, ekstrüzyon elektro eğirme işlemi ile nanoparçacık işlenmesini kapsayan önceki çalışmalar, nanoparçacıkların işlem sırasında verimli bir şekilde dağılabileceğini böylece büyük aglomeratların oluşumunun engellendiğini göstermektedir [16]. Şekil 3.4'te, Ca ve P piklerinin varlığı ve ayrıca artan nHA yoğunluğuyla birlikte artan Ca ve P pik yüksekliği, nHA parçacıklarının varlığını ve oranındaki değişikliği doğrulamaktadır.



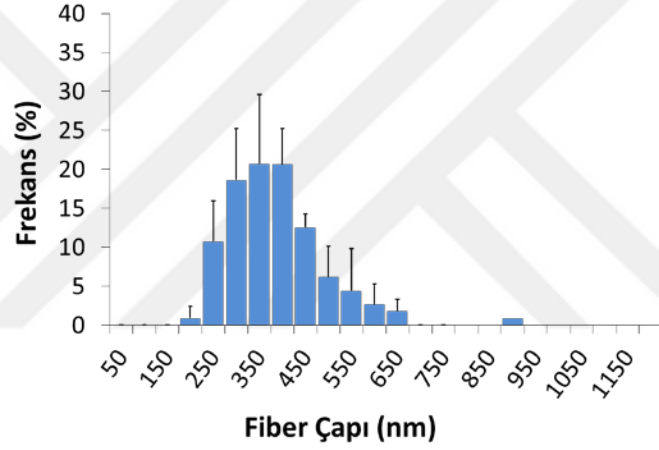
Şekil 3.4 : Farklı akış hızlarında ve farklı nHA konsantrasyonlarındaki PCL ve nHA fiber matların enerji dağılım spektroskopisi (EDS) spektrumu.

Nanopartiküllerin nanofiber içine yedirilmesi, fiber çapının artmasına ve çap dağılım grafiğinde sağa doğru kaymaya sebep olmuş (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6) ve bunun yanı sıra ortalama fiber çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 3.7).

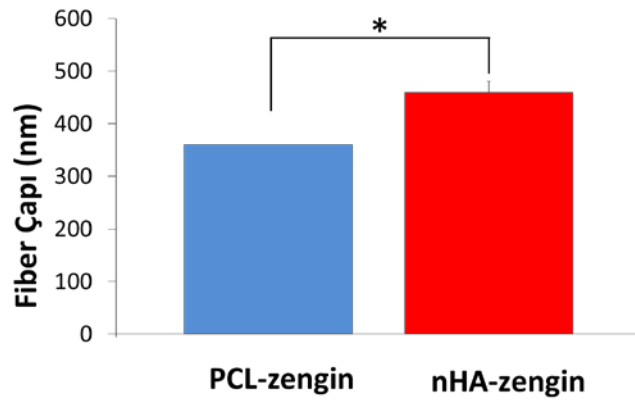
PCL ve nHA zengin yüzeylerdeki ortalama fiber çapları sırasıyla 361 ± 9 nm ve 459 ± 21 nm olarak hesaplanmıştır. Nanopartikül eklenmesinin fiber çapına benzer bir etkisi diğer araştırmacılar tarafından da raporlandırılmıştır [16, 41]. Artan fiber çapının sebebi kısmen nHA aglomeratlarının varlığı ile açıklanabilir. Nozul çıkışındaki polimer filament çapının, püskürtme ucundan toplama yüzeyine ilerledilçe küçüldüğü ve yüzeye çarptığı anda püskürtücünün çapının nihai fiber çapını tanımladığı bilinmektedir. Parçacıkların yokluğunda, malzeme, işlem ve ortam koşulları kontrollü kaldığı takdirde çaptaki bu azalma düzgün bir yol izlemelidir.



Şekil 3.5 : Fiber matların PCL-zengin yüzeyden ölçülen fiber çap dağılımları.



Şekil 3.6 : Fiber matların nHA-zengin yüzeyden ölçülen fiber çap dağılımları



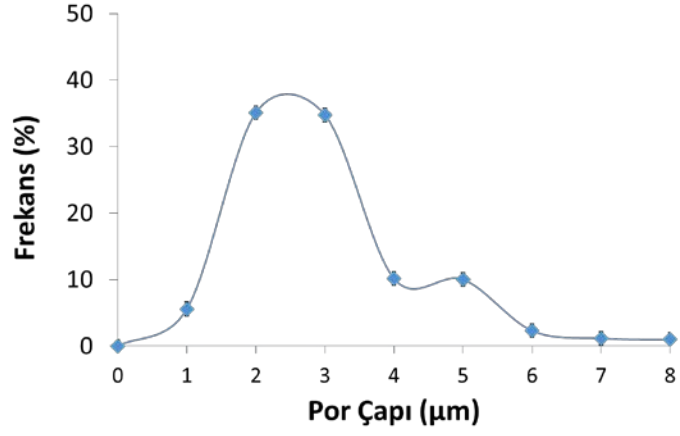
Şekil 3.7 : PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerden ölçülen ortalama fiber çaplarının karşılaştırması. * gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p < 0,05$).

Bununla birlikte, parçacıkların varlığında çapın sürekli azalması bir noktada bozulabilir. Bir süspansiyonda, özellikle elektro eğirme gibi proseslerde, mükemmel dağılmış nanopartiküllerin bulunması son derece zordur. Burada farklı ölçülen PCL ve nHA yüzeylerinin fiber çaplarının hücre deneylerinde bir etkisinin olmayacağı varsayılmaktadır. Bu çalışmadaki fiber çapları arasındaki fark 100nm (361-459nm) düzeyindedir. Daha önceki çalışmalarda hücre davranışına etki eden fiber çaplarına bakıldığında 250-467nm aralığının tek bir grup olarak değerlendirildiği görülmektedir [42]. Bu veriler eşliğinde, 100nm'lik fark istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen biyolojik etkisinin anlamlı olmayabileceği ve dolayısıyla burada öne sürülen varsayımın yerinde olacağı değerlendirilmiştir.

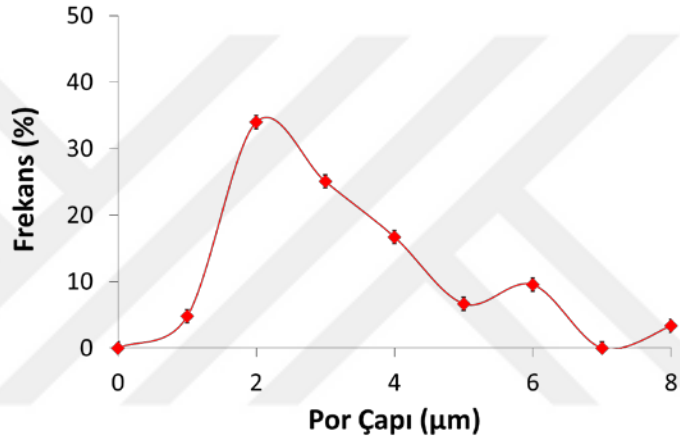
3.1.3 Porozite ve por çapı

PCL/nHA kademeli fiber matların porozitesi %98,55±0,01 olarak ölçülmüştür. Elektro eğirme işleminin oldukça gözenekli, gözeneklerin bağlantılı olduğu fiber matlar oluşturduğu bilinmektedir ve bu sebeple çok çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. Ekstrüzyon elektro eğirme yönteminin kullanıldığı, Erişken ve grubunun yaptığı çalışmada, ağırlıkça, fiber mat boyunca %35 beta-TCP içeren PCL hücre iskelelerinin porozitesi %87±2 olarak rapor edilmiştir. Genel olarak bu tez kapsamında üretilen fiber matın porozitesi, kıkırdak [43] ve kıkırdak-kemik arayüzü uygulamaları için uygun olarak değerlendirilmiştir [18].

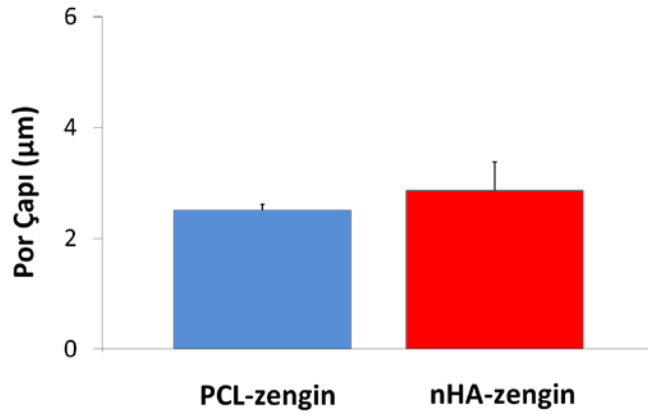
Por büyüklüğü ve dağılımı, fiber matların PCL ve nHA bakımından zengin bölgelerinden alınan SEM görüntülerine dayanılarak rapor edilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Solüsyona nHA eklemenin ortalama por çapı ve por büyüklük dağılımı üzerinde bir etkisinin olmadığı açıkça görülmektedir (Şekil 3.10). Şekilde görüldüğü üzere PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerdeki ortalama por büyüklükleri sırasıyla 2,51±0,1 µm ve 2,86±0,51 µm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8 : PCL-zengin yüzeylerin por büyüklük dağılımı



Şekil 3.9 : nHA-zengin yüzeylerin por büyüklük dağılımı

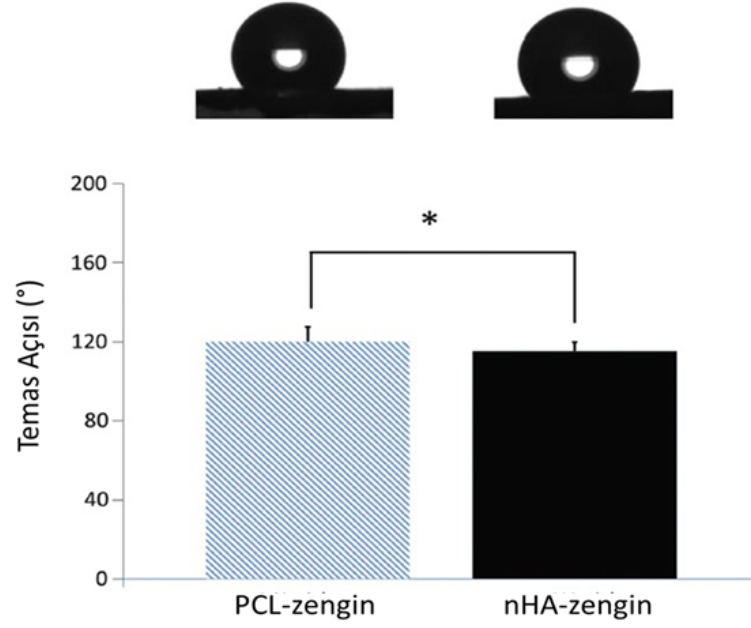


Şekil 3.10: PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerin por büyüklüklerinin karşılaştırılması

Doku mühendisliği uygulamaları açısından bakıldığında, elde edilen fiber matlarda oluşturulan por büyüklüğünün gerçek hücre boyutundan ($5\mu\text{m}$ ile $30\mu\text{m}$ arasında değişkenlik göstermektedir) daha küçük olmasının hücrelerin nanofiber yapıya penetrasyonunu etkileyebileceği düşünülebilir. Ancak, hücrelerin viskoelastik özelliklerde olması, kendilerinden daha küçük çaptaki gözeneklerin içine penetre olmalarına imkan sağlamaktadır. Bizim bulgularımız da bunu doğrulamaktadır. Önceki araştırmalar, por büyüklüğünün en büyük belirleyicilerinin fiber çapı ve porozite olduğunu göstermektedir ve hepsini aynı anda kontrol etmek her zaman mümkün değildir. Bu bağlamda, Eichhorn ve Sampson [44], por büyüklüğü, porozite ve çap arasındaki ilişkiyi matematiksel olarak modellemek için parametrik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ancak, nanofiber çapını gözenek çapı pahasına arttırmak tercih edilen bir uygulama değildir. Böyle durumlarda por büyüklüğünü arttırmak için uygulanabilecek en basit yaklaşım, hücre iskelesi malzemesine ilave olarak sisteme suda çözünebilen bir polimer eklemek ve fabrikasyon sonrası ilave edilen polimeri çözerek gözenek çapını artırmaktır [45]. Genel olarak, bu çalışmadaki sonuçlara bakıldığında fiber çapı büyüklüğü ile por çapı büyüklüğü arasında pozitif bir ilişki olduğu gözlenmektedir. Ancak, por çapı bazında PCL ve nHA yüzeyleri arasında anlamlı fark gözlemlenmemiş olması kısmen fiber yoğunluklarıyla açıklanabilir. Nitekim, Eichhorn ve Sampson por çapının fiber yoğunluğu ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. Bu durumda, bu çalışmada, nHA bakımından zengin olan yüzeyinde fiber yoğunluğunun daha az olduğu söylenebilir. Ancak, bu durumun deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir.

3.1.4 Temas açısı

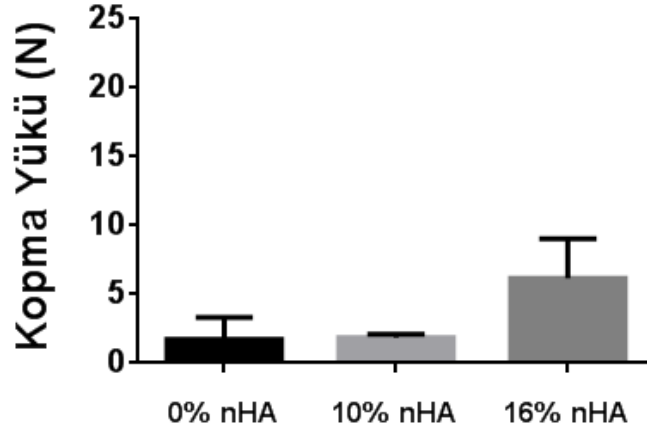
PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerin ortalama temas açıları Şekil 3.11’de gösterilmiştir. Önceki çalışmalara benzer biçimde, bu çalışmada da PCL içine nHA nanopartiküllerinin eklenmesi temas açısını $120,01\pm 2,77^\circ$ ’den $115,24\pm 1,17^\circ$ ’ye düşürmüştür [16, 46]. Bunun sebebi, hidrofobik bir polimer olan PCL’e kısmen hidrofilik olan nHA eklenmesi sonucunda temas açısının azalması olarak düşünülebilir.



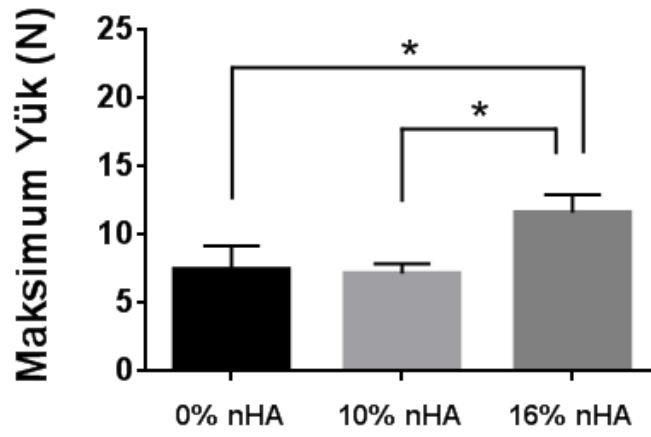
Şekil 3.11 : Fiber matların PCL-zengin ve nHA-zengin yüzeylerinin temas açısı karşılaştırması. * gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.1.5 Mekanik testler

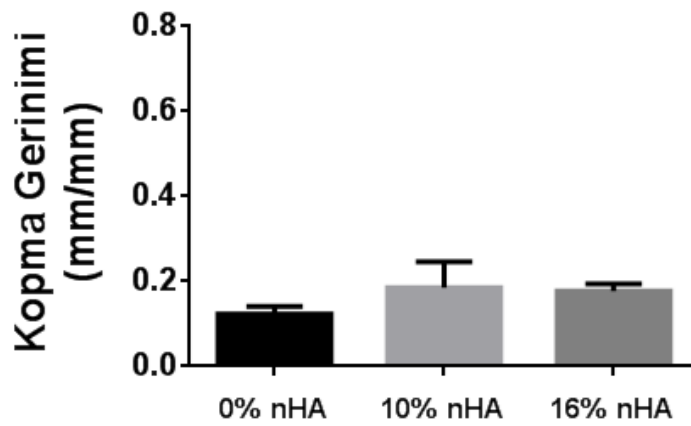
Farklı oranlarda nHA içeren örneklerin maksimum yükleri, kopma gerinimi ve kopma yükleri karşılaştırıldığında %16 oranında nHA içeren örneklerin diğer iki örneğe göre daha fazla dayanım gösterdiği, kopma uzaması ve kopma yük değerlerinde ise farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14). Sırasıyla PCL, %10 ve %16 nHA içeren örneklerin kaldırabileceği maksimum yük miktarları, $7,47 \pm 1,72$, $7,17 \pm 0,72$ ve $11,6 \pm 1,3$ N olarak hesaplanmıştır. %16 nHA içeren grubun diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olduğu ve bu farkın sebebinin hücre iskelesi içerisine kademeli olarak yedirilen nHA olduğu düşünülmektedir. Aynı örnekler için kopma yükü değerlerine de bakılmıştır ve sırasıyla $1,71 \pm 0,56$, $1,84 \pm 0,28$ ve $6,16 \pm 2,8$ N bulunmuştur. Kopma yükü için gruplar arasında, ortalamalar her ne kadar farklı olsa da, istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur. Bu 3 grup için son olarak kopma gerinimi değerlerine bakılmış ve sırasıyla $0,12 \pm 0,02$, $0,18 \pm 0,06$ ve $0,18 \pm 0,02$ mm/mm olarak ölçülmüştür. İstatistiksel açıdan bakıldığında ortalama değerlerdeki farkın aksine anlamlı bir farklılık yoktur.



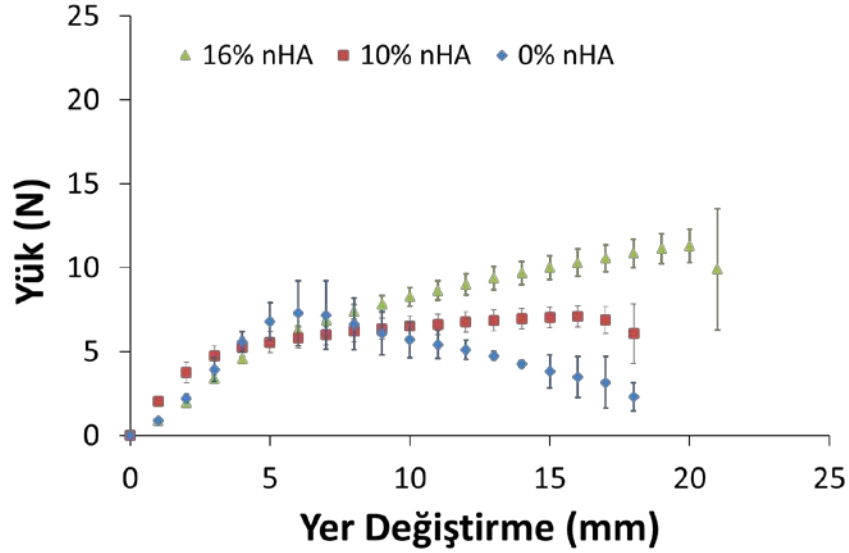
Şekil 3.12: nHA miktarının kopma yüküne etkisi.



Şekil 3.13: nHA miktarının maksimum yüke etkisi. * gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirtmektedir. ($p < 0.05$)



Şekil 3.14: nHA miktarının kopma gerinimine etkisi.



Şekil 3.15: Farklı miktarda nHA içeren hücre iskelelerinin yük-yer değiştirme grafiği

Şekil 3.15'te ölçüm sonuçları bir arada verilmiştir (n=3). Sabit çekme hızında (5 mm/dak), örneklerin maruz kaldığı birim yük ve birim yer değiştirme miktarları artmıştır. Buradan da görüldüğü gibi %16 nHA içeren örnek mekanik olarak daha yüksek dayanım göstermektedir. İçerdiği nHA, sentetik polimerden meydana gelen hücre iskelesinin mekanik özelliklerini arttırmıştır. Diğer taraftan nHA içermeyen hücre iskelesinin dayanımının gruplar arasında en düşük olduğu da şekilde açıkça görülmektedir.

Özetlemek gerekirse, bu çalışmada, çoklu elektro eğirme yöntemi ile üretilen PCL ve nHA kademeli kompozit fiber mat yapıların kalitesi ve özellikleri incelenmiştir. Bulgularımız, nHA'in PCL fiber mat içine kontrollü biçimde yedirildiğini ve sürekli kademeli bir yapı oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca, kompozit fiber matların kalınlığı boyunca, kontrollü nHA yedirilmesi sonucunda, fiber çapı ve temas açısı dahil olmak üzere fiziksel özellikler açısından farklılık gösterecek bölgelerin oluşturulabileceği görülmüştür. Bu çalışmada üretilen fiber matların, tendon-kemik doku mühendisliği uygulamaları başta olmak üzere, diğer doku-doku arayüz uygulamaları için de hücre iskelesi olarak kullanılabilir model sistemler olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

3.2 Büyüme Hormonlu ve Sürekli Kademeli Hücre İskelelerinin Karakterizasyonu

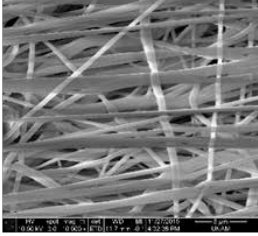
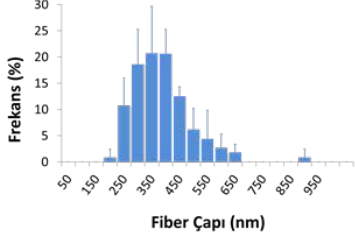
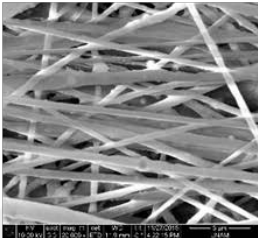
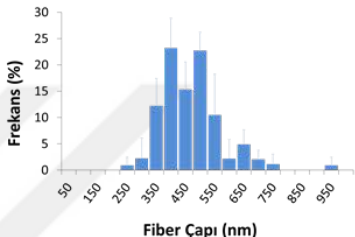
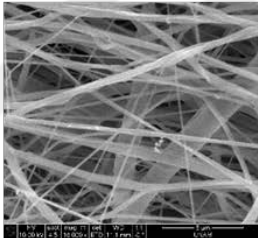
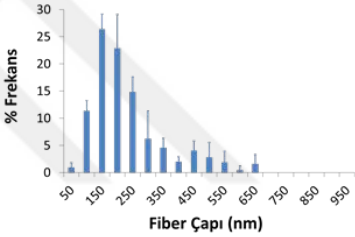
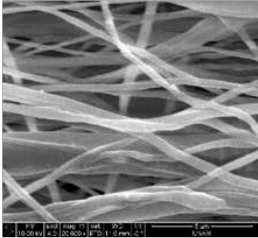
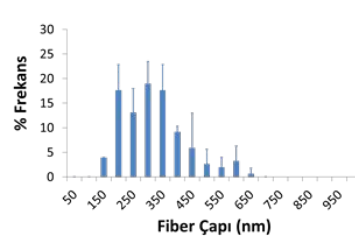
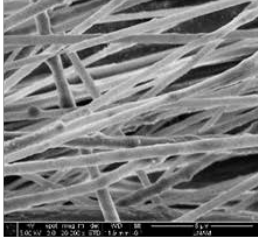
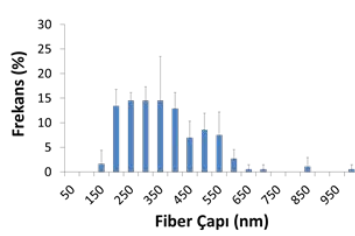
3.2.1 Fiber matların karakterizasyonu

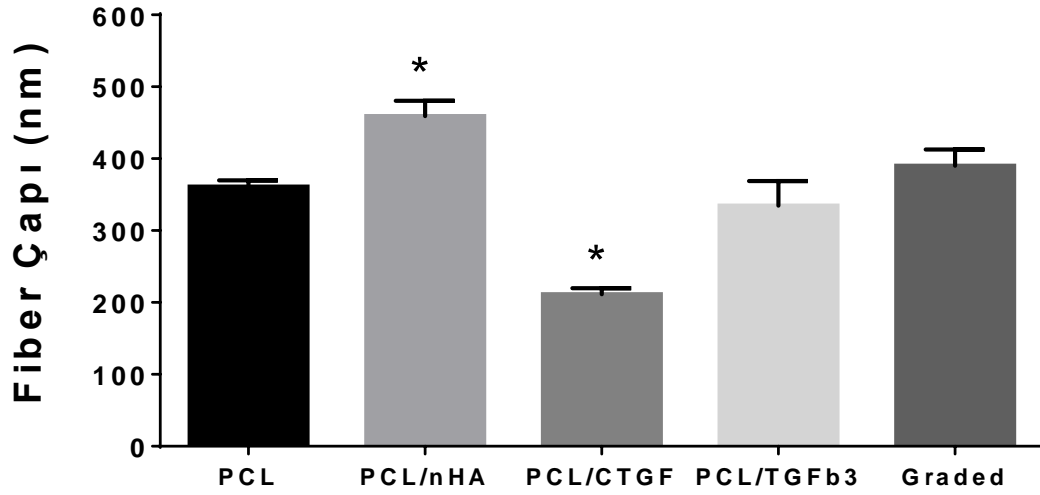
Çalışılan tüm grupların fiber çapları SEM fotoğraflarından ölçülmüş ve istatistiksel analizleri yapılmıştır (Çizelge 3.1, Şekil 3.16). Sonuçlara bakıldığında, PCL/nHA ve PCL/CTGF hücre iskelelerinin fiber çaplarının PCL hücre iskelesinin fiber çapından anlamlı olarak farklı olduğu saptanmıştır. Daha spesifik olarak belirtmek gerekirse, PCL/nHA hücre iskelesi fiber çapının PCL fiber çapından daha büyük, PCL/CTGF hücre iskelesi fiber çapının ise PCL fiber çapından daha küçük olduğu görülmektedir. PCL/nHA hücre iskelesi fiber çapının büyük olması, daha önce de tartışıldığı gibi, nHA partiküllerin fiberler içine yedirilmesi sonucunda ortalama çapın artmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle, nHA partiküllerinin aglomere olması bilindiği üzere fiber çapını artırmaktadır. Bu çalışmada da nHA partiküllerinin aglomere olduğu görülmüş ve çap artışı kısmen bununla ilişkilendirilmiştir.

PCL/CTGF hücre iskelesi fiber çapının PCL fiber çapına kıyasla daha küçük olmasının nedenlerinin bilinmesi önemlidir. Bu çalışmadaki PCL/CTGF hücre iskelesi fiber çapının küçük olmasının nedeni tam olarak bilinmemektedir. PCL/CTGF ve PCL/TGF β 3 hücre iskelelerinin üretim prosesleri arasında hiç fark olmamasına rağmen ve aralarındaki tek farkın eser miktarda olan CTGF ve TGF β 3 hormonları olmasına rağmen PCL/TGF β 3 hücre iskelesi fiber çapının PCL ile aynı olurken PCL/CTGF hücre iskelesi fiber çapının PCL'den küçük olmasının nedeni açıklanamamaktadır.

İskeleler üzerinde hücre davranışlarını incelerken, hücre iskelelerinin kompozisyonları dışındaki tüm parametrelerin sabit tutulması yan etkilerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada da hücre iskelesi tipi dışındaki çap, gözeneklilik, por çapı, temas açısı vb özelliklerin sabit tutulması hedeflenmiştir. Ancak hücre iskelesi fiber çapı bakımından iskeleler arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Her ne kadar bu farklar istatistiksel olarak anlamlı olsa da daha önce de tartışıldığı gibi çaplar arasındaki farkların küçük olması (~150nm) biyolojik olarak anlamlı bir etki oluşturmayabilir.

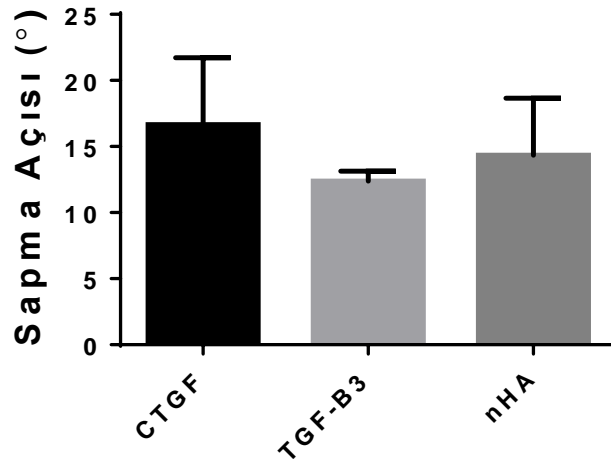
Çizelge 3.1: PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGF- β 3 ve kompozit hücre iskelesinin SEM fotoğrafları ile fiber çap ölçümleri.

Gruplar	SEM Fotoğrafları	Fiber Çap Dağılımları
PCL		
PCL/nHA		
PCL/CTGF		
PCL/TGF-β3		
PCL/nHA/CTGF/ TGF- β3		



Şekil 3.16: PCL, PCL/nHA, PCL/CTGF, PCL/TGFβ3 ve graded hücre iskelelerinin fiber çap karşılaştırması. * PCL hücre iskelesi ile arasında anlamlı fark olan grupları belirtmektedir. ($p < 0.05$)

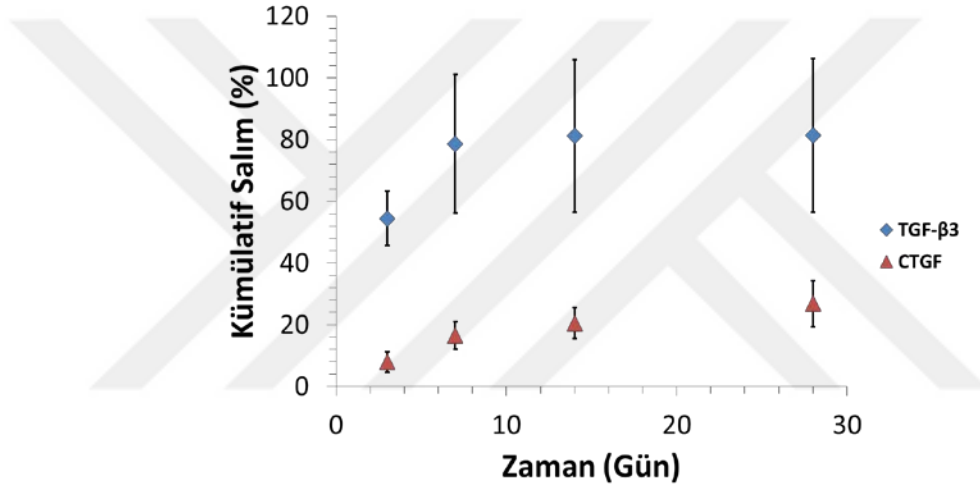
Büyüme hormonlu ve nHA içeren hücre iskelelerinin SEM görüntülerinden ölçülen fiber dizilimleri Şekil 3.17’de gösterilmiştir. Bulgulara göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Fiber esaslı hücre iskelelerinde fiber dizilimi hücre davranışını etkileyen bir parametredir [47]. Ancak buradaki çalışmada Şekil 3.17’den de görüldüğü gibi hücre iskelelerinin fiber dizilimleri birbirinden farklı çıkmamıştır.



Şekil 3.17: PCL/TGF-β3 ve PCL/CTGF hücre iskelelerinin dizilimi

3.2.2 Salım çalışmaları

PCL/TGF- β 3 ve PCL/CTGF hücre iskelelerinden büyüme hormonları salımı deney sonuçları Şekil 3.18’de gösterilmiştir. Kontrollü salım çalışmaları sonuçları, bağ doku büyüme faktörünün (CTGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 3 (TGF β 3)’ün 28.gün sonunda sırasıyla %27 \pm 7 ve %81 \pm 25 salındığını göstermektedir. Ancak, TGF- β 3 salımı CTGF’e göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Bunun nedeninin hücre iskelelerindeki çap farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Şekil 3.16’da görüldüğü gibi TGF- β 3 içeren hücre iskelelerinin fiber çapları ortalama olarak daha büyüktür.



Şekil 3.18: PCL/TGF- β 3 ve PCL/CTGF hücre iskelelerinden büyüme hormonları salımları

Kalın fiber çaplarının yanal yüzey alanı daha fazla olacağından, salım sıvısı ile temas eden büyüme hormonu moleküllerinin de daha fazla olması sebebiyle toplanan ilk numunelerde TGF- β 3 salımının daha fazla olması da şaşırtıcı değildir. Fan ve grubu, 2008’de yaptıkları bir çalışmada, 28 gün sonunda jelatin mikroküreciklerden %87,5 oranında TGF- β 3 salımı raporlamışlardır [48]. Literatürdeki diğer çalışmalardan birinde CTGF’in ilk gün %8,7 salındığı, diğeri bir çalışmada ise ilk gün yaklaşık %10’luk bir salım gerçekleştiği raporlanmıştır [23, 49]. Bu sonuçlar bizim çalışmalarımızla uyumludur.

Özet olarak, bu çalışmada, ayrı ayrı büyüme hormonu içeren hücre iskeleleri ile nHA, CTGF ve TGF- β 3 içeren sürekli kademeli PCL hücre iskelesi üretimi

gerçekleştirilmiş olup, karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bulgularımız büyüme hormonu içeren hücre iskelelerinde 28 günlük periyot içerisinde devamlı bir salım olduğunu göstermiştir. Yapılan salım çalışması sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ek olarak, sürekli kademeli hücre iskelesinin içerisine inkorpore edilen nHA ve büyüme hormonları fiber çapı gibi hücre iskelelerinin fiziksel özelliklerinde değişime sebep olabilmektedir. Bu çalışmada üretilen fiber matların, tendon-kemik doku mühendisliği uygulamaları başta olmak üzere, diğer arayüz uygulamaları için de hücre iskelesi olarak kullanılabilir model sistemler olarak hizmet verebileceği düşünülmektedir.

3.3 Hücre Ekimi ve Karakterizasyonu

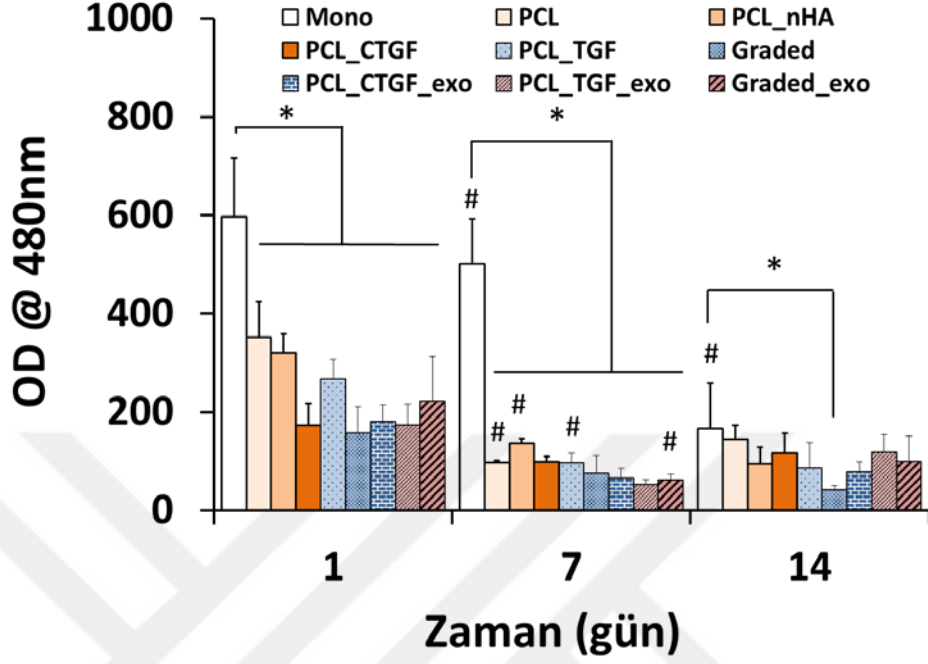
3.3.1 Hücre proliferasyonu

Şekil 3.19'a bakıldığında 1. ve 7. günlerde plaka yüzeyine ekilen hücrelerin diğer gruplara kıyasla daha iyi tutunduğu söylenebilir. Hücreler hiç bir yüzeyde iki hafta içinde çoğalma göstermemiştir. Plaka ve kademeli (graded) PCL/nHA/CTGF/TGFβ3 yüzeyler dışında, tüm yüzeylerdeki hücrelerin 14. gün sonunda birbiriyle aynı davranışı gösterdiği görülmüştür. Bu veriler bize bu çalışmada kullanılan CTGF ve TGF-β3 hormonlarının hücre proliferasyonuna bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak literatürdeki çalışmalar CTGF ve TGF-β3'ün sentetik ve doğal polimerlerle birlikte kullanıldığında hücre proliferasyonunu arttırdığını belirtmektedir [50-53]. Bu çalışmada benzer davranış gözlemlenmemiş olmasının, hücrelerin buldukları ortamı benimsememiş olması, PCL'in hidrofobik yapısının hücre tutunumunda etkili olması gibi nedenler dayandırılabilir düşünülmektedir. Bu sebeple, bu tip çalışmalarda hücre iskelesi yüzeyinin kolajen veya fibronektin gibi hücre tutumunu kolaylaştırıcı ajanların kullanılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

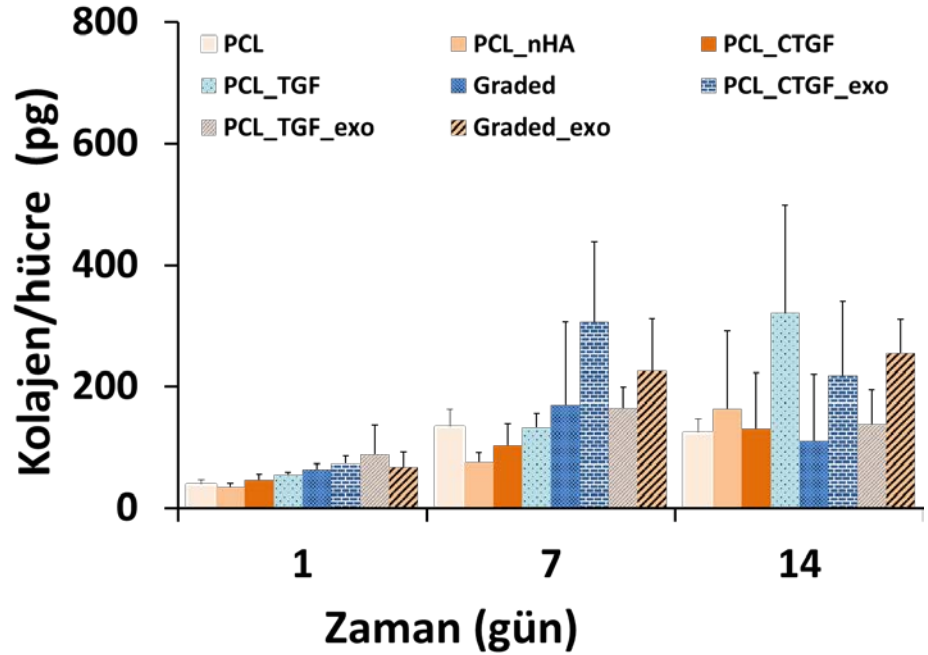
3.3.2 Kolajen üretimi

Elde edilen bulgular, hücre başına kolajen üretimi olarak Şekil 3.20'de gösterilmiştir. Ortalama bazda, birinci günden sonra hücrelerin kolajen üretiminde artış görünse de, istatistiksel analizde herhangi bir zaman diliminde herhangi bir grup arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında da bizim çalışmamızla uyumlu olacak şekilde, hücrelerin ürettikleri kolajen miktarlarında artış raporlanmıştır [48, 50, 51]. Bu bulgulara dayanarak, zamanla ortalama olarak kolajen

üretiminde artış olduğunu, ancak hücre iskelesi tipinin kolajen üretimi üzerinde bir etkisi olmadığını söylemek mümkündür.



Şekil 3.19: Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli hücre iskelesi üzerindeki proliferasyonu. * aynı zaman diliminde gruplararası farkları, # ise aynı grubun bir önceki zaman dilimine göre farkını göstermektedir.



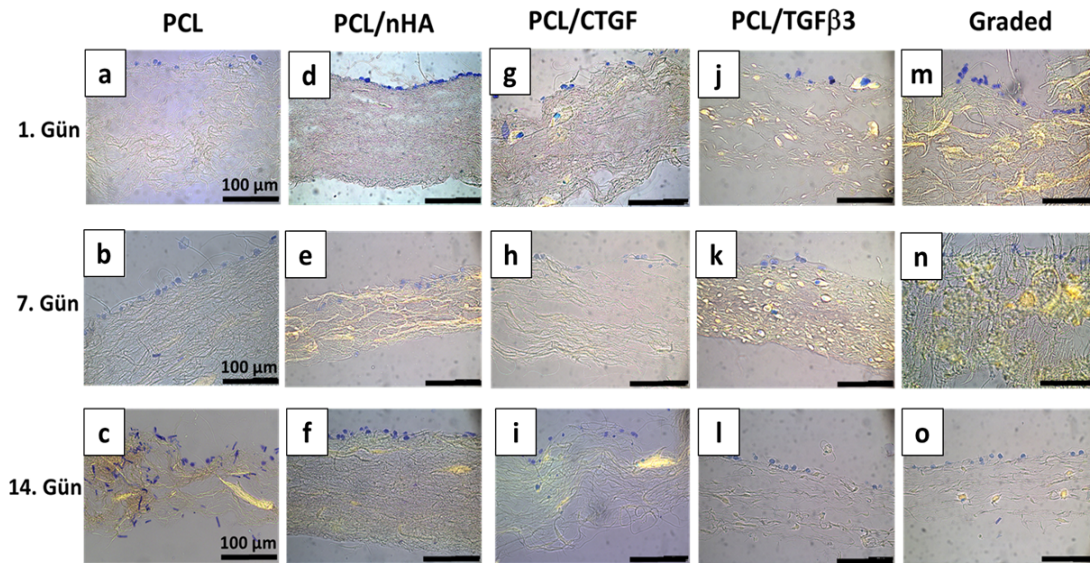
Şekil 3.20: Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli hücre iskelesi üzerindeki kolajen üretimi. * aynı zaman diliminde gruplararası farkları, # ise aynı grubun bir önceki zaman dilimine göre farkını göstermektedir.

3.3.3 Histoloji çalışmaları

3.3.3.1 Giemsa boyama

Hücre iskelelerinin kesim işlemi sırasında her gruptan (n=3) 50 ila 60 adet kesit alınmış, kesitler Giemsa ile boyanarak hücre varlığı tespit edilmiştir. Hücre ekilmiş iskelelerden alınan kesitlerin görüntülenmesi için Leica DM2500 mikroskop kullanılmıştır.

Giemsa boyası ile hücre iskelesi üzerindeki hücre görüntüleri Şekil 3.21’de verilmiştir. Histoloji görüntülerine bakıldığında, hücrelerin PCL/CTGF grubu haricindeki hücre iskelelerinde genellikle yüzeyde konumlandıkları görülmektedir. PCL/CTGF hücre iskelesi grubunda ise hücrelerin 1, 7 ve 14. günlerde hücre iskelesi içine de göç edebildiği gözlenmiştir. Şekil 3.21’de farklı hücre iskelesi grupları üzerinde kalitatif olarak görülen hücre sayılarının Şekil 3.19’daki kantitatif bulgularla uyumlu olduğu söylenebilir.

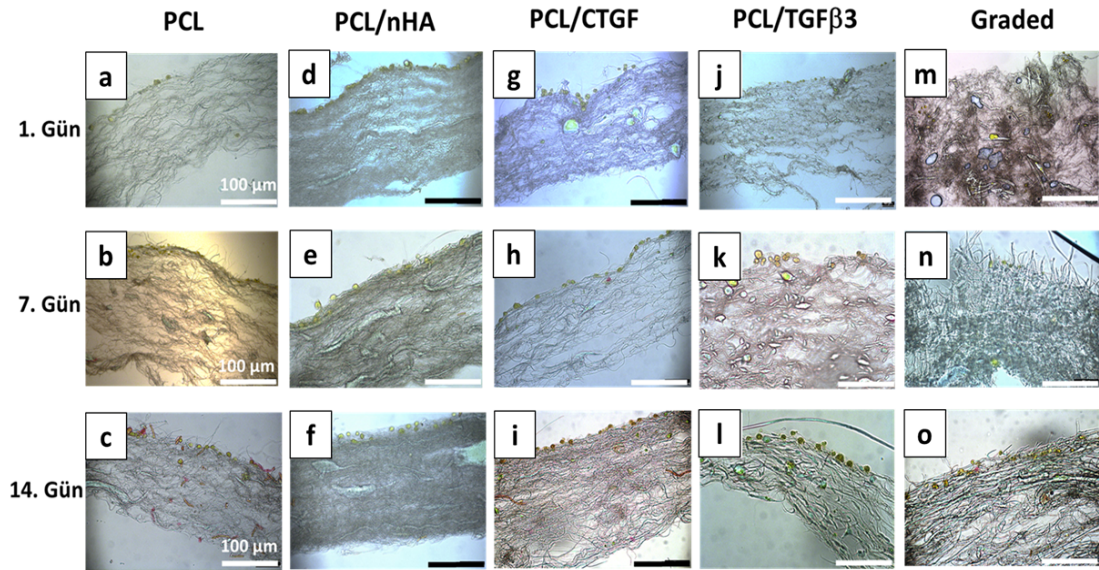


Şekil 3.21: Giemsa ile hücre boyama deneylerinden mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre iskeleleri üzerindeki görüntüleri. (a-c) 1, 7 ve 14. günde PCL üzerine ekilen hücreler. (d-f) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA üzerine ekilen hücreler. (g-i) 1, 7 ve 14. günde PCL/CTGF üzerine ekilen hücreler. (j-l) 1, 7 ve 14. günde PCL/TGF-β3 üzerine ekilen hücreler. (m-o) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA/TGF-β3/CTGF kademeli hücre iskelesi üzerine ekilen hücreler.

3.3.3.2 Kolajen boyama

Hücre iskelelerinin kesim işlemi sırasında her gruptan (n=3) 50 ila 60 adet kesit alınmış, kesitler Picosirius Red ile boyanarak kolajen varlığı tespit edilmiştir. Hücre ekilmiş iskelelerden alınan kesitlerin görüntülenmesi için Leica DM2500 mikroskop kullanılmıştır.

Picosirius Red boyası ile hücre görüntüleri Şekil 3.22’de verilmiştir. Histoloji görüntülerine bakıldığında, boya tutan bölgelerin hücrelerin bulunduğu kısımlar olduğu görülmektedir. Boyamalara göre, hücreler kolajen üretimine başlamış ancak hücreler, hücre iskelesi içine sızamadıkları için bu aktivitenin sadece yüzeyle sınırlı kaldığı görülmektedir. PCL/CTGF hücre iskelesi grubunda hücreler 1, 7 ve 14. günlerde hücre iskelesi içine de göç edebildiği için buralarda da kısıtlı miktarda kolajen üretimi gözlenmiştir. Şekil 3.22’de farklı hücre iskelesi grupları üzerinde gözlemlenen kolajen üretimi miktarının Şekil 3.20’deki kantitatif bulgularla uyumlu olduğu söylenebilir.

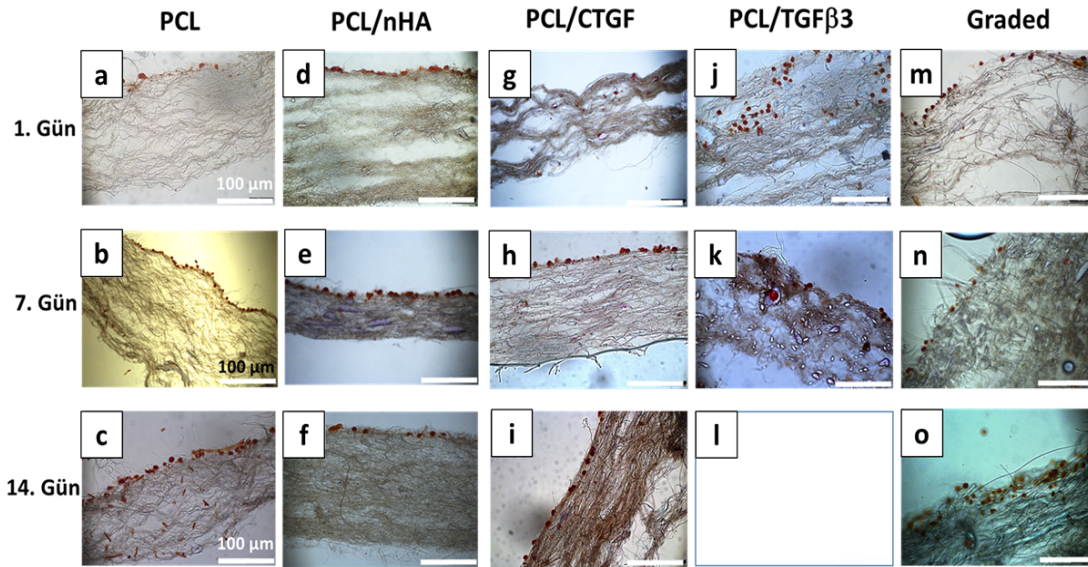


Şekil 3.22: Picosirius Red ile kolajen boyama deneylerinden farklı hücre iskelelerinin görüntüleri. (a-c) 1, 7 ve 14. günde PCL hücre iskelesi içindeki kolajen. (d-f) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA hücre iskelesi içindeki kolajen. (g-i) 1, 7 ve 14. günde PCL/CTGF hücre iskelesi içindeki kolajen. (j-l) 1, 7 ve 14. günde PCL/TGF-β3 hücre iskelesi içindeki kolajen. (m-o) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA/TGF-β3/CTGF kademeli hücre iskelesi içindeki kolajen.

3.3.3.3 GAG boyama

Hücre iskelelerinin kesim işlemi sırasında her gruptan (n=3) 50 ila 60 adet kesit alınmış, kesitler Safranin-O ile boyanarak GAG varlığı tespit edilmiştir. Hücre ekilmiş iskelelerden alınan kesitlerin görüntülenmesi için Leica DM2500 mikroskop kullanılmıştır.

Safranin-O boyası ile hücre görüntüleri Şekil 3.23'te verilmiştir. Histoloji görüntülerine bakıldığında, boya tutan bölgelerin hücrelerin bulunduğu kısımlar olduğu görülmektedir. Boyamalara göre, hücreler GAG üretimine başlamış ancak hücreler hücre iskelesi içine sızamadıkları için bu aktivitenin sadece yüzeyle sınırlı kaldığı görülmektedir. Hücreler, PCL/CTGF hücre iskelesi grubunda 1, 7 ve 14. günlerde, PCL/TGF- β 3 hücre iskelesi grubunda da 1 ve 7. günde hücre iskelesi içine de geçebildiği için buralarda da kısıtlı miktarda GAG üretimi gözlenmiştir.



Şekil 3.23: Safranin-O ile GAG boyama deneylerinden farklı hücre iskelelerinin görüntüleri. (a-c) 1, 7 ve 14. günde PCL hücre iskelesi içindeki GAG. (d-f) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA hücre iskelesi içindeki GAG. (g-i) 1, 7 ve 14. günde PCL/CTGF hücre iskelesi içindeki GAG. (j-l) 1, 7 ve 14. günde PCL/TGF- β 3 hücre iskelesi içindeki GAG. (m-o) 1, 7 ve 14. günde PCL/nHA/TGF- β 3/CTGF kademeli hücre iskelesi içindeki GAG.

Özetlemek gerekirse bu bölümde, DNA proliferasyonu, kolajen üretimi ve histolojik olarak boyanan örnekler incelenmiştir. Hücrelerin 14 gün boyunca kültürlendiği bu çalışmada hücre proliferasyonu görülmemiş ancak kolajen üretimi zamana bağlı olarak ortalama bazda artmıştır. Bununla birlikte kolajen üretimi açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Histoloji çalışmalarına bakıldığında ise hücrelerin çoğunlukla hücre iskelesi yüzeyinde dizildiği, bazı gruplar haricinde hücre iskelesi içine penetre olmadığı görülmüştür. Histolojik boyamalar için kullanılan boyaların tüm hücreleri boyaması, istenilen veriyi elde etmeyi zorlaştırmıştır. Boyamalar ile ilgili daha ileri çalışmaların yapılması alana katkı sağlamak açısından gereklidir.





4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında tendon-kemik arayüzü için sürekli kademeli hücre iskelesi tasarımı, karakterizasyonu ve hücre deneyleri yapılmıştır. Daha önce doku-doku arayüzleri için üretilen hücre iskelelerinin sadece mineral içeren ve içermeyen iki tabakalı olarak üretildiği tezin giriş kısmında belirtilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda, farklı elektro eğirme yaklaşımlarıyla kademeli yapıda hücre iskelesi üretme yöntemlerinin karşılaştırılabileceği bir havuza katkı amacı gütmektedir. Bu anlamda, sonuçlara bakıldığında, burada kullanılan yöntemle kademeli yapıda hücre iskelesi üretmenin mümkün olduğu görülmüştür.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, üretilen hücre iskelelerinden salınan büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonuna ve kolajen üretimine istatistiksel anlamda bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak PCL içerisine inkorpore edilen nHA, CTGF ve TGF- β 3 moleküllerinin hücre iskelelerinin biyomekanik özellikleri, temas açısı ve fiber çapı gibi fiziksel özelliklerini değiştirdiği, bu değişimlerin literatürle uyumlu şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Üretilen kademeli hücre iskelesinin tendon-kemik arayüzünde kullanılıp kullanılmayacağına belirlenmesi için buradaki *in-vitro* testlerine ilave olarak *in-vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir. *In-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar uyumlu olduğu takdirde üretilen bu malzemenin tendon-kemik arayüzü dahil diğer doku-doku arayüz uygulamalarında temel teşkil etmesi beklenmektedir. Çalışmanın nihai hedefi klinik olarak uygulanabilir kademeli bir yapı oluşturmaktır.

Bu çalışmanın kısıtlama ve sınırlamaları;

- Gerçek tendon-kemik arayüzü, hücre ekilmiş hücre iskelesi örnekleri ile histolojik olarak karşılaştırılamamıştır.
- Bu çalışmadaki önemli kısıtlamalardan biri vücut dışında (*in-vitro*) ölçülen kontrollü salım miktarlarının vücut içindeki (*in-vivo*) salımları birebir yansıtmasıdır.

- Fibrokıkırdak yapının gelişimi ve rejenerasyonu esnasında hücrelerin nasıl bir mekanizma izlediği bilinmediğinden, salgıladıkları çok belirgin markerlar (belirteçler) henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır.

Bu tez çalışmasını geliştirmek için önerileri şu şekilde sıralayabiliriz:

- Tezde yapılan Kolajen, GAG ve Giemsa boyamaların yanında immünohistokimyasal boyamalar yapılabilir.
- Fibrokıkırdak yapının en belirgin belirteçleri olan COL I, COL II ve COL X gen ekspresyonuna bakılabilir.
- Biyoaktif moleküllerin hücre iskelesine tam verimle yedirilebilmesi için ekstrüzyon elektro eğirme yöntemi kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Benjamin, M., Evans, E.J., Copp E.,** (1986). The histology of tendon attachments to bone in man, *Journal of Anatomy*, 149, 89-100.
- [2] **Wang, I.N.E., Mitroo, S., Chen, F.H., Lu, H.H., Doty, S.B.,** (2006). Age-dependent changes in matrix composition and organization at the ligament-to-bone insertion, *Journal of Orthopaedic Research*, 24(8), 1745-1755.
- [3] **Benjamin, M., Ralphs, J.R.,** (2004) Biology of fibrocartilage cells, *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, 233, 1-45.
- [4] **Thomopoulos, S., Hattersley, G., Rosen, V., Mertens, M., Galatz, L., Williams, G.R., Soslowky, L.J.,** (2002). The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study, *Journal of Orthopaedic Research*, 20(3), 454-463.
- [5] **Smith, L., Xia, Y.N., Galatz, L.M., Genin, G.M., Thomopoulos, S.,** (2012). Tissue-Engineering Strategies for the Tendon/Ligament-to-Bone Insertion, *Connective Tissue Research*, 53(2), 95-105.
- [6] **Zhang, X.Z., Bogdanowicz, D., Eriskin, C., Lee, N.M., Lu, H.H.,** (2012). Biomimetic scaffold design for functional and integrative tendon repair, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 21(2), 266-277.
- [7] **Genin, G.M., Kent, A., Birman, V., Wopenka, B., Pasteris, J.D., Marquez, P.J., Thomopoulos, S.,** (2009). Functional Grading of Mineral and Collagen in the Attachment of Tendon to Bone, *Biophysical Journal*, 97(4), 976-985.
- [8] **Langer, R., Vacanti, J.P.,** (1993). Tissue engineering, *Science*, 260(5110), 920-926.
- [9] **Moffat, K.L., Kwei, A.S.P., Spalazzi, J.P., Doty, S.B., Levine, W.N., Lu, H.H.,** (2009). Novel Nanofiber-Based Scaffold for Rotator Cuff Repair and Augmentation, *Tissue Engineering Part A*, 15(1), 115-126.
- [10] **Kim, B.S., Kim, E.J., Choi, J.S., Jeong, J.H., Jo, C.H., Cho, Y.W.,** (2014). Human collagen-based multilayer scaffolds for tendon-to-bone interface tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(11), 4044-4054.
- [11] **Friedman, M.J., Sherman, O.H., Fox, J.M., Delpizzo, W., Snyder, S.J., Ferkel, R.J.,** (1985). Autogeneic anterior cruciate ligament (ACL) anterior reconstruction of the knee - A review, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (196), 9-14.
- [12] **Kurosaka, M., Yoshiya, S., Andrish, J.T.,** (1987). A Biomechanical comparison of different surgical techniques of graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction, *American Journal of Sports Medicine*, 15(3), 225-229.
- [13] **Robertson, D.B., Daniel, D.M., Biden, E.,** (1986). Soft-tissue fixation to bone, *American Journal of Sports Medicine*, 14(5), 398-403.

- [14] **Rodeo, S.A., Arnoczky, S.P., Torzilli, P.A., Hidaka, C., Warren, R.F.,** (1993). Tendon-healing in a bone tunnel - a biomechanical and histological study in the dog, *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 75A(12), 1795-1803.
- [15] **Erisken, C., Kalyon, D.M., Wang, H.J., Ornek-Ballanco, C., Xu, J.H.,** (2011). Osteochondral Tissue Formation Through Adipose-Derived Stromal Cell Differentiation on Biomimetic Polycaprolactone Nanofibrous Scaffolds with Graded Insulin and Beta-Glycerophosphate Concentrations, *Tissue Engineering Part A*, 17(9-10), 1239-1252.
- [16] **Erisken, C., Kalyon, D.M., Wang, H.J.,** (2008). A hybrid twin screw extrusion/electrospinning method to process nanoparticle-incorporated electrospun nanofibres, *Nanotechnology*, 19(16), 8.
- [17] **Erisken, C., Kalyon, D.M., Wang, H.J.,** (2010). Viscoelastic and Biomechanical Properties of Osteochondral Tissue Constructs Generated From Graded Polycaprolactone and Beta-Tricalcium Phosphate Composites, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, 132(9), 9.
- [18] **Erisken, C., Kalyon, D.M., Wang, H.J.,** (2008). Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 29(30), 4065-4073.
- [19] **Gulotta, L.V., Rodeo, S.A.,** (2009). Growth Factors for Rotator Cuff Repair, *Clinics in Sports Medicine*, 28(1), 13-+.
- [20] **Rodeo, S.A.** (2007). Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 16(5), 191-197.
- [21] **Galatz, L., Rothermich, S., Vander-Ploeg, K., Petersen, B., Sandell, L., Thomopoulos, S.,** (2007). Development of the supraspinatus tendon-to-bone insertion: Localized expression of extracellular matrix and growth factor genes, *Journal of Orthopaedic Research*, 25(12), 1621-1628.
- [22] **Bian, L.M., Zhai, D.Y., Tous, E., Rai, R., Mauck, R.L., Burdick, J.A.,** (2011). Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF-beta 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 32(27), 6425-6434.
- [23] **Lee, C.H., Shah, B., Moiola, E.K., Mao, J.J.,** (2010). CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model, *Journal of Clinical Investigation*, 120(9), 3340-3349.
- [24] **Wahl, D.A., Czernuszka, J.T.,** (2006). Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair, *European Cells & Materials*, 11, 43-56.
- [25] **Gosain, A.F., Song, L.S., Riordan, P., Amarante, M.T., Nagy, P.G., Wilson, C.R., Toth, J.M., Ricci, J.L.,** (2002). A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived Biomaterials in an adult sheep model: Part I, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 109(2), 619-630.
- [26] **Formhals, A.,** (1934). Process and apparatus for preparing artificial threads, *United States Patents*, No:US1975504 A. Tarih: 02.10.1934.
- [27] **Doshi, J., Reneker, D.H., Ieee, I.A.S.,** (1993). Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Ias 93, Pts 1-3: Conference*

Record of the 1993 Ieee Industry Applications Conference Twenty-Eighth Ias Annual Meeting, 1698-1703.

- [28] **Fridrikh, S.V., Yu, J.H., Brenner, M.P., Rutledge, G.C.**, (2003). Controlling the fiber diameter during electrospinning, *Physical Review Letters*, 90(14), 4.
- [29] **Reneker, D.H., Chun, I.**, (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, 7(3), 216-223.
- [30] **Um, I.C., Fang, D.F., Hsiao, B.F., Okamoto, A., Chu, B.**, (2004). Electrospinning and electro-blowing of hyaluronic acid, *Biomacromolecules*, 5(4), 1428-1436.
- [31] **Kong, C.S., Yoo, W.S., Lee, K.Y., Kim, H.S.**, (2009). Nanofiber deposition by electroblowing of PVA (polyvinyl alcohol), *Journal of Materials Science*, 44(4), 1107-1112.
- [32] **Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J.M., Sharifi, S., Ramakrishna, S.**, (2016). A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(9), 715-738.
- [33] **Sundararaghavan, H.G., Burdick, J.A.**, (2011). Gradients with Depth in Electrospun Fibrous Scaffolds for Directed Cell Behavior, *Biomacromolecules*, 12(6), 2344-2350.
- [34] **Wade, R.J., Bassin, E.J., Rodell, C.B., Burdick, J.B.**, (2015). Protease-degradable electrospun fibrous hydrogels, *Nature Communications*, 6, 10.
- [35] **Samavedi, S., Horton, C.O., Guelcher, S.A., Goldstein, A.S., Whittington, A.R.**, (2011). Fabrication of a model continuously graded co-electrospun mesh for regeneration of the ligament-bone interface, *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4131-4138.
- [36] **Bosworth, L.A., Rathbone, S.R., Bradley, R.S., Cartmell, S.H.**, (2014). Dynamic loading of electrospun yarns guides mesenchymal stem cells towards a tendon lineage, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 39, 175-183.
- [37] **Clarke, B.**, (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3, 131-139.
- [38] **Li, X.R., Xie, J.W., Lipner, J., Yuan, X.Y., Thomopoulos, S., Xia, Y.N.**, (2009). Nanofiber Scaffolds with Gradations in Mineral Content for Mimicking the Tendon-to-Bone Insertion Site, *Nano Letters*, 9(7), 2763-2768.
- [39] **Zhang, X.C., Caldwell, J.M., Easley, J., Heckett, E., Doty, S., Levine, W., Guo, E., Lu, H.**, (2014). In Vivo Evaluation of a Biomimetic Biphasic Scaffold in Sheep, *ORS 2014 Annual Meeting*, New Orleans, Mar, 15-18.
- [40] **Zhu, G., Mallery, S.R., Schwendeman, S.P.**, (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide), *Nature Biotechnology*, 18, 52-57.
- [41] **Wutticharoenmongkol, P., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Supaphol, P.**, (2006). Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles, *Macromolecular Bioscience*, 6(1), 70-77.

- [42] **Kumbar, S.G., Nukavarapu, S.P., James, R., Nair, L.S., Laurencin, C.T.,** (2008). Electrospun poly (lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering, *Biomaterials*, 29(30), 4100-4107.
- [43] **Setton, L.A., Elliott, D.M., Mow, V.C.,** (1999). Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration, *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(1), 2-14.
- [44] **Eichhorn, S.J., Sampson, W.W.,** (2005). Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies, *Journal of the Royal Society Interface*, 2(4), 309-318.
- [45] **Baker, B.M., Gee, A.O., Metter, R.B., Nathan, A.S., Marklein, R.A., Burdick, J.A., Mauck, R.L.,** (2008). The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers, *Biomaterials*, 29(15), 2348-2358.
- [46] **Liao, H.T., Chen, Y.Y., Lai, Y.T., Hsieh, M.F., Jiang, C.,** (2014). The Osteogenesis of Bone Marrow Stem Cells on mPEG-PCL-mPEG/Hydroxyapatite Composite Scaffold via Solid Freeform Fabrication, *Biomed Research International*, 13.
- [47] **Erişken, C., Zhang, X., Moffat, K.L., Levine, W.N., Lu, H.H.,** (2013). Scaffold fiber diameter regulates human tendon fibroblast growth and differentiation, *Tissur Engineering: Part A*, 19(3-4), 519-528.
- [48] **Fan, H.B., Zhang, C.L., Li, J., Bi, L., Qin, L., Wu, H., Hu, Y.Y.,** (2008). Gelatin microspheres containing TGF-beta 3 enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells in modified pellet culture, *Biomacromolecules*, 9(3), 927-934.
- [49] **Xu, R.D., Taskin, M.B., Rubert, M., Seliktar, D., Besenbacher, F., Chen, M.L.,** (2015). hiPS-MSCs differentiation towards fibroblasts on a 3D ECM mimicking scaffold, *Scientific Reports*, 5, 7.
- [50] **Lee, C.H., Moioli, E.K., Mao, J.J.,** (2006). Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor, *28th Annual International Conference of the Ieee Engineering in Medicine and Biology Society*, Vols 1-15, 5360-+.
- [51] **Battula, V.L., Chen, Y., Cabreira, M.D., Ruvolo, V., Wang, Z.Q., Ma, W.C., Konoplev, S., Shpall, E., Lyons, K., Strunk, D., Bueso-Ramos, C., Davis, R.E., Konopleva, M., Andreeff, M.,** (2013). Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment, *Blood*, 122(3), 357-366.
- [52] **Tong, Z.X., Sant, S., Khademhosseini, A., Jia, X.Q.,** (2011). Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffolds and Connective Tissue Growth Factor, *Tissue Engineering Part A*, 17(21-22), 2773-2785.
- [53] **Huang, A.H., Stein, A., Tuan, R.S., Mauck, R.L.,** (2009). Transient Exposure to Transforming Growth Factor Beta 3 Improves the Mechanical Properties of Mesenchymal Stem Cell-Laden Cartilage Constructs in a Density-Dependent Manner, *Tissue Engineering Part A*, 15(11), 3461-3472.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ece BAYRAK
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 1990, Ankara
E-posta : ebayrak@etu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

Yıl	Yer	Görev
2014-2017	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	Burslu Y. Lisans Öğrencisi

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Bayrak, E., Ozcan, B., Erisken, C., 2017.** Processing of polycaprolactone and hydroxyapatite to fabricate graded electrospun composites for tendon-bone interface regeneration, *Journal of Polymer Engineering*, 37(1), 99-106.
- **Bayrak, E., Ozcan, B., Erisken, C. 2016.** Functionally graded composites for tendon-bone tissue interface regeneration, Proceedings of İNES International Academic Research Congress, November 3-5, Antalya, Turkey.
- **Bayrak, E., Ozcan, B., Erisken, C. 2016.** Biomimetic Nanofibrous Composites for Tendon-Bone Interface Regeneration, Proceedings of NEMB2016: ASME 5th Global Conference on Nanoengineering in Medicine and Biology, February 21-24, Texas, US.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Bayrak, E.**, Ozcan, B., Erisken, C. 2016. Cartilage-Bone Interface Features, Scaffold and Cell Options for Regeneration, *Journal of Tissue Science and Engineering*, 7(2), 174.
- Ozcan, B., **Bayrak, E.**, Erisken, C. 2016. Characterization of Human Dental Pulp Tissue Under Oscillatory Shear and Compression, *Journal of Biomechanical Engineering*, 138, 061006.
- Gurlek, A., Sevinc, B., **Bayrak, E.**, Erisken, C. 2016. Synthesis and Characterization of Polycaprolactone for Anterior Cruciate Ligament Regeneration, *Materials Science & Engineering C*, 71, 820-826.

