ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BMP-6 İLE DESTEKLENMİŞ POLİKAPROLAKTON BAZLI FİBRÖZ DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ ve *IN VITRO* KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Özge TOPRAK

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BMP-6 İLE DESTEKLENMİŞ POLİKAPROLAKTON BAZLI FİBRÖZ DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ ve *IN-VITRO* KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Özge TOPRAK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Kemik doku mühendisliği yaklaşımında, kemik rejenerasyonu, hücre üremesi ve osteojenik farklılaşma osteojenik büyüme faktörleriyle desteklenmektedir. Kemik morfogenetik proteini-6 (BMP-6), osteoindüktif kapasiteye sahip ve kemik doku mühendisliğinde biyosinyal olarak kullanılan bir osteojenik büyüme faktörüdür. Büyüme faktörlerinin ani ve kontrolsüz salımları istenmeyen etkilere neden olmakta, bunun üstesinden gelmek amacıyla büyüme faktörleri taşıyıcı sistemlere yüklenmektedir. Metal Organik Kafesyapıları (MOF), kimyasal, ısıl ve hidrotermal kararlılıkları, yüksek gözenek oranı/yüzey alanı ile ilaç yükleme/salım uygulamalarındaki problemlerin aşılmasında kullanılabilecek malzemelerdir. MOF malzemelerin alt sınıfı zeolit benzeri yapıya sahip ZIF (*Zeolitic Imidazolate Framework*) yapıları, toksik olmayan ve biyouyumlu özellikleri nedeniyle ilaç salım sistemleri tasarımında ayrıcalıklı özelliklere sahiptir. Tez çalışmasında, BMP-6 büyüme faktörünün ZIF-8 nanokristallerine enkapsülasyonu (BMP-6@ZIF-8) ile MOF bazlı biyomolekül taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, bu yapıların doku iskelelerine yüklenerek kontrollü salım davranışının incelenmesi ve bunların kemik doku mühendisliğinde kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda BMP-6@ZIF-8 sentezi *in-situ* olarak %98 enkapsülasyon verimi ile gerçekleştirilmiş, partiküllerin karakterizasyonu XRD, SEM ve FTIR-ATR analizleri ile yapılmıştır. Ardından, elektroeğirme yöntemiyle ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristalleri içeren polikaprolakton fibröz membranlar hazırlanmış, SEM ve su tutma analizleri ile karakterize edilmiştir. Membranlardan BMP-6 salım kinetiğinin Korsmeyer-Peppas modeline uyduğu, *pseudo-Fickian* davranışı gösterdiği bulunmuştur. Membranların kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla, MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreleriyle *in-vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş, hücre üremesi Presto Blue ve osteojenik farklılaşma RT-PCR analizleri ile tayin edilmiştir. Membranların kemik iyileşmesine katkısı *in-vivo* deneyler ile belirlenmiştir. Wistar albino ratlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli oluşturulmuş ve kemik iyileşmesi mikro-BT ile analizlenmiştir. İmplantasyondan 8 hafta sonra membran içermeyen defekte göre PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarda 2.3 kat daha fazla yeni kemik hacmi oluşumu gözlemlenmiştir. Tez çalışmaları 218M791 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Temmuz 2020, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Metal Organik Kafesyapı (MOF), Zeolitik İmidazolat Kafesyapı-8 (ZIF-8), Osteojenik Farklılaşma, Kemik İyileşmesi

ABSTRACT

Master Thesis

FABRICATION of BMP-6 RAINFORCED POLYCAPROLACTONE BASED FIBROUS TISSUE SCAFFOLD and *IN-VITRO* BONE TISSUE ENGINEERING

Özge TOPRAK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Ass. Prof. Dr. Ayse KARAKECILI

In bone tissue engineering approach, bone regeneration, cell growth and osteogenic differentiation are supported by osteogenic growth factors. Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) is an osteogenic growth factor with osteoinductive activity, which is frequently used in bone tissue engineering. Burst and uncontrolled releases of growth factors cause undesirable effects. For this reason, particulate carrier systems are used. Metal Organic Frameworks (MOF) are materials that can be used to overcome problems in drug loading/release applications with their outstanding chemical, thermal, hydrothermal stability, and high porosity/surface area. Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF) structures, which are a sub-class of MOF materials, have a zeolite-like structure, and have privileged properties in the design of drug release systems due to their non-toxic and biocompatible properties. In this thesis, it is aimed to develop a MOF-based biomolecule carrier system by encapsulating BMP-6 into ZIF-8 nanocrystals (BMP-6 @ ZIF-8) and investigate their use in bone tissue engineering. Accordingly, the synthesis of BMP-6 @ ZIF-8 was performed *in situ* and encapsulation efficiency was calculated as 98%. The characterization of the nanocrystals was carried out by XRD, SEM and FTIR-ATR analyses. Subsequently, polycaprolactone fibrous membranes containing ZIF-8 or BMP-6 @ ZIF-8 nanocrystals were prepared by electrospinning and characterized by SEM analysis and swelling tests. The release behavior of BMP-6 from membranes was investigated and it was found that the release kinetics fits Korsmeyer-Peppas model and shows pseudo-Fickian behavior. *In vitro* and *in vivo* experiments were carried out to investigate the application of membranes in bone tissue engineering applications. *In vitro* cell culture studies with MC3T3-E1 pre-osteoblast cells were carried out for 21 days. Cell growth was determined by Presto Blue analysis and osteogenic differentiation was examined by RT-PCR analysis. *In vivo* experiments were performed by applying the critical-sized cranial bone defect model to Wistar albino rats and bone healing was analyzed by micro-CT. After 8 weeks from implantation, 2.3 times more bone volume was observed in rats receiving PCL/BMP-6@ZIF-8 membranes when compared to control groups without membrane. Studies were supported by TÜBİTAK under grant no 218M791.

July 2020, 85 pages

Key Words: Metal Organic Framework (MOF), Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8), Osteogenic Differentiation, Bone Regeneration

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, beni yetiştiren ve bugünlere getiren canım aileme, her zaman yanımda olan daimî dostlarım Bengü GETİREN ve Ceren GÖKALP'e müteşekkirim, iyi ki varsınız.

Üniversite hayatım boyunca bilgisiyle, tecrübesiyle ve doğru yönlendirmeleriyle yolumu aydınlatan Sayın Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ve Sayın Hocam Doç. Dr. Berna TOPUZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi), yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ'a (Erciyes Üniversitesi Temel Eczacılık Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) teşekkür ederim, hakkınız ödenmez.

Yüksek lisans tez çalışmam sürecinde 218M791 numaralı 1002 projesi kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın RT-PCR çalışmaları için laboratuvar imkânı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, çalışmalarım boyunca yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı) ve laboratuvarlarını benimle paylaşan ÖZDAĞ LAB. ekibinden Araştırma asistanı Sayın Seda TAŞIR YILMAZ'a, Edibe Ece ABACI'ya, Sülgün CHARYYEVA'ya ve Laleh MADAYEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın *in vivo* çalışmalarında yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Çağdaş OTO'ya (Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi), Uzman Dr. Yanad Abou Monsef'e (Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Pataloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ve bana laboratuvarlarını açarak yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Kaan ORHAN'a (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Öğretim Üyesi) ve Dr. Mert OCAK'a (Ankara Üniversitesi Temel Tıp Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkürlerimi borç bilirim.
Son olarak laboratuvar çalışmalarım boyunca ailem olan, desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Mert ERDEK'e, Dr. Serdar KORPAYEV'e, Şeyda GÖKYER'e, Şevval ERSOY'a, Toygun ŞAHİN'e ve Ayşe GÜNYAKTI'ya çok teşekkür ederim.

Özge TOPRAK
Ankara, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER **3**
2.1 Kemik Doku Mühendisliği **3**
2.1.1 Kemik yapısı ve özellikleri **8**
2.1.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler **10**
2.1.3 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörleri **15**
2.2 Elektroeğirme Yöntemi **16**
2.2.1 Elektroeğirmeyi etkileyen parametreler **18**
2.2.2 Elektroeğirme ve kemik doku mühendisliği uygulamaları **24**
2.3 Metal-organik kafesyapı (MOF) **25**
2.3.1 MOF'ların biyomedikal alanında uygulamaları **27**
2.3.2 Zeolitik imidazolat kafesyapı (ZIF) **29**
3. GEREÇ ve YÖNTEM **34**
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler **34**
3.2 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Sentezi **35**
3.3 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Karakterizasyonu **35**
3.3.1 BMP-6 yükleme veriminin tayini **36**
3.3.2 Kristal yapı tayini **36**
3.3.3 Kristallerin Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma (FTIR-ATR) analizi **36**
3.3.4 Kristallerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapı tayini **36**
3.4 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Fibröz Membranların Elektroeğirme Yöntemi ile Üretilmesi **37**
3.5 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Fibröz Membranların Karakterizasyonu **37**
3.5.1 Fibröz membranların morfolojik yapı tayini **37**
3.5.2 Fibröz membranların su tutma kapasitesi analizi **38**
3.6 Fibröz Membranlardan BMP-6 Salım Kinetiğinin İncelenmesi **38**
3.7 MC3T3-E1 Preosteoblast Hücreleri ile *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları **38**
3.7.1 PCL membranlar üzerinde hücre üremesinin tayini **39**
3.7.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile hücre morfolojisinin tayini **39**
3.7.3 Alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi tayini **40**
3.7.4 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile hücre farklılaşmasının tayini **40**
3.8 *In Vivo* Kemik İyileşmesinin İncelenmesi **41**
3.8.1 Kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli **42**

3.8.2 Mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) 42
3.8.3 Histolojik analiz 43
3.9 İstatistiksel analizler 44
4. BULGULAR 45
4.1 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Sentezi ve Karakterizasyonu 45
4.2 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Membranlarının Karakterizasyonu 50
4.3 BMP-6 Salım Kinetiğinin İncelenmesi 53
4.4 *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları 56
4.4.1 Hücre üremesinin tayini 57
4.4.2 Hücre morfolojisinin tayini 59
4.4.3 ALP aktivitesi tayini 61
4.4.4 RT-PCR ile hücre farklılaşmasının tayini 62
4.5 *In Vivo* Kemik İyileşmesi 66
4.5.1 Kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli 67
4.5.2 Mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) 68
4.5.3 Histolojik analiz 70
5. SONUÇLAR 73
KAYNAKLAR 75
EK 1 BMP-6 kalibrasyon grafiği 84
ÖZGEÇMİŞ 85

SİMGELER DİZİNİ

a	Ağırlık
h	Hacim
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
gr	Gram
m^2	Metrekare
cm^2	Santimetrekare
ng	Nanogram
pg	Pikogram
kV	Kilo volt
nm	Nanometre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
^oC	Santigrat
µm	Mikrometre
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	hidroksiapatit
Co	Kobalt
Mo	Molibden
Ti	Titanyum
Cr	Krom
Al	Alüminyum
V	Vanadyum
Ti_6Al_4V	%6 alüminyum ve %4 vanadyum içeren titanyum
Zr	Zirkonyum
$Ca_3(PO_4)_2$	Trikalsiyum fosfat
mIm	İmidazol
$C_4H_6N_2$	2-metilimidazol
$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Çinko nitrat hekzahidrat
HCl	Hidroklorik asit
Θ	Teta
dk	Dakika
sa	Saat
Au-Pd	Altın-Paladyum
p	Anlamlılık seviyesi
K	Model sabiti
n	Model derecesi
A_0	Kuru ağırlık
A_t	Belirli bir t anındaki ağırlık
NaOH	Sodyum hidroksit
°	Derece
Q	Kümülatif salım
C	Derişim
Hz	Hertz
R^2	Regresyon katsayısı

M_a	Molekül ağırlığı
M	Molar
mM	Milimolar

Kısaltmalar

THF	Tetrahidrofuron
DCM	Diklorometan
HFIP	Hekza floro izopropanol
TFE	Trifloro etanol
DMF	Dimetil formamit
PLGA	Poli (laktid-ko-glikolik) asit
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteinleri
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
BSA	Sığır serum albümin
FBS	Fetal sığır serum
MOF	Metal-organik kafesyapı
ZIF	Zeolitik imidazol kafesyapı
MC3T3-E1	Pre-osteoblast hücre hattı
HA	Hidroksiapatit
RPM	Hızlı perfringens besi ortamı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
PA	Pensilvanya
CA	Kaliforniya
FL	Florida
TN	Tennessee
GDF	büyüme farklılaşma faktörü-5
VEGF	vasküler endotelyal büyüme faktörü
nHA	nano- hidroksiapatit
PCL	poli(Ɛ-caprolakton)
PLGA	poli (laktik-ko-glikolik) asit
PDGF	trombosit kaynaklı büyüme faktörü
FGF	fibroblast büyüme faktörü
TCP	Trikalsiyum fosfat
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü
EGF	epidermal büyüme faktörü
PEG	polietilen glikol
PLA	polilaktik asit
PU	poliüretan
PVA	polivinil alkol
Hg-292	osteoblast hücre hattı

DCM	diklorometan
DMF	dimemtil formamid
ELISA	Enzime Bağlı İmmüno Emici Test Testi
MEM Alpha	Minimum temel besi ortamı
FBS	fetal sığır serum
pen/strep	penisilin-streptomisin pen/strep
HMDS	hekzametildisilazan
PXRD	toz X-ışını kırınımı
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DPBS	*Dulbecco's* fosfat tampon çözeltisi
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribo nükleik asit
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
mikro-BT	Mikro-bilgisayarlı tomografi
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
ROI	İlgili bölge
TV	Doku hacmi
BV	Kemik hacmi
HE	Hematoksilin ve eozin
BSA	Sığır seum albumin
DOX	doksorubisin
PXRD	toz X-ışını kırınımı
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma
COL-I	Kollajen 1
RUNX-2	Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2
OPN	Osteopontin
ALP	Alkalin fosfataz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kemiğin hiyerarşik yapısı 9
Şekil 2.2 Polimer nanofiber yapılarının uygulama alanları 17
Şekil 2.3 Elektroeğirme sisteminin şematik gösterimi 18
Şekil 2.4 Voltaj artışıyla iğne ucundan polimer jeti oluşumunun şematik gösterimi 19
Şekil 2.5 MOF'un şematik yapısı 26
Şekil 2.6 MOF'ların sentez yöntemleri ve uygulamaları 26
Şekil 2.7 MOF'ların biyomedikal alandaki uygulamaları 27
Şekil 2.8 Çeşitli ZIF yapıları 30
Şekil 2.9 ZIF-8'in şematik yapısı 31
Şekil 4.1 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin toz-XRD desenleri 47
Şekil 4.2 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin FTIR-ATR spektrumları 48
Şekil 4.3 ZIF-8 (a-b) ve BMP-6@ZIF-8 (c-d) nanokristallerinin SEM görüntüleri 49
Şekil 4.4 Elektroeğirilmiş PCL (a1, a2), PCL/ZIF-8 (b1, b2) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (c1, c2) fibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a1, b1 ve c1 X5000 büyütme, a2, b2 ve c2 X20000 büyütme. Turuncu oklar fiber içindeki nanokristalleri işaret etmektedir.) 51
Şekil 4.5 PCL ve PCL/ZIF-8 fibröz doku iskelelerinin PBS (pH: 7.4) ortamında şişme eğrileri 52
Şekil 4.6 PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membrandan %kümülatif BMP-6 salımı (küçük grafik ilk 24 saatlik salım davranışını göstermektedir) 53
Şekil 4.7 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait Presto Blue analizi sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=4, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, **** $p<0.0001$; kültürün ilk günü kontrolken PCL için #, PCL/ZIF-8 için Δ, PCL/BMP-6@ZIF-8 için ● simgeleri kullanılmıştır.) 57
Şekil 4.8 Osteojenik farklılaşma ortamında PCL (a1, a2), PCL/ZIF-8 (b1, b2), PCL/BMP-6@ZIF-8 (c1, c2) doku iskeleleri üzerinde kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 7. (a1, b1, c1) ve 14. (a2, b2, c2) günlerine ait SEM görüntüleri (Temel görüntüleme X1000, küçük görüntü X4000 büyütme ile çekilmiştir.) 60
Şekil 4.9 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP aktiviteleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.005$, kontrol 7. gün iken Δ $p<0.05$, Δ Δ $p<0.01$, Δ Δ Δ $p<0.005$ ve kontrol 14. gün iken ● $p<0.05$, ● ● $p<0.01$, ● ● ● $p<0.005$) 61

Şekil 4.10 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl COL-I ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.005, kontrol 7. gün iken Δ p<0.05, Δ Δ p<0.01, Δ Δ Δ p<0.005 ve kontrol 14. gün iken ● p<0.05, ● ● p<0.01, ● ● ● p<0.005) 63

Şekil 4.11 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RUNX-2 ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.005, kontrol 7. gün iken Δ p<0.05, Δ Δ p<0.01, Δ Δ Δ p<0.005 ve kontrol 14. gün iken ● p<0.05, ● ● p<0.01, ● ● ● p<0.005) 64

Şekil 4.12 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OPN ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.005, kontrol 7. gün iken Δ p<0.05, Δ Δ p<0.01, Δ Δ Δ p<0.005 ve kontrol 14. gün iken ● p<0.05, ● ● p<0.01, ● ● ● p<0.005) 65

Şekil 4.13 Rat kafatasında açılmış kritik boyutlu kranial defekti (a) ve membran implantasyonu (b) işlemi 67

Şekil 4.14 Sekiz hafta sonunda defektli (a), PCL (b), PCL/ZIF-8 (c) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (d) implante edilmiş rat kafalarındaki iyileşme (siyah düz ok defekt bölgesini, noktalı ok ise iyileşmeden sonra kalmış dikişi işaret etmektedir) . 68

Şekil 4.15 *In vivo* çalışmada kontrol grubu (a), PCL (b), PCL/ZIF-8 (c) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (d) membranları implantasyonundan 8 hafta sonra elde edilen mikro-BT görüntüleri (siyah alan kemiksiz bölgeyi, açık renk alan kemiği göstermektedir) 69

Şekil 4.16 Mikro-BT görüntülerinin işlenmesiyle elde edilen yeni kemik oluşum hacmi yüzdesi (a), yapı kalınlığı (b), yeni kemik kesişim yüzeyi (c) ve yeni kemik yüzey yoğunluğu (d) grafikleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=6, kontrol grubu membransız yara iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005, **** p<0.001; kontrol grubu PCL iken Δ, PCL/ZIF-8 iken □ olarak simgelenmiştir) 70

Şekil 4.17 Kontrol grubu, PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları implante edilmiş gruplara ait *Masson's trichrom* boyaması yapılmış histolojik görüntüler (X4 büyütmedeki görüntülerdeki işaretli bölgelerden x20 büyütmede görüntü alınmıştır) 71

Şekil 4.18 Kontrol grubu, PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları implante edilmiş gruplara ait HE boyaması yapılmış histolojik görüntüler (x4 büyütmedeki görüntülerdeki işaretli bölgelerden x20 büyütmede görüntü alınmıştır) 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Otolog kemik greftlerinin, allogreftlerin ve ksenograftların avantaj ve dezavantajları 6
Çizelge 2.2 Kemik rejenerasyonunda piyasada mevcut olan ürünler 7
Çizelge 2.3 Doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler ve önemleri 11
Çizelge 2.4 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları 13
Çizelge 2.5 Elektroeğirmeyi etkileyen parametreler 20
Çizelge 3.1 RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri 41
Çizelge 4.1 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membranların elektroeğirme parametreleri 50
Çizelge 4.2 PCL/BMP-6@ZIF-8 membranından BMP-6 salımının matematiksel modelleme verileri 55

1. GİRİŞ

Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile hedeflenen doku rejenerasyonunda büyüme faktörleri, fonksiyonel yapıların elde edilmesi için anahtar görevi gören moleküllerdir. Osteojenik büyüme faktörleri varlığında hücre üremesi ve osteojenik farklılaşmanın büyük ölçüde desteklendiği bilinmektedir. TGF-β (transforming growth factor) ailesinin alt grubunda bulunan kemik morfogenetik proteini-6 (BMP-6), osteoindüktif kapasiteye sahip olduğu bilinen ve kemik doku mühendisliğinde biyosinyal olarak kullanımı ilgi çeken bir büyüme faktörüdür. Bununla birlikte, büyüme faktörlerinin bulundukları yapıdan ani ve kontrolsüz salımları istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması amacıyla büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemlere yüklenmesi önemli bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Osteojenik büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemlere yüklenmesine ilişkin olarak sıklıkla tercih edilen yöntem fiziksel enkapsülasyon yöntemidir. Çoğunlukla polimerik partiküllerin kullanıldığı yaklaşımda, yapı içerisine hapsedilen moleküllerin çevre dokuya salımı difüzyon/degradasyon kontrolü ile gerçekleşmektedir. Bu sistemlerde karşılaşılan en önemli problemler, partikül üretimi/biyosinyal molekül enkapsülasyonu sırasında uygulanan sert kimyasal ve fiziksel koşullar nedeniyle oluşabilecek aktivite kayıpları, düşük enkapsülasyon verimi, ani salım (*burst release*) ve salımın istenen hız ve sürelerde gerçekleştirilememesidir. Yeni bir malzeme grubu olan organik-inorganik hibrit metal-organik kafesyapılar (MOF), kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi adına kullanım potansiyeli yüksek malzemelerdir. Kimyasal, ısıl ve hidrotermal kararlılıkları yüksek olan bu malzemeler, yüksek gözenek oranı ve yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle son yıllarda ilaç yükleme/salım uygulamalarında var olan problemlerin aşılmasında kullanılabilecek üstün özellikli malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Zeolit benzeri yapıya sahip ZIF (*Zeolitic Imidazolate Framework*) yapıları, MOF malzemelerin son yıllarda en fazla çalışılan ısıl, hidrotermal ve kimyasal kararlılığı yüksek olan alt sınıfıdır. Bu malzemeler yüksek kimyasal kararlılıkları, toksik olmayan, biyouyumlu özellikleri nedeniyle ilaç salım sistemleri tasarımında ayrıcalıklı özelliklere sahiptir.

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi ışığında, tez çalışması kapsamında, BMP-6 büyüme faktörünün ZIF-8 nanokristallerine enkapsülasyonu (BMP-6@ZIF-8) ile MOF bazlı

biyomolekül taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, bu yapıların doku iskelelerine yüklenerek kontrollü salım davranışının incelenmesi ve doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğinde kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç ve hedefler doğrultusunda öncelikle ZIF-8 ve BMP-6 yüklü ZIF-8 sentezi ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ardından, elektroeğirme yöntemi kullanılarak ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristalleri yüklü polikaprolakton fibröz membranlar hazırlanmıştır. Membran yapıların karakterizasyonunun ardından, yapıdan BMP-6 salım davranışı incelenmiş ve salım kinetiği uygun modeller kullanılarak tanımlanmıştır. Membran yapısındaki doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla ise, MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreler ile *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş, hücre üremesi ve osteojenik farklılaşma üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Son olarak hazırlanan membranlar ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda, membranlar Wistar albino ratlara implante edilmiş ve kemik oluşumu takip edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ VE KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan genel bilgiler ve literatür özetleri üç ana başlık altında sunulmuştur. İlk ana başlıkta, doku mühendisliği, kemik doku mühendisliği, kemiğin yapısı ve özelliklerini takiben biyomalzemeler, büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin kontrollü salımı ve matematiksel modelleri incelenmiştir. İkinci ana başlıkta, elektroeğirme yöntemi ve doku mühendisliği uygulamalarına yer verilmiştir. Üçüncü ana başlıkta ise, tez çalışması kapsamında önemli bir yer tutan metal-organik kafesyapıları (*metal-organic framework*, MOF), bu yapıların biyomedikal uygulamaları ve MOF'ların bir alt grubu olan zeolitik imidazol kafesyapısı-8 (ZIF-8) incelenmiştir.

2.1 Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, doku yenilenmesi amacıyla kimyasal, biyolojik ve mühendislik prensiplerini kullanarak çeşitli yöntemler geliştiren modern bir bilimsel disiplindir (Goonoo vd. 2013, Zhao vd. 2018, Christy vd. 2020). '**Doku mühendisliği**' terimi ilk kez 1990'lı yıllarda Langer ve Vacanti tarafından tanımlanmış (Stratton vd. 2016) ve 1988'de Ulusal Bilim Vakfı (NSF) çalıştayında dile getirilmiştir (O'Brien 2011). Doku mühendisliği, kusurlu olan veya farklı patolojik durumlardan dolayı kaybedilen doku fonksiyonlarının yenilenmesi, sürdürülmesi veya iyileştirilmesine odaklanan disiplinlerarası bir alandır (Christy vd. 2020). Günümüzde, doku ve/veya organ transplantasyonuna alternatif olarak yeni bir tedavi potansiyeli sunan doku mühendisliği, gelişen bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Christy vd. 2020, Khan ve Tanaka 2018, Dhandayuthapani vd. 2011).

Doku mühendisliği yaklaşımında izlenen stratejiler genel olarak: (i) sadece dokuya spesifik veya kök hücrelerin izole edilerek hücrelerin çoğaltılması ve hasarlı bölgeye yerleştirilmesi, (ii) sadece hasarlı bölgeye spesifik olarak üretilmiş biyomalzemelerin kullanılması, (iii) biyosinyal moleküllerin (büyüme faktörlerinin) doku büyümesini ve yenilenmesini tetiklemesi amacıyla direkt hasarlı dokuya enjekte edilerek veya bir taşıyıcıya yüklenerek kullanılması ve (iv) tüm bu stratejileri bünyesinde bulundurarak

biyosinyal moleküllerle zenginleştirilmiş doku iskelelerine hücre kültürünün uygulanmasıyla yapay doku elde edilerek hasarlı bölgeye implantasyonudur (Göz, 2014).

Doku mühendisliği ilgilenilen doku türlerine göre genel anlamda iki türe ayrılmaktadır: (a) cilt, kan damarı, tendon/ligament, kalp yaması, sinir ve iskelet kası ile ilgilenen yumuşak doku mühendisliği, (b) sert doku mühendisliği veya diğer bir ifadeyle **kemik doku mühendisliği** (Kumbar vd. 2008, Christy vd. 2020).

Kemik dokusu, kemikte meydana gelen hasarları tedavi etmek amacıyla greftlerin veya biyomateryallerin kullanıldığı, dünyanın en sık nakledilen ikinci dokusudur (Turnbull vd. 2018). Kemik dokusu, sadece kritik olmayan boyut kusurları (<6 mm) için şaşırtıcı bir kendi kendini iyileştirme kapasitesine sahiptir. Bunun ötesinde, kritik boyut kusurları için klinik müdahale gerektirmektedir ve kaynamayan kemik kırıkları ve kritik boyuttan daha büyük kemik kusurları önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Pereira vd. 2020).

Enfeksiyonlar, kemik tümörleri ve kemik zedelenmeleri gibi bozukluklar kemik yenilemesiyle tedavi edilebilmektedir (Gong vd. 2015). Kemik kendini sabitlemek için doğal bir kapasiteye sahiptir, ancak kemik iyileşmesinin tamamlanamayacağı ve yenilenmesini gerektiren çok sayıda durum mevcuttur. Kemik kusurları yaşayan çok sayıda hasta için kemik grefti veya ikamesi gerektiğinden, kemik rejenerasyonu doku mühendisliğinde çekici bir alan haline gelmektedir (Christy vd. 2020).

Kemik doku mühendisliğinin amacı, yeni kemik rejenerasyonunu arttırmak için malzeme mühendisliği ve biyolojik kaynakların bir arada kullanımını optimize ederek doku rejenerasyonu ve onarımı için uygun bir ortam sağlamak ve kemik dokusunun işlevini düzeltmek ve iyileştirmektir. Kemik doku mühendisliği, on yıllardır kemik travmasıyla başa çıkmanın en zorlayıcı yaklaşımlarından biri olarak ortaya çıkmıştır. Osteoporoz, osteoartrit ve neoplazmlar nedeniyle kemik kusurlarını tedavi etmek için çeşitli biyomalzemeler kullanılarak geliştirilen metalik protezler, polimerik doku iskeleleri ve hidrojel yapıların kullanımı gündeme gelmiştir (Christy vd. 2020).

Klinik olarak bakıldığında, gençlerde çoğu kemik, yüksek kemik rejenerasyon kapasitesi nedeniyle cerrahi müdahale olmadan iyileşebilmektedir. Büyük kemik defektlerinde, kemik rejenerasyon kalıbından yoksunluk nedeniyle tıbbi müdehaleye ihtiyaç duyulmaktadır. Yaşlı hastaların durumunda ise, ağır kırıklarda kemiklerin yanlış kaynaması (malünyon) veya kaynamaması gibi problemler doğal iyileşmede ciddi bir sorun yaratmaktadır. Birleşmeyen veya yanlış birleşen kırıklar kemik doku mühendisliğinde büyük bir zorluktur. Kritik boyuttaki kemik defekti hastanın yaşamı boyunca tedavi edilememektedir. Bu durum, kemik greftlerini, kemiğin yerine geçebilecek malzemeleri, büyüme faktörlerini, serbest fibula vaskülarize greftleri ve kemiğe yardımcı olmak, stabilize etmek ve/veya rejenere etmek için metal bazlı implantasyonların kullanımını zorunlu kılmaktadır. Kemik onarımında altın standart, otolog kemik greftleri, allogreftler ve ksenograftların kullanımını içermektedir (Christy vd. 2020; Turnbull vd. 2018). **Otolog kemik grefti**, yükleyici olmayan bir bölgeden hastanın kendisinden alınmakta ve kusurlu bölgeye nakledilmektedir. **Allojenik kemik greftleri** ise başka bir kişiden veya bir kadavradan sağlanan kemik greftleridir. **Ksenograftlar** insan dışı organizmalardan, genellikle inek ve domuz gibi hayvanlardan alınarak türetilen malzemelerdir (Christy vd. 2020). Bu greftlerin avantaj ve dezavantajları **Çizelge 2.1**'de verilmiştir (Pereira vd. 2020). Kemik doku mühendisliği stratejilerinin sınırlı greft arzının üstesinden gelmesi önerilmiştir. Tam ve başarılı kemik rejenerasyonu çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir: hastanın yaşı, sağlığı, cinsiyeti ve kemik rejenerasyonu için ideal iskelenin biyoaktivite ve osteoindüktivite gibi faktörleri bir araya getirmesi gerekmektedir (Pereira vd. 2020).

Piyasada kemik rejenerasyonuna yönelik satılan mevcut ürünlerin, ana işlevi kemik değişimi esasına dayanmaktadır (Pereira vd. 2020). Bu kapsamda genellikle metal implantlar tercih edilmektedir. Metaller iyi mekanik mukavemet ve bütünlüğe sahiptir. Dezavantajları ise kemik yoğunluğundaki azalma, sertlik, enfeksiyonlar ve kronik ağrı, aşınma ve revizyon cerrahisi riskidir. Kemik yenilenmesini başarılı bir şekilde gerçekleştiren çeşitli gözenekli iskeleler kemik rejenerasyonuna yardımcı olmak ve yönlendirmek için kullanılmaktadır (Christy vd. 2020). Bununla birlikte, iskelelerinin zayıf osteointegrasyon ve sınırlı vaskülarizasyon dahil olmak üzere halen üstesinden gelinmesi gereken sınırlamaları mevcuttur. Yapay doku iskelelerinde gözenekli yapıların

oluşturulması, hücre ve damar infiltrasyonuna izin verdiğinden osteointegrasyonu desteklemede önemli bir yapısal faktördür. Ayrıca, büyüme faktörleri veya sağlıklı kemik dokusu ile entegrasyonu arttırmaya yönelik kullanılan kaplamaların yapay doku iskelelerinin osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerini arttırdıkları bilinmektedir. Birçok kemik grefti alternatifi şu anda ortopedik kullanım için ticari olarak mevcuttur. Bileşimleri mineral kompozitler, seramikler, mineral çimento, biyoaktif camlar ve sentetik kemik ikamelerini içermektedir. **Çizelge 2.2**, kemik lezyonlarının tedavisi için piyasada mevcut olan ürünleri özetlemektedir. Ticarileşmiş ürünlerinin çoğu hasarlı bölgeyi doldurmak amacıyla kullanılmakta ancak kemik yenilenmesini teşvik etmemektedir.

Çizelge 2.1 Otolog kemik greftlerinin, allogreftlerin ve ksenograftların avantaj ve dezavantajları

Biyomateryal	**Avantajları**	**Dezavantajları**
Otolog kemik greftleri	Osteokondüktif Osteoindüktif Osteojenik Bağışıklık komplikasyonu yok Hastalık bulaşımı göstermez	Hazırda bulunmama Ağrı/kronik ağrı Kırık ve enfeksiyon riski Yetersiz damarlanma Ek cerrahi işlemler
Allogreftler	Kolay kullanım Osteokondüktif Osteoindüktif Kolay bulunabilir	Hastalık bulaşması Alıcı reddi Ön işlem gerektirmesi Değişim gerekmesi riski Etik sorunlar
Ksenograftlar	Osteokondüktif Osteoindüktif Kullanılabilirliği yüksek Kolay bulunabilir Ucuz	Alıcı reddi Hayvansal hastalık bulaşması riski Sınırlı osteojenik aktivite Etik sorunlar Yetersiz damarlanma

Gelecek nesil ürünlerden, büyüme faktörleri ve/veya hücrelerin dahil edilmesiyle çok işlevli olması beklenmektedir (Pereira vd. 2020). Hibrid iskelelerin geliştirilmesini de içeren ilginç ilerlemelere karşın, klinik uygulamaya geçilmesinde halen ele alınması gereken önemli zorluklar vardır (Pereira vd. 2020).

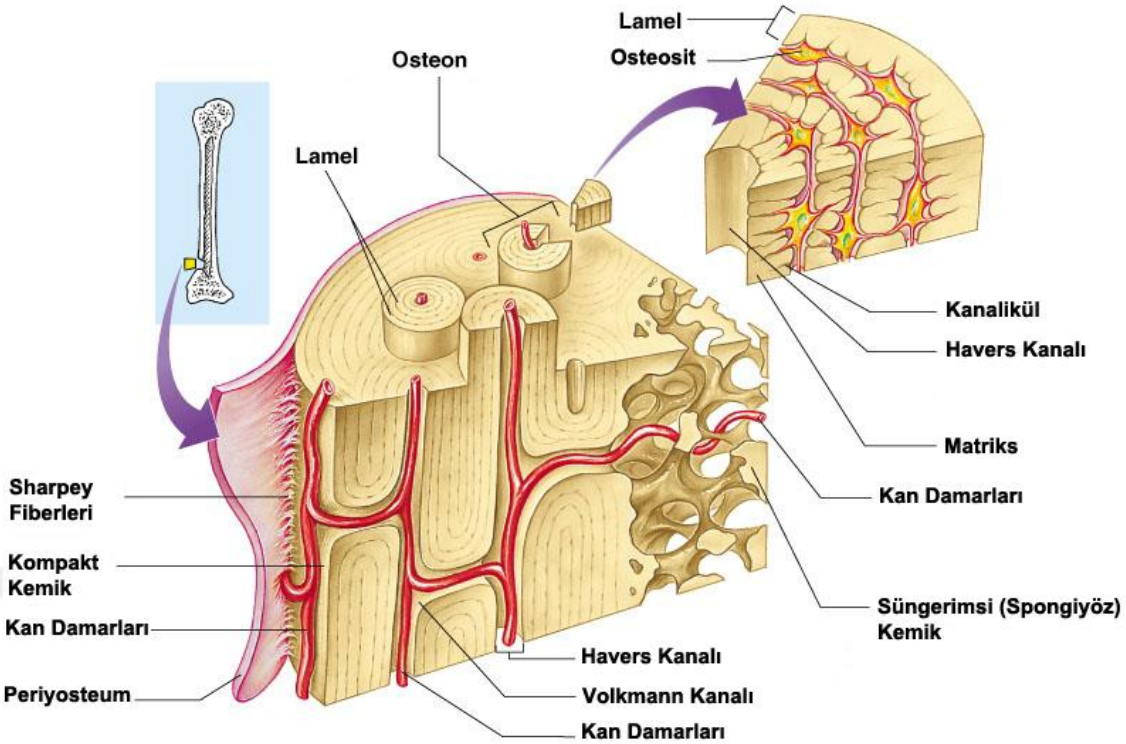
Çizelge 2.2 Kemik rejenerasyonunda piyasada mevcut olan ürünler

Bileşim	**Yapı**	**Ürün**	**Şirket**
Kalsiyum fosfat	Macun	Norian SRS	Synthes (PA, ABD)
%50 kalsiyum sülfat, %10 kalsiyum fosfat ve %40 DBM	Macun	PRO-STIM	Wright Medical Technology (TN, ABD)
Hidroksit ve iyodoform karışımı	Macun	Vitapex	Neo Dental Chemical Products (Tokyo, Japonya)
Silikat katkıl kalsiyum fosfat	Macun	Infuse	Medtronic (Minneapolis, ABD)
%19,5 demineralize kemik, %12,5 sünger membranla ve ters-faz besi ortamı (RPM)	Mastik ya da macun	OrthoBlast	Isotis Orthobiologics (CA, ABD)
Gözenekli membran katkılı HA granülleri	Macun/Katı	ACTIFUSE	Bexter International (II, ABD)
DBM/jelatin	Jel/Katı/ Macun	Optefil	Exactech (FL, ABD)
Kalsiyum fosfat ve DBM	Mastik	Allomatrix	Wright Medical Technology (TN, ABD)
Çift fazlı kalsiyum fosfat ve kolajen tip I	Katı	CopiOs	Zimmer (IN, ABD)
Gözenekli hidroksiapatit granülleri + gözenekli domuz jelatini bazlı köpük matriks	Katı	7embr Bioactive 3D	Pioneer Surgical Technology (MI, ABD)
Sığır kolajen tip 1 ile bir arada gözenekli β-TCP	Blok/Köpük/ Şerit/Parça	Vitoss	Orthovia (PA, ABD)

2.1.1 Kemik yapısı ve özellikleri

Kemik yapısının taklit edilebilmesi için doğal kemik yapısının ve iyileşme sürecinin anlaşılması en önemli adımlardan biridir. Kemik dokusu, hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) içeren bir mineral faz, ~%90 tip I kollajen, ~%5 kollajenöz olmayan proteinler ve ~%2 lipit içeren bir organik faz ve %10-20 arasında su içeren kompleks, heterojen, hiyerarşik olarak yapılandırılmış bir dokudur (Boskey 2013). Bir başka deyişle kemik, nanoölçekten makro ölçeğe kadar hiyerarşik bir yapıya sahip, organik (kollajen) ve inorganik (esas olarak nano-hidroksiapatit) bileşenlerden oluşan bir yapıdır (Christy vd. 2020). Kemiğin hiyerarşik yapısı **Şekil 2.1**'de verilmiştir (Göz 2014).

Kemiğin hücresel bileşenleri osteojenik öncü hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliğinin hematopoietik elementlerinden oluşmaktadır. **Osteoblastlar** olgun, metabolik olarak aktif ve kemik oluşum sürecinde rol oynayan hücrelerdir. Osteoblastlar mineral ile temas ettiğinde osteositlere ayrılmaktadırlar. **Osteositler**, kemik matrisi içinde hapsolmuş olgun osteoblastlardır. Her osteositten, silindirik kanallar yoluyla kan damarlarına ve iletişimine izin veren diğer osteositler uzanmaktadır. **Osteoklastlar**, terminal olarak farklılaşmış osteoblast hücreleridir. Bu hücreler kemik yapısını ve metabolizmasını desteklemekte, hormonal ve hücresel mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedirler. Kemik oldukça vaskülarize yapıdadır ve kan akışı metabolik aktivitesini düzenler. İskelet kemikleri yapısal destek sağlar, harekete izin verir ve organlara koruma sağlarken mineral dengesini ve kan pH'sını da düzenler (Pereira vd. 2020).



Şekil 2.1 Kemiğin hiyerarşik yapısı

Kemiğin iyileşme sürecini etkileyen temel faktörler kan dolaşımının varlığı, mekanik stabilite, hasarın boyutu, çevre doku yaralanmalarının etkisi ve ciddiyetidir. Kırık iyileşme süreci rejeneratif bir süreç olarak kabul edilebilir ve karmaşık bir biyolojik süreçtir. Kemik, doğrudan veya dolaylı kırık iyileşmesi ile iyileşmektedir. En yaygın süreç dolaylı kırık iyileşmesidir ve birbirini takip eden üç aşamada ortaya çıkar: erken enflamatuar aşama, onarım aşaması ve yeniden yapılanma aşaması.

Enflamatuar aşamada, kırık bölgesinde ilk birkaç saat ve gün boyunca bir hematom gelişmektedir. Enflamatuar hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve fibroblastlar kemiğe prostaglandin aracılığında sızmaktadır. Bu, vasküler doku büyümesi ve mezenkimal hücrelerin göçü ile sonuçlanmaktadır. Vasküler iç büyüme ilerledikçe, mineralizsyonun ardından kollajen sentezi gerçekleşmekte, bu da onarım bölgesi etrafında yumuşak bir doku örtüsü oluşturmaktadır. Sonunda bu doku, kırık parçaları arasında bir köprü oluşturarak osteoblastların birikmesiyle kemikleşmektedir. Hasarlı bölge yeteri kadar bağlantılanınca, yeni oluşan kemik orjinal şekline, yapısına ve mekanik gücüne yeniden

yapılandırılmaktadır. Kırık iyileşmesi bu aşamada (yeniden yapılanma aşaması) tamamlanmaktadır. Doğrudan iyileşme doğal bir süreç değildir. Doğrudan kemik iyileşmesi meydana gelebilmesi için kırık uçlarında anatomik bir azaltma ve sabitleme gerekmektedir (Pereira vd. 2020).

Kemik iyileşmesi sürecinde, mezenkimal kök hücrelerin katılımıyla, kollajen tip I ve kollajen tip II matris üretimi ve birkaç peptit sinyal molekülünün katılımını içeren bir moleküler katmanlanma başlamaktadır. TGF-β2, -F3 gibi büyüme faktörü-beta (TGF-y) üst aile üyeleri ve büyüme farklılaşma faktörü-5 (GDF-5) de iyileşme sürecine dahil olmaktadır. Kemik morfogenetik proteini (BMP), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve metalloproteinazın etkilerinin dahil edilmesi iyileşme için anahtar faktörlerdir. Bu faktörler, kemik kusurlarının efektif bir şekilde yenilenmesini sağlamaktadır (Pereira vd. 2020).

2.1.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Kemik doku mühendisliği stratejileri, osteoporoz, kemik enfeksiyonu ve genellikle büyük kemik hasarları ile sonuçlanan kas-iskelet tümörü rezeksiyonu dahil olmak üzere çeşitli klinik koşullarda gerekli olan kemik rejenerasyonunu sağlamayı amaçlamaktadır. Kemik tedavisi için doku mühendisliği ürünleri iki gruba ayrılabilir: kemik yenilenmesini uyaranlar ve kemiğin yerine kalıcı bir çözüm sağlayanlar. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile tedavide, ideal özelliklere sahip, çeşitli biyomalzemelerden hazırlanan yapay doku iskelelerinin geliştirilmesi önemli bir basamaktır (Pereira vd. 2020; Sitharaman vd. 2008). Bu özellikler **Çizelge 2.3**'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3 Doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler ve önemleri

Doku iskelesi özelliği	Önemi
Biyouyumluluk	Enflamatuar bir yanıt başlatmadan konakçı dokuda bulunabilme kapasitesi
Osteoindüktivite	Mezenkimal hücreleri toplayabilme ve farklılaştırabilme
Kimya	Hücre davranışını etkileme
Uygun yüzey topolojisi	Adezyon, proliferasyon ve farklılaşma gibi hücresel davranışları etkileme
3 Boyutlu yapı	Yeni oluşan doku konağı 3D olarak yeni doku oluşumuna izin verme
Mekanik dayanım	Kusur alanını destekleme
	Hücre davranışını etkileme
Gözeneklilik ve gözenek yapısı	Doku büyümesi, besin maddesi ve oksijen değişimine izin verme; damarlanma ve hücre davranışını etkileme
Islanabilirlik	Uygun bir ıslanabilirlik, proteinlerin ve dolayısıyla hücre yapışmasını arttırma

Biyouyumluluk, bir biyomalzemenin implante edildiği organizmada toksik veya enflamatuar etki oluşturmaması olarak tanımlanabilir (Pereira vd. 2020). Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik geliştirilecek yapay doku iskelelerinin tasarımında yüzey topografyası, yüzey kimyası, yüzey enerjisi ve ıslanabilirlik, gözenek boyutu, şekli, mekanik özellikleri gibi parametreler kemik büyümesini ve biyouyumluluğu en üst düzeye çıkarmak için optimize edilmelidir. Ayrıca elastisite, sıkışabilme veya kayma gerilimi değeri hücre davranışını ve hatta epigenetik durumu etkileyebilmektedir. Biyomalzeme yüzeyi, biyolojik ortamla en erken teması kurduğu için yüzey özellikleri biyomalzemenin başarılı tasarımı ve tıbbi uygulaması için kritik öneme sahiptir. Malzemenin hem kimyasal hem de topografik yüzey özellikleri, protein adsorpsiyonu ve buna bağlı hücresel etkileşimlerden (hücre yapışması ve üremesi), kemiğin yeniden şekillenmesine kadar, implantasyon sonrası meydana gelen birçok biyolojik olayda rol oynamaktadır (Pereira vd. 2020).

Literatürde, birçok çalışma hücre yapışması ile **yüzey pürüzlülüğü** arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Amin Yavari vd. (2014) araştırmalarında üç yüzeyde modifiye gözenekli titanyum varyasyonu ve yüzey işleminin hücre yanıtını iyileştirdiği sonucuna varmışlardır. Qian vd. (2013) ise hücrelerin, uygun bir hücre yayılımı gösteren polikaprolakton/nano-hidroksiapatit (PCL/nHA)'nın bal peteği benzeri yapı iskelelerinde filopodial hücre uzantılarının oluşumunu gözlemlemiştir. Genel olarak, yüzey pürüzlülüğünün, kemik öncül hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırdığı sonucuna varılmıştır (Pereira vd. 2020).

Islanabilirlik ve yüzey serbest enerjisi gibi parametreler, Zhou vd. (2017) çalışmasında da görüldüğü gibi hücre büyümesini etkilemektedir. Yüzey serbest enerjisinin pürüzlülükten ziyade hücre yapışması ve üremesi için daha kritik bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır.

Kemik rejenerasyonunda kullanılacak yapay doku iskelelerinin sahip olması gereken bir diğer önemli özellik, **gözeneklilik** (Pereira vd. 2020). Kemik dokusu rejenerasyonu için bir iskelenin **gözenekliliği ve gözenek boyutu**, biyolojik olarak kemik büyümesine, damarlanmaya, hücresel göçe, protein adsorpsiyonuna ve besinlerin infiltrasyonuna izin verecek şekilde tasarlanması gereken anahtar faktörlerdendir. Gözeneklerin çok küçük olduğu durumda, hücre infiltrasyonu ve göçü engellenmektedir. Bununla birlikte, gözenek boyutunun ve gözenekliliğin artması mekanik dayanımı düşüreceğinden, dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir. (Pereira vd. 2020). Literatürde yapılmış olan çalışmalar değerlendirildiğinde, genel olarak kemik büyümesi için 100-500 μm aralığında gözenek boyutları önerilmektedir (Karageorgiou ve Kaplan 2005, Murphy vd. 2010, Pereira vd. 2020). Fukuda vd. (2011) özdeş ortamlarda 500 μm, 600 μm, 900 μm ve 1200 μm gibi farklı gözenek boyutları için osteoindüksiyon etkilerini karşılaştırmış ve 500 μm gözenek boyutunun mükemmel osteoindüksiyon sağladığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, 300 μm, 600 μm ve 900 μm dahil olmak üzere farklı gözenek boyutlarına sahip iskelelerden 600 μm gözenek boyutunda önemli ölçüde daha yüksek fiksasyon yeteneği gösterdiği gözlenmiştir (Taniguchi vd. 2016). Prananingrum vd. (2016) ise 60 μm, 100 μm, 200 μm ve 600 μm gözenek boyutlarına sahip iskeleleri tavşan kalvarisine implante edildikten üç hafta sonra sonra 600 μm gözenek büyüklüğüne sahip iskelenin,

20 hafta sonra 100 μm gözenek büyüklüğü diğer gözenek boyutlarından daha fazla kemik büyümesi gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Çizelge 2.4'te kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları gözden geçirilmiştir. Yapay kemik doku iskelelerini hazırlamak için kullanılan biyomalzemeler doğal veya sentetik, biyobozunur veya biyobozunmaz olarak sınıflandırılabilir (Pereira vd. 2020).

Çizelge 2.4 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları

Biyomalzeme	**Avantajları**	**Dezavantajları**
Metaller	Mekanik dayanım Biyouyumluluk Osseointegrasyon Kişiselleştirilebilir üretim	Aşınma riski Metal iyon toksisitesi riski Yetersiz damarlanma Biyoinert
Seramikler	Biyouyumluluk Kişiselleştirilebilir üretim İyi mekanik özellikler Korozyona dayanıklı	Kırılgan Düşük elastisite Yetersiz damarlanma
Polimerler	Biyouyumluluk Kişiselleştirilebilir üretim İyi mekanik özellikler Düşük elastisite modülü	Yetersiz damarlanma

Biyobozunur olmayan **metalik biyomalzemeler** esas olarak yapay kalça eklemleri, kemik plakaları ve diş implantları gibi sert dokuların yerine kullanılmaktadır. Bunlar, mekanik özellikleri ve korozyon direnci nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Paslanmaz çelik, implant olarak başarılı bir şekilde kullanılan ilk metalik biyomalzemedir. Kobalt (Co) bazlı ve titanyum (Ti) alaşımları ise kullanılan ana metalik biyomalzemelerdendir. Paslanmaz çelik malzemeler, krom (Cr) katkılanmasıyla güçlü tutuş, kendi kendini onarma ve korozyona dayanıklılık özellikleri kazandırılarak kullanılabilmektedir (Pereira vd. 2020). Titanyum ve alaşımları, mükemmel mekanik, fiziksel, biyolojik performans, korozyon direnci ve olağanüstü biyouyumluluklarından dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak saf Ti, tipik olarak tek fazlı alfa mikroyapısı ile halihazırda diş implantlarında kullanılırken, %6 alüminyum (Al) ve

%4 vanadyum (V) (Ti_6Al_4V) ile titanyum çoğunlukla ortopedik alanda kullanılmaktadır. (Pereira vd. 2020).

Seramikler genellikle inorganik, metalik olmayan malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Alüminyum (Al) ve zirkonyum (Zr) türevleri ve biyoinert seramikler en çok ortopedik cihazlarda kullanılmaktadır. Alümina basınç altında mükemmel bir performans gösterirken gerilim altında kırılgandır ve düşük sürtünme ve aşınma katsayıları nedeniyle yaklaşık 20 yıldır implant olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat seramikleri kemik yerine kullanılan maddeler, kaplamalar, çimento türleri, ilaç taşıyıcı sistemler ve doku mühendisliği yapı iskeleleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Trikalsiyum fosfat (TCP; $Ca_3(PO_4)_2$) biyoaktif ve biyobozunur bir seramik malzemedir. TCP implantları ortopedik ve dental uygulamalarda sentetik kemik boşluk dolgu maddeleri olarak kullanılmaktadır. Biyoaktif cam (*bioactive glass*) ve ilgili cam-seramik biyomateryalleri, kemik rejenerasyonu için iskelelerde kullanılan biyobozunur yapıdaki malzemelerdir. Zirkonya implantlar en yüksek mukavemete sahip seramik malzemelerden biridir ve biyoinert olması, korozyona ve aşınmaya karşı mükemmel direnci, yüksek kırılma tokluğuna sahip olması ve yüksek biyouyumluluk gibi avantajlar sunmaktadır (Pereira vd. 2020).

Kemik doku mühendisliğinde doku iskelelerinin sahip olması gereken en önemli özellikler arasında vücutta bozunabilen biyobozunur yapıda, yeterli dayanıma sahip ve hafif olmaları sayılabilir (Levengood ve Zhang 2014). Bu nedenle, kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak metaller ve seramikler daha az kullanılırken biyobozunur yapıdaki **polimerler** daha fazla tercih edilmektedir. Bununla birlikte, polimerlerin kolay şekillendirilebilir olması, farklı teknikler ile çeşitli formlarda hazırlanabilmeleri, yüzeylerinin modifiye edilebilmesi ve birden fazla malzeme kullanılarak kompozit yapıda hazırlanabilmeleri, polimerlerin sahip olduğu önemli avantajlardır. Kemik doku mühendisliğindeki uygulamalarında kullanılan **polimerler**, doğal ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Biyobozunur özellikteki kitosan veya kollajen gibi **doğal polimerlerin** yanısıra, polikaprolakton (PCL), poli-laktik asit (PLA) veya poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) gibi **sentetik polimerler** de sıklıkla tercih edilen biyomalzemeler arasındadır (Pereira vd. 2020). **Doğal polimerler** genellikle

hücreleri destekleyebilen ve yönlendirebilen ve böylece iskelelerin konakçı doku ile biyolojik etkileşimini arttırabilen yapılardır. **Sentetik polimerler** ise doğal polimerlerin aksine daha düşük maliyetle kontrollü fizikokimyasal özellikte üretilebilirler. Ayrıcı doğal polimerlere göre dayanımları daha yüksektir. Buna karşın, biyomedikal uygulamalarda biyouyumlulukları doğal polimerlere göre daha düşüktür. Bu nedenle, birçok uygulamada doğal polimerler veya biyoseramikler ile kompozitleri hazırlanmaktadır (Abbasian vd. 2019, Rezwan vd. 2006).

2.1.3 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörleri

Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile hedeflenen doku rejenerasyonunda **büyüme faktörleri**, fonksiyonel yapıların elde edilmesi için anahtar görevi gören moleküllerdir (Vukicevic ve Grgurevic 2009, Seeherman ve Wozney 2005). Hücre çoğalması ve farklılaşmasını doğrudan uyaran bu biyosinyal moleküller, hücresel aktiviteleri düzenlediklerinden son derece önem taşımaktadırlar (Chen ve Ito 2001). Büyüme faktörleri hücre zarındaki reseptörlere bağlanarak hücrelerin farklılaşmasını ve bölünmesini tetikler. Daha sonra hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşerek kompleks bir yapı oluştururlar (Vo vd. 2012). Doğal şartlarda sağlıklı hücreler büyüme faktörü salımıyla sinyal iletim mekanizmasını başlatırlar, bu moleküller hücrenin transreseptörlerine bağlanarak hücrenin davranışlarını düzenler. Büyüme faktörleri hücre çekirdeğine iletildiğinde metabolik değişikliklere ve gen ekspresyonu gibi kompleks değişikliklere sebep olurlar (Lee vd. 2011). Bu mekanizma büyüme faktörlerinin doku iskelesine entegrasyonuyla hücresel fonksiyonlarını etkin bir şekilde regüle edebileceğini göstermektedir (Chen ve Ito 2001, Karakecili vd. 2007). Literatürde farklı dokuların rejenerasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-β), kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri kullanılmıştır. Osteojenik büyüme faktörleri varlığında hücre üremesi ve osteojenik farklılaşmanın büyük ölçüde desteklendiği bilinmektedir (Demirtaş vd. 2016, Soran vd. 2012).

Kemik morfogenetik proteini-6 (BMP-6)

TGF-β (*transforming growth factor*) ailesinin alt grubunda yer alan osteoindüktif kapasiteye sahip olan **kemik morfogenetik proteinleri (BMPs)** kemik dokusunun iyileşmesinde ve kıkırdak oluşumunda etkilidir. **BMP-6** yüklü kitosan doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalarda, MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşması incelenmiş ve BMP-6'nın önemli bir role sahip olduğu ortaya konulmuştur (Göz 2014, Akman vd. 2010). Ayrıca BMP-6'nın osteojenik etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, osteoblastik hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır (Mizrahi vd. 2013).

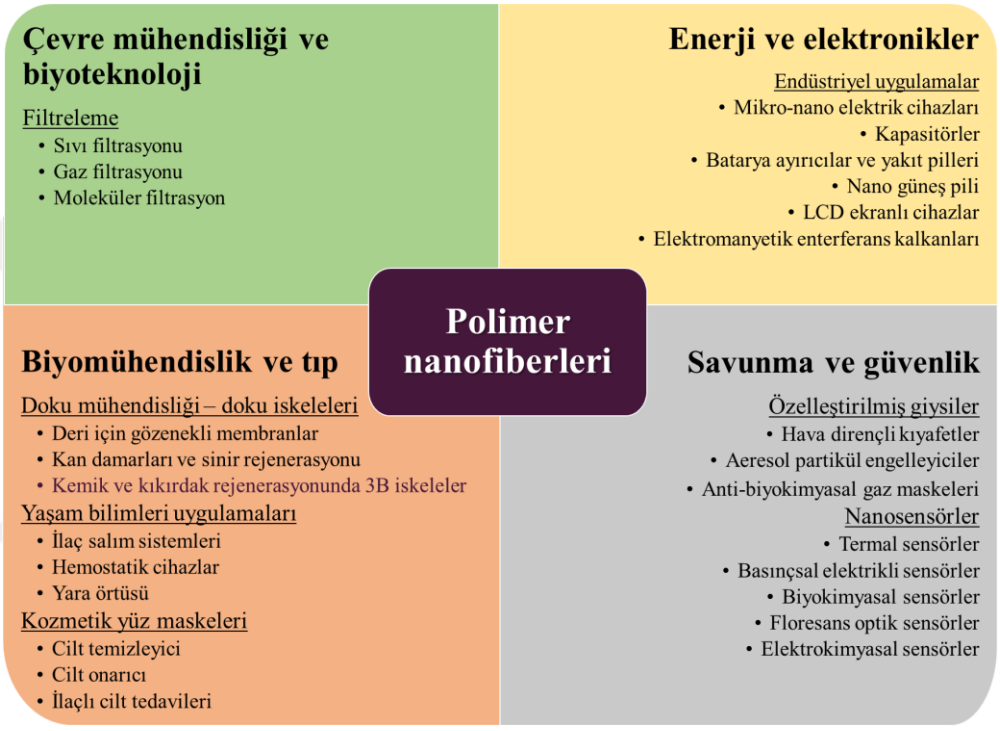
Büyüme faktörlerinin kontrollü salımı ve kemik hücresine destek sağlayacak doku iskeleleri ile kombinasyonu, büyüme faktörünün uzun süreli etkinliğini sağlarken doğal kemik ortamını taklit ederek kemik iyileşmesini geliştirmesini desteklemektedir. Çoğunlukla, büyüme faktörünün protein yapıda olmasından kaynaklanan hızlı denatürasyon ve yarılanma ömürlerinin kısa olması gibi problemlerden dolayı büyüme faktörü içeren mikro veya nanoküre yapılar, hücrelerin tutunmasını ve doğal ortam koşullarını sağlayacak 3-boyutlu doku iskelelerine yüklenerek hasarlı dokunun olduğu bölgeye yerleştirilmektedir. Büyüme faktörü taşıyıcılarının tasarımı, kemik iyileşmesi sırasında meydana gelen olayların dizisine uyan bir profilde kontrollü salımı da sağlayacak şekilde yapılmalıdır (Lauzon vd. 2012, Göz 2014).

2.2 Elektroeğirme Yöntemi

Elektroeğirmenin tarihi 19. Yüzyıla kadar uzanmaktadır. İlk olarak 1897'de Rayleigh tarafından gözlemlenmiş ve 1914'te Zeleny tarafından elektrosprey yöntemi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elektroeğirme, 1930'ların sonunda uygulanabilir bir fiber eğirme yöntemi olarak kabul edilip ve patentlenmiştir. Nanoteknolojinin 1990'dan bu yana hızla gelişmesiyle, dünya çapındaki araştırmacılar ve bilim adamları bu elektroeğirme sürecini yeni bir perspektiften incelemeye devam etmişlerdir (Angammana ve Jayaram, 2016).

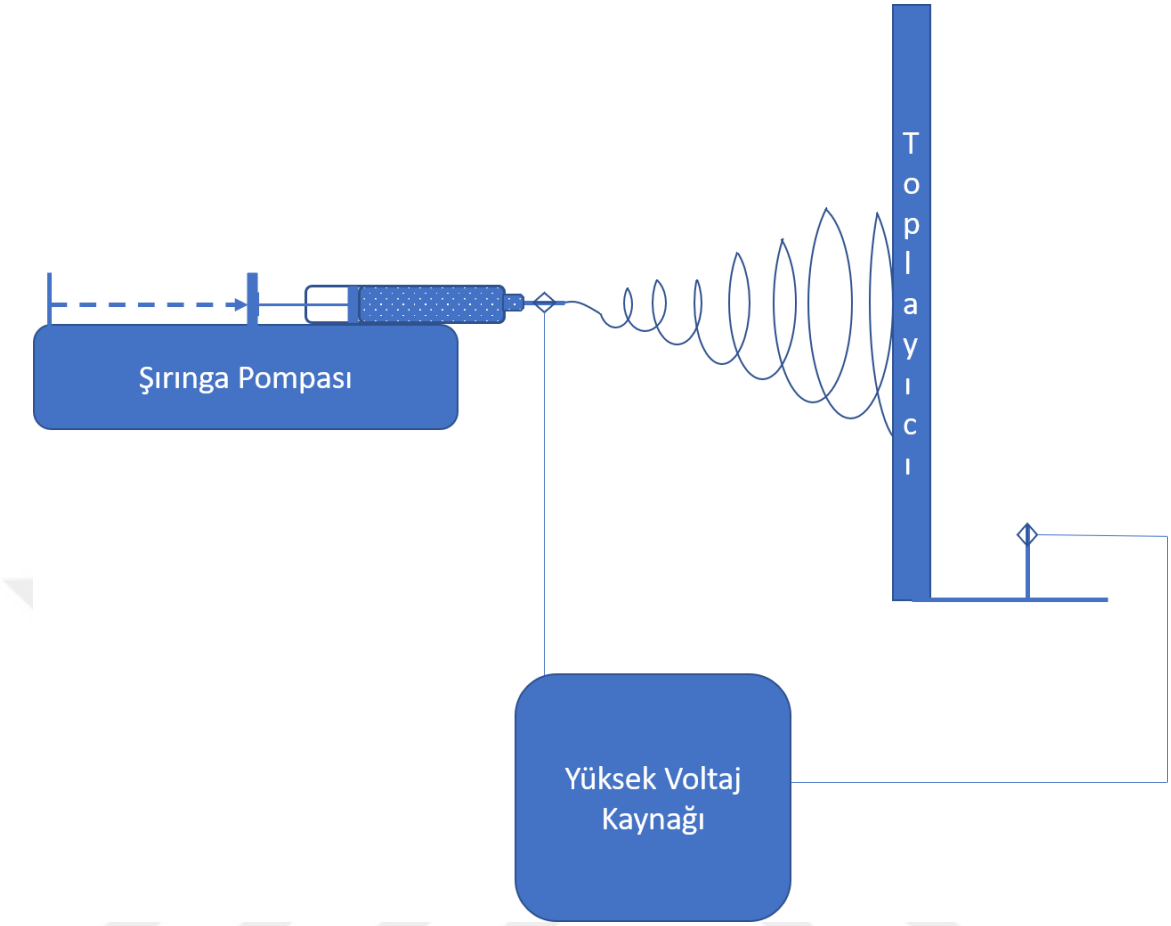
Elektroeğirme yönteminin geliştirilmesi, nanofiberlerin potansiyel uygulamalarının araştırılmasına önemli bir ivme kazandırmıştır Yeni malzemelere olan talep arttıkça

elektroeğrilmiş nanofiberler, malzeme biliminde yeni bir döneme girilmesini sağlamıştır. **Şekil 2.2**'de görülebileceği gibi, olası ana uygulamalar biyomühendislik, çevre mühendisliği, biyoteknoloji, tıp bilimi, enerji, elektronik, savunma ve güvenlik olarak kategorize edilebilmektedir. Bununla birlikte, elektroeğirmeyle ilgili olarak sunulan patentlerin çoğu tıbbi ve filtre uygulamaları alanında bulunmaktadır (Angammana ve Jayaram, 2016).



Şekil 2.2 Polimer nanofiber yapılarının uygulama alanları

Elektroeğirme, mikron-altı çaplardan nanometre çaplarına kadar sürekli nanofiber üreten basit ve ucuz bir işlemdir. İşlem, Rayleigh kararsızlığı nedeniyle parçalanmayacak kadar uzun bir zincire sahip, polimer moleküllerinden oluşan elektrik yüklü bir polimer çözeltisi veya polimer eriyiği içermektedir (Angammana ve Jayaram, 2016). **Şekil 2.3**'te gösterildiği gibi elektroeğirme sistemi, polimer eriğinin veya çözeltisinin kontrollü şekilde sisteme verilmesi için bir **pompa**, elektrik alanı oluşturabilmek için **yüksek voltaj kaynağı** ve iletilen polimerin birikmesi için bir **toplayıcı** olmak üzere 3 elemandan oluşmaktadır (Yüksel, 2014).

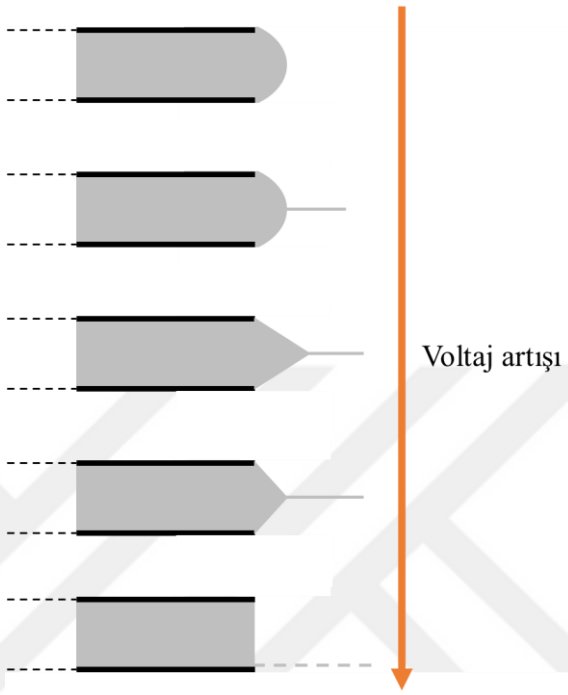


Şekil 2.3 Elektroeğirme sisteminin şematik gösterimi

2.2.1 Elektroeğirmeyi etkileyen parametreler

Elektroeğirme işlemi, iğneden çıkan polimer eriği veya çözeltisinin kendi yüzey gerilimiyle tutulmasının ardından yüksek voltaj uygulamasıyla elektrostatik olarak yüklenmesiyle başlamaktadır. Polimer sıvısındaki elektrik yükleriyle elektrik alan etkileşimleri, Taylor konisinin (Taylor 1964) oluşmasına neden olmakta, bu koninin ucunda eşik değerini geçecek bir elektrik alan gradyeni uygulandığında, damlacık kararsız hale gelmekte ve **Şekil 2.4**'te gösterildiği gibi Taylor konisinden sıvı jeti çekilmektedir (Angammana ve Jayaram, 2016). Oluşan jet, Taylor konisinden neredeyse düz bir çizgide aktığında, hareket eden sıvı jeti, Coulomb kuvveti, harici elektrik alanı tarafından uygulanan bir elektrik kuvveti, viskoelastik kuvvet, yüzey gerilimi kuvveti, yerçekimi kuvveti ve hava sürükleme kuvveti gibi çeşitli kuvvetlere maruz kalmaktadır. Böylece bükülme dengesizliği gözlemlenmektedir (Reneker vd. 2000). Elektrik

kuvvetleri, jeti germekte, inceltmekte ve çözücünün de buharlaşmasıyla nanofiberler toplayıcıda toplanmaktadır (Angammana ve Jayaram, 2016).



Şekil 2.4 Voltaj artışıyla iğne ucundan polimer jeti oluşumunun şematik gösterimi

İşlem koşullarına bağlı olarak, elektroeğrilmiş fiberlerin ortalama çapı yaklaşık 5 nm-10 mm arasında değişmektedir. Elektroeğirme işlemini etkileyen ana parametreler çözelti özellikleri, işlem parametreleri ve ortam koşullarını içermekte (**Çizelge 2.5**), bu parametrelerinin her biri fiber morfolojisini ve boyutlarını etkilemektedir (Ghorani ve Tucker, 2015).

Çizelge 2.5 Elektroeğirmeyi etkileyen parametreler

Elektroeğirme Parametreleri	
Çözelti özellikleri	Viskozite Polimer derişimi Polimerin molekül ağırlığı Çözücü dielektrik sabiti Elektriksel iletkenlik Elastisite Yüzey gerilimi
İşlem parametreleri	Uygulanan voltaj İğne ucu-toplayıcı arası uzaklık Akış hızı İğne çapı
Ortam koşulları	Sıcaklık Nem Atmosfer basıncı

Çözelti özellikleri

Fiber çapı ve morfolojisini etkileyen ana parametrelerden biri polimer çözeltisinin özellikleridir. Fiber çapı ve boncuk oluşumu eğilimi, yüzey gerilimi ve çözeltinin viskozitesine bağlıdır. Çözelti özellikleri **polimer çözeltisinin viskozitesi**, **yüzey gerilimi** ve **çözeltinin elektriksel iletkenliği** olarak incelenebilmektedir (Ghorani ve Tucker 2015, Yüksel 2014).

Polimer çözeltisinin viskozitesi, yüzey gerilimi ve jet tarafından taşınan net yük yoğunluğu, boncuk oluşumunu etkileyen ana faktörlerdendir. Çözelti viskozitesini ise polimerin molekül ağırlığı ve derişimi doğru orantılı olarak etkilemektedir. Çözeltinin viskozitesi arttıkça, tanecikler büyümekte, tanecikler arasındaki ortalama mesafe uzamakta, fiber çapı büyümekte ve taneciklerin şekli küreselden ağsı hale gelmektedir. Bir polimer elektroeğrilerek fiber haline getirilebildiği sürece, ideal durum polimer çözeltisinin mümkün olan en yüksek polimer yüzdesinden oluşması ve jet oluşumuna izin verecek kadar düşük bir viskoziteye sahip olmasıdır. Başka bir deyişle, elektroeğirme sırasında fiber oluşumunu kolaylaştırmak için belirli bir minimum polimer derişimi gerekmektedir. Bu kritik değerin altında, gerilim uygulaması, öncelikle Rayleigh

kararsızlığı nedeniyle elektrospreyleme ve boncuk (*bead*) oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Ghorani ve Tucker, 2015, Yüksel 2014). Polimer derişimi arttıkça, boncuk ve fiber beraber elde edilmektedir. Polimer derişimindeki herhangi bir artış, sürekli fiber oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, polimer derişimi bir üst sınırın ötesine yükseltilmemelidir, çünkü ortaya çıkan yüksek çözelti viskozitesi sürekli elektroeğirmeyi engellemektedir (Ghorani ve Tucker, 2015).

Elektroeğrilmiş fiberlerin morfolojisi, büyük ölçüde çözücüye bağlı olarak şekillenen fiziksel ve elektriksel özelliklerinden etkilenmektedir. Tipik bir eğirme çözeltisi ağırlıkça %80-90 çözücü ve ağırlıkça %10-20 polimer içermektedir. Fiber morfolojisini direkt olarak etkilediğinden, çözücü seçimi önem taşımaktadır (Ghorani et al., 2013; Lu, Chen, Li ve Zhang, 2006).

Polimer çözeltisinin elektroeğirme ile fiber yapıda elde edilebilmesi için Taylor konisinin oluşturulması, başka bir deyişle, iğne ucunda oluşan çözelti damlasının **yüzey geriliminin** elektriksel kuvvetlerce aşılması gerekmektedir. İşlem sırasında yüzey geriliminden dolayı jet boyunca boncuklar oluşabilmektedir (Yüksel 2014).

Bir çözeltinin **elektriksel iletkenliği** jet üzerindeki yük yoğunluğunu, başka bir deyişle, jetin elektriksel bir kuvvetle uzama seviyesini yansıtmaktadır. Uygulanan voltaj ve eğirme mesafesi sabit tutulduğunda, daha yüksek elektrik iletkenliğine sahip bir çözelti, jetin ekseni boyunca daha uzun uzamasına ve dolayısıyla daha küçük çaplı elektroeğrilmiş fiberler elde edilmesine neden olmaktadır (Ghorani ve Tucker, 2015). Doğal polimerler genellikle doğada polielektrolitik olarak bulunmaktadır, bu da elektrik alan oluşturulmasıyla daha yüksek gerilime maruz kalan polimer jetinin yük taşıma kabiliyetini arttırmaktadır. Bu nedenle, doğal polimerlerin elektroeğrilmesinde, sentetik polimere kıyasla daha zayıf fiber oluşumu gözlenmektedir (Ghorani ve Tucker, 2015). Çözeltinin elektriksel iletkenliğini etkileyen bir diğer önemli faktör ise kullanılan çözücü veya çözücü sistemlerinin **dielektrik sabitleridir**. Kullanılan çözücünün dielektrik sabiti yükseldikçe çözeltinin tutacağı yük artmakta ve daha düzgün ve daha düşük çapta fiberlerin oluşumuna yol açmaktadır. Buna karşın, çok yüksek dielektrik sabitine sahip

çözücüler ile hazırlanan çözeltiler elektroeğirme sırasında jetin bükülme kararsızlığını arttırmakta, bu da fiberde kopmalara sebep olabilmektedir (Yüksel 2014).

İşlem Parametreleri

Elektroeğirmeyi etkileyen diğer önemli parametreler **uygulanan voltaj**, **iğne ucu-toplayıcıya arası uzaklık**, **çözelti besleme hızı** ve **iğne çapı** olarak sınıflandırılabilen işlem parametreleridir. (Ghorani ve Tucker, 2015, Yüksel 2014).

Elektroeğirme işleminde **uygulanan voltaj** en önemli işlem parametrelerinden biridir. Yüksek voltaj uygulandığında iğne ucu-toplayıcı arasında bir elektrik alan oluşmakta ve bu alanın çekme kuvveti dolayısıyla polimer çözeltisinin iğne ucundan toplayıcıya ulaşması sağlanmaktadır (Ghorani ve Tucker, 2015). Çözeltinin besleme hızına bağlı olarak, kararlı bir Taylor konisinin oluşması için daha yüksek bir voltaj gerekebilmekte ve çözeltinin yüzey gerilimi ve elektrik kuvveti arasındaki denge, iğne ucundaki polimer çözeltisinin başlangıç koni şeklinin belirlenmesinde kritik önem taşımaktadır (Buer vd. 2001, Zong vd. 2002). Uygulanan voltajın yükselmesi jetin ivmelenmesine ve iğnenin ucundan daha fazla hacimde çözelti çekilmesine neden olmakta, bu da daha küçük ve kararsız bir Taylor konisine neden olabilmektedir (Mazoochi ve Jabbari 2011). Viskozite arttıkça, jetin inceltilmesi ve fiberlerin oluşturulabilmesi için hem yüzey geriliminin hem de viskoelastik kuvvetin üstesinden gelmek adına daha fazla kuvvet gerekmektedir (Doshi ve Reneker 1995). Yüklü bir jetin iğne ucundaki damladan çekilmesi için gereken eşik voltajı esas olarak çözelti derişimine bağlıdır. Hem uygulanan voltaj hem de oluşturulan elektrik alanı, jetin gerilmesi ve hızlanması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğundan, elde edilen fiberlerin morfolojisi ve çapı üzerinde etkili olmaktadır (Buer vd. 2001; Megelski vd. 2002; Zhang vd. 2005; Zhuo vd. 2008). Genel olarak, uygulanan voltaj yükseldikçe elektroeğrilmiş fiberlerin ortalama çapı düşmektedir (K. H. Lee vd. 2003; Lin vd. 2008; Mazoochi ve Jabbari, 2011; Tan vd. 2005; Wannatong vd. 2004).

Polimer çözeltisi **akış hızı**, elektroeğirme sırasında iğne ucunda bulunan çözelti miktarını belirlemektedir. Belirli bir voltajda, kararlı bir Taylor konisi oluşturmak için gerekli bir

akış hızı vardır (Yüksel vd. 2016). Belirli bir elektrik alanında polimer çözeltisi akış hızındaki değişiklik fiber morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir (Jalili vd. 2005). Yüksek akış hızlarında genellikle daha büyük çaplı fiberler elde edilmekte, buna karşın düşük akış hızlarında genellikle çap dağılım aralığı dar fiberler elde edilmektedir (Dotti vd. 2007, Megelski vd. 2002, Yuan vd. 2004, Zong vd. 2002). Fiber jetinin çözelti tam kurumadan toplayıcıya ulaşması toplanan fiberlerin arasında boncuk oluşumuna ve kaynaşmış bağlantılara neden olmaktadır (Zong vd. 2002).

Elektroeğirme yönteminde kullanılan **iğnenin iç çapı** işlemi etkileyen sistem parametrelerinden biridir. İğne iç çapı arttıkça, çözeltinin oluşturduğu yüzey geriliminden dolayı iğne ucunda tıkanmalar meydana gelebilmektedir (Mo vd. 2004). İğne çapını azaltmak damlacık yarıçapını azaltmakta ve damlacığın yüzey gerilimini arttırmaktadır. Sabit voltajda jetin başlangıç ivmesi, artan polimer yüzey gerilimi ile azalmakta ve bu nedenle ortalama hız azalmaktadır. Bu da iğne ucundan toplayıcıya giden jet uçuş süresinin artması anlamına gelmekte ve çözücü buharlaşmasını ve jetin kararsızlaşmasını arttırmaktadır. Sonuç olarak, daha küçük çaplı ve boyut dağılımı daha dar fiberler elde edebilmek için küçük çaplı bir iğne kullanmak gerekmektedir. Bununla birlikte, iğnenin çapı çok küçükse, çözeltinin yüzey gerilimine bağlı olarak iğne ucunda polimer damlacıklarının oluşturulması zor olabilmektedir (S. Zhao vd. 2003). İğne çapı elektroeğirme yönteminin uygulanabilmesi için önemli bir parametre olmakla beraber oluşturulan fiber çapıyla arasında doğrudan bir ilişki bulunmamaktadır (Yoshihiro vd. 2007).

İğne ucu-toplayıcı arası uzaklık sistem parametreleri içerisinde en az etkiye sahip parametredir. İğne ucu-toplayıcı arası uzaklık jet uçuş süresini ve elektrostatik alan kuvvetini etkilemektedir. Bu uzaklık çok kısa olduğunda, polimer jetinin toplayıcıya ulaşmadan önce çözücünün buharlaştırması yetersiz kalmakta ve sonuç olarak, kaynaşmış fiber-fiber kesişimleri olan kısmen ıslak ağların ve yoğun bir şekilde boncuklanmaların gözlenmesine neden olmaktadır (Barhate vd. 2006). Uzaklığın arttırılması ise boncuk oluşumu ve ortalama fiber çapında azalmaya neden olmaktadır (Ahn vd. 2006, Doshi ve Reneker 1995, Jarusuwannapoom vd. 2005, Lin vd. 2008, Yuan vd. 2004). Bununla birlikte, sabit voltajda, iğne ucu-toplayıcı arası uzaklığındaki artış, elektrostatik alan

gücünün azalmasına neden olmakta ve jet bölünmesi ve zayıflaması gibi istenmeyen etkilere neden olmaktadır. İğne ucu-toplayıcı arası uzaklığının arttırılmasının, daha fazla çözücünün buharlaşmasıyla daha düşük fiber çapının elde edilmesine neden olabileceğini bildirilmiştir (Chowdhury ve Stylios 2010).

Ortam özellikleri

Özellikle **nem** ve **sıcaklık** gibi ortam parametrelerinin fiber morfolojisini ve elektroeğirme verimliliğini etkilediği düşünülmektedir (H. M. Chen ve Yu 2010). Bunun nedeni, çözücünün buharlaşması ve çözücünün iletkenliği ile sıcaklık arasında doğrudan bir ilişkinin olmasıdır. Her ikisi de polimer çözeltisinin elektroeğrilebilirliğini etkileyebilir (H. M. Chen ve Yu 2010). Ayrıca, polimer çözeltisinin polimer viskozitesi ve yüzey gerilimi sıcaklıktan etkilenmektedir (Bhardwaj ve Kundu 2010, De Vrieze vd. 2009).

2.2.2 Elektroeğirme ve kemik doku mühendisliği uygulamaları

Elektroeğirme yöntemi birçok polimere uygulanabilmesi dolayısıyla doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik ile örülmemiş ağ yapıda ya da doğrusal yapıda nanoboyuttan mikron boyuta kadar fiberler elde edilebilmektedir. Ayrıca sentezlenen fiber yapıların doğal hücre dışı matriks yapısını taklit edebilmesi, fiberlerin hücre etkileşimi için gerekli geniş yüzey alanı sağlaması ve oluşan yapının besin maddeleri gibi çözeltilerin difüzyonuna olanak tanıması açısından oldukça önemli bir tekniktir (Kim vd. 2008, Sill ve von Recum 2008).

Literatürde, kemik doku mühendisliğine yönelik olarak gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda, poli(Ɛ-caprolakton) (PCL), jelatin, polietilen glikol (PEG), polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poliüretan (PU), polivinil alkol (PVA) ve polihidroksibütirat gibi polimerik yapılardan elektroeğirme yöntemi kullanılarak elde edilmiş doku iskelelerinin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Doostmohammadi vd.

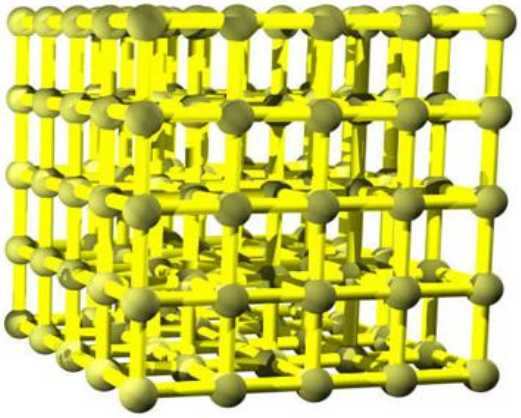
2020). Son yıllarda kemik doku mühendisliğinde elektroeğirilmiş PCL doku iskeleleri kullanımı, amaca yönelik iyileştirmeler ve eklemeler yapılarak devam etmektedir.

Heydari vd. (2017) elektroeğirme yöntemiyle elde ettikleri oktakalsiyum fosfat içeren PCL membranları Hg-292 osteoblast hücre hattıyla kültüre etmiş ve kemik rejenerasyonunda potansiyelinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada, hidrofilik bir polimer olan jelatin ile dayanımı yüksek PCL polimerini farklı oranlarda karıştırılmış ve elektroeğirme ile elde edilen membranlar üzerinde MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin kemiğe farklılaşması incelenmiştir (Ren vd. 2017). Yu vd. (2016) PCL'in 3 boyutlu yazıcı ve elektroeğirme yöntemiyle elde ettikleri doku iskelelerini MC3T3-E1 kültüründe karşılaştırmış ve iki yöntemin entegrasyonu ile en iyi sonuçları elde etmişlerdir. Zaiss vd. (2016), PCL eriğini katman-katman elektroeğirerek 3 boyutlu dışbükey doku iskeleleri elde etmiş ve osteoblast hücrelerinin çoğalmasını incelemişlerdir.

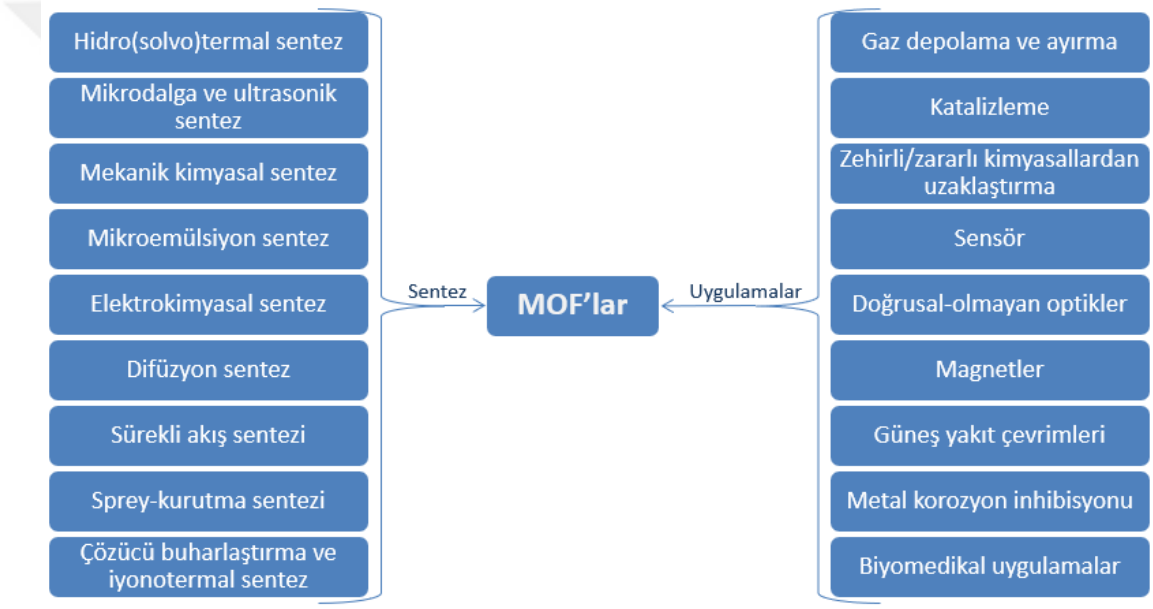
2.3 Metal-organik kafesyapı (MOF)

Metal-organik kafesyapılar (MOF'lar) metal koordinasyonlu düğümler ve organik ligandlardan oluşan yeni bir hibrid gözenekli nanomalzeme sınıfıdır (Yang vd. 2018). **Şekil 2.5**'te MOF'un şematik yapısı bir model olarak verilmiş olup gri bölgeler metal iyonlarını, sarı bölgeler ise organik ligandları simgelemektedir (Monash University 2018).

MOF'lar çeşitli sentetik stratejilerle tasarlanmış ve birçok uygulama için çalışılmıştır. Wu ve Yang (2017) **Şekil 2.6**'da gösterildiği gibi MOF'ların genel sentez yöntemlerini ve ana uygulamalarını özetlemişlerdir. MOF'ların biyomedikal alandaki uygulamaları halen araştırılmakta ve giderek daha fazla ilgi görmektedir.



Şekil 2.5 MOF'un şematik yapısı



Şekil 2.6 MOF'ların sentez yöntemleri ve uygulamaları

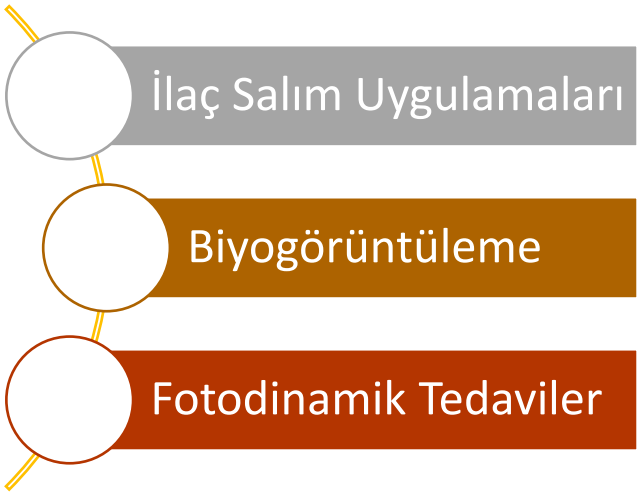
MOF yapıları, organik türlerle bağlı metal iyonlarından (Zn(II), Cr(II), Mo(II), Co(II), Zr(IV)) ya da metal oksit kümelerinden oluşur. Yüksek gözenek oranı (>%50) ve yüzey alanına sahip (Langmuir yüzey alanı: 1000-10000 m^2/gr) olan bu yapılar, gözenek özelliklerinin kolay değiştirilebilir olmasıyla farklı uygulamalar için avantaj sağlamaktadırlar (Furukawa vd. 2013). Kimyasal kompozisyonlarındaki çeşitlilik, kontrol edilebilen gözenek boyutu, açık gözenek yapısı/geniş gözenek açıklığı, hidrofobik/hidrofolik davranışları nedeniyle farklı özelliklerde 20000'in üzerinde MOF sentezlenmiştir (Furukawa vd. 2013), ve son yıllarda ilaç yükleme/salım uygulamalarında

var olan problemlerin aşılmasında kullanılabilecek umut verici malzemeler olarak görülmektedirler (Gao vd. 2016; Horcajada vd. 2012).

MOF yapıları kuvvetli C-C, C-H, C-O ve M-O bağları nedeniyle yüksek ısıl kararlılığa (250°C-500°C) sahip malzemelerdir. Ancak MOF yapılarının endüstriyel kullanımını kısıtlayan en büyük dezavantaj su/su buharı ve çözücü ortamında organik bağlayıcı-yer değiştirme (*linker-displacement*) reaksiyonlarına duyarlılıkları nedeniyle kimyasal kararlılıklarının kısıtlı olmasıdır (Furukawa vd. 2013).

2.3.1 MOF'ların biyomedikal alanında uygulamaları

Yang vd. (2018), MOF'ların biyomedikal alandaki uygulamalarını **ilaç taşıma ve salım uygulamaları**, **biyogörüntüleme** ve **fotodinamik** tedaviler olarak üç sınıfta incelemişlerdir (**Şekil 2.7**). MOF'lar, geniş yüzey alanı, iyi fizikokimyasal kararlılık ve ayarlanabilir fonksiyonelliği nedeniyle biyomedikal uygulamalar için artan ilgi görmektedirler. Ayrıca iyi tasarlanmış gözenek açıklığı, çeşitli bileşimi ve yapısı, ayarlanabilir boyutu, çok yönlü işlevselliği, yüksek madde yüklemesi ve geliştirilmiş biyolojik uyumluluk gibi MOF'ların üstün özellikleri, onları ilaç salım ajanları olarak umut verici adaylar haline getirmektedir. (Wu ve Yang 2017).



Şekil 2.7 MOF'ların biyomedikal alandaki uygulamaları

MOF'ların daha geleneksel gözenekli malzemeler üzerindeki en üstün avantajlarından biri, ev sahibi-konuk etkileşimini, sadece gözenek büyüklüğünü değiştirerek değil, aynı zamanda yapı gruplarını sentez sonrası modifikasyonu aracılığıyla kimyasal gruplarla işlevselleştirerek, kontrol etme imkanını sağlamasıdır. Ayrıca, ilaç salımını geliştirmek için, tümör dokularında ilaç birikimini artırabilen nano-ölçekli MOF'ların geliştirilmesi için kapsamlı araştırmalar devam etmektedir. Polimer temelli ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesine ilişkin önceki araştırmalardan ilham alan bazı araştırmacılar, hedefe yönelik **ilaç salım uygulamaları**, **biyogörüntüleme** ve **fotodinamik tedaviler** için MOF temelli bir nanoparçacık geliştirmeye çalışmışlardır (Luo vd. 2018).

İlaç taşıma ve salım uygulamalarındaki araştırmalar toksik olmayan taşıyıcı materyaller kullanarak hızlı ve güçlü bir tedavi sağlayan etkili ilaç salım sistemleri geliştirmek amacındadır. Şimdiye kadar, nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, hidrojeller, miseller ve lipozomlar gibi farklı şekillerde birçok taşıyıcı materyal oluşturulmuştur. Bu malzemelerin büyük bir çoğunluğu düşük ilaç yükleme kapasiteleri, yüksek toksisite ve/veya kontrolsüz salım ve morfolojik dengesizlik özelliklerinden dolayı yetersiz kalmaktadır (Luo vd. 2018).

Geleneksel ilaç taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında, MOF'ların belirgin **avantajları** bulunmaktadır. İlk olarak çeşitli morfolojilerde, bileşimlerde ve boyutlarda tasarlanabilen MOF'lar kolaylıkla hedef bölgeye spesifik olarak geliştirilebilmektedirler. Bu sayede istenilen fizikokimyasal özellikler sağlanarak kararlı bir taşıyıcı ve kontrollü salım sağlanabilmektedir. İkinci olarak MOF'ların **geniş yüzey alanı** ve **yüksek gözeneklilikleri** ilaç yükleme kapasitelerinin oldukça yüksek olmasını sağlamaktadır. Üçüncüsü ise sahip oldukları zayıf koordinasyon bağları sayesinde MOF'lar **biyobozunur** özelliktedirler. Tüm bu avantajları sayesinde MOF'lar, ilaç taşıma ve kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde umut verici platformlardır (Luo vd. 2018, Wu ve Yang 2017). MOF'lar halihazırda **pH-duyarlı**, **folat-hedefli** ve **manyetik** olarak hedeflendirilebilen birçok ilaç salım sisteminde kullanılabilmektedir (Luo vd. 2018).

Kontrollü ve duyarlı salım sistemlerinin uygulanabilmesi için bir diğer önemli faktör de ilacın kapsüllenme yöntemidir. Genel olarak, ilaç kapsülleme mekanizması elektrostatik etkiler, adsorpsiyon etkisi, Van der Waals kuvvetleri, koordinasyon bağı veya hidrojen bağı, içyapıda etkin iyon değişimi veya serbest difüzyonu ile gerçekleşmektedir. Literatürde MOF'lara ilaç yüklenmesinde başlıca üç yükleme stratejisi mevcuttur, ***in situ*** **kapsülleme** (tek adımda sentez sırasında kapsülleme), ***ex situ*** **kapsülleme** (sentez sonrası kapsülleme) ve **ligand yöntemi** olarak aktif bir molekülle ilaç yüklenmesidir. Kapsüllenecek ilacın özelliklerine ve hedeflenmiş uygulamaya göre uygun MOF seçimi kritik önem taşımaktadır (Luo vd. 2018). Liédana vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada kafein molekülünü *in situ* ve *ex situ* yöntemlerle MOF yapıya kapsüllemiş, yükleme verimlerini karşılaştırmış ve *in situ* yöntemle 2 saatte ulaştıkları verime (%28) *ex situ* yöntemle 3 gün sonunda (%25) ulaşabildiklerini bulmuşlardır.

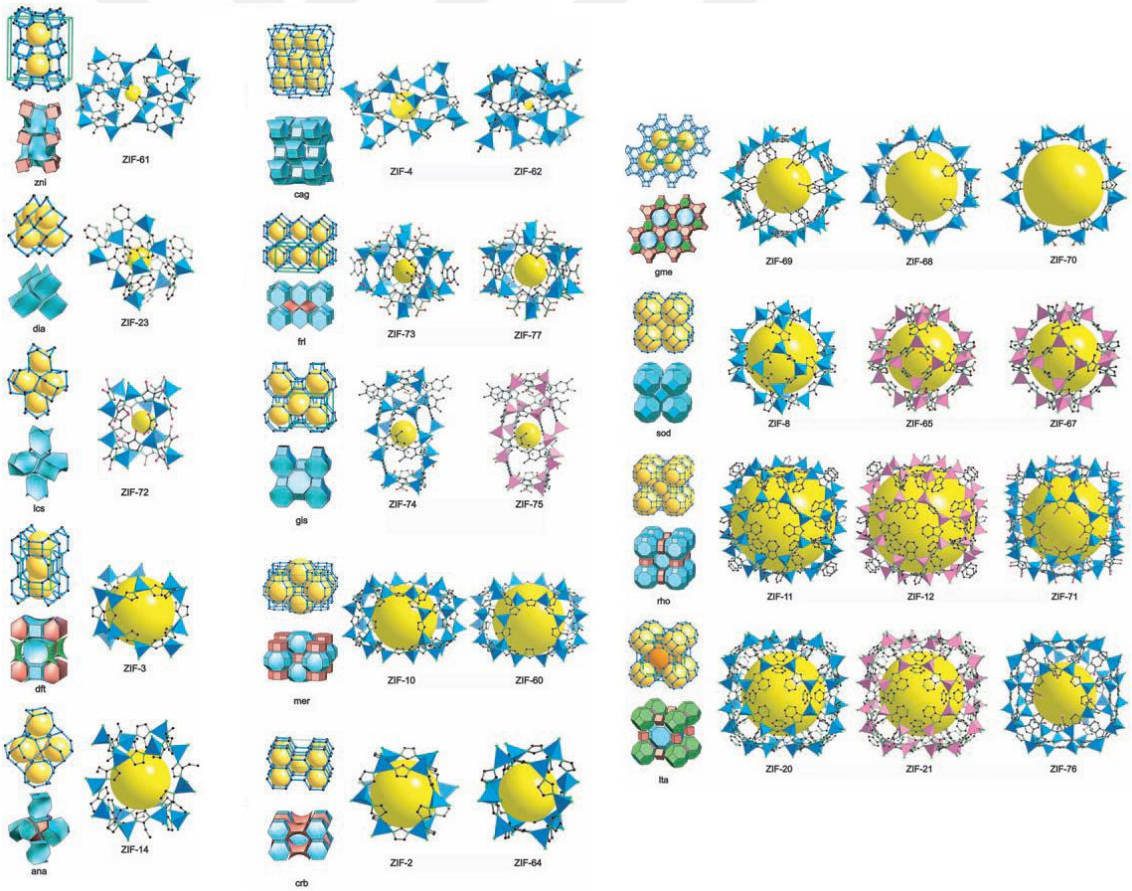
MOF'lar biyouyumlulukları ve iyi dağılım stabilitesi nedeniyle, **biyogörüntüleme** alanında da büyük ilgi çekmiştir. Dikkatle tasarlanmış hibrid MOF'lar, büyük paramanyetik/süperparamanyetik metal iyonlarının dahil edilmesiyle manyetik rezonans görüntüleme için kontrast maddeleri olarak kullanılabilmektedir (Luo vd. 2018). Bunun yanısıra, ışıkla aktive edilmiş liganttan yapılandırılan veya ışık-duyarlı moleküllerle ile dekore edilmiş MOF'lar, oldukça güçlü **Fotodinamik tedavi** ajanı olarak da dikkat çekmektedir (Luo vd. 2018).

2.3.2 Zeolitik imidazolat kafesyapı (ZIF)

Zeolitik imidazolat kafesyapılar (*Zeolitic Imidazolate Framework*, ZIF'ler), MOF ailesinin bir üyesi olup iyi düzenlenmiş gözenekler barındıran kristal materyallerdir. Yüksek yüzey alanına, yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ve sıklıkla yüksek termal, kimyasal ve hidrotermal stabiliteye sahiptirler. Bu özellikler, onları gaz depolama, ayırma, kataliz, ilaç iletimi ve kimyasal sensörler gibi birçok uygulama için cazip malzemeler haline getirmektedir. ZIF'lerin özellikleri, tipleri ve yapıları temel olarak farklı imidazol bağlayıcılar ve metal iyonlarının farklı kombinasyonlarına bağlıdır. Literatürde, farklı geçiş metalleri (örn., çinko ve kobalt), imidazol bağlayıcılar (örneğin 2-metilimidazol, benzimidazol) ve su, dimetilformamid, dietilformamid, etanol ve

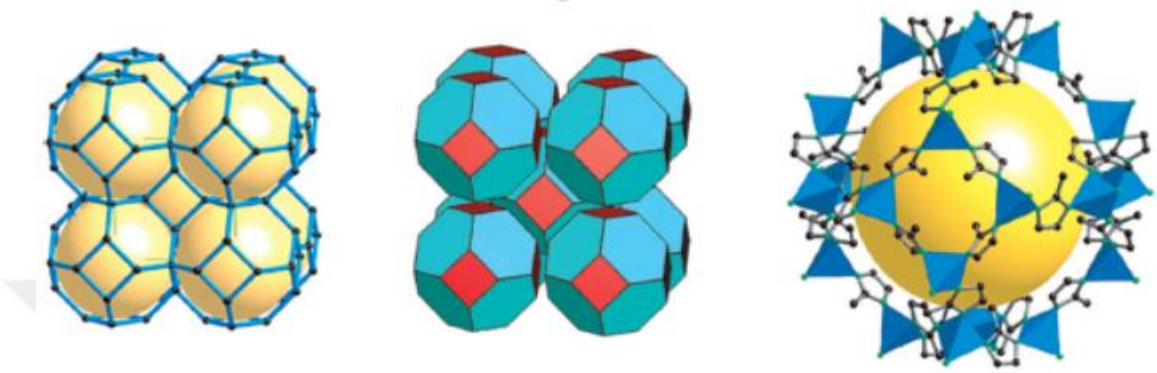
metanol gibi çözücüler kullanılarak sentezlenebilen çok sayıda ZIF yapısı rapor edilmiştir (Demir vd. 2014). **Şekil 2.8**'de çeşitli yapılardaki ZIF'ler örnek olarak gösterilmiştir (Banerjee vd. 2015, B. Chen vd. 2014).

Zeolit benzeri yapıya sahip ZIF yapıları, MOF malzemelerin son yıllarda en fazla çalışılan ısıl, hidrotermal ve kimyasal kararlılığı yüksek olan alt sınıfıdır. Bu yapılar, metal düğümlerinin (genellikle çinko ve kobalt) imidazol (mIm) gruplarına (bağlayıcı) bağlandığı yapılardır. İlk olarak 2006 yılında Yaghi ve grubu tarafından sentezlenen bu malzemeler yüksek kimyasal kararlılıkları, toksik olmayan, biyouyumlu özellikleri nedeniyle ilaç salım sistemleri tasarımında ayrıcalıklı özelliklere sahiptir (Park vd. 2016; Zheng vd. 2015; Sun vd. 2012).



Şekil 2.8 Çeşitli ZIF yapıları

MOF ailesinin ZIF grubunun bir üyesi olan **ZIF-8**, genellikle aşırı miktarda imidazol kullanan 298-423K arasındaki sıcaklıklarda solvotermal veya hidrotermal sentez yöntemleri ile sentezlenebilmektedirler. ZIF-8'in şematik yapısı **Şekil 2.9**'da verilmiştir (Park 2006, Demir vd. 2014).



Şekil 2.9 ZIF-8'in şematik yapısı

MOF yapıları içerisinde kimyasal kararlılığı gösterilmiş ilk örnek ZIF-8'dir (Zn(mIm)2; mIm=2-metil imidazol). Hidrofobik özelliğe sahip ZIF-8, 0.34 nm gözeneklerin mIm bağlantı gruplarının oluşturduğu 1.16 nm açıklıklarla bağlandığı kafes yapısına sahiptir. Özellikle toksik olmaması, yüksek yüzey alanı, esnek iskelet yapısı, yüksek gözenek oranı/geniş gözenek açıklığı ve pH kontrollü kararlılığı nedeniyle ilaç yükleme/salım sistemleri geliştirilmesinde önemli potansiyele sahiptir. Buna karşın, ZIF-8 kristalleri sulu ortamda yüksek pH değerlerinde kararlı olmalarına rağmen düşük pH ortamlarında Zn^{2+} iyonlarının yapıdan çözünmeleri nedeniyle kararlılıklarını yitirmektedir. pH-duyarlı çözünme davranışı nedeniyle kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanımı yaygınlaşmaktadır (Sun vd. 2012).

Kanser tedavisine yönelik yapılan ve ZIF-8'in ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı çalışmalarda genellikle *in-situ* kapsülleme yöntemi kullanılmıştır. Zheng vd. (2016), ZIF-8 nanokristaline *in situ* yöntemle doksorubisin (DOX) antikanser ilacını %20 yükleme verim ile kapsüllemiş, pH 6.5-7.4'te 15 günde <%1 salımla sağlıklı hücrelere zarar vermezken pH 5.0-6.0'da 7-9 gün içerisinde yüksek salım oranıyla (>%95) kanser hücrelerini hedefleyen salım sistemi geliştirmişlerdir. Liang vd. (2018) ise yürüttükleri

çalışmada DOX'u sığır serum albümin (BSA) ile beraber ZIF-8 yapısına %20 yükleme verimiyle kapsülleyerek 22 saatteki salımını incelemiş ve pH 5'te, 6'da ve 7.4'te sırasıyla %80, %40 ve %10 oranında salındığını bulmuşlardır. Li ve Zheng (2018) ise kanser tedavisi amaçlı kullanılan kurkumin (CCM) ilacını hiyaluronik asit kaplamalı ZIF-8'e *in situ* olarak ~%4.5 yükleme verimiyle kapsülleyerek nötr ortamda 1 haftada %24 salım oranı elde ederken kanserli hücrelerin pH'ında 3 günde %80 salım oranına ulaşmışlardır.

Antibakteriyal etkinlik, ZIF-8 kullanılarak araştırılmış bir diğer uygulamadır. Bu çalışmalarda ZIF-8 tek başına veya antibiyotik ilaçların yüklenmesi ile kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılmıştır. Enfeksiyonun olduğu ortamın pH'ının düştüğü bilinmektedir. ZIF-8 yapısı özellikle düşük pH'larda bozunduğunda ortamasalınan Zn^{+2} iyonlarına bağlı olarak antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Antibiyotiklerin enkapsüle edildiği çalışmalar ise, antibiyotiğin etkinliği sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek şekilde pH kontrollü salım ile sağlamaya yöneliktir (Karakeçili vd. 2019). Liu vd. (2020) araştırmalarında ZIF-8'e vankomisin antibiyotiğini kapsülleyerek hiyaluronik asit ile kaplamış ve *in vivo* olarak akciğer iltihabını gidermede etkili sonuçlar elde etmişlerdir. Karakeçili vd. (2019) ise vankomisin antibiyotiği kapsülledikleri ZIF-8 partiküllerini farklı oranlarda ıslak eğrilmiş kitosan doku iskelelerine ekleyerek kemik iliği iltihabı tedavisinde etkili olabilecek potansiyel doku iskelesi geliştirmişlerdir.

ZIF-8 sadece ilaç salım sistemlerinde değil farklı biyolojik moleküllerin depolanmasında da araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmalar genellikle biyodepolama uygulamaları olarak geçmektedir ve kapsüllenen molekülün ömrünü uzatmaya yöneliktir. Liang vd. (2015) araştırmalarında albumin, BSA, çeşitli enzimler ve DNA'yı sırasıyla %100, %100-82 ve %100 yükleme verimiyle *in situ* olarak kapsüllemiş, 6 saat süreyle pH 6'da ve pH 7.4'te salımlarını incelemiş ve sırasıyla %90-100 ve %5-15 olarak bulmuşlardır. Bu da kolay degredasyona uğrayan bu moleküllerin ZIF-8 yapılara yüklenmesiyle 6 saat süreyle pH 7.4'te saklanabileceğini göstermekte ve ZIF-8'in potansiyel biyodepolama ajanı olduğunu kanıtlamaktadır.

Literatürde kemik doku mühendisliğinde ZIF-8 kullanımı yeni yeni gelişmeye başlamıştır. Ran vd. (2018), kemik farklılaşması ajanı olan dekzametazon (DEX) molekülünü ZIF-8'e % 6.5 yükleme verimiyle yüklemiş ve sonrasında Ti yüzeyine bu partikülleri eklemiş, üzerlerini hücre yapışmasını sağlayabilmek adına modifiye ipek fibron ile kaplamışlardır. Salımın pH 7.4'te 12 günde %90'a ulaşmasıyla kök hücrelerin kemik farklılaşmasını sağlamayı başarmışlardır (Ran vd. 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan deneysel çalışmalar ile ilgili bilgi sunulmaktadır. Öncelikle deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler tanımlanmış, ardından ZIF-8 ve BMP-6 yüklü ZIF-8 (BMP-6@ZIF-8) nanokristal yapıların sentezine ve karakterizasyonunayönelik gerçekleştirilen çalışmalar açıklanmıştır. Sonrasında, boş PCL, ZIF-8 nanokristallerini içeren PCL ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerini içeren PCL fibröz yapıdaki doku iskelelerinin elektroeğirme yöntemi ile üretimi anlatılmış, karakterizayon çalışmalarına değinilmiştir. Son olarak, doku iskeleleri ile gerçekleştirilmiş olan ve MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücrelerin kullanıldığı *in vitro* hücre kültür çalışmaları ve Wistar albino ratlar ile gerçekleştilen *in vivo* çalışmalar açıklanmıştır.

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin sentezinde kullanılan 2-metilimidazol ($C_4H_6N_2$, mIm), çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), hidroklorik asit (HCl, *fuming* 37%) ve rekombinant insan morfogenetik proteini-6 (BMP-6; 26.2 kDa) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Fibröz membranların üretiminde kullanılan poli(Ɛ-caprolakton) (PCL, M_a=70000-90000), diklorometan (DCM) ve dimemtil formamid (DMF) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. BMP-6'nın kontrollü salımının incelendiği çalışmalarda Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilen BMP-6 ELISA Kiti kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücre hattı MC3T3-E1 (preosteoblast, ikilenme süresi 36 saat) Riken (Japonya) firmasından temin edilmiştir. Besi ortamı olarak kullanılan *Minimum Essential Medium* (MEM Alpha, L-glutamin içeren) Biowest (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan fetal sığır serum (FBS), penisilin-streptomisin (pen/strep), hekzametildisilazan (HMDS, 100%) ve gluteraldehit çözeltisi (25% w/v) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. *Presto Blue* belirteci Invitrogen (ABD) firmasından temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmalarında kullanılan yüksek-kapasiteli cDNA ters transkriptaz kiti

Applied Biosystems (ABD), Trizol (*Qiazol*) ve *Rneasy Mini Kit* QIAGEN (Almanya) firmalarından satın alınmıştır.

3.2 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Sentezi

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerin sentezi hidrotermal sentez yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, sulu ortamda hazırlanan çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2.6H_2O$)) çözeltisi ve 2-metil imidazol (mIm) çözeltileri oda sıcaklığında 30 dakika süre ile karıştırılmıştır. ZIF-8 sentezinde karışımın mol oranı: Zn^{+2}:mIm:Su=1:70:1243 olarak belirlenmiştir (Şahin vd. 2018). Elde edilen reaksiyon çözeltisi 18000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından nanokristal yapılar saf metanol ile dört kez 15'er dakika yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işlemi sonrasında nanokristaller 40ºC'de iki gün süre ile kurutulmuş ve ZIF-8 nanokristal yapıları **(ZIF-8)** elde edilmiştir.

BMP-6'nın ZIF-8 nanokristallerine yüklenmesi *in-situ* olarak sentez sırasında gerçekleştirilmiştir. ZIF-8 sentezinde açıklandığı şekilde hazırlanan çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2.6H_2O$)) çözeltisine BMP-6'nın deiyonize suda çözülmesiyle hazırlanan BMP-6 çözeltisi eklenmiştir (10 µg/ml). Ardından, elde edilen karışıma 2-metil imidazol (mIm) çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti santrifüjlenerek çöken nanokristaller dört kez saf metanol ile yıkanmıştır. İki gün 40ºC'de gerçekleştirilen kurutma işleminin ardından BMP-6 yüklü ZIF-8 nanokristalleri **(BMP-6@ZIF-8)** elde edilmiştir.

3.3 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Karakterizasyonu

Bu bölümde tez çalışması kapsamında ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapıların karakterizasyonuna yönelik olarak BMP-6 yükleme veriminin tayini, kristal yapıların PXRD ile tayini, FTIR-ATR ile kimyasal yapı analizi ve SEM ile gerçekleştirilen morfolojik yapı analizleri açıklanmıştır.

3.3.1 BMP-6 yükleme veriminin tayini

BMP-6 yükleme veriminin tayin edilmesi amacıyla, metanol ile yıkama işlemi öncesinde santrifüjden elde edilen süpernatant BMP-6 ELISA kiti kullanılarak analiz edilmiştir. ELISA yöntemiyle süpernatantta tayin edilen miktar nanokristallere yüklenmeyerek çözelti ortamında kalan BMP-6 miktarıdır. İndirekt yöntemle gerçekleştirilen bu miktar tayini sonucunda yükleme verimi Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Yükleme Verimi (\%)} = \left[\frac{(\text{toplam BMP-6}) - (\text{supernatanttaki BMP-6})}{\text{toplam BMP-6}}\right] \times 100 \qquad (3.1)$$

3.3.2 Kristal yapı tayini

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapılara ait toz X-ışını kırınımı (PXRD) modelleri, Cu-Ka radyasyon kaynağına sahip Rigaku Ultima-IV kırınımölçer kullanılarak kaydedilmiştir. Analizler 5–400 2θ Bragg açısı aralığında 0.20 dk^{-1} tarama hızı ile gerçekleştirilmiş ve 7.35, 12.75 ve 18.07 Bragg açılarındaki piklerin yoğunlukları saf ZIF-8'in %100 kristalinitede olduğu kabul edilerek hesaplanmıştır.

3.3.3 Kristallerin Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma (FTIR-ATR) analizi

Nanokristal yapıların FTIR-ATR (Thermo Scientific Nicolet Is10) spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 4000-700 cm^{-1} dalga boyu aralığında elde edilmiştir.

3.3.4 Kristallerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapı tayini

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapıların morfolojisi ve partikül boyutu taramalı elektron mikroskopisi (SEM, *QUANTA 400F Field Emission*) ile belirlenmiştir. Örnekler, görüntülenmeden önce Altın-Paladyum (Au-Pd) ile kaplanmıştır. Ortalama parçacık boyutu ve standart sapması, SEM görüntüsü üzerinde en az 50 nanokristal kullanılarak hesaplanmıştır (*Image J,* ABD).

3.4 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Fibröz Membranların Elektroeğirme Yöntemi ile Üretilmesi

Polikaprolakton (PCL) çözeltisi (%12, a/h) oda sıcaklığında diklorometan-dimetil formamid (DCM:DMF, 1:1 h/h) içerisinde hazırlanmıştır. Elektroeğirme yönteminde sistem parametreleri, şırınga pompası kullanılarak akış hızı 3-12 ml sa^{-1}, toplayıcı-iğne ucu arası uzaklık 15-35 cm ve uygulanan voltaj 22-26 kV arasında optimize edilmiştir ZIF-8 veya BMP-6@ZIF-8 yüklü membranların üretimi amacıyla, hazırlanmış olan PCL çözeltisine elektroeğirme işlemi öncesinde, %5 (a/a) oranında ZIF-8 veya BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapılar eklenmiştir. Mikron-altı fiberler düz bir toplayıcı üzerinde rastgele toplanmış ve 11 mm çapında dairesel membranlar halinde kesilmiştir. Elde edilen membranlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4^{o}C'de tutulmuştur (**PCL**, **PCL/ZIF-8**, **PCL/BMP-6@ZIF-8**).

3.5 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Fibröz Membranların Karakterizasyonu

Bu bölümde tez çalışması kapsamında PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membranların karakterizasyon yöntemleri verilmiştir. Karakterizasyonlar SEM ile morfolojik inceleme ve su tutma kapasitesi tayini olarak iki kısımda incelenmiştir.

3.5.1 Fibröz membranların morfolojik yapı tayini

Morfoloji ve fiber çapı, taramalı elektron mikroskobu (SEM, *QUANTA 400F Field Emission*) ile analiz edilmiştir. Membran örnekleri, görüntülemeden önce alüminyum numune tutuculara monte edilmiş ve Au-Pd ile kaplanmıştır. Ortalama fiber çapı ve standart sapması, her SEM görüntüsü üzerinde en az 20 fiber kullanılarak hesaplanmıştır (*Image J*, ABD).

3.5.2 Fibröz membranların su tutma kapasitesi analizi

Mebranların su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Membranlar 37ºC'de fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) içerisine alınmış ve su tutma kapasiteleri gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Belirli zaman aralıklarında 37ºC'deki PBS içerisinden alınan membranlar fazla suyu filtre kağıdına emdirilerek tartılmıştır. Su tutma değerleri Eşitlik 3.2 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Su Tutma} = \frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte; A_0 membranın kuru ağırlığını, A_t ise belirli bir t zamanındaki membran ağırlığını ifade etmektedir.

3.6 Fibröz Membranlardan BMP-6 Salım Kinetiğinin İncelenmesi

PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlardan BMP-6 salımının incelendiği çalışmalar ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları 37ºC'de 3 ml rezervuar hacminde fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) ortamında yürütülmüştür. Belirlenen zaman aralıklarında salım ortamından alınan örnekler ELISA kiti ile analiz edilinceye kadar -20ºC'de saklanmıştır. Elde edilen veriler salım davranışının kinetik modelini belirlemek üzere değerlendirilmiştir (Rezaei ve Nasirpour, 2019; Singhvi ve Singh, 2011).

3.7 MC3T3-E1 Preosteoblast Hücreleri ile *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Osteojenik aktivitenin belirlenmesi amacıyla MC3T3-E1 preosteoblastik hücreler ile *in vitro* ortamda hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Hücreler 37ºC'de %5 CO_2 ortamında (Thermo-Scientific), %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 pen/strep (10^4 ünite penisilin+10mg/ml streptomisin) içeren MEM Alpha bazal besi ortamı içerisinde inkübe edilmiştir. Hücre doluluk oranı %85'in üzerine ulaştığında, tripsinizayon işlemi ile hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Tüm hücre kültür çalışmaları laminer akışlı kabin içerisinde yürütülmüştür (Bioair, Type II).

3.7.1 PCL membranlar üzerinde hücre üremesinin tayini

MC3T3-E1 hücrelerinin PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP@ZIF-8 membranlar üzerindeki üreme davranışı *Presto Blue* analizi ile takip edilmiştir. Membranlar hücre ekimi öncesinde 30 dakika süreyle şartlandırma ortamında bekletilmiştir. Çalışmalar parafilm kaplı 24-gözlü Petri kaplarında yürütülmüştür. Bazal besi ortamında süspanse edilen hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiş ve her bir gözde bulunan doku iskelesi üzerine hücre ekimi yapılmıştır ($1x10^5$ hücre/membran, 50 µL). Hücrelerin yüzeye tutunması için membranlar 2 saat süre ile 37ºC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiş ardından üzerlerine bazal besi ortamı eklenmiştir. Bazal besi ortamı 24 saatlik inkübasyonun ardından uzaklaştırılarak kültüre osteojenik farklılaşma ortamı (MEM Alpha, %10 FBS, %1 PS, 10 mM β-gliserol fosfat ve 50 µg/ml askorbik asit) eklenmiştir. Hücre üremesi belirlenen kültür sürelerinde (1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günler) *Presto Blue* analizi ile takip edilmiştir. Belirlenen günlerde kültür ortamı uzaklaştırılarak her bir örnek üzerine *Presto Blue* çözeltisi eklenmiştir. İki saatlik inkübasyonun ardından renk değiştiren ortamın 570 nm'de absorbans değeri belirlenmiştir (Demirtaş vd. 2017).

3.7.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile hücre morfolojisinin tayini

Membranlar üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisi kültürün 7. ve 14. günlerinde gerçekleştirilen SEM (*QUANTA 400F Field Emission*) analizleri ile belirlenmiştir. Membranlar %2.5'luk glutaraldehit çözeltisi (PBS pH:7.4 içerisinde) ile fiksasyon işlemine tabi tutulmuş ardından farklı konsantrasyonlardaki (%30, %50, %70, %90 ve %100) etanol çözeltilerinde 2'şer dk. bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak saf hekzametilendisilazan ile 5 dk. muamele edilen membranlar altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM analizi gerçekleştirilmiştir (Demirtaş vd. 2017).

3.7.3 Alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi tayini

Kültürün 7 , 14. ve 21. günlerinde alınan ve analiz gününe dek -80ºC'de tutulan membran formundaki doku iskelesi örnekleri üzerindeki hücreler bistüri yardımıyla parçalanmış, ardından her örneğe 250 µl Triton X-100 (0.01%, h/h in DPBS) çözeltisi ilave edilmiş ve örnekler 4ºC'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 4ºC'de 12 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve 50 µl supernatant 125 µl ALP çözeltisi (1 mM MgCl2 ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren p-nitrofenil fosfat (10 ml) sıvı substrat sistemi) 96-kuyucuklu petri kaplarına alınarak 37ºC'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda oluşan tepkimeyi durdurmak için 2.5 M NaOH ilave edilmiştir. Ardından absorbans değerleri 405 nm'de mikroplaka okuyucusunda (Raito, Kore) belirlenmiştir.

3.7.4 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile hücre farklılaşmasının tayini

Hücrelerin osteojenik farklılaşması gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde alınan membran doku iskelesi örnekleri RNA izolasyonuna kadar -80ºC'de muhafaza edilmiştir. Örnekler Trizol ile muamele edildikten sonra *Rneasy Mini Kit* kullanılarak ve üreticinin protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti kullanılarak ısıl döngüleyici (Bio-rad) cihazında dört aşamalı sıcaklık döngüsünde (25ºC 10 dk, 37 ºC 120 dk, 85ºC 5 dk ve 4 ºC soğutma) cDNA'lara çevrilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri ölçümünde *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (*Solis BioDyne*, Estonya) kitleri ile *Light Cycler 480* (*Roche*) RT-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz, aktivasyon basamağı 95ºC'de 15 dk, uzatma basamağı 95ºC'de 15 s, 60ºC'de 20 sn, 72ºC'de 20 sn ve ayrılma basamağı 60ºC'de 4 sn ve 95ºC'de 20 sn olmak üzere 40 döngüde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan genler ve gen spesifik primer dizinleri **Çizelge 3.1**'de verilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde C_T değerlerinden yararlanılmış ve hesaplamalar HPRT referans genine göre normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri

Gen	İleri primer dizilimi (5′-3′)	Geri primer dizilimi (5′-3′)
HPRT (Referans)	CTGGTGAAAAGGACC TCTCGAA	CTGAAGTACTCATTA TAGCAAGGGCAT
OCN	AAGCAGGAGGGCAAT AAGGT	TTAGGGCAGCACAGG TCCTA
OPN	CACTTTCACTCCAAT CGTCCCTAC	ACTCCTTAGACTCAC CGCTCTTC
RUNX-2	ACCAGATGGGACTGT GGTTA	AAGGTGAAACTCTTGC CTCG
COL-I	ATGCCGCGACCTCAA GATG	TGAGGCACAGACGGC TGAGTA

3.8 *In Vivo* Kemik İyileşmesinin İncelenmesi

PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP@ZIF-8 membranların *in vivo* ortamda kemik iyileştirme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla Wistor albino ratlar ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hayvanlarla ilgili tüm işlemler Ankara Üniversitesi HADYEK tarafından onaylanmış ve çalışmalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmalarda, kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli kullanılmış ve kemik rejenerasyonun incelenmesinde 4 ana grup oluşturulmuştur. Bu gruplar: tedavi uygulanmayan negatif kontrol grubu, PCL membranların kullanıldığı kontrol grubu (PCL), PCL/ZIF-8 membranlar ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların kullanıldığı gruplardır. Her grupta 6 rat olacak şekilde toplam 24 dişi Wistar albino rat kullanılmıştır.

3.8.1 Kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli

Membranların implantasyonunda, genel anestezi altındaki ratların tıraş ve tespit işlemlerinin ardından kafataslarına parietal kemik üzerinde yaklaşık 5 mm çapında 1 mm derinliğinde delik açılmış ve implantasyon gerçekleştirilmiştir (Kim vd. 2014). Negatif kontrol grubunda ise sadece ensizyon ve trepanasyon yapılıp yara kapatılmıştır. İşlem görmüş bölgeler enfeksiyona karşı antibiyotik içeren krem ile muamele edilmiştir. Operasyon sonunda ratlar ayrı kafeslerde rutin yaşam ortamlarına alınarak gözlemlenmiştir. Post-op ağrı veya acıların azaltılması amacıyla subkutan enjeksiyon yoluyla uygun dozda aneljezik uygulanmıştır. Sekiz haftalık bekleme süresinin ardından ratlar sakrifiye edilerek kafatasına implante edilmiş olan membranlar çevre dokuyla birlikte incelenmek üzere alınmıştır. Doku iskelelerinin kemik yenilenmesine etkisi mikro-bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) ile incelenmiştir.

3.8.2 Mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT)

Örnekleri taramak için yüksek çözünürlüklü, masaüstü bir Micro-CT sistemi olan Bruker Skyscan 1275 (Kontich, Belçika) kullanılmıştır. Tarama koşulları 100 kVp, 120-mA, 0.5-mm Al / Cu-lt, 15.2, µm piksel boyutu, 0.2 adımda döndürme şeklindedir. Halka artefaktlarını en aza indirmek için, her taramadan önce dedektörün hava kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Her numune 5 dakikalık bir entegrasyon süresi içinde 360° döndürülmüştür. Ortalama tarama süresi yaklaşık 2 saat sürmüştür. Diğer ayarlar, sertleştirme düzeltmesi, örneklerin önceden taranması ve rekonstrüksiyonu üreticinin talimatlarına göre optimal kontrast limitlerinin girilmesini içermektedir.

Analiz sonrası görüntülerin analizlenmesinde eksenel iki boyutlu (2B), 1000 × 1000 piksel görüntüler elde etmek, örneklerin görselleştirilmesi ve nicel ölçümleri için Feldkamp vd. (1989) tarafından açıklanan modifiye edilmiş algoritmayı kullanan NRecon (sürüm 1.6.10.5, SkyScan, Kontich, Belçika) ve *CTAn* (sürüm 1.19.11.1, SkyScan) yazılımları kullanılmıştır. Rekonstrüksiyon parametreleri için halka artefakt düzeltmesi ve düzgünleştirme sıfıra sabitlenmiş ve ışın artefakt düzeltmesi %40'a ayarlanmıştır. NRecon yazılımı (Skyscan, Kontich, Belgium) kullanılarak tarayıcı tarafından elde edilen

görüntüler numunenin 2B dilimlerini göstermek üzere yeniden yapılandırılmıştır. Toplamda 1023 kesit görüntü, mikro-CT'deki tüm hacimden yeniden oluşturulmuştur. Ayrıca, micro-BT için numunenin 3B hacimsel görselleştirilmesi, analizi ve hacmi için CTAn (Skyscan, Aartselaar, Belçika) yazılımı kullanılmıştır. Tüm rekonstrüksiyonlar 75 Hz'de 2048-2560 ve 11.9 bitte çalışan 0.17 mm nokta aralığı ile 21.3 inç düz panel renkli aktif matris TFT tıbbi ekran (NEC MultiSync MD215MG, Münih, Almanya) üzerinde yapılmıştır. Görselleştirme için Skyscan CTVox(v.3.3.1, Skyscan, Kontich, Belçika)'ta yeniden yapılandırılmış görüntüler işlenmiştir.

Rekonstrüksiyondan sonra, ilgi alanlar (ROI) CTAn yazılımı kullanılarak numunenin içindeki tüm implantı içerecek şekilde çizilmiş, bu program yeni oluşturulan kemiğin 3B mikro mimarisini analiz etmek için kullanılmıştır. Yeni oluşan kemikleri kafatasından ayırt etmek için uygun bir eşik gerektiğinden eşik değeri; alt sınır 80 ile 255 arasında (gri değerlerle), üst sınır en yüksek kemik yoğunluğu değerini temsil eden parlaklık spektrumununa göre ayarlanmıştır. Yeni oluşturulmuş kemiğin 3B olarak hesaplanması için orijinal gri tonlamalı görüntüler, gürültü azaltma için bir Gauss düşük geçiş filtresi ile işlenmiş ve uyarlanabilir eşik yöntemi (Otsu'nun yöntemi) kullanılmıştır. Eşikleme (veri çiftleme) işleminden sonra, yalnızca siyah / beyaz piksellerin dayatılan bir görüntüsü elde edilmiştir. Daha sonra, her dilim için ayrı ayrı, tamamen yeni kemiğin hesaplanmasına izin vermek için tek bir nesne içerecek şekilde ilgilenilen bir bölge seçilmiştir. Her numunenin 2B ve 3B mikro mimarisini analiz etmek için programın tüm spesifikasyonları kullanılmıştır. Doku hacmi (TV), kemik hacmi (BV), yüzde kemik hacmi (BV / TV; %), trabeküler kalınlık (Tb.Th; mm), trabeküler ayrılma), trabeküler sayı, yüzey yoğunluğu (1/mm) ölçülen yapısal parametreler ve yapısal model indeksi ve yeni kemiğin fraktal boyutu ölçülmüştür. Bu parametreler, 3B olarak hesaplanmıştır.

3.8.3 Histolojik analiz

Defekte edilen kalvarial kemik örnekleri, 24 saat boyunca hızlı dekalsifikatör çözeltisinde (*Biocal C decalsifier*) dekalsifiye edilmiş ve daha sonra kademeli olarak etanol serisi ile dehidre edilmiştir. Ksilol içerisinde temizlenen örnekler parafine gömülmüş, 4 μm kalınlığında beş adet boyuna seri kesit alınmış ve hematoksilin ve eozin (HE) ve

mikroskobik değerlendirme için Masson'un trikrom boyama tekniği ile boyanmıştır. Örnekler daha sonra ışık mikroskobu altında incelenmiş görüntüler kaydedilmiştir.

3.9 İstatistiksel analizler

Hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçların anlamlılığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler *GraphPad Prism 6.1* programı kullanılarak bağımsız örneklem t-testi yapılarak gerçekleştirilmiş, p değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı şeklinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu bölümde deneysel çalışmaların sonucunda elde edilen bulgular sunulmuştur. Öncelikle nanokristallerin sentez ve karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar açıklanmıştır. Sonrasında, elektroeğirme yöntemi ile üretilen fibröz membran yapıdaki PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara değinilmiştir. Doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğinde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yürütülen ve MC3T3-E1 preosteoblastik hücreler ile gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına ait bulgular verilmiştir. Son olarak, doku iskeleleri ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş, membran yapıdaki doku iskelelerinin kemik oluşumuna katkıları değerlendirilmiştir.

4.1 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 Nanokristallerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

ZIF-8 nanokristallerinin sentezinde en çok tercih edilen yöntemler yüksek sıcaklıklar gerektirmeyen solvotermal ve hidrotermal sentezlerdir. Solvotermal yöntemde organik çözücüler kullanılmakta ve hassas moleküllerin, özellikle biyomoleküllerin enkapsülasyonu sırasında molekül yapısında bozunmalara neden olabilmektedir. Bu çalışmada BMP-6@ZIF-8 nanokristallerin sentezinde BMP-6 yapısının bozulmaması için oda sıcaklığında hidrotermal sentez yöntemi tercih edilmiştir. Paralel olarak ZIF-8 de aynı yöntemle sentezlenmiş ve reaksiyonun verimi her iki nanokristal için de ~%70 olarak hesaplanmıştır. Bu verim literatürle karşılaştırıldığında beklenen seviyededir (Demir vd. 2014, Fatma vd. 2018), ayrıca reaksiyon verimlerinin benzer olması BMP-6 molekülünün ZIF-8 sentezinde inhibe edici etkisinin olmadığını göstermektedir.

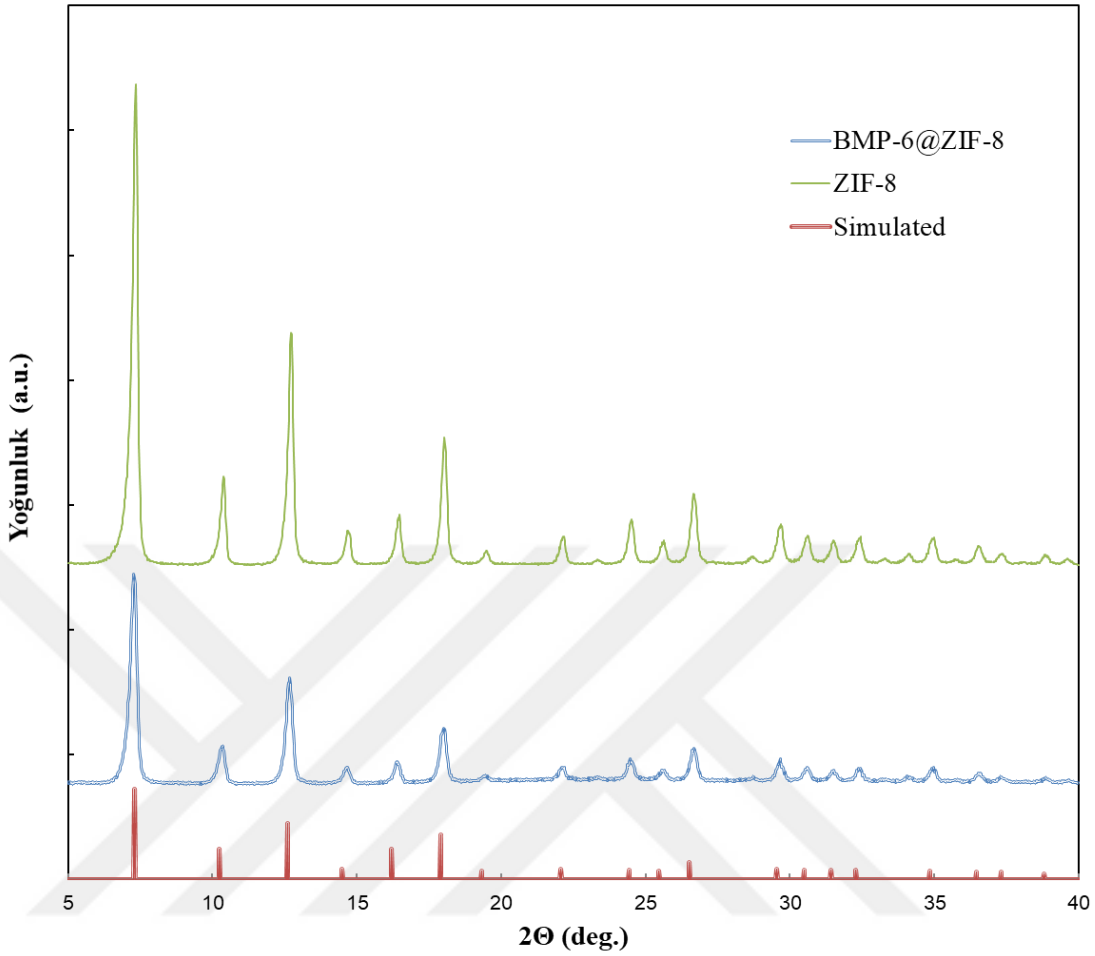
4.1.1 BMP-6 yükleme veriminin tayini

Tez çalışması kapsamında BMP-6 büyüme faktörünün ZIF-8 nanokristallerine enkapsülasyonu, *in-situ* olarak sentez aşamasında gerçekleştirilmiştir. Literatürde, ZIF-8 nanokristallerinin taşıyıcı olarak kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde, ilaç veya biyomoleküllerin adsorpsiyon yoluyla sentez sonrası nanokristallere yüklendiği veya

ZIF-8 sentezi sırasında ortama eklenerek *in-situ* olarak moleküllerin enkapsüle edildiği çalışmalar mevcuttur (Fu vd. 2019, Liédana vd. 2012, Liu vd. 2017, Luo vd. 2018, Nabipour vd. 2017). Bu çalışmalar incelendiğinde, *in-situ* yöntemde yükleme veriminin arttığı ve daha kısa sürelerde enkapsülasyon sağlandığı görülmüştür (Liédana vd. 2012, Luo vd. 2018, Karakeçili vd. 2019). Tez çalışması kapsamında, BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin *in-situ* sentezi, oda sıcaklığında başarıyla gerçekleştirilmiştir. ELISA analizi ile BMP-6 enkapsülasyon verimi, Eşitlik 3.1 kullanılarak %98 olarak hesaplanmıştır. Literatürde, Zheng vd. (2016) DOX antikanser ilacını ~%20, Liang vd. (2018) BSA ve DOX moleküllerini beraber ~%20, Li ve Zheng (2018) CCM antikanser ilacını ~%5, Liu vd. (2020) ve Karakeçili vd. (2019) vankomisin antibiyotiğini sırasıyla ~%34 ve ~%99, Liang vd. (2015) çeşitli enzimleri %82-100 aralığında ve Ran vd. (2018) kemik farklılaşma molekülü olan DEX'i % 6.5 enkapsülasyon verimiyle *in situ* olarak sentezlemişlerdir. Yapılan çalışma literatürle karşılaştırıldığında, BMP-6'nın ZIF-8 nanokristaline *in situ* olarak enkapsüle edilmesi ile oldukça yüksek enkapsülasyon verimi elde edilmiştir.

4.1.2 Kristal yapı tayini

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristalleri için elde edilen toz-XRD deseninde 7.35, 10.40, 12.75, 14.73, 16.48, 18.07, 22.18, 24.55 ve 26.73 Bragg (2Θ) açılarında çıkan pikler ZIF-8 kristalleri için karakteristik piklerdir ve literatürle uyuşmaktadır (**Şekil 4.1**) (Park vd. 2006). ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8'in toz-XRD desenleri, saf ZIF-8 fazının varlığını doğrular niteliktedir. BMP-6'nın ZIF-8 nanokristallerine yüklenmesi sonrasında, ZIF-8'in kristal yapısının değişmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte BMP-6 yüklü nanokristal yapıların kristalinite değerinde %55 oranında azalma meydana geldiği görülmüştür. BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapılara ait XRD deseni değerlendirildiğinde, enkapsülasyon sonrası kafes yapıda bulunan BMP-6 moleküllerinin X-ışını geçirimini etkilemesi ile pik şiddetlerinde azalma meydana geldiği sonucuna varılmıştır (Gu vd. 2005, Gu vd. 2012, Zhu vd. 2014).

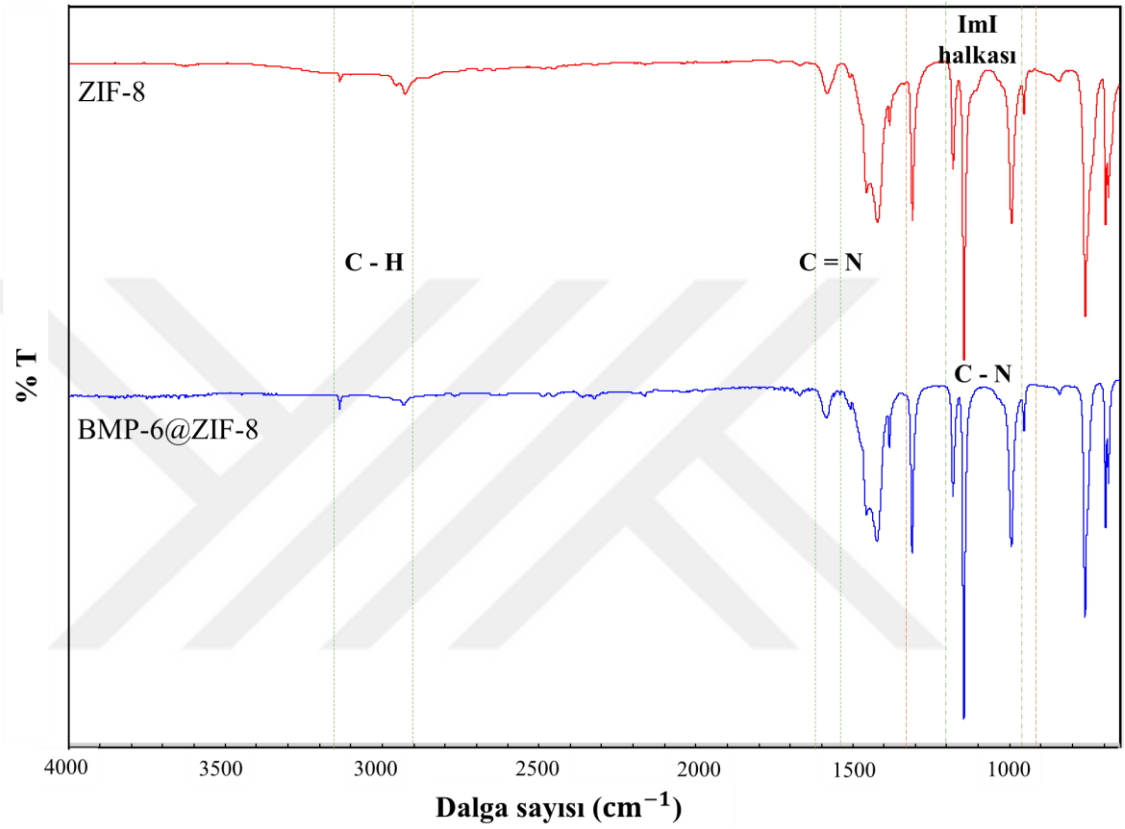


Şekil 4.1 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin toz-XRD desenleri

4.1.3 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapıların Fourier dönüşümlü kızılötesi – zayıflatılmış toplam yansıtma (FTIR-ATR) analizi

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapıların FTIR-ATR spektrumları incelendiğinde, BMP-6 enkapsülasyonu sonrası, ZIF-8 nanokristal yapıların fonksiyonel gruplarında bir değişim olmadığı görülmüştür (**Şekil 4.2**). Saf ZIF-8'in karakteristik IR spektral bantları, sırasıyla 3135 cm^{-1} ve 2929 cm^{-1}'de aromatik ve alifatik C-H gruplarıdır. Spektrumdaki 1584 cm^{-1}'deki tepe, mIm birimlerinde C=N gerilmesini, 900-1350 cm^{-1} spektral bölgelerdeki bantlar mIm halkasının düzlemsel bükülmesini, 1146 ve 995 cm^{-1} dalga sayısındaki güçlü bantlar ise mIm birimlerinin C-N gerilmesini belirtmektedir. BMP-6@ZIF-8 nanokristalleri için FTIR-ATR spektrumu, sadece saf ZIF-8 nanokristallerinin karakteristik dalga sayılarını göstermiştir ve BMP-6'nın amino asit yapısında bulunan

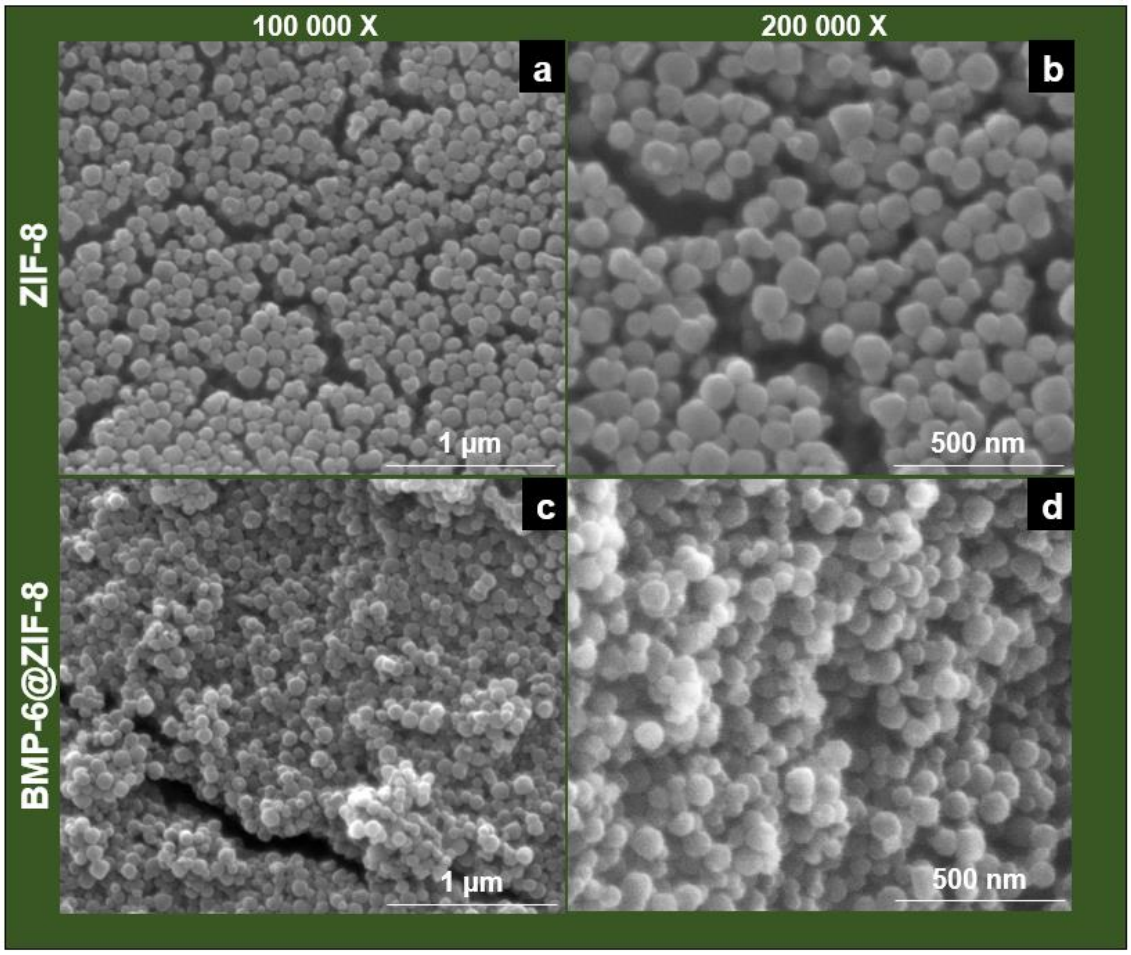
amino gruplarına veya karboksilik asit gruplarına rastlanmamıştır. Bu sonuç, BMP-6'nın ZIF-8 nanokristal yapılarının yüzeyinde adsorplanmadığı ve sentez sırasında ortama eklendiğinde ZIF-8 nanokristalleri içerisinde enkapsüle olduğu sonucunu desteklemektedir (Karakeçili vd. 2019, Kohsari vd. 2016, Park vd. 2016).



Şekil 4.2 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin FTIR-ATR spektrumları

4.1.4 ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapı tayini

ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. **Şekil 4.3**'te verilen görüntüler incelendiğinde, ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 kristallerinin tipik *rhombic dodecahedral* yapıda olduğu ve BMP-6 enkapsülasyonu sonrasında kristalin morfolojik yapısında bir değişim olmadığı görülmektedir. SEM görüntüleri, ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin tekil dağılımlı (*monodispers*) yapıda olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3 ZIF-8 (a-b) ve BMP-6@ZIF-8 (c-d) nanokristallerinin SEM görüntüleri

Sentezlenen ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin boyut analizi Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi *ImageJ* programı kullanılarak yapılmış, sırasıyla 82±18 nm ve 68±15 nm olarak bulunmuştur. Literatürde, oda koşullarında sulu ortamda sentezlenen ZIF-8 nanokristallerinin çapları 70-100 nm arasında değişmektedir (Fatma vd. 2018, Pan vd. 2011, Şahin vd. 2018, Zheng vd. 2015). Yang vd. (2018) indosiyanın yeşilini, Zheng vd. (2016) ve Vasconcelos vd. (2012) doksorubisin antikanser ilacını ve Kaur vd. (2017) 6-merkaptopurin ilacını, ZIF-8 nanokristaline enkapsüle etmiş ve tanecik çaplarında farklı oranlarda artış gözlemlemişlerdir. Ran vd. (2018) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, dekzametazon kemik farklılaşma ajanı ZIF-8 nanokristallerine enkapsüle edilmiş ve nanokristal çaplarında bir değişim gözlenmemiştir. Chowdhuri vd. (2016) ve Karakeçili vd. (2019) tarafından yapılan çalışmalarda, vankomisin antibiyotiği ZIF-8 nanokristallerine enkapsüle edilmiş ve tanecik boyutunda anlamlı bir değişim

gözlenmemiştir. Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, moleküllerin *in situ* enkapsülasyonu sonrasında nanokristal çaplarındaki değişimin, enkapsüle edilen moleküle ve nanokristal ile olan etkileşimine göre değişim gösterebileceği sonucuna varılmıştır. Tez çalışması kapsamında, *in situ* BMP-6 enkapsülasyonu sonrası nanokristal boyutunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0.05$).

4.2 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 Membranlarının Karakterizasyonu

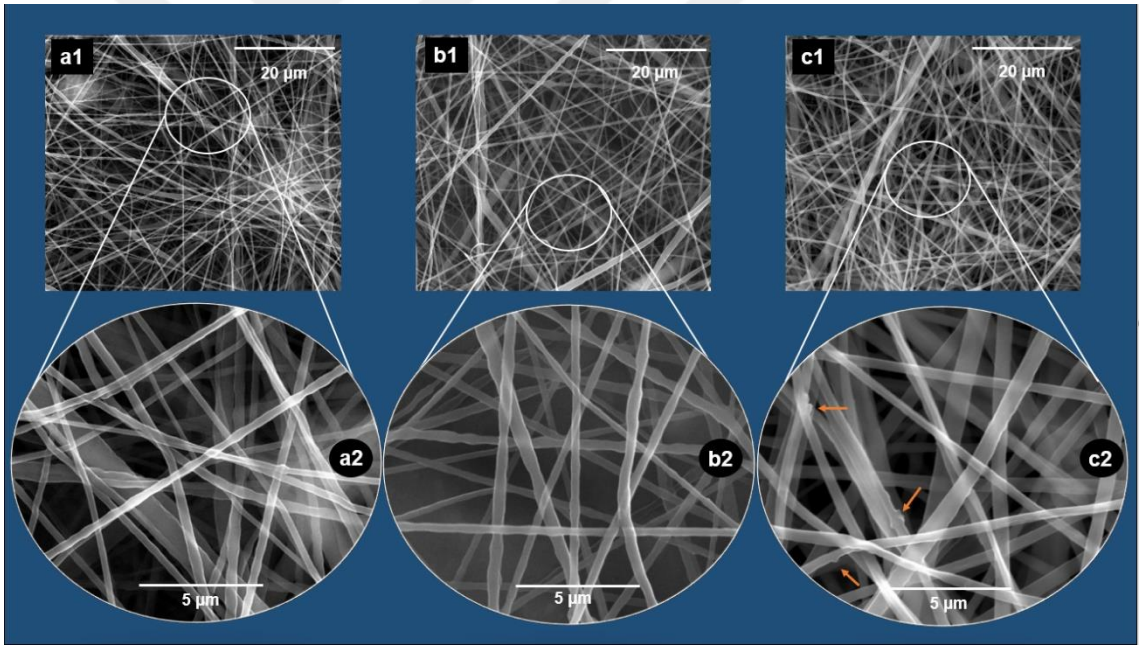
PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membranların elektroeğirme tekniği ile hazırlanması çalışmalarında Bölüm 3.4'te belirtilen aralıkta farklı akış hızı, voltaj ve iğne ucu-toplayıcı arası uzaklık parametrelerinin gelişigüzel yapıda fiber oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Tüm elektroeğirme işlemlerinde sabit derişimde PCL çözeltisi (%12 a/a) DCM:DMF (1:1 h/h) ko-çözücüsünde çözülmüş, ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 içeren doku iskelesi üretiminde birim doku iskelesi başına BMP-6 miktarının sabit tutulması amacıyla %5 (a/a) BMP-6@ZIF-8 kullanılmıştır. Elektroeğirme işleminde sistem parametrelerinin değiştirilmesiyle %10'dan fazla boncuk içermeyen örülmemiş yapıda fiberler elde edilmiştir. **Çizelge 4.1**'de optimize edilen elektroeğirme parametreleri verilmiştir.

Çizelge 4.1 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membranların elektroeğirme parametreleri

Membran	**% PCL (a/h)**	**BMP-6 (ng/doku iskelesi)**	**Voltaj (kV)**	**Akış hızı (ml sa^{-1})**	**Uzaklık (cm)**
PCL	12	0	25.5	6	35
PCL/ZIF-8	12	0	25.0	12	35
PCL/ BMP-6@ZIF-8	12	94	23.0	3	20

4.2.1 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların morfolojik yapı tayini

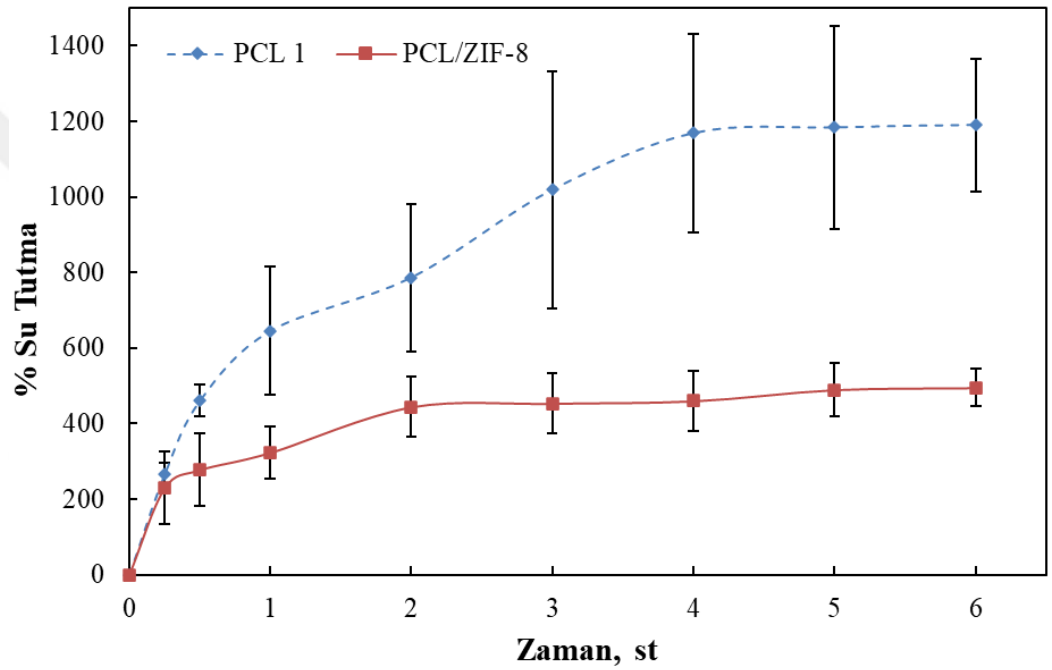
Şekil 4.4'te verilen SEM görüntülerinden en az 20 fiber seçilerek *ImageJ* programı ile ortalama fiber çapları hesaplanmıştır. PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarının ortalama fiber çapları sırasıyla, 256 ± 50 nm, 321 ± 79 nm ve 451 ± 132 nm olarak bulunmuştur. PCL membranının fiber çapları literatürle uyumludur (Şimşek vd. 2012; Tiğli vd. 2011). Yapıya ZIF-8 ve BMP-6@ZIF-8 nanokristallerinin eklenmesi ile birlikte, fiber çaplarında artış gözlenmiştir. Literatürde, Ghaee vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, elektroeğirme ile hazırlanan PCL membranlara polimerin %1'i kadar ZIF-8 eklenmesiyle fiber çaplarında %30'luk bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.4 Elektroeğirilmiş PCL (a1, a2), PCL/ZIF-8 (b1, b2) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (c1, c2) fibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a1, b1 ve c1 x5000 büyütme, a2, b2 ve c2 x20000 büyütme. Turuncu oklar fiber içindeki nanokristalleri işaret etmektedir.)

4.2.2 PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların su tutma kapasitesi

Doku iskelelerinin belirli oranda su tutma kapasitesi özellikle *in vivo* ortamda besin ve metobolitlerin geçişi için önemlidir (Göz, 2014). Tez çalışması kapsamında hazırlanan PCL, PCL/ZIF-8 membranlarının su tuma kapasiteleri Bölüm 3.5.2'de açıklanan şekilde şişme deneyleri ile gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Membranların zamana karşı su tutma oranları (%) **Şekil 4.5**'te gösterilmiştir.

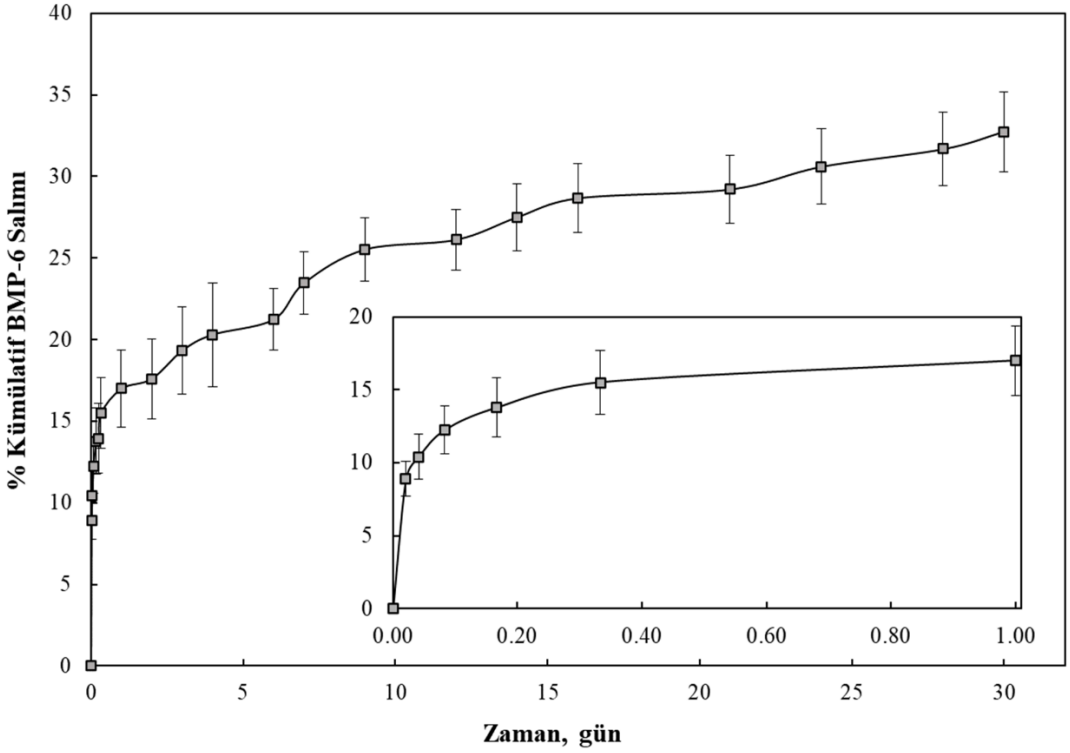


Şekil 4.5 PCL ve PCL/ZIF-8 fibröz doku iskelelerinin PBS (pH: 7.4) ortamında su tutma eğrileri

PCL ve PCL/ZIF-8 membranlarının denge şişme değerleri sırasıyla %1169±264 ve %444±80 olarak bulunmuştur. PCL membranının denge şişme değerine ulaşması 4 saat sonunda gerçekleşmiş, PCL/ZIF-8 membran için ise bu süre 2 saat olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda ZIF-8 nanokristallerinin yapıya eklenmesi ile PCL membranlarda denge şişme değerinin ~%38 oranında azaldığı ve 2 kat daha hızlı dengeye ulaştığı görülmüştür. Denge şişme değerindeki bu azalmanın, ZIF-8 nanokristallerinin hidrofobik yapısına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3 BMP-6 Salım Kinetiğinin İncelenmesi

BMP-6 salım kinetiğinin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmalar, ELISA kiti kullanılarak Bölüm 3.6'da açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. PCL membranlardan zaman karşı %BMP-6 salımı **Şekil 4.6**'da verilmiştir. Salım çalışmaları 30 gün boyunca devam ettirilmiş ve tüm örnekler ELISA kiti kullanılarak analizlenmiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 membranından BMP-6 salımı ani (*burst*) salım gerçekleşmemiş, ilk 4 saatte sadece %12±1 değerine ulaşmış ve 8. saatten itibaren salım yavaşlamış ve kontrollü salım 30 gün boyunca devam etmiştir. 30. gün sonunda kümülatif BMP-6 salımı %33±2 olarak bulunmuştur. Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi salım değerleri plato evresine ulaşmamıştır, bu nedenle salımın 30 günden sonra da devam edebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6 PCL/BMP-6@ZIF-8 fibröz membrandan %kümülatif BMP-6 salımı (küçük grafik ilk 24 saatlik salım davranışını göstermektedir)

Salım kinetiğinin değerlendirilmesi için literatürde kontrollü ilaç salım sistemleri için önerilmiş kinetik modeller kullanılmıştır. Denenen modellerin R^2 değerinin 1'e yakınlığı modelin verilere uyumluluğunu göstermiş ve bu değerlere göre model seçilmiştir. Uygun

model belirlendikten sonra modelin sabiti (K) ve derecesi (n) belirlenmiş ve literatür ile karşılaştırılması yapılmıştır (Berardi vd. 2017; Heydari-Majd vd. 2019; Jassal vd. 2015; Jou vd. 1991; Pisani vd. 2019; Radisavljevic vd. 2018; Ran vd. 2018; Rezaei ve Nasirpour, 2019; Siepmann ve Siepmann, 2012; Song vd. 2009; Thanyacharoen vd. 2018; Um-i-Zahra vd. 2014).

Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi, salım davranışını en iyi tanımlayan matemaktiksel modelin Korsmeyer-Peppas modeli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu modele göre n < 0.5 iken *pseudo-Fickian*, n = 0.5 iken *Fickian*, 0.5 < n < 1 iken anomal difüzyon ve n = 1 iken *non-Fickian* davranışı gözlenmektedir (Pisani vd. 2019). Genelleştirilmiş kuvvet modeli olan Korsmeyer-Peppas modelinde (Eşitlik 4.1) R^2 = 0.974, n = 0.1644 ve K = 17.3293 olarak hesaplanmış ve elektroeğirilmiş PCL/BMP-6@ZIF-8 membranından BMP-6 salımının matematiksel modeli Eşitlik 4.2 kullanılarak değerlendirilmiştir.

$$Q_t = t^n \times K \quad (4.1)$$

$$Q_t = t^{0,1644} \times 17,3293 \quad (4.2)$$

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, n<0.5 olarak bulunduğundan PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlardan BMP-6 salımının *pseudo-Fickian* davranışı gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu salım davranışında difüzyon Fick Yasasına uymakta ve difüzyon kontrollü gerçekleşmektedir ancak difüzyonun dengeye gelmesi oldukça yavaş olmaktadır (Song vd. 2009). Bu salım kinetiği literatürde uzun süreli salımın sağlandığı çalışmalarda gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2 PCL/BMP-6@ZIF-8 membranından BMP-6 salımının matematiksel modelleme verileri

Model	**Sabit, K**	**Derece, n**	**R^2**
Sıfırıncı derece $Q - Q_0 = Q_t = K_0 \times t$	0.1856	0	-8.995
Birinci derece $\frac{dC}{dt} = K_1 \times (C_S - C_t)$	-0.0096	1	0.7958
Higuchi $Q_t = K_H \times t^{0,5}$	7.2095	0.5	0.3199
Hixon-Crowell ${Q_0}^{1/3} - {Q_t}^{1/3} = K_{HC} \times t$	0.0139	1	0.7676
Korsmeyer-Peppas (*The Power Law*) $\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \times t^n$	17.3293	0.1644	0.9740

Literatürde *pseudo-Fickian* salım kinetiğinin geçerlilik gösterdiği çalışmalarda hidrofobik polimerlerden nanofiber elde edilerek ilaç salımının incelendiği çalışmalar mevcuttur. Um-i-Zahra ve çalışma grubu (2014), hidrofobik selüloz asetat/etil asetat polimerlerini farklı oranlarda karıştırarak hidrofilik ketaprofen ilacını yüklemiş ve elektroeğirme yöntemiyle nanofiber elde etmişlerdir. İlaç salımını pH 7.4'te 24 saat inceledikleri bu çalışmada, ilaç salım kinetiği *pseudo Fickian* davranışı göstermiş, ilk 6 saatte ilacın ~%40'ı salınan sistemde 24 saatin sonunda ~%80 salım elde etmişlerdir. Radisavljevic vd. (2018), kefazolin isimli antibiyotiği hidrofobik PCL polimerine yüklemiş ve elektroeğirme ile nanofiberler elde etmişlerdir. Çalışmada ilaç salım kinetiği *pseudo Fickian* davranışı göstermiş ve en yüksek ilaç salımında 1 günde ~%33 salım gerçekleşirken 30. günde toplam salım ~%68 olarak belirlenmiştir. Pisani vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada gentamisin yüklü hidrofobik poli(laktik asit)(PLA)/PCL polimer karışımı elektroeğirme yöntemiyle sentezlenmiş ve ilaç salım kinetiği *pseudo Fickian* davranışı göstermiştir. Salımın ilk 4 saatinde hızlı bir gentamisin salımı olmasına rağmen (~%20) 26. günde %100 salım oranına ulaşılmıştır. Literatür çalışmalarından da

anlaşıldığı gibi hidrofobik polimerlerin nanofiber yapıda sentezlenmesi su tutma özelliklerini iyileştirmiş ve dolayısıyla salım ilk zamanlarında hızlı gerçekleşmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen BMP-6 salım bulguları literatür ile karşılaştırıldığında hidrofobik yapıda bir polimer olan PCL nanofiberlerinden salım mekanizması için *pseudo Fickian* davranışı beklenen bir sonuçtur. BMP-6 moleküllerinin önce içinde bulunduğu hidrofobik ZIF-8 nanokristallerinden, daha sonra hidrofobik PCL fiberlerinden difüzlenerek ortama salındığı düşünülmektedir. Toplam salım oranının 30 gün sonunda ~%30 değerine ulaşabilmesi, BMP-6'nın salım sırasında iki ayrı hidrofobik bariyerle (ZIF-8 ve PCL) karşılaşması ile açıklanabilir. BMP-6 moleküllerinin membranlardan salımı, öncelikle PCL yapının şişmesi sonrasında ise su ile temas eden ZIF-8 nanokristallerinin bozunması ve BMP-6 moleküllerinin serbestleşmesi ile gerçekleşmektedir.

Literatürde, ZIF-8 nanokristallerinden ilaç salımının incelendiği çalışmalarda, asidik ortam koşulları ile pH 7.4 ortamındaki salım miktarları ve hızları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, pH duyarlı ZIF-8 nanokristallerinin asidik ortamlarda hızlı bozunması ile ilaç salımının pH 7.4 ortamına göre çok daha hızlı ve yüksek yüzdelerde olduğunu göstermiştir (Karakeçili vd. 2019; Li ve Zheng, 2018; K. Liang vd. 2015; Z. Liang vd. 2018; Y. Liu vd. 2020; H. Zheng vd. 2016). Bu çalışmada, BMP-6 moleküllerinin PCL membranlardan yavaş ve uzun süreli salımında, ZIF-8 nanokristallerinin pH 7.4 salım ortamında kararlı yapılarını daha uzun süre korumalarının da etkin olduğu düşünülmüştür.

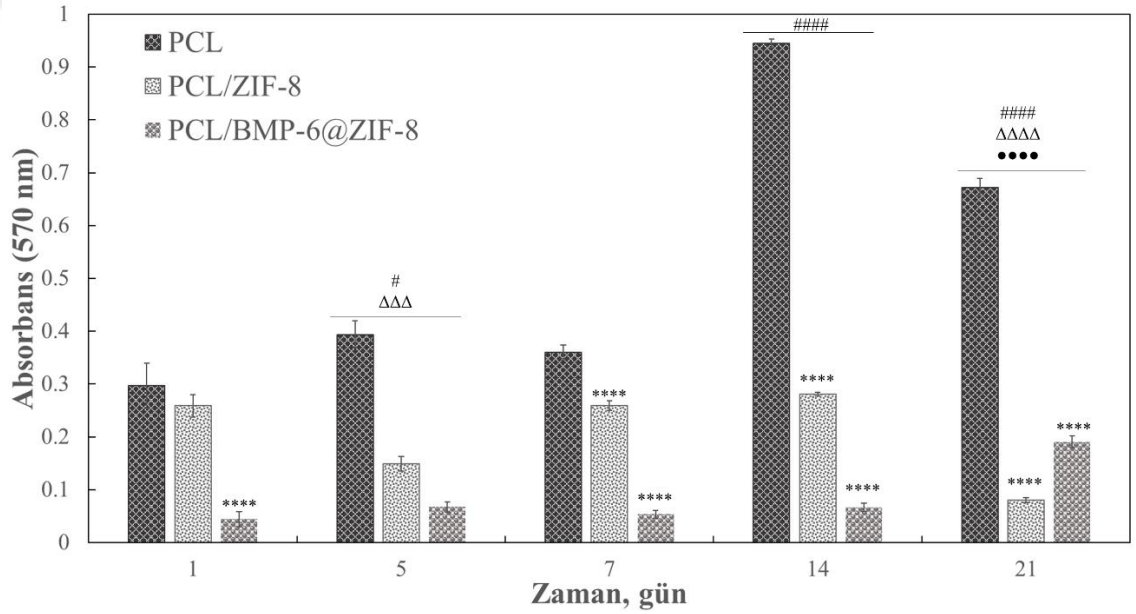
4.4 *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Osteojenik aktivitenin belirlenmesi amacıyla MC3T3-E1 preosteoblastik hücreler ile *in-vitro* ortamda hücre kültür çalışmaları Bölüm 3.7'de ifade edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmaları, hücre üremesinin tayini, hücre morfolojisinin incelenmesi ve RT-PCR analizleri ile hücre farklılaşmasının analizi olarak üç basamakta gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda elde edilen bulgular bu

bölümde verilmiş, sonuçlar Bölüm 3.9'da anlatıldığı gibi istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

4.4.1 Hücre üremesinin tayini

Hücrelerin, elde edilen membranlar üzerindeki canlılıkları mitokondriyal aktivite testi olan *Presto Blue* analizi ile Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak **Şekil 4.7**'de verilmiştir. Hücre ekiminden sonra tüm membranlarda hücreler tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir.



Şekil 4.7 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait Presto Blue analizi sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=4, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, **** $p<0.0001$; kültürün ilk günü kontrolken PCL için #, PCL/ZIF-8 için Δ, PCL/BMP-6@ZIF-8 için ● simgeleri kullanılmıştır.)

Kültürün birinci gününde kontrol grubu olan PCL membran ile PCL/ZIF-8 membranı arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiş ($p>0.05$), ancak PCL/BMP-6@ZIF-8 membranı ile karşılaştırıldığında PCL membrandaki mitokondriyal aktivitenin daha fazla olduğu ($p<0.001$) gözlemlenmiştir. PCL/ZIF-8 ile PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Hücre

kültürünün ilk gününde PCL ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları arasındaki bu farkın hücrelerin ortama uyum sağlamaya çalışmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kültürün 5. gününde PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların tümünde hücre aktivitesi birinci güne göre artmıştır (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.005$ ve $p<0.05$). Ancak membranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Kültürün 7. gününde tüm membranlar üzerindeki hücrelerde kültürün ilk gününe kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Yedinci günde PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları PCL membranı ile karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$). Mitokondriyal aktivitedeki bu anlamlı farklılık, hücrelerin farkılaşma aşamasında mitokondriyal aktivitelerini azaltmaları ile açıklanabilir.

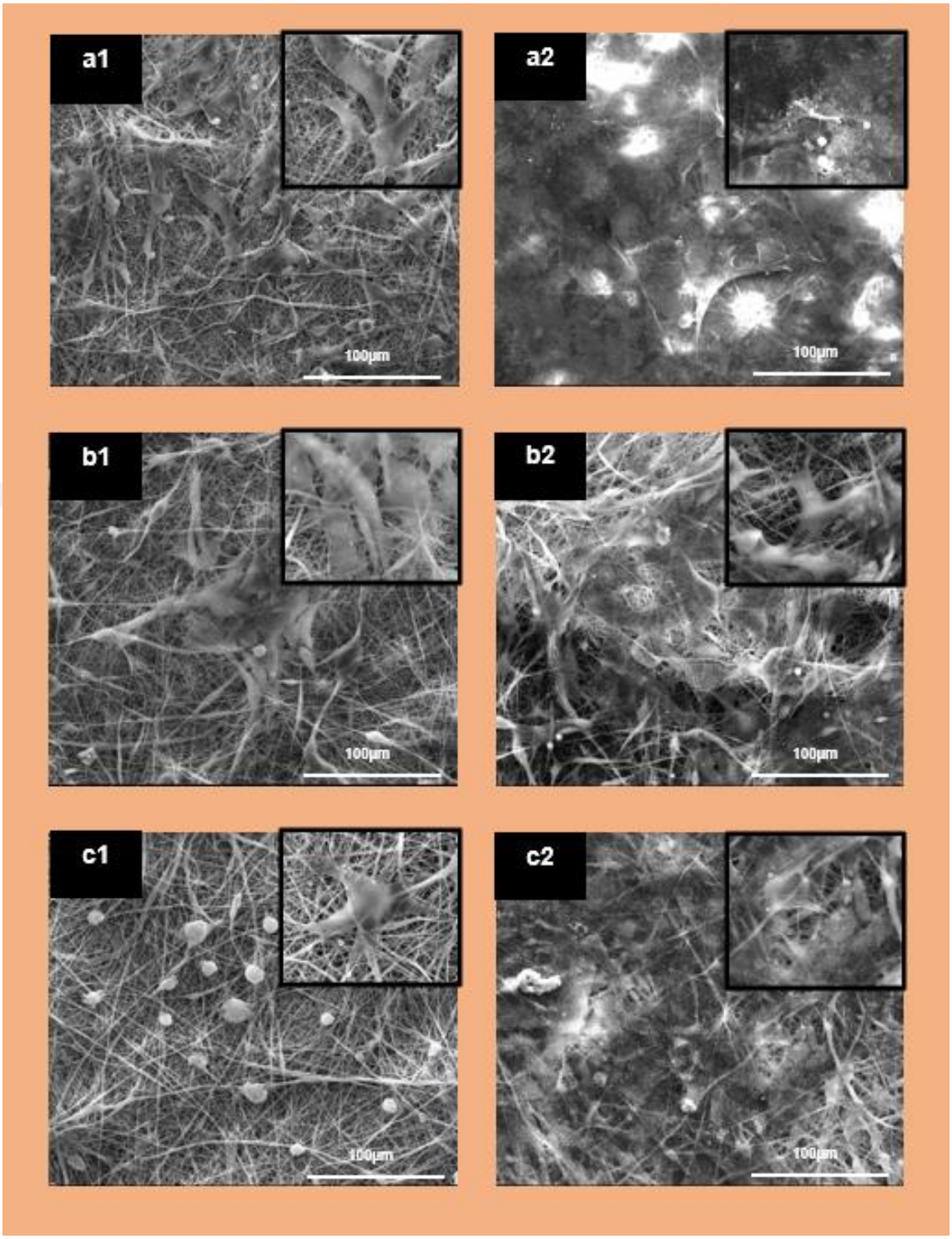
Hücre kültürünün 14. gününde ise, PCL ve PCL/ZIF-8 membranlarında anlamlı artışlar görülmüştür (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.01$), ancak PCL/BMP-6@ZIF-8 membranındaki azalma anlamlı değildir ($p>0.05$). Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise $p<0.005$ anlamlılığında PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarındaki hücresel aktivite daha azdır. Kültürün son günü olan 21. günde PCL ve PCL/ZIF-8 membranlarında hücresel aktivitede anlamlı azalma ($p<0.001$) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranında anlamlı artış ($p<0.001$) olduğu gözlemlenmiştir. Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise $p<0.005$ anlamlılığında PCL/ZIF-8 membranında hücresel aktivite daha düşük ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarındaki hücresel aktivite PCL membrana göre daha düşük olmakla beraber PCL/BMP-6@ZIF-8 membranına göre daha fazladır.

PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların tümünde 21 günlük kültür sonunda MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu da her 3 yüzeyde de hücrelerin tutunabildiğini ve hücresel canlılığını devam ettirebildiğini göstermektedir.

4.4.2 Hücre morfolojisinin tayini

Membranlar üzerinde MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin morfolojik tayini için SEM görüntüleri Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Kültürün 7. ve 14. günlerinde çekilen SEM görüntüleri **Şekil 4.8**'de verilmiştir.

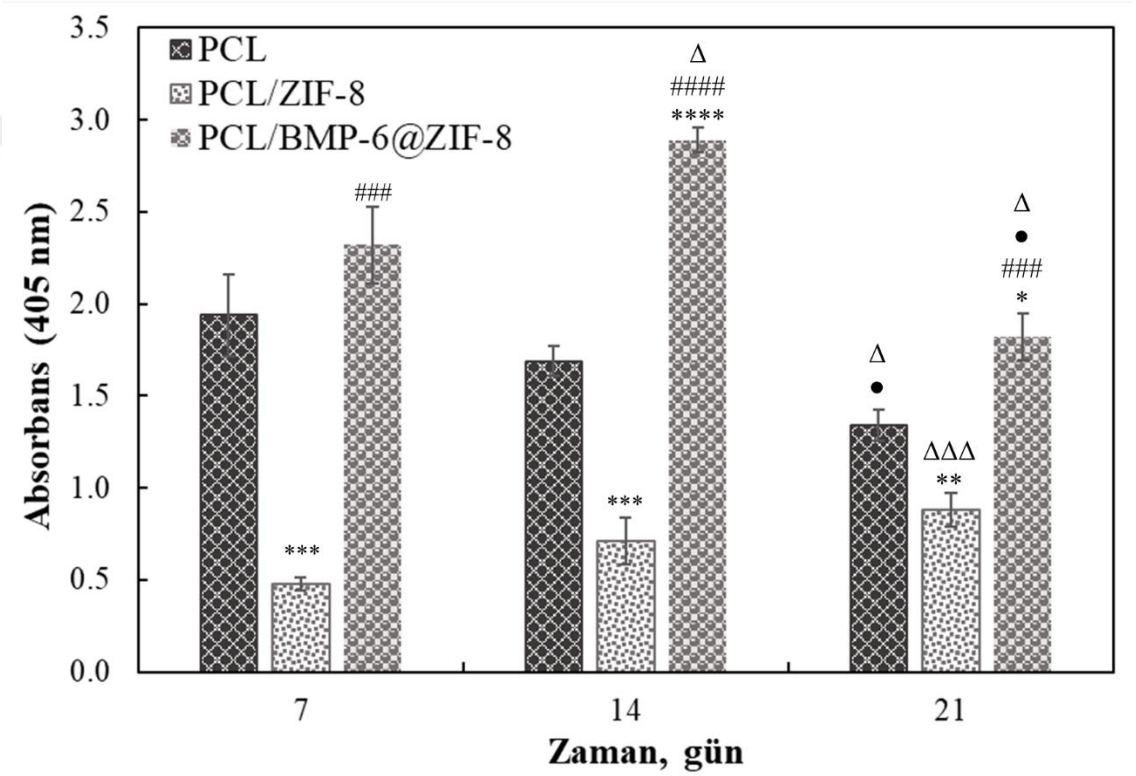
SEM görüntülerinde hücrelerin yüzeylere tutunduğu açıkça görülmektedir. Kültürün 7. gününde alınan görüntüler incelendiğinde (Şekil 4.8.a1, b1 ve c1) PCL membranlar üzerinde üremekte olan MC3T3-E1 hücrelerinden farklı olarak PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları üzerindeki hücrelerin görüntülerinde ağsı yapılar gözlemlenmiştir. Kültürün 14. gününde (Şekil 4.8.a2, b2 ve c2) alınan görüntülerde ise hücrelerin üzerinde bulundukları membranlara uyum sağlayarak yayıldığı ve MC3T3-E1 hücrelere özgü fibroblastik yapılarını oluşturdukları gözlenmiştir.



Şekil 4.8 Osteojenik farklılaşma ortamında PCL (a1, a2), PCL/ZIF-8 (b1, b2), PCL/BMP-6@ZIF-8 (c1, c2) doku iskeleleri üzerinde kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 7. (a1, b1, c1) ve 14. (a2, b2, c2) günlerine ait SEM görüntüleri (Temel görüntüleme X1000, küçük görüntü X4000 büyütme ile çekilmiştir.)

4.4.3 ALP aktivitesi tayini

Kemik farklılaşması belirteçlerinden biri olan alkalin fosfataz aktivitesi, kalsifikasyonun bir göstergesidir (Karakeçili vd. 2019). Membranlar üzerinde MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin ALP aktivitesi analizi Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde alınan örneklerin günlere karşı absorbans değerleri **Şekil 4.9**'da verilmiştir.



Şekil 4.9 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP aktiviteleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.005$, kontrol 7. gün iken Δ $p<0.05$, Δ Δ $p<0.01$, Δ Δ Δ $p<0.005$ ve kontrol 14. gün iken ● $p<0.05$, ● ● $p<0.01$, ● ● ● $p<0.005$)

MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile yürütülen hücre kültüründe 7., 14. ve 21. günlerde PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP aktiviteleri incelendiğinde kültürün 7. gününde PCL/ZIF-8 membranında ALP aktivitesi diğer membran gruplarına

göre düşük bulunmuştur ($p<0.005$). PCL ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kültürün 14.gününde ise BMP-6 içeren PCL/BMP-6@ZIF-8 membranı üzerindeki hücrelerde ALP aktivitesi hem gruplar arasında karşılaştırıldığında da hem de 7. gün ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekide artış göstermiştir (sırasıyla $p<0.0001$ ve $p<0.05$). Kültürün 21. gününde ise 14. güne oranla hem PCL hem de PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları üzerindeki hücrelerde ALP aktiviteleri gün bazında düşüş göstermiştir ($p<0.05$) ancak PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları PCL membranıyla karşılaştırıldığında ALP aktivitesnin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p<0.05$) açıkça gözlemlenmiştir. Sonuç olarak PCL ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarında ALP aktivitesinin en yüksek olduğu gün 14. gün olarak bulunmuştur. En yüksek aktivitenin beklendiği üzere PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarda, en düşük ALP aktivitesinin ise PCL/ZIF-8 membranlarda üreyen MC3T3-E1 hücrelerinde olduğu belirlenmiştir.

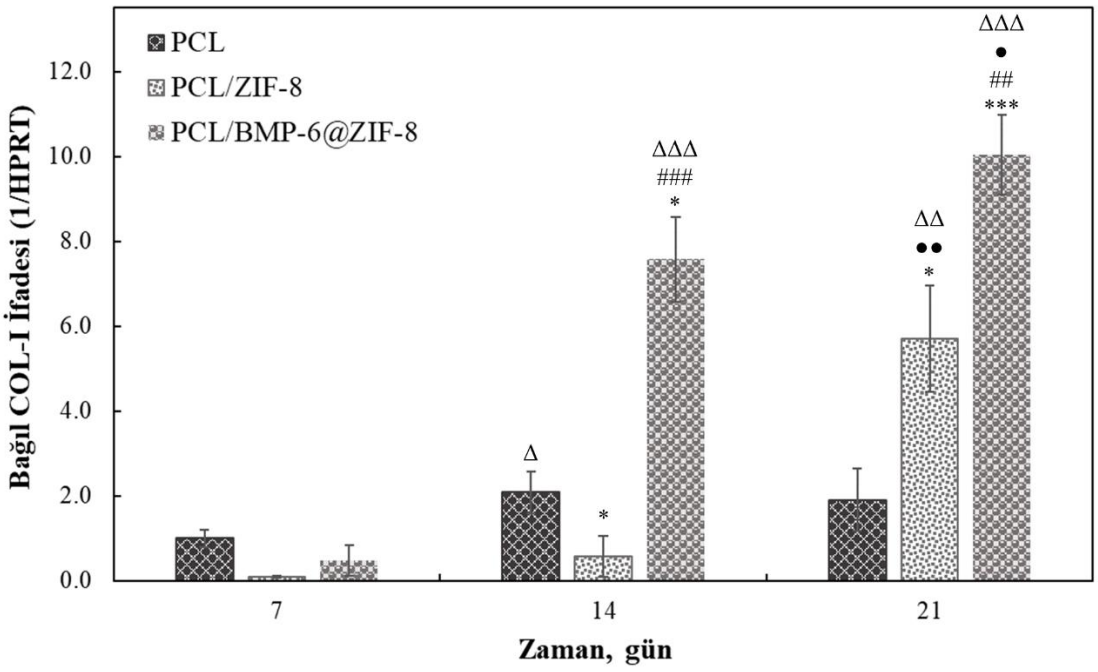
4.4.4 RT-PCR ile hücre farklılaşmasının tayini

Membranlar üzerinde MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin farklılaşma analizi için RT-PCR ile Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi gen ifadeleri tayin edilmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde alınan örneklerin bağıl gen ifadeleri hesaplanmıştır.

Kültür günlerine karşı hesaplanan COL-I bağıl gen ifadesi **Şekil 4.10**'da verilmiştir. MC3T3-E1 hücre hattının bağıl COL-I ifadesindeki artış kemiğe farklılaştığının bir belirtecidir (Gümüşderelioğlu vd. 2020). PCL membran üzerinde üreyen hücrelerde kültür süresi boyunca istatistiksel olarak tek anlamlı farklılık 14. günde gözlenmiştir. PCL/ZIF-8 membranlarda üreyen hücrelerde COL-I ifadesindeki değişim 21. günde anlamlı olarak artış göstermiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarda üreyen hücrelerde ise, hem 14. günde hem de 21. günde COL-I ifadesi, 7. güne göre anlamlı olarak artmıştır. Kültürün 14. gününde alınan veriler değerlendirildiğinde, PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlar üzerinde üreyen hücrelerin COL-I ifadesinin, PCL ve PCL/ZIF-8 membranlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Kültürün 21. gününe gelindiğinde, PCL/ZIF-8 membranları üzerindeki hücrelerin COL-I ifadesi, PCL membranlara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. BMP-6 içeren

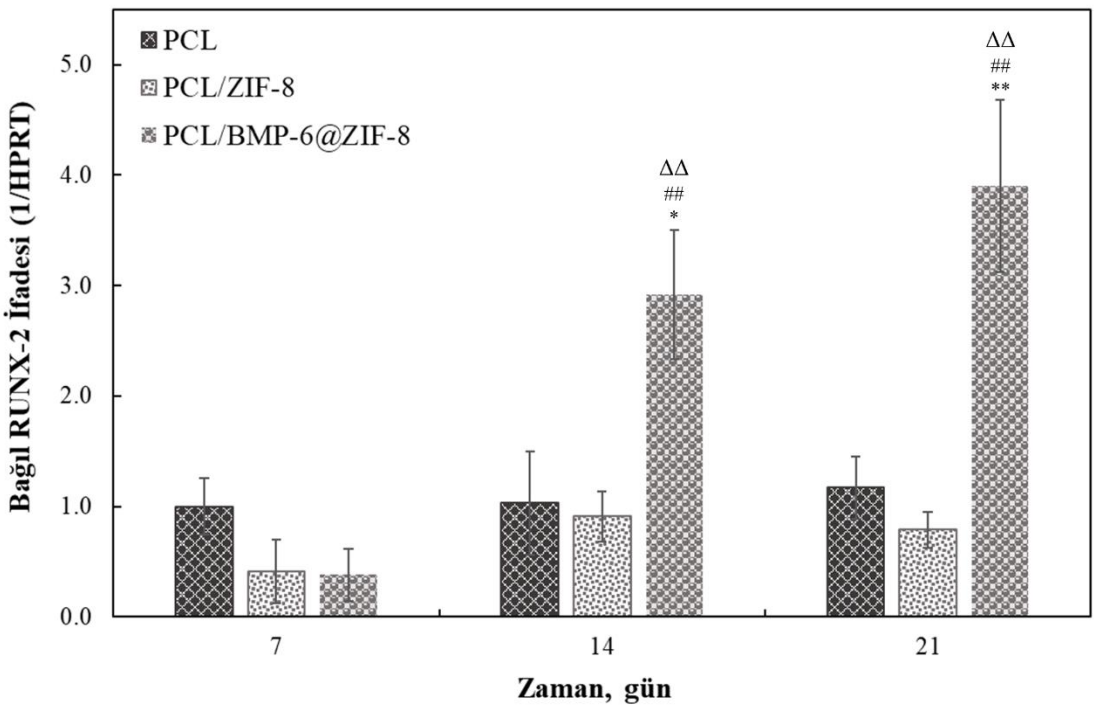
membranlarda ise hem PCL hem de PCL/ZIF-8 membranlara göre daha yüksek oranda (sırasıyla, $p<0.005$ ve $p<0.01$) COL-I ifadesi gerçekleşmiştir.

PCL/ZIF-8 membranlar üzerinde üreyen hücrelerde kültürün 21. gününde PCL membrana göre gözlemlenen COL-I ifadesindeki anlamlı artış, ZIF-8 nanokristallerinin de COL-I sentezine katkı sağladığı sonucunu doğurmaktadır. ZIF-8 nanokristal yapısındaki Zn^{2+} iyonlarının MC3T3-E1 pre-osteoblast kemik hücrelerinde COL-I sentezinde etkili olduğu bilinmektedir (Seo vd. 2010). Bununla birlikte, membran grupları arasında en yüksek COL-I ifadesi BMP-6 içeren PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlar üzerinde üreyen hücrelerde görülmüştür. Bu sonuç, BMP-6 salımının kemik hücre farklılaşmasını desteklediği ve arttırdığı bulgusuyla uyumludur (Demirtaş vd. 2016, Gümüşderelioğlu vd. 2020).



Şekil 4.10 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl COL-I ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.005$, kontrol 7. gün iken Δ $p<0.05$, Δ Δ $p<0.01$, Δ Δ Δ $p<0.005$ ve kontrol 14. gün iken ● $p<0.05$, ● ● $p<0.01$, ● ● ● $p<0.005$)

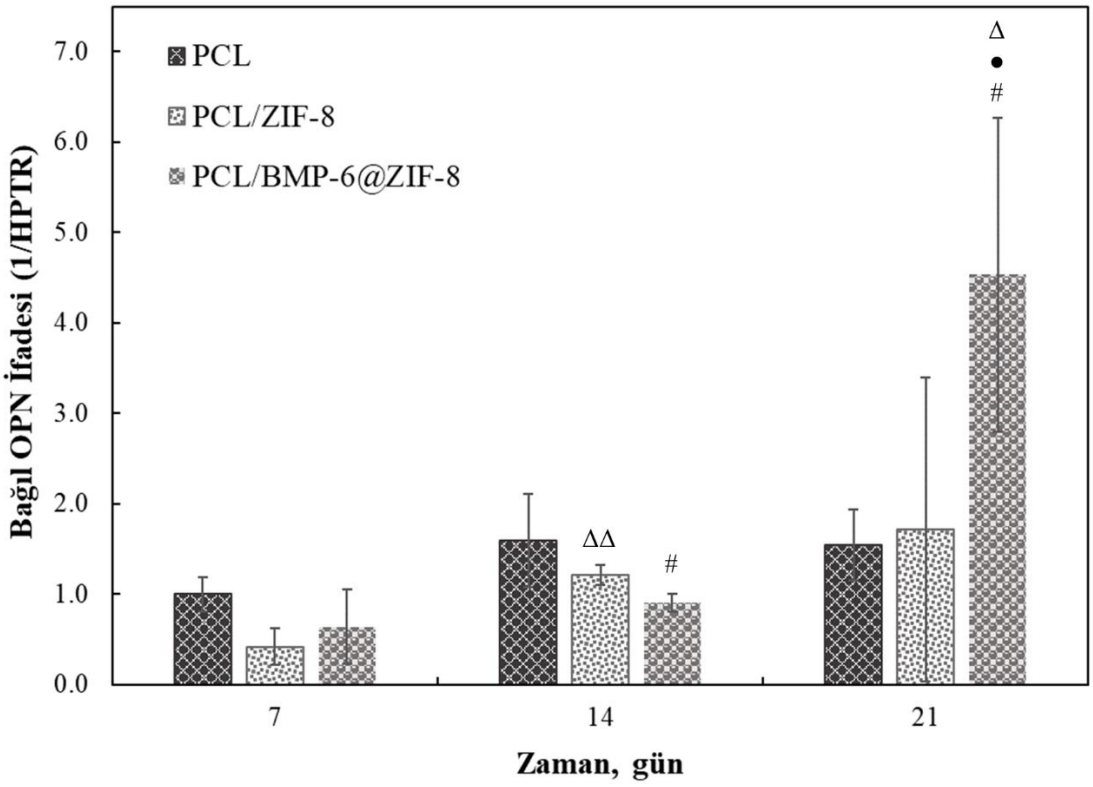
Kültür süresi boyunca hesaplanan RUNX-2 bağıl gen ifadesi **Şekil 4.11**'de verilmiştir. Runt ailesi transkripsiyon faktörlerinden olan RUNX-2, pre-osteoblastik hücrelerin kemiğe farklılaşmasında erken dönemde eksprese olmaktadır (Schroeder vd. 2005). PCL ve PCL/ZIF-8 membranlar üzerinde üreyen hücrelerde kültür süresi boyunca RUNX-2 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlar üzerinde üreyen hücrelerde ise, RUNX-2 gen ekspresyonu 14. ve 21. günlerde kültürün 7. gününe göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde BMP-6'nın RUNX-2 geni ifadesinde etkili olduğu, ZIF-8'in ise tek başına RUNX-2 ifadesinde artışa sebep olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.11 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RUNX-2 ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.005$, kontrol 7. gün iken Δ $p<0.05$, Δ Δ $p<0.01$, Δ Δ Δ $p<0.005$ ve kontrol 14. gün iken ● $p<0.05$, ● ● $p<0.01$, ● ● ● $p<0.005$)

Kültür süresi boyunca değerlendirilen OPN bağıl gen ifadesi **Şekil 4.12**'de verilmiştir. OPN, osteoklastik resorpsiyonu desteklemede önemli bir rol oynamaktadır ve kemik gelişiminin geç aşamalarında daha belirgindir (Aragón vd. 2018). PCL ve PCL/ZIF-8

membran üzerinde üreyen hücrelerde kültür süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarda üreyen hücrelerde ise OPN ifadesindeki değişim 21. günde anlamlı olarak artış göstermiştir. Kültürün 21. gününe gelindiğinde, BMP-6 içeren membranlarda hem PCL hem de PCL/ZIF-8 membranlara göre daha yüksek oranda (sırasıyla, $p<0.05$ ve $p<0.05$) OPN ifadesi gerçekleşmiştir. Bu sonuç, BMP-6 salımının kemik hücre farklılaşmasını desteklediği ve arttırdığı bulgusuyla uyumludur (Demirtaş vd. 2016, Gümüşderelioğlu vd. 2020)



Şekil 4.12 PCL, PCL/ZIF-8, PCL/BMP-6@ZIF-8 doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma ortamında kültürlenen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OPN ifadeleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu PCL iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, kontrol grubu PCL/ZIF-8 iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.005$, kontrol 7. gün iken Δ $p<0.05$, Δ Δ $p<0.01$, Δ Δ Δ $p<0.005$ ve kontrol 14. gün iken ● $p<0.05$, ● ● $p<0.01$, ● ● ● $p<0.005$)

OCN geç dönem kemik farklılaşmasının belirtecidir (Demirtaş vd. 2016). Kollajen olmayan bir protein olan OCN sadece olgun osteoblastlar ve osteositler tarafından ifade olmakta ve mineralizasyonu ifade etmektedir (Aragón vd. 2018; Gong vd. 2018). Tez

çalışması kapsamında gerçekleştirilen analizlerde, kültür süresi boyunca hiçbir membran grubunda OCN geni ifadesinde bağıl bir artış gözlenememiştir. Gerçekleştirilen çalışmada tasarlanan kontrollü salım sisteminde, BMP-6 moleküllerinin salımı oldukça yavaş gerçekleşmekte, salımın 30. gününde dahi ~%33 salım değerine ulaşılmaktadır. Bu durumun geç dönemde eksprese olan OCN geninin tayini için bir dezavantaj oluşturabileceğini söylemek mümkündür. Bununla birlikte, literatürde yapılan bazı çalışmalarda, 2 boyutlu yapılarda 28. günlük inkübasyon sonrası OCN ifadesinin ortaya çıkabileceği görülmüştür (Liu vd. 2009). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, 21 günlük kültür süresi sonunda PCR çalışmalarının yapılmış olması, membranlarda BMP-6 salımının yavaş ve kontrollü olarak gerçekleşiyor olması ve çalışmada kullanılan membranların 2 boyutlu yapıda olması nedeniyle 21 gün sonunda OCN ifadesinde anlamlı sonuçlar elde edilemediği sonucuna varılmıştır.

Tüm bağıl gen ifadeleri bir arada değerlendirildiğinde, *in vitro* ortamda, BMP yüklü ZIF-8 nanokristallerini içeren PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasında en etkin yapı olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, ZIF-8 nanokristallerinin yapıya katılması ile kollajen sentezinin tetiklendiği gözlemlenmiştir.

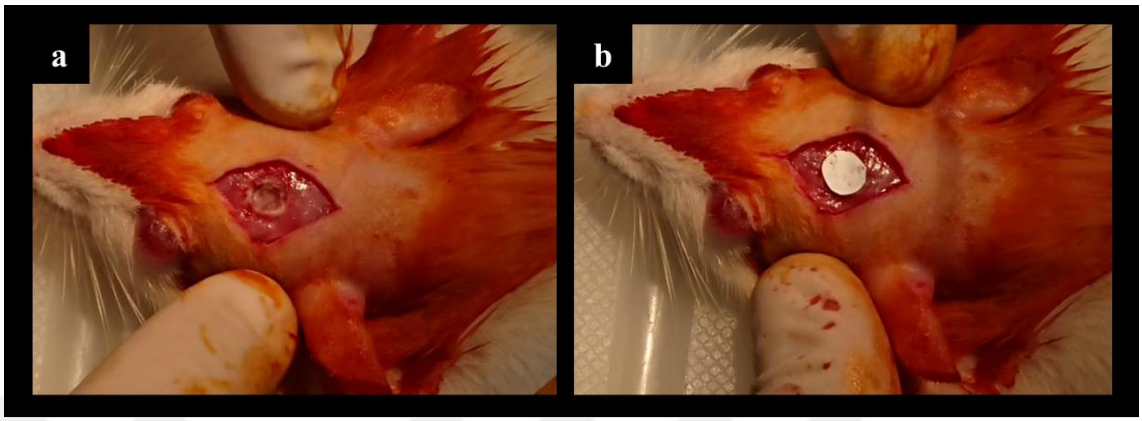
4.5 *In Vivo* Kemik İyileşmesi

In vitro olarak kemik farklılaşması incelenen elektroeğrilmiş fibröz membranlar (PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8), Bölüm 3.8'de anlatıldığı gibi *in vivo* olarak kemik iyileşmesinin incelenmesi amacıyla canlı hayvan deneylerinde kullanılmıştır. Kritik boyutlu kranial kemik defekti oluşturulan ratlar 8 hafta sonra mikro-BT ile analizlenmiştir.

4.5.1 Kritik boyutlu kranial kemik defekti modeli

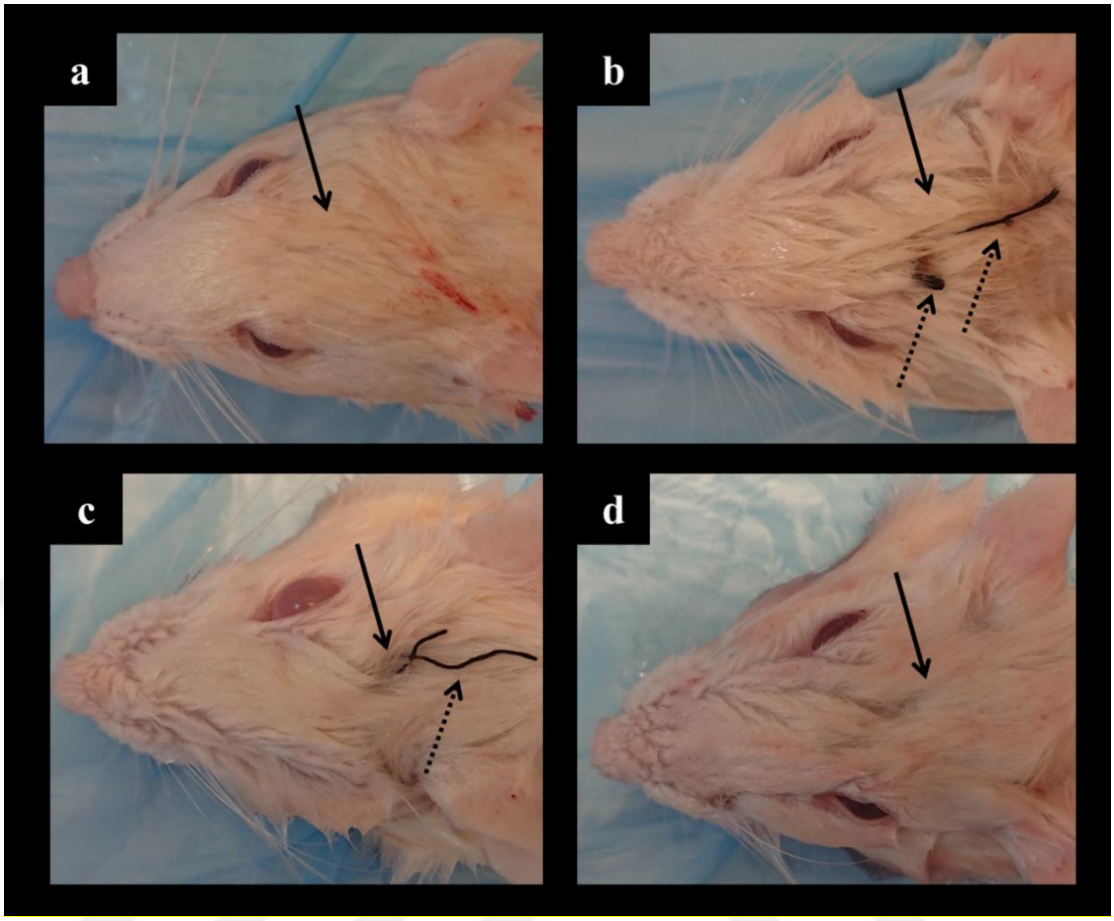
Kritik boyutlu kranial kemik defekti Bölüm 3.8.1'de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi oluşturulmuştur (**Şekil 4.13**.a). Defekt oluşturulan 6 rat kontrol grubu olarak herhangi bir

implantasyon işlemi yapılmadan yarası kapatılarak bırakılmış, diğer ratlara 6 paralel olacak şekilde membranlar implante edilmiştir (Şekil 4.14b).



Şekil 4.13 Rat kafatasında açılmış kritik boyutlu kranial defekti (a) ve membran implantasyonu (b) işlemi

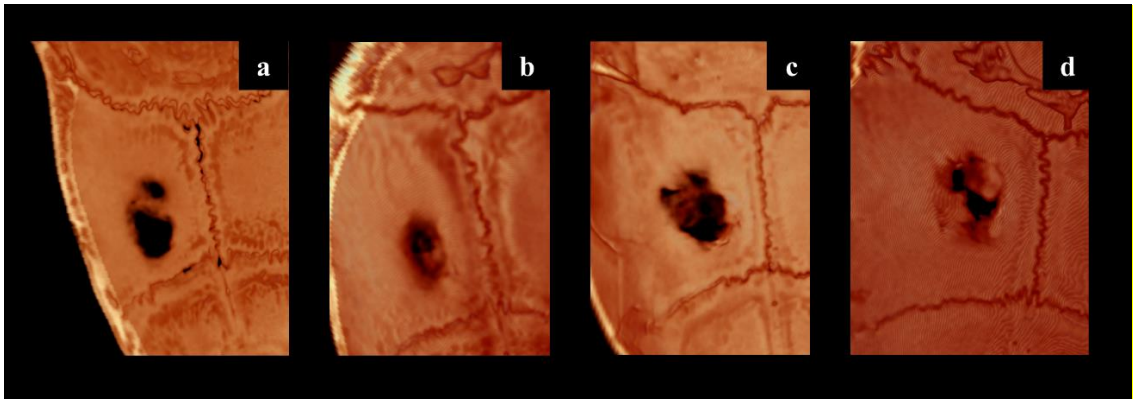
Sekiz haftanın sonunda ratlar sakrifiye edilerek implantasyon gerçekleştirilen bölge çevre doku ile birlikte alınmış ve %10'luk formalin çözeltisi içinde 4^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Sekiz haftanın sonunda ratların yaraları **Şekil 4.14**'te gösterildiği gibi tamamen kapanmış ve üzerleri kıllarla tamamen kaplanmıştır.



Şekil 4.14 Sekiz hafta sonunda defektli (a), PCL (b), PCL/ZIF-8 (c) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (d) implante edilmiş rat kafalarındaki iyileşme (siyah düz ok defekt bölgesini, noktalı ok ise iyileşmeden sonra kalmış dikişi işaret etmektedir)

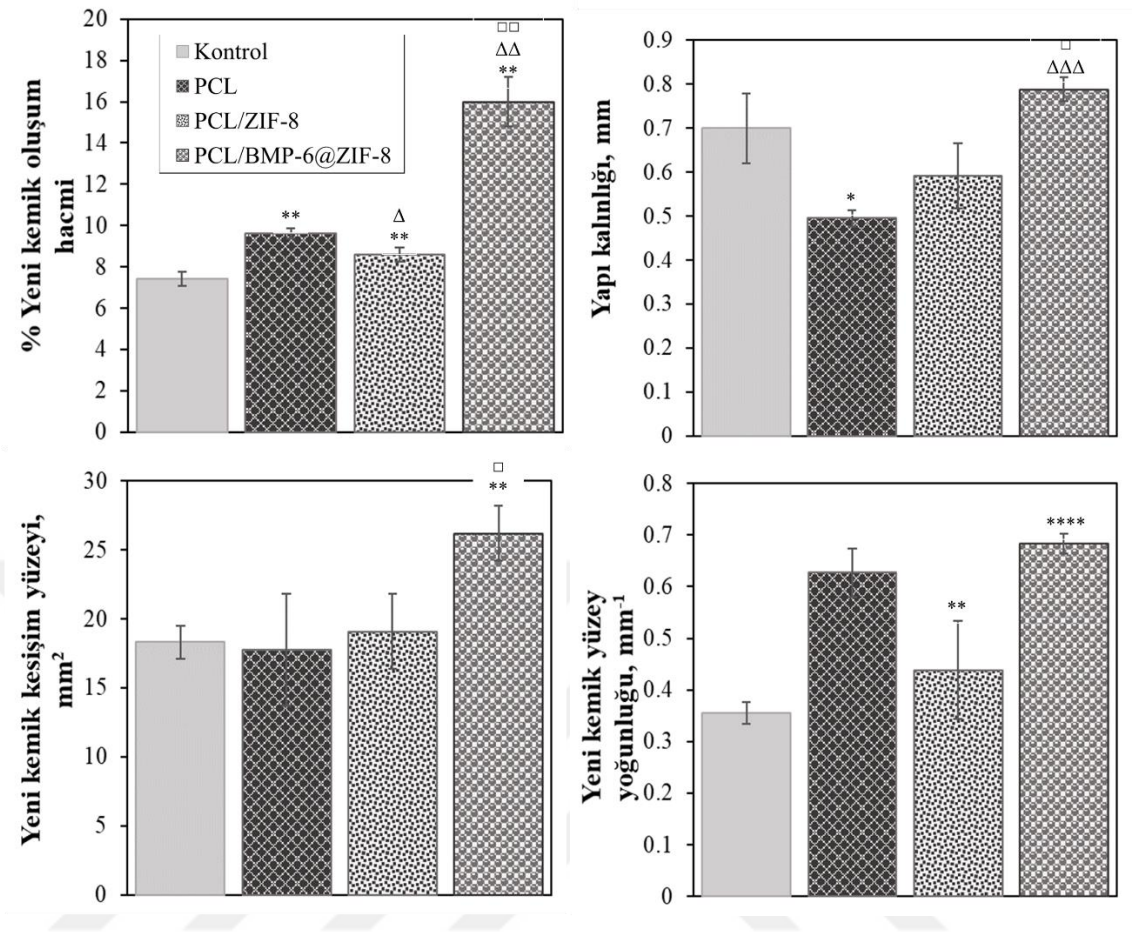
4.5.2 Mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT)

Mikro-BT analizi Bölüm 3.8.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mikro-BT ile çekilen görüntülerin her grup için birer örneği **Şekil 4.15**'te verilmiştir. Hesaplanan yüzde kemik oluşum hacmi, yeni kemik kesişim yüzeyi, yapı kalınlığı ve yeni kemik yüzey yoğunluğu verileri **Şekil 4.16**'da verilmiştir.



Şekil 4.15 *In vivo* çalışmada kontrol grubu (a), PCL (b), PCL/ZIF-8 (c) ve PCL/BMP-6@ZIF-8 (d) membranları implantasyonundan 8 hafta sonra elde edilen mikro-BT görüntüleri (siyah alan kemiksiz bölgeyi, açık renk alan kemiği göstermektedir)

Şekil 4.16'da de gösterildiği gibi kemik iyileşme oranları yüzde kemik oluşum hacmi (Şekil 4.16.a) baz alındığında büyükten küçüğe PCL/BMP-6@ZIF-8 (~%16), PCL (~%10), PCL/ZIF-8 (~%9) ve kontrol (~%7) grubu şeklindedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde yeni kemik oluşum hacminin en yüksek olduğu grup, PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların implante edildiği rat grubudur. Yeni oluşan kemiğin yapı kalınlığı (Şekil 4.16.b), kesişim yüzeyi (Şekil 4.16.c) ve yüzey yoğunluğu (Şekil 4.1.d) değerlendirildiğinde her üç parametrede de PCL/BMP-6@ZIF-8 implante edilmiş defektelerde anlamlı bir farklılık elde edilmiştir.

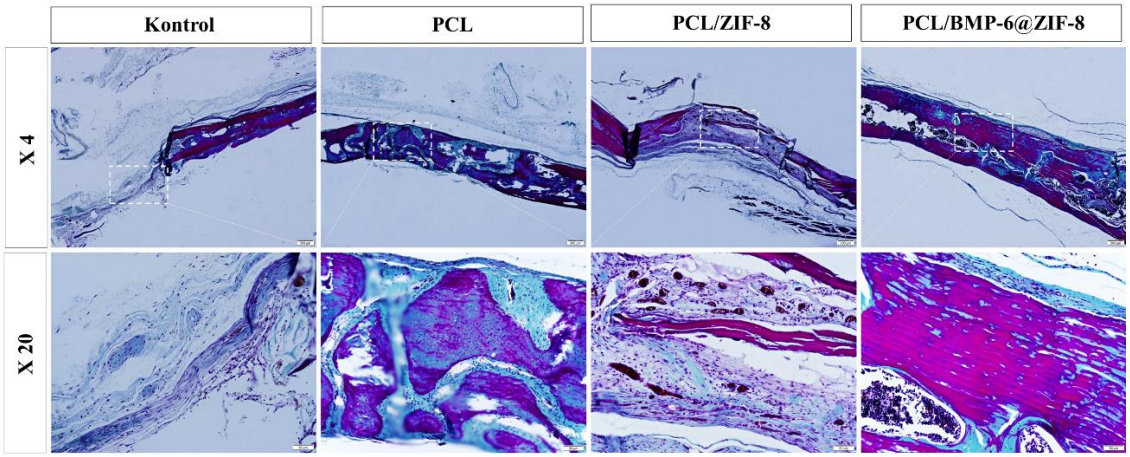


Şekil 4.16 Mikro-BT görüntülerinin işlenmesiyle elde edilen yeni kemik oluşum hacmi yüzdesi (a), yapı kalınlığı (b), yeni kemik kesişim yüzeyi (c) ve yeni kemik yüzey yoğunluğu (d) grafikleri (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=6, kontrol grubu membransız yara iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$, **** $p<0.001$; kontrol grubu PCL iken Δ, PCL/ZIF-8 iken □ olarak simgelenmiştir)

4.5.3 Histolojik analiz

Histolojik kesitler, kemik rejenerasyonu, mezenkimal doku hücreleri ve enflamatuar hücreler (yabancı cisim reaksiyonu varlığı) cinsinden değerlendirilmiştir. HE ve *Masson's trichrom* boyama teknikleri ile tüm gruplarda kalvaryum defektlerinin histolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Kontrol grubu ve PCL/ZIF-8 membranının implente edildiği grubun incelenmesi, olguların çoğunda kalvaryum defektinin birleşmemiş düzende olduğunu ortaya koymuştur (**Şekil 4.17**), bu grupların defekt alanlarında bol miktarda bağ dokusu hücresi gözlenmiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 ve PCL membranlarının implante edildiği gruplarda daha iyi kapanma ve kalvaryum defekti

birlikteliği gözlenmiş, implant ve konak kemik dokusu arasında bağlanma tespit edilmiş ve defekt yeni oluşan kemik dokusu ile doldurulmuştur (Şekil 4.16).

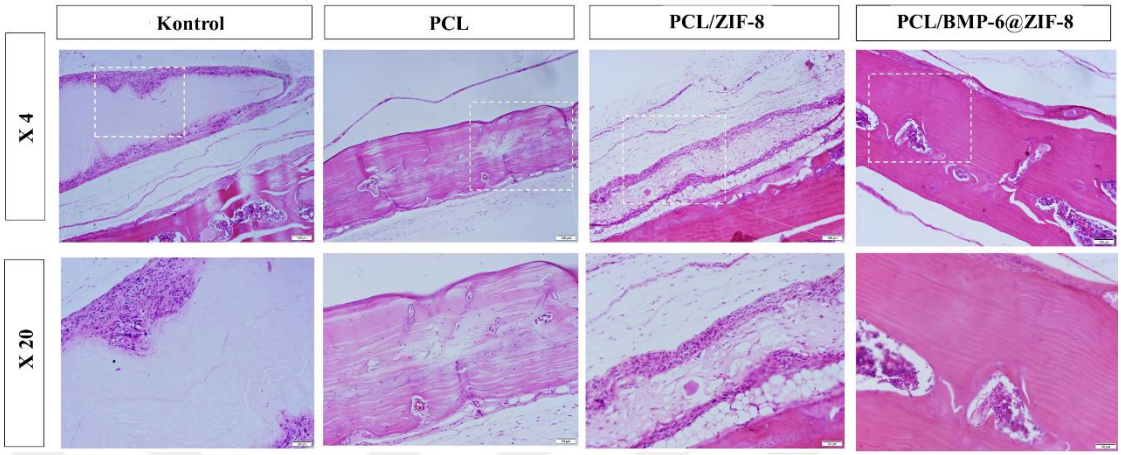


Şekil 4.17 Kontrol grubu, PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları implante edilmiş gruplara ait *Masson's trichrom* boyaması yapılmış histolojik görüntüler (x4 büyütmedeki görüntülerdeki işaretli bölgelerden x20 büyütmede görüntü alınmıştır)

Kalvaryum defekt alanlarının çevresinde ve merkezinde kemik rejenerasyonunu değerlendirirken; kontrol ve PCL/ZIF-8 gruplarında defekt alanının çevresinde seyrek kemik oluşumu ve merkezde osteoid doku eksikliği saptanmıştır. PCL/BMP-6@ZIF-8 ve PCL grupları, kalvaryum defektinin hem çevresinde hem de merkezinde yeni oluşan kemik dokusu gözlemlenmiştir. PCL/BMP-6@ZIF-8 grubunda diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede daha fazla kemik oluşumu saptanmış, intrateküler kemik iliği olan normal trabeküller görülmüştür. *Masson's trichrom* boyaması, PCL/BMP-6@ZIF-8 grubunda daha belirgin kırmızı boyalı iyi mineralize kemik dokusunu göstermektedir (Şekil 4.17), diğer gruplarda daha belirgin mavi boyalı olgunlaşmamış kemik dokusu gözlemlenmiştir.

İnflamatuar reaksiyon PCL/ZIF-8 grubunda belirgin, kontrol ve PCL/BMP-6@ZIF-8 gruplarında daha az belirgin olmakla beraber PCL grubunda neredeyse gözlemlenmemiştir (**Şekil 4.18**). Sonuç olarak, PCL/BMP-6@ZIF-8 ve PCL gruplarında etkili bir kemik rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Özellikle PCL/BMP-6@ZIF-8

gruplarında daha belirgin, olgun ve olan homojen kemik rejenerasyonu ve kalvarial defekt birlikteliği gözlenmiştir, bu sonuç BMP-6 ile osteogenezin uyarılmasını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.18 Kontrol grubu, PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranları implante edilmiş gruplara ait HE boyaması yapılmış histolojik görüntüler (x4 büyütmedeki görüntülerdeki işaretli bölgelerden x20 büyütmede görüntü alınmıştır)

5. SONUÇLAR

Tez çalışmasında, yeni kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanım potansiyeli yüksek olan MOF yapılarından ZIF-8'in, doku mühendisliğinde büyük önem taşıyan büyüme faktörlerinden BMP-6'nın kontrollü salımında taşıyıcı sistem olarak kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

- ✓ Osteoindüktif etkiye sahip olduğu bilinen BMP-6 büyüme faktörü ZIF-8 nanokristallerine sulu ortamda *in-situ* olarak enkapsüle edilmiş, yüksek enkapsülasyon verimine (%98) ulaşılmıştır.

- ✓ ZIF-8 ve BMP-6 yüklü ZIF-8 nanokristalleri elektroeğirme yöntemiyle PCL fiberler içerisine yüklenmiş, ZIF-8 veya BMP-6@ZIF-8 içeren mikron altı fiber çapına sahip, boncuksuz ve gelişigüzel yapıda fiberlerden oluşan membranlar elde edilmiştir.

- ✓ Fiber yapıdaki membranlardan BMP-6'nın kontrollü salımı sağlanmış, salım kinetiğinin matematiksel modellemesi değerlendirilerek, salım mekanizmasının *pseudo Fickian* olduğu belirlenmiştir.

- ✓ ZIF-8 veya BMP-6@ZIF-8 yüklü PCL membranlar üzerinde MC3T3-E1 hücreleri ile *in-vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Presto Blue analizinden elde edilen sonuçlar, ZIF-8 veya BMP-6@ZIF-8 nanokristal yapıların hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olmadıklarını ve hücre kültür süresi boyunca hücre üremesinin artarak devam ettiğini göstermiştir. MC3T3-E1 hücrelerinin fibroblastik yapısı SEM çalışmalarından elde edilen görüntülerde açıkça gözlemlenmiş ve tüm membranlar üzerinde hücrelerin tutunarak yayılma davranışı gösterdiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar membranların hücre üremesini desteklediğini ve morfolojik yapılarının korunduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

- ✓ PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlar üzerinde üretilen MC3T3-E1 hücrelerin ALP aktiviteleri sonuçlarından PCL ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarında ALP aktivitesinin en yüksek olduğu gün 14. gün olarak belirlenmiş, en yüksek aktivitenin beklendiği üzere PCL/BMP-6@ZIF-8 membranında olduğu ve en düşük aktivitenin ise PCL/ZIF-8 membranında olduğu belirlenmiştir.

- ✓ PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlar üzerinde üretilen MC3T3-E1 hücrelerin COL-I, RUNX-2 ve OPN bağıl gen ifadeleri RT-PCR analizleri ile başarıyla gerçekleştirilmiştir. PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranlarında COL-I ifadesinde artış meydana gelmiş, ZIF-8'in kollajen üretimine katkısı görülmüştür. Özellikle PCL/BMP-6@ZIF-8 membranı üzerindeki hücrelerde COL-I, RUNX-2 ve OPN genlerinin bağıl ifadeleri osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. RT-PCR çalışmalarında da hedeflenen verimli sonuçlara ulaşılmıştır.

- ✓ PCL, PCL/ZIF-8 ve PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların Wistar albino ratlara implantasyonu ile *in vivo* deneyler gerçekleştirilmiştir. 8 haftalık süre sonunda değerlendirilen mikro-BT görüntülerinden elde edilen sonuçlar, yeni kemik oluşum parametreler, histolojik analizlerde gözlemlenen doku rejenerasyonu ile beraber değerlendirilmiş ve BMP-6 içeren PCL/BMP-6@ZIF-8 membranların implante edildiği ratlarda yeni ve sağlıklı kemik oluşumunun diğer gruplara oranla istatistiksel olarak yüksek düzeyde olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Tüm veriler değerlendirildiğinde, tez çalışması kapsamında tasarlanıp üretilen PCL/BMP-6@ZIF-8 membran yapılardan BMP-6 salımının kontrollü olarak gerçekleştiği ve bu membran yapıların tek başına veya implant kaplama malzemesi olarak kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abbasian, M., Massoumi, B., Mohammad-Rezaei, R., Samadian, H., Jaymand, M. 2019. "Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering?". International Journal of Biological Macromolecules, *134*, 673–694.

Ahn, Y. C., Park, S. K., Kim, G. T., Hwang, Y. J., Lee, C. G., Shin, H. S., Lee, J. K. 2006. "Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers". Current Applied Physics, *6*(6 SPEC. ISS.), 1030–1035.

Akman, A. C., Seda Tiğli, R., Gumusderelioglu, M., Nohutcu, R. M. 2010. "Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells". Artificial Organs, *34*(1), 65–74.

Amin Yavari, S., van der Stok, J., Chai, Y. C., Wauthle, R., Tahmasebi Birgani, Z., Habibovic, P., … Zadpoor, A. A. 2014. "Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium". Biomaterials, *35*(24), 6172–6181.

Angammana, C. J., Jayaram, S. H. 2016. "Fundamentals of electrospinning and processing technologies". Particulate Science and Technology, *34*(1), 72–82.

Aragón, J., Salerno, S., De Bartolo, L., Irusta, S., Mendoza, G. 2018. "Polymeric electrospun scaffolds for bone morphogenetic protein 2 delivery in bone tissue engineering". Journal of Colloid and Interface Science, *531*, 126–137.

Banerjee, D., Liu, J., Thallapally, P. K. 2015. "Separation of C2 Hydrocarbons by Porous Materials: Metal Organic Frameworks as Platform". Comments on Inorganic Chemistry, *35*(1), 18–38.

Barhate, R. S., Loong, C. K., Ramakrishna, S. 2006. "Preparation and characterization of nanofibrous filtering media". Journal of Membrane Science, *283*(1–2), 209–218.

Berardi, A., Bisharat, L., Cespi, M., Basheti, I. A., Bonacucina, G., Pavoni, L., AlKhatib, H. S. 2017. "Controlled release properties of zein powder filled into hard gelatin capsules". Powder Technology, *320*, 703–713.

Bhardwaj, N., Kundu, S. C. 2010. "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique". Biotechnology Advances, *28*(3), 325–347.

Boskey, A. L. 2013. "Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects". BoneKEy Reports, *2*(DECEMBER), 1–11.

Buer, A., Ugbolue, S. C., Warner, S. B. 2001. "Electrospinning and Properties of Some Nanofibers". Textile Research Journal, *71*(4), 323–328.

Chen, B., Yang, Z., Zhu, Y., Xia, Y. 2014. "Zeolitic imidazolate framework materials : recent progress in synthesis and applications", 16811–16831.

Chen, G., Ito, Y. 2001. "Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation". Biomaterials, *22*(18), 2453–2457.

Chen, H. M., Yu, D. G. 2010. "An elevated temperature electrospinning process for

preparing acyclovir-loaded PAN ultrafine fibers". Journal of Materials Processing Technology, *210*(12), 1551–1555.

Chowdhuri, A. R., Laha, D., Pal, S., Karmakar, P., Sahu, S. K. 2016. "One-pot synthesis of folic acid encapsulated upconversion nanoscale metal organic frameworks for targeting , imaging and pH", 18120–18132.

Chowdhury, M., Stylios, G. 2010. "Effect of experimental parameters on the morphology of electrospun Nylon 6 fibres". International Journal of Basic & Applied Sciences, *10*(06), 116–131.

Christy, P. N., Basha, S. K., Kumari, V. S., Bashir, A. K. H., Maaza, M., Kaviyarasu, K., … Ignacimuthu, S. 2020. "Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review". Journal of Drug Delivery Science and Technology, *55*(November 2019), 101452.

De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., De Clerck, K. 2009. "The effect of temperature and humidity on electrospinning". Journal of Materials Science, *44*(5), 1357–1362.

Demir, N. K., Topuz, B., Yilmaz, L., Kalipcilar, H. 2014. "Microporous and Mesoporous Materials Synthesis of ZIF-8 from recycled mother liquors". Microporous and Mesoporous Materials, *198*, 291–300.

Demirtaş, T. Tolga, Göz, E., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M. 2016. "Combined delivery of PDGF-BB and BMP-6 for enhanced osteoblastic differentiation". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *27*(1), 1–11.

Demirtaş, Tuğrul Tolga, Irmak, G., Gümüşderelioğlu, M. 2017. "A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering". Biofabrication, *9*(3).

Doostmohammadi, M., Forootanfar, H., Ramakrishna, S. 2020. "Regenerative medicine and drug delivery: Progress via electrospun biomaterials". Materials Science and Engineering C, *109*(April 2019), 110521.

Doshi, J., Reneker, D. H. 1995. "Electrospinning process and applications of electrospun fibers". Journal of Electrostatics, *35*(2–3), 151–160.

Dotti, F., Varesano, A., Montarsolo, A., Aluigi, A., Tonin, C., Mazzuchetti, G. 2007. "Electrospun porous mats for high efficiency filtration". Journal of Industrial Textiles, *37*(2), 151–162.

Fatma, Ş., Topuz, B., Kal, H. 2018. "Microporous and Mesoporous Materials Synthesis of ZIF-7 , ZIF-8 , ZIF-67 and ZIF-L from recycled mother liquors", *261*(November 2017), 259–267.

Fu, H., Ou, P., Zhu, J., Song, P., Yang, J., Wu, Y. 2019. "Enhanced Protein Adsorption in Fibrous Substrates Treated with Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) Nanoparticles". ACS Applied Nano Materials, *2*(12), 7626–7636.

Fukuda, A., Takemoto, M., Saito, T., Fujibayashi, S., Neo, M., Pattanayak, D. K., … Nakamura, T. 2011. "Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting". Acta Biomaterialia, *7*(5), 2327–2336.

Ghaee, A., Karimi, M., Lotfi-Sarvestani, M., Sadatnia, B., Hoseinpour, V. 2019. "Preparation of hydrophilic polycaprolactone/modified ZIF-8 nanofibers as a wound dressing using hydrophilic surface modifying macromolecules". Materials Science and Engineering C, *103*(December 2018).

Ghorani, B., Tucker, N. 2015. "Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology". Food Hydrocolloids, *51*, 227–240.

Gong, M., Chi, C., Ye, J., Liao, M., Xie, W., Wu, C., … Zhang, L. 2018. "Icariin-loaded electrospun PCL/gelatin nanofiber membrane as potential artificial periosteum". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, *170*(March), 201–209.

Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., Lin, Y. 2015. "Nanomaterials and bone regeneration". Bone Research, *3*(July).

Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A., Bowlin, G. L., Jhurry, D. 2013. "An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering". Polymer International, *62*(4), 523–533.

Gu, Jinlou, Huang, M., Liu, J., Li, Y., Zhao, W., Shi, J. 2012. "Calcium doped mesoporous silica nanoparticles as efficient alendronate delivery vehicles". New Journal of Chemistry, *36*(9), 1717–1720.

Gu, Jin Lou, Shi, J. L., You, G. J., Xiong, L. M., Qian, S. X., Hua, Z. Le, Chen, H. R. 2005. "Incorporation of highly dispersed gold nanoparticles into the pore channels of mesoporous silica thin films and their ultrafast nonlinear optical response". Advanced Materials, *17*(5), 557–560.

Gümüşderelioğlu, M., Sunal, E., Tolga Demirtaş, T., Kiremitçi, A. S. 2020. "Chitosan-based double-faced barrier membrane coated with functional nanostructures and loaded with BMP-6". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *31*(1).

Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A., Adun, P., Ostadrahimid, A. 2019. "Kinetic release study of zinc from polylactic acid based nanocomposite into food simulants". Polymer Testing, *76*(November 2018), 254–260.

Jalili, R., Hosseini, S. A., Morshed, M. 2005. "The effects of operating parameters on the morphology of electrospun polyacrilonitrile nanofibres". Iranian Polymer Journal (English Edition), *14*(12), 1074–1081.

Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., … Supaphol, P. 2005. "Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers". European Polymer Journal, *41*(3), 409–421.

Jassal, M., Sengupta, S., Bhowmick, S. 2015. "Functionalization of electrospun poly(caprolactone) fibers for pH-controlled delivery of doxorubicin hydrochloride". Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, *26*(18), 1425–1438.

Jou, D., Camacho, J., Grmela, M. 1991. "On the Nonequilibrium Thermodynamics of

Non-Fickian Diffusion". Macromolecules, *24*(12), 3597–3602.

Karageorgiou, V., Kaplan, D. 2005. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis". Biomaterials, *26*(27), 5474–5491.

Karakecili, A., Satriano, C., Gumusderelioglu, M., Marletta, G. 2007. "Relationship between the fibroblastic behaviour and surface properties of RGD-immobilized PCL membranes". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *18*(2), 317–319.

Karakeçili, A., Topuz, B., Korpayev, S., Erdek, M. 2019. "Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds". Materials Science and Engineering C, *105*(August).

Kaur, H., Mohanta, G. C., Gupta, V., Kukkar, D., Tyagi, S. 2017. "Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug". Journal of Drug Delivery Science and Technology, *41*, 106–112.

Khan, F., Tanaka, M. 2018. "Designing smart biomaterials for tissue engineering". International Journal of Molecular Sciences, *19*(1), 1–14.

Kim, B. R., Nguyen, T. B. L., Min, Y. K., Lee, B. T. 2014. "In vitro and in vivo studies of BMP-2-loaded PCL-gelatin-BCP electrospun scaffolds". Tissue Engineering - Part A, *20*(23–24), 3279–3289.

Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., Cho, C. S. 2008. "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications". Biotechnology Advances, *26*(1), 1–21.

Kohsari, I., Shariatinia, Z., Pourmortazavi, S. M. 2016. "Antibacterial electrospun chitosan-polyethylene oxide nanocomposite mats containing ZIF-8 nanoparticles". International Journal of Biological Macromolecules, *91*, 778–788.

Kumbar, S. G., James, R., Nukavarapu, S. P., Laurencin, C. T. 2008. "Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues". Biomedical Materials, *3*(3).

Lauzon, M. A., Bergeron, É., Marcos, B., Faucheux, N. 2012. "Bone repair: New developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling". Journal of Controlled Release, *162*(3), 502–520.

Lee, K. H., Kim, H. Y., Bang, H. J., Jung, Y. H., Lee, S. G. 2003. "The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers". Polymer, *44*(14), 4029–4034.

Lee, K., Silva, E. A., Mooney, D. J. 2011. "Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments". Journal of the Royal Society Interface, *8*(55), 153–170.

Levengood, S. K. L., Zhang, M. 2014. "Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering". Journal of Materials Chemistry B, *2*(21), 3161–3184.

Li, Y., Zheng, Y. 2018. "zeolitic imidazolate frameworks for enhanced drug", 23623–23628.

Liang, K., Ricco, R., Doherty, C. M., Styles, M. J., Bell, S., Kirby, N., … Falcaro, P.

2015. "Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules". Nature Communications, *6*, 1–8.

Liang, Z., Yang, Z., Yuan, H., Wang, C., Qi, J., Liu, K., … Zheng, H. 2018. "nanocomposite for pH-triggered anticancer drug", 10223–10228.

Liédana, N., Galve, A., Rubio, C., Téllez, C., Coronas, J. 2012. "CAF@ZIF-8: One-step encapsulation of caffeine in MOF". ACS Applied Materials and Interfaces, *4*(9), 5016–5021.

Lin, Y.-H., Yang, J.-M., Lin, Y.-R., Jeng, S.-C., Liao, C.-C. 2008. "A polarizer-free flexible and reflective electro-optical switch using dye-doped liquid crystal gels". Optics Express, *16*(3), 1777.

Liu, G., Xu, Y., Han, Y., Wu, J., Xu, J., Meng, H., Zhang, X. 2017. "Immobilization of lysozyme proteins on a hierarchical zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)". Dalton Transactions, *46*(7), 2114–2121.

Liu, X., Smith, L. A., Hu, J., Ma, P. X. 2009. "Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering". Biomaterials, *30*(12), 2252–2258.

Liu, Y., Li, Z., Zou, S., Lu, C., Xiao, Y., Bai, H., … Duan, J. 2020. "Hyaluronic acid-coated ZIF-8 for the treatment of pneumonia caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus". International Journal of Biological Macromolecules, *155*, 103–109.

Luo, Z., Fan, S., Gu, C., Liu, W., Li, B., Liu, J. 2018. "Metal – Organic Framework (MOF) -based Nanomaterials for Biomedi- cal Applications", 1–29.

Mazoochi, T., Jabbari, V. 2011. "Chitosan nanofibrous scaffold fabricated via electrospinning: The effect of processing parameters on the nanofiber morphology". International Journal of Polymer Analysis and Characterization, *16*(5), 277–289.

Megelski, S., Stephens, J. S., Bruce Chase, D., Rabolt, J. F. 2002. "Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers". Macromolecules, *35*(22), 8456–8466.

Mizrahi, O., Sheyn, D., Tawackoli, W., Kallai, I., Oh, A., Su, S., … Gazit, Z. 2013. "BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells". Gene Therapy, *20*(4), 370–377.

Mo, X. M., Xu, C. Y., Kotaki, M., Ramakrishna, S. 2004. "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation". Biomaterials, *25*(10), 1883–1890.

Murphy, C. M., Haugh, M. G., O'Brien, F. J. 2010. "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering". Biomaterials, *31*(3), 461–466.

Nabipour, H., Sadr, M. H., Bardajee, G. R. 2017. "Synthesis and characterization of nanoscale zeolitic imidazolate frameworks with ciprofloxacin and their applications as antimicrobial agents". New Journal of Chemistry, *41*(15), 7364–7370.

O'Brien, F. J. 2011. "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering". Materials Today,

14(3), 88–95.

Pan, Y., Liu, Y., Zeng, G., Zhao, L., Lai, Z. 2011. "Rapid synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nanocrystals in an aqueous system". Chemical Communications, *47*(7), 2071–2073.

Park, J., Jiang, Q., Feng, D., Mao, L., Zhou, H. C. 2016. "Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal-Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy". Journal of the American Chemical Society, *138*(10), 3518–3525.

Park, K. S. 2006. "Supporting Info Exceptional stability ZIFS". Pnas, *103*(27), 10188.

Park, K. S., Ni, Z., Côté, A. P., Choi, J. Y., Huang, R., Uribe-Romo, F. J., … Yaghi, O. M. 2006. "Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *103*(27), 10186–10191.

Pereira, H. F., Cengiz, I. F., Silva, F. S., Reis, R. L., Oliveira, J. M. 2020. "Scaffolds and coatings for bone regeneration". Journal of materials science. Materials in medicine, *31*(3), 27.

Pisani, S., Dorati, R., Chiesa, E., Genta, I., Modena, T., Bruni, G., … Conti, B. 2019. "Release profile of gentamicin sulfate from polylactide-co-polycaprolactone electrospun nanofiber matrices". Pharmaceutics, *11*(4).

Prananingrum, W., Naito, Y., Galli, S., Bae, J., Sekine, K., Hamada, K., … Ichikawa, T. 2016. "Bone ingrowth of various porous titanium scaffolds produced by a moldless and space holder technique: An in vivo study in rabbits". Biomedical Materials (Bristol), *11*(1).

Qian, J., Xu, M., Suo, A., Yang, T., Yong, X. 2013. "An innovative method to fabricate honeycomb-like poly(ε-caprolactone)/ nano-hydroxyapatite scaffolds". Materials Letters, *93*, 72–76.

Radisavljevic, A., Stojanovic, D. B., Perisic, S., Djokic, V., Radojevic, V., Rajilic-Stojanovic, M., Uskokovic, P. S. 2018. "Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced via different electrospinning methods: Characterization, drug release and antibacterial effect". European Journal of Pharmaceutical Sciences, *124*(August), 26–36.

Ran, J., Zeng, H., Cai, J., Jiang, P., Yan, P., Zheng, L., … Tong, H. 2018. "Rational design of a stable, effective, and sustained dexamethasone delivery platform on a titanium implant: An innovative application of metal organic frameworks in bone implants". Chemical Engineering Journal, *333*(July 2017), 20–33.

Ren, K., Wang, Y., Sun, T., Yue, W., Zhang, H. 2017. "Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes". Materials Science and Engineering C, *78*, 324–332.

Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., Koombhongse, S. 2000. "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning". Journal of Applied Physics, *87*(9 I), 4531–4547.

Rezaei, A., Nasirpour, A. 2019. "Evaluation of Release Kinetics and Mechanisms of Curcumin and Curcumin-β-Cyclodextrin Inclusion Complex Incorporated in Electrospun Almond Gum/PVA Nanofibers in Simulated Saliva and Simulated Gastrointestinal Conditions". BioNanoScience, *9*(2), 438–445.

Şahin, F., Topuz, B., Kalıpçılar, H. 2018. "Synthesis of ZIF-7, ZIF-8, ZIF-67 and ZIF-L from recycled mother liquors". Microporous and Mesoporous Materials, *261*(July 2017), 259–267.

Schroeder, T. M., Jensen, E. D., Westendorf, J. J. 2005. "Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts". Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews, *75*(3), 213–225.

Seeherman, H., Wozney, J. M. 2005. "Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration". Cytokine and Growth Factor Reviews, *16*(3 SPEC. ISS.), 329–345.

Seo, H.-J., Cho, Y.-E., Kim, T., Shin, H.-I., Kwun, I.-S. 2010. "Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells". Nutrition Research and Practice, *4*(5), 356.

Siepmann, J., Siepmann, F. 2012. "Modeling of diffusion controlled drug delivery". Journal of Controlled Release, *161*(2), 351–362.

Sill, T. J., von Recum, H. A. 2008. "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering". Biomaterials, *29*(13), 1989–2006.

Şimşek, M., Çapkin, M., Karakeçili, A., Günmünşderelioğlu, M. 2012. "Chitosan and polycaprolactone membranes patterned via electrospinning: Effect of underlying chemistry and pattern characteristics on epithelial/fibroblastic cell behavior". Journal of Biomedical Materials Research - Part A, *100 A*(12), 3332–3343.

Singhvi, G., Singh, M. 2011. "In-Vitro Drug Release Characterization Models". International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, *2*(1), 77–84.

Sitharaman, B., Shi, X., Walboomers, X. F., Liao, H., Cuijpers, V., Wilson, L. J., … Jansen, J. A. 2008. "In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering". Bone, *43*(2), 362–370.

Song, F., Zhang, L. M., Yang, C., Yan, L. 2009. "Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery". International Journal of Pharmaceutics, *373*(1–2), 41–47.

Soran, Z., Aydin, R. S. T., Gumusderelioglu, M. 2012. "Chitosan scaffolds with BMP-6 loaded alginate microspheres for periodontal tissue engineering". Journal of Microencapsulation, *29*(8), 770–780.

Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., Kumbar, S. G. 2016. "Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering". Bioactive Materials, *1*(2), 93–108.

Tan, S. H., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S. 2005. "Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process". Polymer, *46*(16), 6128–

6134.

Taniguchi, N., Fujibayashi, S., Takemoto, M., Sasaki, K., Otsuki, B., Nakamura, T., … Matsuda, S. 2016. "Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment". Materials Science and Engineering C, *59*, 690–701.

Thanyacharoen, T., Chuysinuan, P., Techasakul, S., Nooeaid, P., Ummartyotin, S. 2018. "Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: Release characteristics and antioxidant activity". International Journal of Biological Macromolecules, *107*(PartA), 363–370.

Tiğli, R. S., Kazaroğlu, N. M., Maviş, B., Gumusderelioglu, M. 2011. "Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds". Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, *22*(1–3), 207–223.

Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., … Shu, W. 2018. "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering". Bioactive Materials, *3*(3), 278–314.

Um-i-Zahra, S., Shen, X. X., Li, H., Zhu, L. 2014. "Study of sustained release drug-loaded nanofibers of cellulose acetate and ethyl cellulose polymer blends prepared by electrospinning and their in-vitro drug release profiles". Journal of Polymer Research, *21*(12).

Vasconcelos, I. B., Da Silva, T. G., Militão, G. C. G., Soares, T. A., Rodrigues, N. M., Rodrigues, M. O., … Junior, S. A. 2012. "Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8". RSC Advances, *2*(25), 9437–9442.

Vo, T. N., Kasper, F. K., Mikos, A. G. 2012. "Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration". Advanced Drug Delivery Reviews, *64*(12), 1292–1309.

Vukicevic, S., Grgurevic, L. 2009. "BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation". Cytokine and Growth Factor Reviews, *20*(5–6), 441–448.

Wannatong, L., Sirivat, A., Supaphol, P. 2004. "Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene". Polymer International, *53*(11), 1851–1859.

Wu, M., Yang, Y. 2017. "Metal – Organic Framework (MOF) -Based Drug / Cargo Delivery and Cancer Therapy", 1–20.

Yang, C., Xu, J., Yang, D., Wang, X., Liu, B., He, N., Wang, Z. 2018. "ICG@ZIF-8: One-step encapsulation of indocyanine green in ZIF-8 and use as a therapeutic nanoplatform". Chinese Chemical Letters, *29*(9), 1421–1424.

Yang, H. Y., Li, Y., Lee, D. S. 2018. "Multifunctional and Stimuli-Responsive Magnetic Nanoparticle-Based Delivery Systems for Biomedical Applications", *1800011*, 1–17.

Yoshihiro, Y., Ko, F., Akira, T., Hajime, M. 2007. "Characteristics of elastomeric nanofiber membranes produced by electrospinning". Journal of Textile Engineering, *53*(4), 137–142.

Yu, Y., Hua, S., Yang, M., Fu, Z., Teng, S., Niu, K., … Yi, C. 2016. "Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold". RSC Advances, *6*(112), 110557–110565.

Yuan, X. Y., Zhang, Y. Y., Dong, C., Sheng, J. 2004. "Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning". Polymer International, *53*(11), 1704–1710.

Yüksel, E., Karakeçili, A., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M. 2016. "Preparation of bioactive and antimicrobial PLGA membranes by magainin II/EGF functionalization". International Journal of Biological Macromolecules, *86*, 162–168.

Zaiss, S., Brown, T. D., Reichert, J. C., Berner, A. 2016. "Poly(ε-caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning for bone tissue engineering". Materials, *9*(4), 1–15.

Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J. 2005. "Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats". European Polymer Journal, *41*(3), 423–432.

Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., Turng, L. sheng. 2018. "Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review". Frontiers of Mechanical Engineering, *13*(1), 107–119.

Zhao, S., Wu, X., Wang, L., Huang, Y. 2003. "Electrospinning of Ethyl – Cyanoethyl Cellulose / Tetrahydrofuran Solutions".

Zheng, H., Zhang, Y., Liu, L., Wan, W., Guo, P., Nyström, A. M., Zou, X. 2016. "One-pot Synthesis of Metal-Organic Frameworks with Encapsulated Target Molecules and Their Applications for Controlled Drug Delivery". Journal of the American Chemical Society, *138*(3), 962–968.

Zheng, M., Liu, S., Guan, X., Xie, Z. 2015. "One-Step Synthesis of Nanoscale Zeolitic Imidazolate Frameworks with High Curcumin Loading for Treatment of Cervical Cancer". ACS Applied Materials and Interfaces, *7*(40), 22181–22187.

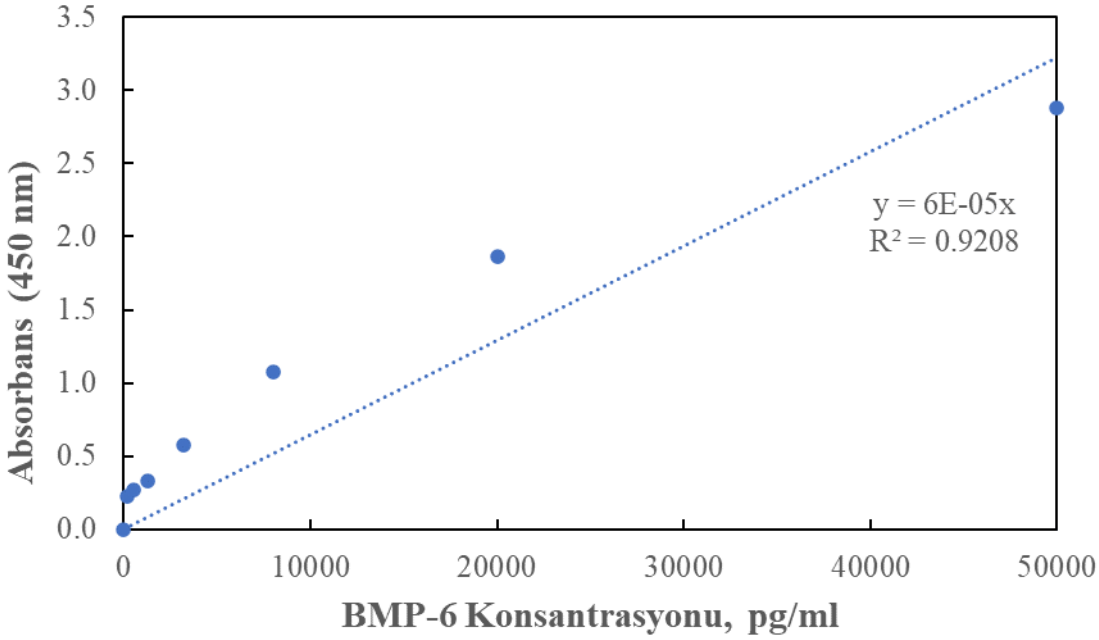
Zhou, X., Li, J., Sun, H., Hu, Y., Che, L., Wang, Z. 2017. "Controlled Cell Patterning on Bioactive Surfaces with Special Wettability". Journal of Bionic Engineering, *14*(3), 440–447.

Zhu, X., Gu, J., Wang, Y., Li, B., Li, Y., Zhao, W., Shi, J. 2014. "Inherent anchorages in UiO-66 nanoparticles for efficient capture of alendronate and its mediated release". Chemical Communications, *50*(63), 8779–8782.

Zhuo, H., Hu, J., Chen, S. 2008. "Electrospun polyurethane nanofibres having shape memory effect". Materials Letters, *62*(14), 2074–2076.

Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S., Chu, B. 2002. "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes". Polymer, *43*(16), 4403–4412.

EK 1 BMP-6 kalibrasyon grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge TOPRAK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 30/06/1992

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise	:	TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi (2010)
Lisans	:	Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2017)
Yüksek Lisans:		Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2017-Temmuz 2020)

Yer Aldığı Projeler:

2018-2019	Osteokondral Rejenerasyon için Biyomimetik Gradyen Doku İskelelerinin Geliştirilmesi, TÜBİTAK, Proje No: 116M437
2019-2020	BMP-6/MOF Yüklü Polikaprolakton Fibröz Membranlar: Sentez, Karakterizasyon ve Osteojenik Farklılaşmanın İncelenmesi, TÜBİTAK Proje No: 218M791
2020 (5 ay)	Antibiyotik Yüklü Kitosan/MOF Kompozit Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Osteomiyelit Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, TÜBİTAK Proje No: 218M342

Yer Aldığı Makaleler:

2020	Serdar Korpayev, **Özge Toprak**, Gülşah Kaygusuz, Murat Şen, Kaan Orhan, Ayşe Karakeçili, Regulation of chondrocyte hypertrophy in an osteochondral interface mimicking gel matrix, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 193. ISSN 0927-7765, https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111111.