T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OSTEOKONDRAL HASARLARIN ONARIMINA YÖNELİK 3B-BİYOYAZICI İLE ÇİFT-TABAKALI NANOHİBRİT DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

BURÇİN İZBUDAK

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ AYÇA BAL ÖZTÜRK

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİMDALI

İSTANBUL-2021

T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OSTEOKONDRAL HASARLARIN ONARIMINA YÖNELİK 3B-BİYOYAZICI İLE ÇİFT-TABAKALI NANOHİBRİT DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

BURÇİN İZBUDAK

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ AYÇA BAL ÖZTÜRK

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 118S549

İSTANBUL-2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “Osteokondral Hasarların Onarımına Yönelik 3B-Biyoyazıcı İle Çift-Tabakalı Nanohibrit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burçin İZBUDAK

İTHAF

Asla pes etmeyen bilim insanlarına ve aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman yüreklendiren, hiçbir zaman bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, her zaman desteğini üzerimde hissettiğim tez dönemim boyunca da üstümden ilgisini ve emeğini hiç eksik etmeyen, benim için hoca öğrenci ilişkisini kırıp yeni bir boyuta getiren ve bilime her zaman teşvik eden, iş disiplinine ve çalışkanlığına hayran olduğum sevgili danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK'e

Bilimsel çalışmalarıyla kendisine hayran olduğum, bilimsel çalışmalara başlamamı sağlayan, bilgi birikimi ve tecrübelerini esirgemeyen, bana disiplinli ve etik olarak çalışmayı aşılayan çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e

Öğrencilere her zaman bilgilerini aktarmayı seven, bu bölüme başlamamı sağlayan, hiçbir zaman desteğini üzerimden eksik etmeyen, bilgi birikimine hayran olduğum, ufkumu açan, inceliğini hiç bozmayan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI'ya

Tez deneylerim boyunca 3B-Biyoyazıcı ile olan deneylerimde yardımcı olan, kadınların her koşulda bilimde yer alabileceğini gösteren ve bana örnek olan, sevgili hocam Rümeysa TUTAR'a

Yüksek lisansım ve tez dönemim boyunca her zaman yanımda olan, deneylerimde bana yardımcı ve destek olan, sevinçlerimi ve üzüntülerimi paylaşabildiğim, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Aslı OYUNLU, Elif YÜCE, Selin URSAVAŞ, Beste AYDIN, Barışhan KILIÇ, Zeynep Püren AKGÜNER, Ayça KARAGÖZ KOROĞLU, Merve TOPAL'a

Tez dönemim boyunca beni cesaretlendiren ve her yardıma ihtiyacım olduğunda bana destek olan Sezgin SAZLIOĞULLARI'na

Beni her zaman yüreklendiren ve yanımda olan, karakteriyle hayatıma renk katan Kaan GÜNER'e

Her zaman varlıklarıyla mutlu olduğum, beni bugünlere büyük bir azim ve gururla getiren, kararlarımı destekleyen ve her hatamda da başarımda da arkamda dağ gibi duran, beni her zaman koşulsuz seven, bana bütün iyi olanakları sağlamak için ellerinden geleni yapan canım annem Hacer İZBUDAK ve canım babam Kemal İZBUDAK'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 118S549

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI i
İTHAF ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER v
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ xiv
ÖZET xvii
ABSTRACT xviii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 2
1.1. Doku Mühendisliği 2
1.2. Osteokondral Doku Mühendisliği 4
1.2.1. Osteokondral Dokunun Yapısı ve Özellikleri 6
1.2.1.1. Kemik Doku ve Özellikleri 8
1.2.1.2. Kıkırdak Doku ve Özellikleri 11
1.2.2. Osteokondral Doku İskelelerinde Aranan Özellikler 12
1.2.2.1. Biyouyumluluk 13
1.2.2.2. Biyobozunurluk 14
1.2.2.3. Gözeneklilik 14
1.2.2.4. Mekanik Özellikler 15
1.3. Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler 15
1.3.1. Biyopolimerler 15
1.3.1.1. Jelatin Metakrilat (GelMA) 20
1.3.1.2. Kitosan Metakrilat (ChitMA) 21
1.3.2. Biyoseramikler 22
1.3.3. Nanomalzemeler 23
1.3.3.1. Çift Tabakalı Hidroksit Bileşikleri (LDH) 26
1.4. Hidrojeller 27
1.4.1. Nanokompozit Hidrojeller 29
1.5. Osteokondral Doku İskeleleri 31

1.5.1. Tek Fazlı Doku İskeleleri 31
1.5.2. İki Fazlı ve Çok Fazlı Doku İskeleleri 33
1.6. Doku İskelesi Üretim Teknikleri 36
1.6.1. Çözücü Döküm Yöntemi 36
1.6.2. Dondurarak Kurutma Yöntemi (Freeze Drying) 36
1.6.3. Elektrospinning (Elektro-eğirme) Yöntemi 37
1.6.4. Mikro-Kalıplama (Mikro-molding) Yöntemi 38
1.6.5. 3B-Biyoyazıcı 40
1.7. Osteokondral Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Tipleri 42
1.7.1. Osteoblast 42
1.7.2. Kondrosit 42
1.7.3. Kök Hücreler 43
2. MATERYAL VE METOD 47
2.1. Kimyasal Malzemeler 47
2.2. Sarf Malzemeler 49
2.3. Hücre Hatları 49
2.4. Kullanılan Cihazlar 50
2.5. hBMMSC'lerin *In Vitro* Çalışmalar için Hazırlanması 51
2.5.1. hBMMSC'lerin Stoktan Çıkartılması 51
2.5.2. hBMMSC'lerin Pasajlanması 51
2.5.3. hBMMSC'lerin Stoklanması 52
2.5.4. Thoma Lamı ile hBMMSC Sayımı 52
2.6. LDH Nanopartiküllerinin Sitotoksisite Analizi 52
2.7. LDH Nanopartiküllerine Büyüme Faktörleninin Yüklenmesi ve Salım Çalışmaları 53
2.7.1. LDH nanopartiküllerine BMP-2 veya TGF-β1 yüklenmesi 53
2.7.2. LDH nanopartiküllerinden BMP-2 veya TGF-β1 Salımı 54
2.8. Biyomürekkeplerin Hazırlanması 54
2.9. 3B-Biyoyazıcı ile Tek ve Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Üretimi 56
2.10. hBMMSC'lerin Doku İskelelerinde Adezyon Davranışlarının Belirlenmesi 57
2.10.1. Çoğalma Hızı Analizi 57
2.10.2. DAPI/Actin Analizi 58
2.11. 3B-Biyobaskı ile hBMMSC Yüklü Tek katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi 58
2.12. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 59
2.12.1. hBMMSC Canlılık Analizi 59
2.12.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi 59

2.13. 3B-Biyobaskı ile hBMMSC Yüklü Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi 60
2.14. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi 60
2.14.1. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi..... 60
2.14.2. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi..... 61
2.14.3. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell-Tracker ile İncelenmesi 61
2.15. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaştırma için Kültürlenmesi..... 62
2.16. Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları 62
2.16.1. Histolojik Boyamalar..... 63
2.16.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması..... 63
2.16.1.2. Alizarin Red S Boyaması..... 63
2.16.1.3. Von Kossa Boyaması..... 64
2.16.2. İmmunfloresan Boyamalar 64
2.17. Kondrojenik Farklılaşma Çalışmaları 65
2.17.1. Histolojik Boyamalar..... 66
2.17.1.1. Alcian Blue Boyaması 66
2.17.1.2. Toluidin Mavisi Boyaması..... 66
2.17.2. GAG Analizi..... 67
2.17.3. İmmunfloresan Boyamalar 68
3. BULGULAR..... 69
3.1. LDH Nanopartiküllerinden Sitotoksisite Analizi Sonuçları 69
3.2. Büyüme Faktörü Yüklü LDH Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi Sonuçları 69
3.3. LDH Nanopartiküllerinden Büyüme Faktörü Salım Sonuçları..... 70
3.4. Doku İskelelerinde hBMMSC Adezyonu Sonuçları..... 71
3.4.1. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları 71
3.4.2. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları 71
3.5. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu..... 72
3.5.1. hBMMSC Canlılık Analizi Sonuçları..... 72
3.5.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları 74
3.5.3. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları 75
3.5.4. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi..... 77
3.5.5. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi..... 77
3.5.6. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi..... 78

3.5.7. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell-Tracker ile Görüntülenmesi 79
3.6. Osteojenik Farklılaşma Sonuçları 80
3.6.1. Histolojik Boyamalar 80
3.6.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması Sonuçları 80
3.6.1.2. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları 82
3.6.1.3. Von Kossa Boyaması Sonuçları 83
3.6.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları 84
3.7. Kondrojenik Farklılaşma Sonuçları 87
3.7.1. Kondrojenik Histolojik Boyamalar 87
3.7.2. Alcian Blue Boyaması Sonuçları 87
3.7.3. İmmunfloresan Boyama Sonuçları 88
3.7.4. GAG Analiz Sonuçları 91
4. TARTIŞMA 92
4.1. LDH Nanopartiküllerinden Sitotoksisite Analizi Sonuçları 92
4.2. Büyüme Faktörü Yüklü LDH Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi Sonuçları 93
4.3. LDH Nanopartiküllerinden Büyüme Faktörü Salım Sonuçları 93
4.4. Doku İskelelerinde hBMMSC Adezyonu Sonuçları 94
4.4.1. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları 94
4.4.2. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları 95
4.5. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 95
4.5.1. hBMMSC Canlılık Analizi Sonuçları 95
4.5.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları 95
4.5.3. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları 96
4.5.4. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi 96
4.5.5. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi 97
4.5.6. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi 97
4.5.7. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell Tracker ile Analizi 98
4.6. Osteojenik Farklılaşma Sonuçları 98
4.6.1. Osteojenik Histolojik Boyamalar 98
4.6.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması Sonuçları 98
4.6.1.2. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları 99
4.6.1.3. Von Kossa Boyaması Sonuçları 99
4.6.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları 100
4.7. Kondrojenik Farklılaşma Sonuçları 101

4.7.1. Kondrojenik Histolojik Boyamalar 101
4.7.1.1. Alcian Blue Boyaması Sonuçları 101
4.7.1.2. Toluidin Mavisi Boyaması Sonuçları 101
4.7.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları 102
4.7.3. GAG Analiz Sonuçları 102
5. SONUÇ 104
KAYNAKÇA 105
İNTİHAL FORMU 124

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1: Biyopolimerlerin avantaj ve dezavantajları 19
Tablo 1.2: Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türlerinin avantaj ve dezavantajları. 28
Tablo 3.1: LDH nanopartiküllerine BMP-2 ve TGF-β1 yükleme miktarı 69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Doku mühendisliğinde yapay organ oluşturmanın şematik gösterimi. 3
Şekil 1.2: Doku mühendisliği çalışma prensibi. 4
Şekil 1.3: Kıkırdak ve kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için enjekte edilebilir hidrojeller yapma yaklaşımlarının şematik gösterimi..... 6
Şekil 1.4: Osteokondral dokunun yapısını oluşturan birimler. 8
Şekil 1.5: Kemiğin yapısı..... 9
Şekil 1.6: Kemik hücrelerinin şematik gösterimi (Michael H. Ross, 1930-2020)..... 11
Şekil 1.7: Farklı kıkırdak türleri ve arasındaki farklılıklar: (a) Hiyalin kıkırdak, lakunada yuvarlak kondrositler gösterir ve mevcut kolajen lifleri olmasına rağmen, matriste gözle görülür şekilde boyanmaz, (b) Fibröz kıkırdak, aralarında kondrosit sıraları bulunan kalın, üst üste katmanlanmış kolajen demetleri gösterir ve (c) Elastik kıkırdak, hiyalin kıkırdağa benzer görünür, ancak matriste koyu lekeli elastik lifler görünür. 12
Şekil 1.8: Jelatinin metakrilanması ile GelMA polimerinin eldesi. 21
Şekil 1.9: Karbon nanotüplerin biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları. 26
Şekil 1.10: Nanokompozit hidrojellerin biyomedikal uygulamaları. 31
Şekil 1.11: Osteokondral doku mühendisliğinde tek ve iki fazlı doku iskelesi yaklaşımları..... 32
Şekil 1.12: Farklı oranlarda hidroksiapatit içeren çok katmanlı doku iskelesinin şematik görünümü. 34
Şekil 1.13: PLGA/PLGA-HAp iki katmanlı iskelelerinin in vivo tavşan diz eklem modelinde değerlendirilmesi: (A) Etkinliğin, (B) defekt ve implantın bulunduğu yerin şematik gösterimi. (C) Geliştirilen iki katmanlı, gözenekli kompozit doku iskelesi. 35
Şekil 1.14: Bifazik HAp/PCL doku iskelelerinin üretim süreci. 36
Şekil 1.15: Dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskelesi üretimi. 37
Şekil 1.16: Elektro-eğirme yöntemi kullanılarak nanofiber üretiminin şematik görünümü. 38
Şekil 1.17: JelMA/nHA nano kompozit hidrojelden UV ışığı altında mikro-kalıpma yöntemi ile doku iskelesi üretimi. 39
Şekil 1.18: 3B-biyoyazıcı ile hücre yüklü doku iskelesi üretimi ve uygulama alanları, (b) Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, dokuları oluşturmak için sırayla küçük hücre

damlacıkları ve hidrojel çıkarır, (c) Lazer tabanlı biyoyazıcılar, donör katmandaki (üstte) bir bölgeyi buharlaştırmak için bir lazer kullanır, (d) Ekstrüzyon biyoyazıcıları, bir sıvı hücre-hidrojel çözeltisini sürekli olarak ekstrüde etmek için pnömatik veya manuel güç kullanır, (e) Stereolitografik yazıcılar, biyomürekkepleri düzlemden düzleme seçici olarak çapraz bağlamak için bir dijital ışık projektörü kullanır. 41
Şekil 1.19: Kök hücre kaynakları. 46
Şekil 2.1: Biyoink A (kemik) ve Biyoink B (kıkırdak) formülasyon içeriği. 55
Şekil 2.2: 3B-Biyobasım sonrası çift-tabakalı doku iskelesinin görünümü (alt katman: 10 kat Biyoink A5, üst katman: 10 kat Biyoink B3). 56
Şekil 2.3: Proje kapsamında satın alınan Axobioprint 3B-Biyoyazıcı sistemi 57
Şekil 2.4: (A) GAG Kiti seyreltme protokolü ve (B) GAG standart eğrisi. 67
Şekil 3.1: LDH nanopartiküllerinin MTT analizi sonuçları. 69
Şekil 3.2: LDH nanopartiküllerinden (A) BMP-2 ve (B) TGF-β1 kümülatif salımı..... 70
Şekil 3.3: (A) BMP-2 yüklü LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinden BMP-2'nin kümülatif salımı, (B) TGF-β1 yüklü LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinden TGF-β1'in kümülatif salımı. 70
Şekil 3.4: Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin 1, 3, 5 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivitesi sonuçları (proliferasyon hızı). 71
Şekil 3.5: Biyoink A ve BiyoinkB doku iskelelerinin in vitro hücre adezyonu sonuçları. 72
Şekil 3.6: hBMMSC-yüklü Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası canlılık analizi sonuçları. 73
Şekil 3.7: hBMMSC-yüklü doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası % hücre canlılığı sonuçları. 74
Şekil 3.8: Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 1, 3, 5 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivitesi sonuçları (proliferasyon hızı). 75
Şekil 3.9: hBMMSC-yüklü Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası Alexa Fluor 488 /DAPI boyama sonuçları. 76
Şekil 3.10: hBMMSC-yüklü Biyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası Alexa Fluor 488 /DAPI boyama sonuçları 76

Şekil 3.11: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası canlılık analizi sonuçları. 77
Şekil 3.12: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası çoğalma hızı analizi sonuçları. 78
Şekil 3.13: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası DAPI/Actin analizi sonuçları. Ölçek çubuğu (A) 50 µm ve (B) 25 µm. 79
Şekil 3.14: Biyoink A5/ Biyoink B3 çift tabakalı doku iskelesinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin katmanlar arası geçişi. 80
Şekil 3.15: Tek tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Hemotoksilen Eosin boyaması sonuçları 81
Şekil 3.16: Çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Hemotoksilen Eosin boyaması sonuçları 82
Şekil 3.17: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Alizarin Red S boyaması sonuçları. 83
Şekil 3.18: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Von Kossa boyaması sonuçları. 84
Şekil 3.19: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14. gün inkübasyon sonrası DAPI/RUNX II boyama sonuçları. 85
Şekil 3.20: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası DAPI/RUNX II boyama sonuçları. 86
Şekil 3.21: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Alcian Blue boyama sonuçları. 87
Şekil 3.22: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Toluidin mavisi boyama sonuçları. 88
Şekil 3.23: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14. gün inkübasyon sonrası DAPI/COL II boyama sonuçları. 89
Şekil 3.24: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası DAPI/COL II boyama sonuçları. 90
Şekil 3.25: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası GAG üretimi. 91

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

2B : İki boyutlu

3B : Üç boyutlu

AdMSC : Yağdan türetilmiş kök hücreler

ALP : Alkalen fosfataz

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü 2

BMMSC : Kemik iliği mezenkimal kök hücreler

BSA : Sığır serum albümin

BSP : Kemik silia protein

CaP : Kalsiyum fosfat

ChitMA : Kitosan metakrilat

CNT : Karbon nanotüp

Col : Kolajen

COL II : Kolajen TİP 2

COL1A : Kolajen Tip 1 Alfa

DAPI : 4’ 6, 6-diamidino-2-fenilindol

DIW : Doğrudan mürekkeple yazma

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)

EBB : Ekstrüzyon bazlı biyoyazıcılar

ECM : Ekstraselüler matris

EKH : Embriyonik kök hücreler

FBS : Fetal sığır serumu

GelMA : Jelatin metakrilamid

H&E : Hematoksilen ve Eosin

HA : Hidroksiapatit

hBMMSC : İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreler

HCI : Hidrojen klorür

IF : İmmünofloresan

iPSC : İndüklenmiş pluripent kök hücreler

LDH : Çift katmanlı hidroksit bileşikleri

MSC : Mezenkimal kök hücre

MTT : Metilltiazoldifeniltetrazolyum bromür

Na_2CO_3 : Sodyum karbonat

NaOH : Sodyum hidroksit

OA : Osteoartrit

OCN : Osteokalsin

OL : Osteokondral lezyon

PBS : Fosfat tuz tamponu

PCL : Polikaprolaktan

PDMS : Polidimetilsiloaksan

PEG : Polietilen glikol

PFA : Paraformaldehit

PGA : Poliglikolik asit

PLA : Polilaktik asit

PLGA : Polilaktit-ko-glikolid

PLLA : Poli L-laktik asit

PTHrP : Paratiroid hormonu ile ilişkili peptit

RGD : Arjinin-glisin-aspartik asit

rGO : İndirgenmiş grafen oksit

rhBMP-2 : Rekombinant insan kemik morfogenetik proteini-2

SLA : Stereolitografi

SLS : Seçici Lazer Sinterleme

TGFβ-1 : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-1

UV : Ultraviyole

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WJ : Wharton jeli

WJMSC : Wharton jeli mezenkimal kök hücreleri

ÖZET

İzbudak, B. (2021). Osteokondral Hasarların Onarımına Yönelik 3B-Biyoyazıcı ile Çift-Tabakalı Nanohibrit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tez çalışması kapsamında osteokondral defektlerin onarımında kullanılmak üzere 3B-biyoyazıcı teknolojisi ile kök hücre yüklü jelatin metakrilat/ kitosan metakrilat (GelMA/ChitMA) polimerleri ve LDH nanopartikülleri içeren nanohibrit çift-tabakalı 3B doku iskeleleri geliştirilmiştir. Çift tabakalı doku iskelelerinin alt tabaka kemik dokuyu üst tabaka ise kıkırdak dokuyu taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. LDH nanopartiküllerine TGF-ß1 ve rhBMP-2 sinyal molekülleri ayrı ayrı yüklenmiş ve enzim-bağlı immünosorbent testi (ELISA) ile *in vitro* salım davranışları incelenmiştir. Çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin canlılığı, morfolojisi, gelişimi, proliferasyonu, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri incelenmiştir. Geliştirilen kemik doku iskelelerinde osteojenik farklılaştırma kapasiteleri Hematoksilen&Eosin, Alizarin Red S, Von Kossa ve immünfloresan boyamaları ile değerlendirilmiştir. Geliştirilen kıkırdak doku iskelelerinde kondrojenik farklılaştırma kapasiteleri Hematoksilen&Eosin, Alcian Blue, Toluidin mavisi, GAG anlizi ve immünfloresan boyamaları ile değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar LDH nanopartikül katkılı çift fazlı GelMA/ChitMA nanohibrit doku iskelelerinin osteokondral defektlerin onarımı için kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Osteokondral doku mühendisliği, 3B-Biyoyazıcı, GelMA, ChitMA, nanopartikül, mezenkimal kök hücre

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 118S549

ABSTRACT

Izbudak, B. (2021). Development of Double-Layer Nanohybrid Tissue Scaffolds Using 3D Bioprinter for Repair of Osteochondral Defects. Istinye University Institute of Health Sciences, Stem Cell and Tissue Engineering Department. Master Thesis. Istanbul.

Within the scope of the thesis, stem cell-loaded nanohybrid 3D scaffolds with bilayer structures containing gelatin methacrylate/ chitosan methacrylate (GelMA/ChitMA) polymers and LDH nanoparticles were developed by 3D-bioprinting technology for the repair of osteochondral defects. The bottom and the upper layer of bilayer scaffolds are designed to mimic bone tissue and cartilage tissue, respectively. TGF-ß1 and rhBMP-2 signaling molecules were loaded into the LDH nanoparticles separately and their *in vitro* release behaviors were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The viability, proliferation, morphology, osteogenic and chondrogenic differentiation characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells encapsulated double-layer tissue scaffolds were investigated. The osteogenic differentiation capacities of the developed bone tissue scaffolds were evaluated with Hematoxylin&Eosin, Alizarin Red S, Von Kossa and immunofluorescent staining. Chondrogenic differentiation capacities of the developed cartilage scaffolds were evaluated with Hematoxylin&Eosin, Alcian Blue, Toluidine Blue, GAG analysis and immunofluorescence staining. All results showed that double-layer GelMA/ChitMA nanohybrid scaffolds doped with LDH nanoparticles can be used for the repair of osteochondral defects.

Keywords: Osteochondral tissue engineering, 3D-Bioprinter, GelMA, ChitMA, nanoparticle, mesenchymal stem cell

The present work was supported by TÜBİTAK. Project No. 118S549

GİRİŞ

Kondral ve osteokondral kayıplarda dokuların kendini yenileme yeteneği sınırlıdır. Özellikle osteokondral kusurlar, karmaşık hiyerarşik yapıları ve kıkırdak dokudaki kan dolaşım sisteminin eksikliği nedeniyle kendiliğinden yeterince iyileşememektedir. Bu tür dokular zedelendiği veya kayba uğradığında, hasarlı bölgenin tamir edilmesinde ya da tamamen yenilenmesinde kullanılmak amacıyla yapay kıkırdak/kemik dokusu üretebilmek günümüzün önemli tıbbi ve sosyal ihtiyaçlarından birisidir. Kıkırdak/kemik doku mühendisliği bu problemi çözmek için ortaya çıkmış olan biyoteknolojik bir alandır.

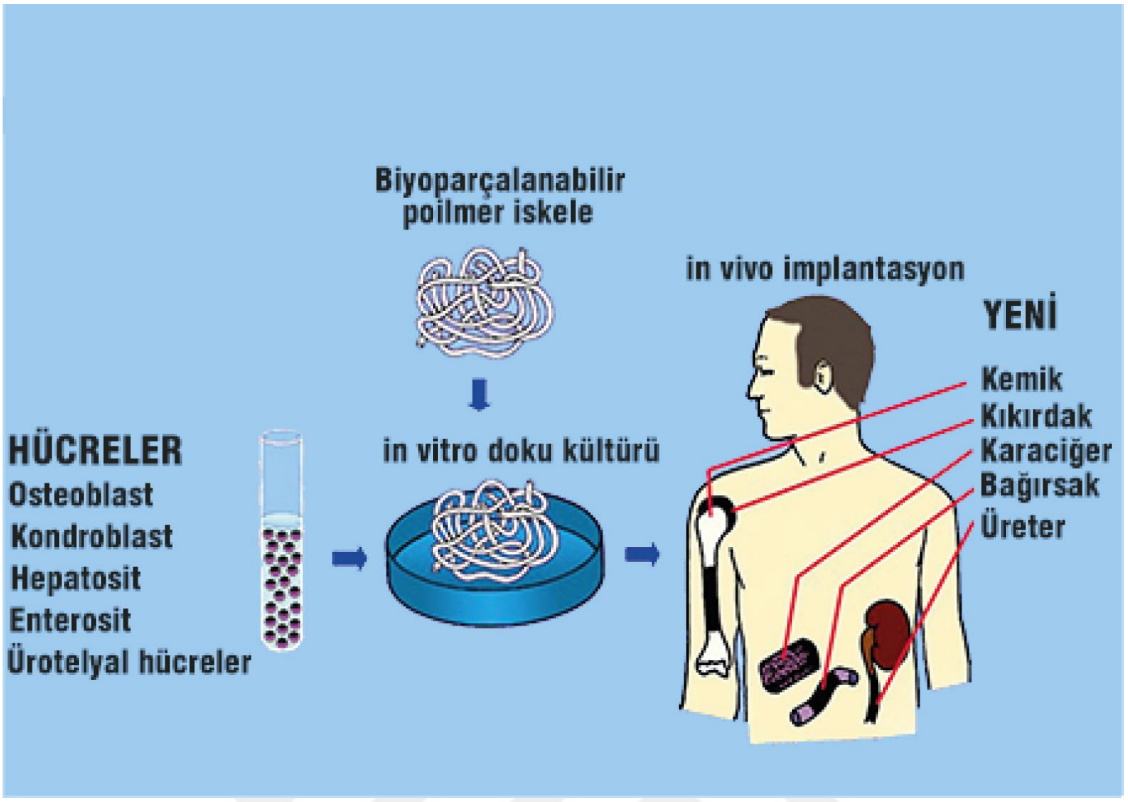
Osteokondral tedavi odaklı doku mühendisliği stratejilerinde, osteokondral dokunun doğal yapısı ve kompleksliğine benzer şekilde hem kıkırdağı hem de kemiği taklit edebilen, her iki bölümünde de farklı materyaller, morfolojiler ve özellikler kombinasyonları içeren iki tabakalı doku iskelelerinin (bifazik yapılar) tasarımları ön plana çıkmaktadır (Li ve ark., 2015). Üst kısımda bulunan kıkırdak tabakası daha düşük mukavemetli iskelelerden (Kon ve ark.., 2014), alt kısımda bulunan subkondral tabaka ise yüksek mukavemetli iskelelerden (W. Zhang ve ark.., 2015) oluşmalıdır. En ideal bifazik doku iskeleleri, katmanlara yüklenen hücrelerle birlikte kondrojenik ve osteojenik iki büyüme faktörünü içeren iskelelerdir.

Tez çalışmasında, osteokondral defektlerde kullanılmak üzere 3B-biyoyazıcı teknolojisi ile kök hücre yüklü jelatin metakrilat/N-metakriloil kitosan (GelMA/ChitMA) polimerleri ve LDH nanopartikületi içeren nanohibrit 3B çift-tabakalı doku iskeleleri geliştirilmiştir. Çift tabakalı doku iskelelerinin alt tabaka kemik dokuyu üst tabaka ise kıkırdak dokuyu taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. LDH nanopartiküllerine TGF-ß1 ve rhBMP-2 sinyal molekületi ayrı ayrı yüklenmiş ve enzim-bağlı immünosorbent testi (ELISA) ile *in vitro* salım davranışları incelenmiştir. Çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen kök hücrelerin canlılığı, morfolojisi, gelişimi, proliferasyonu, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri incelenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

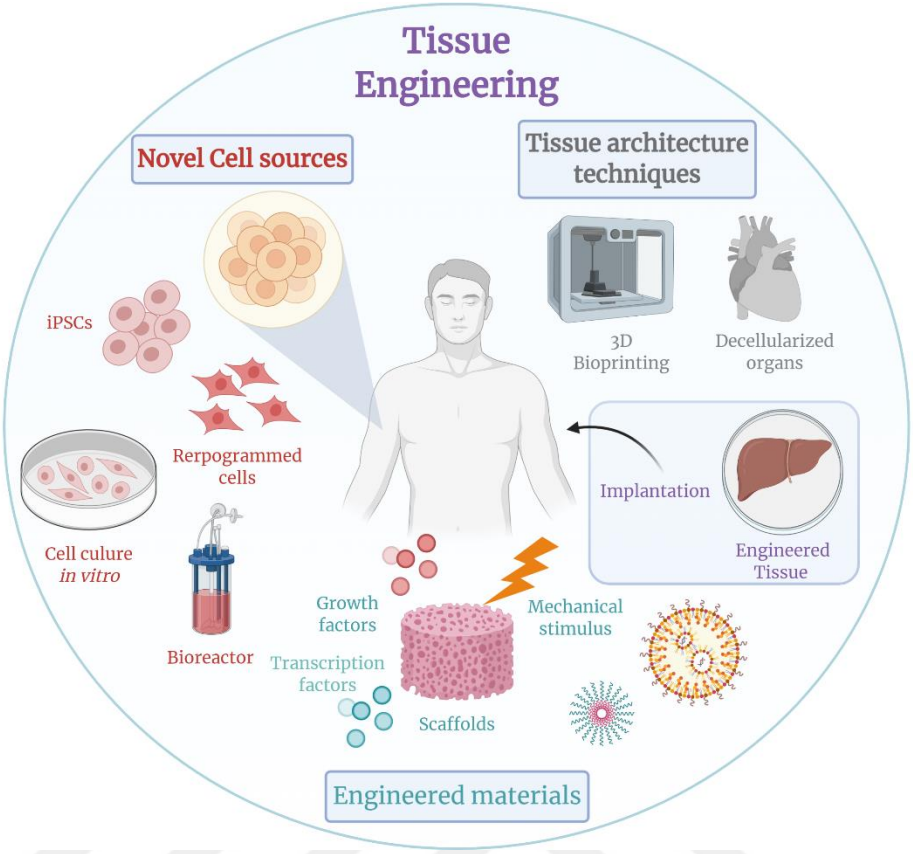
1.1. Doku Mühendisliği

Günümüzde doku mühendisliği, hasar gören veya yapısal ve işlevsel olarak yeterlilik sağlayamayan dokuları rejenere eden ve implante edilebilir doku iskelelerine üretmeye yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır (Rusk, 1950). Doku mühendisliği, yapay dokuların *in vitro* olarak inşa edilmesini sağlar. Donör dokusundan ve biyouyumlu iskele malzemelerinden izole edilmiş uygun hücreleri hasar görmüş dokulara implant ederek hücre büyümesinin ve doku fonksiyonunun *in vivo* olarak değiştirilmesini hedefler (Risbud ve Sittinger, 2002) (Şekil 1.1). Doku mühendisliği disiplinlerarası çalışma prensibi ile vücutta hasarlanmış veya kısmen kaybedilmiş dokuları onarmayı ve yenilemeyi amaçlar (Mehrasa ve ark., 2015). Doku mühendisliği için biyomateryaller, hücreler tarafından endojen hücre dışı matris materyallerinin optimal hücre yapışmasını, göçünü ve birikmesini teşvik etmek için kontrollü yüzey kimyasına, gözenekliliğe ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahip olmalıdır (Furth ve ark., 2014). Biyouyumlu ve işlevsel doku veya organlar elde etmek için; hücre, mühendislik ve malzeme bileşenlerinin uygun biyokimyasal ve fizikokimyasal kombinasyonlarıyla kullanılması gerekmektedir (Nianli Zhang ve David H. KohnDepartment, 2016). Hücre ile doku iskelesinin birleşmesi ile oluşan yapılarda hücre ve doku iskelesi seçimi çok önemlidir. Özellikle yapay doku ve organ geliştirmede kök hücre veya progenitör hücreler farklılaşma potansiyeli yüksek olduğu için tercih edilirken doku iskelesinin biyouyumlu olması başarı oranlarını artırmaktadır (B. P. Chan ve Leong, 2008). Doku iskeleleri üzerinde hücrelerin çoğalması, büyümesi ve farklılaşması için doğru mikro ortamı sağlamak için üç boyutlu doku iskelesi ve yeterli sıcaklık, pH, gaz oranını sağlayan (bir biyoreaktör gibi) makro ortama ihtiyaç vardır (Tonelli ve ark., 2017) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1: Doku mühendisliğinde yapay organ oluşturmanın şematik gösterimi (Langer ve Vacanti, 2016).

Sonuç olarak temelde mevcut doku mühendisliği çalışmaları, hücre bağlanması, çoğalması, farklılaşması ve doku oluşumu için üç boyutlu yapı işlevi gören uygulanabilir polimerik iskeleleri bulma konusunda yoğunlaşmıştır. Güçlü hücre destekleyici özelliklere sahip bir yapı iskelesi, hücreler için doğal bir ekstrasellüler matris (ECM) görevi görmektedir (P. X. Zhang ve ark., 2019). İskele malzemeleri hücre adezyonu, proliferasyonu, büyümesi ve dokunun rejenerasyonu ile birlikte vaskülarizasyonu için gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır. Bu doku iskelesi malzemeleri biyolojik olarak uyumlu, biyobozunur olmalı ve parçalanma ürünleri toksik olmamalı metabolik yolaklarla kolayca uzaklaştırılmalıdır (Sultana ve Khan, 2012).



Şekil 1.2: Doku mühendisliği çalışma prensibi (Anonim, 2020).

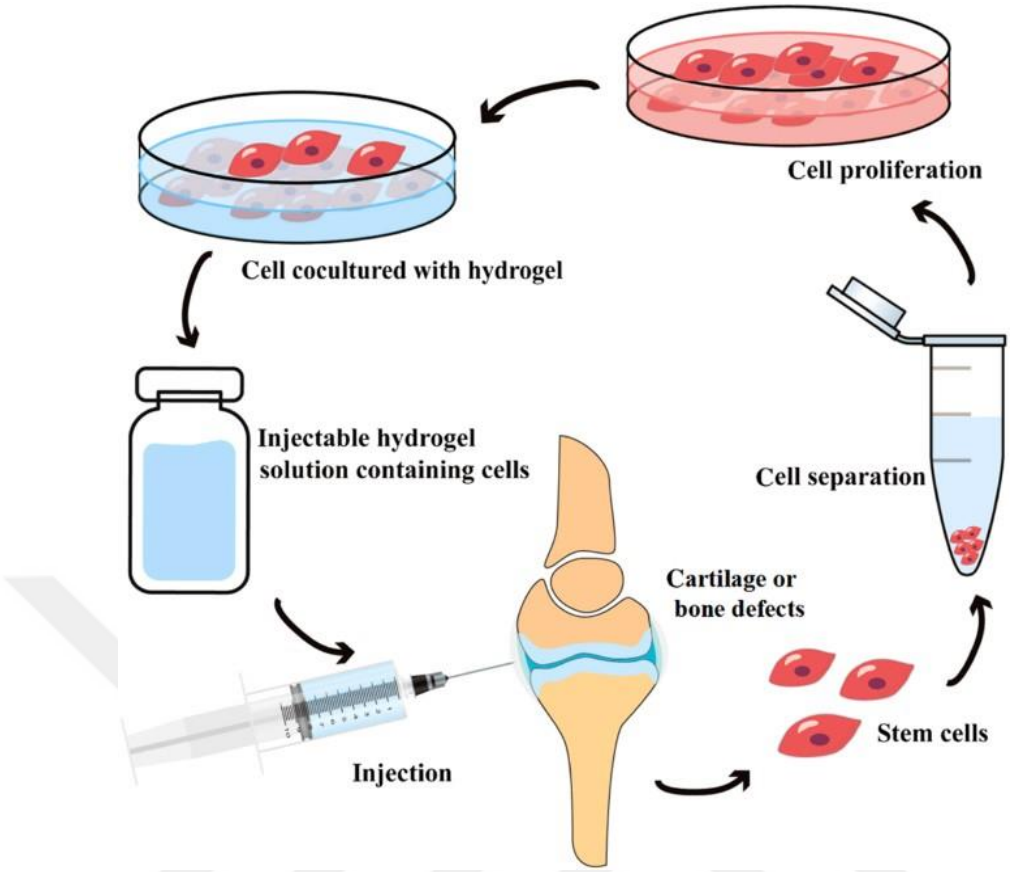
1.2. Osteokondral Doku Mühendisliği

Osteokondral lezyonlar (OL), akut travmanın bir sonucu gelişen morfolojik bir bulgudur. Osteokondrit disekanlar, osteoartrit (OA), subkondral yetmezlik kırıkları veya osteonekroz nedeniyle oluşur. OL'ler, eklem kıkırdağının ötesinde subkondral kemik ve iliğe uzandıkları için eklemi korumak, cerrahlar için zor bir klinik durum oluşturmaktadır (Gorbachova ve ark., 2018). Eklem kıkırdağı ile birlikte yapısal destek sisteminde de hasar bulunması daha kapsamlı bir klinik çözüm gerektirir. Kıkırdak dokusunun avasküler doğası nedeniyle, onarıcı büyüme faktörlerinin ve hücrelerin ulaşamayacağı bir yerdedir, bu nedenle normal doku hasarı yanıtını takip etme şansına sahip değildir (Sophia Fox ve ark., 2009). OL'lerin doğal iyileşmesi, subkondral uzantıları nedeniyle kendiliğinden hücresel onarımla sonuçlanan kondral lezyonlardan farklıdır. Vücudun oluşturduğu doğal tepki fibröz kıkırdak dokunun rejenerasyonunu sağlıklı bir şekilde sağlayamaz. Eklem yüzeyi zamanla dejenere olur ve OA'ya doğru ilerler (Ochi ve ark., 2001). OA, kıkırdak lezyonunun erken evresinde ağrı ve şişlik ile

karakterize olan dejeneratif bir hastalıktır. Osteokondral dokunun doğal yapılarında, eklem kıkırdağı subkondral kemik ile iyi bütünleşir ve kıkırdak defektleri her zaman subkondral kemiğe derinlemesine uzanır ve daha sonra osteokondral defektlere dönüşür (Re'Em ve ark., 2012). OA, eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin bozulması nedeniyle etkilenen eklemin hareketliliğini sınırlayan dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Kıkırdağın sınırlı rejeneratif kapasitesi, kıkırdak degradasyonunun etkilerini onarmaya veya tersine çevirmeye çalışırken önemli zorluklar ortaya çıkarır (Kotlarz ve ark., 2009).

Doku mühendisliği ürünleri, hastanın mevcut dokusuna entegre olma potansiyelleri nedeniyle osteokondral dejenerasyonu tedavi etmek için umut verici bir alternatiftir (Mellor ve ark., 2020). Doku mühendisliği yaklaşımları, OA'nın erken evrelerinde kıkırdak kusurlarının ve subkondral kemiğe verilen hasarların onarımı için ortaya çıkmış ve eklemin işlevini eski haline getirme potansiyeli göstermiştir. Bu yaklaşımda, üç boyutlu doku iskelelerin (hücreli veya hücresiz) kullanılması doku büyümesi için destek sağlar (Tamaddon ve ark., 2018). Her iki süreçte de, üç boyutlu gözenekli doku iskelesi, hücrelerin büyümesini desteklemede ve yeni doku oluşumuna rehberlik etmede önemli bir rol oynar. ECM doğal yapısı ve bileşimini takiben, bir yapı iskelesi, biyomimetik iskelelerin temelini oluşturur ve bu nedenle, biyomimetik OC iskeleleri genellikle doğal doku yapısını yansıtmak için iki veya çok katmanlı yapıda tasarlanır (Loh ve Choong, 2013).

OL tedavi stratejileri hem subkondral kemiği hem de üstündeki kondral yüzeyi ele almayı hedeflemelidir (Gomoll ve ark., 2010). Mevcut teknikler, lezyona bağlı olarak otolog kondrosit implantasyonu, osteokondral greftleme ve otolog kondrosit implantasyon ile greftlemenin bir kombinasyonunu içerir. Daha yeni tedavilerde etkili osteokondral onarım sağlamak için tek fazlı, iki fazlı ve çok fazlı iskeleler kullanan doku mühendisliği ve kök hücre tedavileri kullanılmaktadır (Şekil 1.3) (Jacob ve ark., 2020).



Şekil 1.3: Kıkırdak ve kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için enjekte edilebilir hidrojeller yapma yaklaşımlarının şematik gösterimi (M. Liu ve ark., 2017).

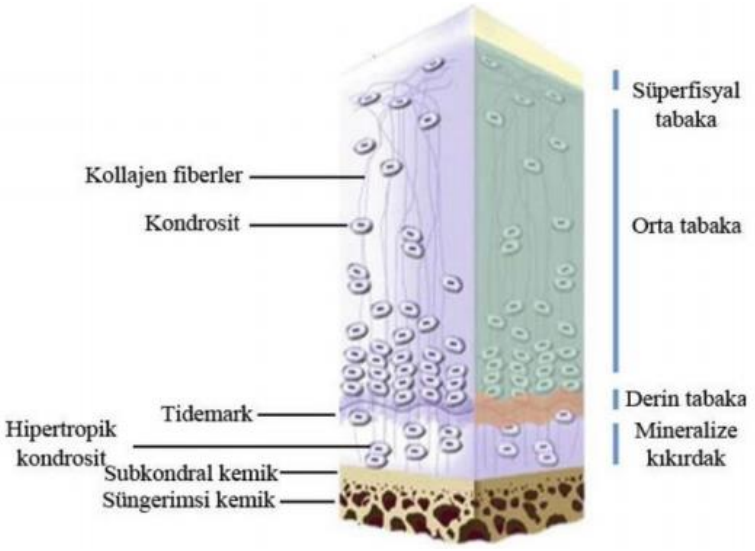
1.2.1. Osteokondral Dokunun Yapısı ve Özellikleri

Yapısal olarak osteokondral yapı; kıkırdak, osteokondral arayüz ve subkondral kemikten oluşur (Huey ve ark., 2012) (Şekil 1.4). Eklem kıkırdağı, pürüzsüz görünen ve açık mavi morfoloji sergileyen, görünüşte yarı saydam bir dokudur (Nooeaid ve ark., 2012). Kıkırdağın ana bileşeni, kondrositleri ve ECM içerir ve ECM, su, proteoglikan ve kolajen lif ağından oluşur (Madry ve ark., 2010). Eklem kıkırdaklarındaki ana GAG'lar kondroitin ve keratin sülfatlar iken ana proteoglikan ise agregandır. GAG ve proteoglikanlar bir polimer ağ tabaka oluşturarak yapısal kolajenlerle iç içe geçer (Athanasiou ve ark., 2000). Kolajen fiberlerin varlığı, eklem kıkırdağına yapısal ve elastik dayanım sağlar. Eklem kıkırdağında genellikle tip II kolajen bulunur fakat tip V, VI, IX ve XI kolajen de bu kıkırdak yapısında bulunmaktadır. Aynı zamanda bu kolajenlerin moleküller arası etkileşimlerde ve tip II kollajenin yapısal düzenlenmesinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Çakmak, 2018). Fizyolojik olarak kıkırdak dört

farklı bölgeye ayrılmaktadır. Bunlar; yüzeysel, orta, derin ve kalsifiye kıkırdak bölgeleridir (Madry ve ark., 2010). Her bölgenin benzersiz bir kondrosit bileşimi ve organizasyonu ve ayrıca ECM proteinleri vardır (Goldring, 2012). Osteokondral arayüzün ana bileşeni olan kalsifiye kıkırdak, önemli miktarda hidroksiapatit (HA) ve kolajene sahiptir. Kolajen fibrillerin dikey oryantasyonu, kesme kuvveti dağılımı ve basınç dayanımı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Oegema ve ark., 1997).

Kalsifiye eklem kıkırdağı bölgesinin altında subkondral kemik bulunur. Altta yatan subkondral kemik, eklem kemiğinin ana hatlarını korumaktan ve kıkırdağın farklılaşması ve gelişimi için uygun bir biyomekanik ortam yaratmaktan sorumlu olan osteokondral dokunun önemli bir parçasıdır (Yang ve Temenoff, 2009). Subkondral kemiğin ana bileşenlerinin HA ve glikoproteinleri (tip I ve V kolajen, fibronektin ve laminin) içermesi nedeniyle kıkırdaktan farklıdır (Huey ve ark., 2012). Önemli miktarda HA ve tip I kollajen lifleri, subkondral kemik için güçlü bir basınç dayanımı ve güçlü sertlik sağlar (Arvidson ve ark., 2011). Kıkırdak ile karşılaştırıldığında, subkondral kemik daha yüksek bir sıkıştırma modülüne ve daha düşük bir esneklik modülüne sahiptir. Subkondral kemik ve kıkırdağın önemli ölçüde farklı biyomekanik özellikleri, morfolojik bileşimleri ve fizyolojik fonksiyonları, kıkırdak-kemik arayüzünün karmaşıklığını göstermektedir (Deng ve ark., 2019). Anatomik olarak, kıkırdak-kemik arayüzü, bu iki doku arasındaki yük transferinde anahtar rol oynayan eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin bağlantı merkezidir (Keeney ve Pandit, 2009).

Kemik ve kıkırdağın farklı bileşimleri ve mekanik özellikleri, doku mühendisliği iskeletlerinin tasarımını ve üretimini doku ara yüzünün karmaşıklığı nedeniyle zorlamaktadır (Deng ve ark., 2019).



Şekil 1.4: Osteokondral dokunun yapısını oluşturan birimler (Çakmak, 2018).

1.2.1.1. Kemik Doku ve Özellikleri

Kemik, diğer bağ dokuları gibi hücrelerden ve ECM'den oluşan özel bir bağ dokusu formudur. Kemiği diğer bağ dokularından ayıran özellik, matriksin mineralizasyonudur ve bu özellik, destek ve koruma yeteneğine sahip son derece sert bir doku oluşturur. Mineral, hidroksiapatit kristalleri [Ca_{10} $(PO_4)_6$ $(OH)_2$] halinde olan kalsiyum fosfattır. Kemik sert, dinamik, bol damarlı bir bağ doku tipidir. Yapısında %65'i mineral bileşenler, %25'i organik yapılar ve ECM bileşenleri ve geri kalan %10'luk kısmı ise su ve lipitlerden oluşmaktadır, inorganik yapıyı hidroksiapatit (HA) oluşturmaktadır (Sheean, 2013b) (Şekil 1.5).

Kemik matriksinin ana yapısal öğesi tip I ve daha az miktarda tip V kollajendir. Tip lll, XI ve XIII kollajenler gibi diğer tipler de matrikste eser miktarlarda bulunmaktadırlar. Bütün kolajen molekülleri kemik matriks proteinlerinin roplam ağırlığının %90' ını oluşturmaktadırlar. Matriks aynı zamanda kemiğin ara maddesini oluşturan diğer matriks (non-kolajenöz) proteinlerini de içermektedir. Proteoglikan makromolekülleri, bir merkezi protein ve buna kovalent olarak bağlanmış çeşitli sayılarda glikozaminoglikan (hyaluronan, kondroitin sülfat ve keratan sülfat) yan zincirleri içermektedirler. Çoklu yapışkan glikoproteinler kemik hücrelerinin ve kolajen fiberlerinin mineralize ara maddeye tutunmalarından sorumludurlar. Önemli glikoproteinlerden bazıları osteonektin ve osteopontindir. Kemik morfogenik proteinleri

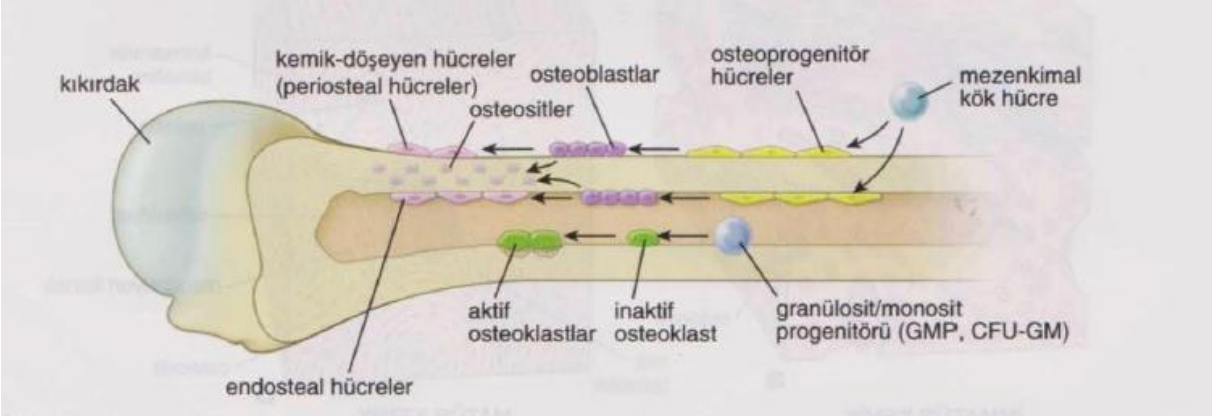
(BMPler) ve kemiğe dönüştürücü büyüme faktörü TGF-β içerir. Kemik dokusu, kompakt (sıkı) ve spongiyoz (süngerimsi) olarak sınıflandırılmaktadır. Kemik kesildiğinde kemik dokusunun iki farklı düzenlenmesi fark edilebilir. Kemiğin dış kısmında kompakt, sıkı bir tabaka (kompakt kemik) bulunur ve trabeküllerden oluşan süngerimsi bir ağ (spongiyoz kemik) kemiğin iç kısmını oluşturur. Ağın içindeki boşluklar devamlılık gösterirler ve yaşayan bir kemikte kemik iliği ve kan damarları tarafından işgal edilmişlerdir. Spongiyoz ve kompakt kemiğin yerleşimi kemik şekline göre değişkenlik göstermektedir. Uzun, kısa, yassı ve irregüler kemik olarak 4 grupta sınıflandırılmaktadır. Kemikler, diğer kemiklerle eklem yaptıkları yerler hariç periost ile kaplanmışlardır (Michael H. Ross, 1930-2020).



Şekil 1.5: Kemiğin yapısı (Topaloğlu ve ark., 2017).

Kemik dokusu ile ilişkili beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlar: osreoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler, periosteal hücreler ve osteoklastlardır (Şekil 1.6). Osteoprogenirör hücreler, kemik iliğinde fibroblastlar, osteoblastlar, adipositler, kondrositler ve kas hücrelerini içerecek şekilde pek çok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeli olan mezenkimal kök hücrelerden türerler. Osteoprogenirör hücrelerin farklılaşmalarını tetikleyen anahtar faktör, merkezi bağlayıcı faktör CBFA1 adı verilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu protein osteoblat fenotipi için karakteristik olan

genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır. Morfolojik olarak periostun en iç tabakasını oluşturan periosteal hücreleri ve kemik iliği kavitesini, osteon (Havers) kanallarını ve perfore eden (Volkmann) kanalları döşeyen endosteal hücreleri oluştururlar. Bu yapı kemik oluşumu sırasında kemiği korur, besin alışverişini sağlar ve kemiği destekler (Sheean, 2013b). Osteoblast, farklılaşmış, kemik matriksi salgılayan, kemik oluşturan hücredir. Hem tip I kolajen (kemikteki proteinin %90'ını oluşturur) hem de başlangıçtaki mineralize olmamış kemiği ya da osteoidi oluşturan kemik matriks proteinlerini bone matrix protein (BMP) salgılar. Osteoblast tarafından üretilen kemik matriks proteinlerinin arasında osteokalsin ve osteonektin gibi kalsiyum bağlayan proteinler, kemik siyaloproteinleri I ve II, osteopontin ve trombospondin gibi çoklu yapışkan glikoproteinler, çeşitli proteoglikanlar, bunların kümeleri ve alkalin fosfataz (ALP) bulunmaktadır. ALP ve osteokalsinin dolaşımdaki düzeyleri klinik olarak osteoblast aktivitesinin belirteçleri olarak kulanılmaktadır (Mohamed, 2008). Osteosit, osteoblast olarak kendisinin sentezlediği kemik matriksi ile çevrelenmiş matür kemik hücresidir. Osteoid ya da kemik matriksi ile tamamen çevrelendiğinde osteoblasta osteosit adı verilir. Osteositler kemik matriksinin devamlılığından sorumlu hücrelerdir. Osteoklast kemik rezorbsiyonundan sorumludur. Osteoklastlar, kemiğin uzaklaştırılmakta olduğu bölgelerde bulunan büyük, çok nükleuslu hücrelerdir. Rezorbsiyonun gerçekleşmekte olduğu yerde, direkt olarak kemik dokusunun üzerinde bulunurlar (Michael H. Ross, 1930-2020; Topaloğlu ve ark., 2017).



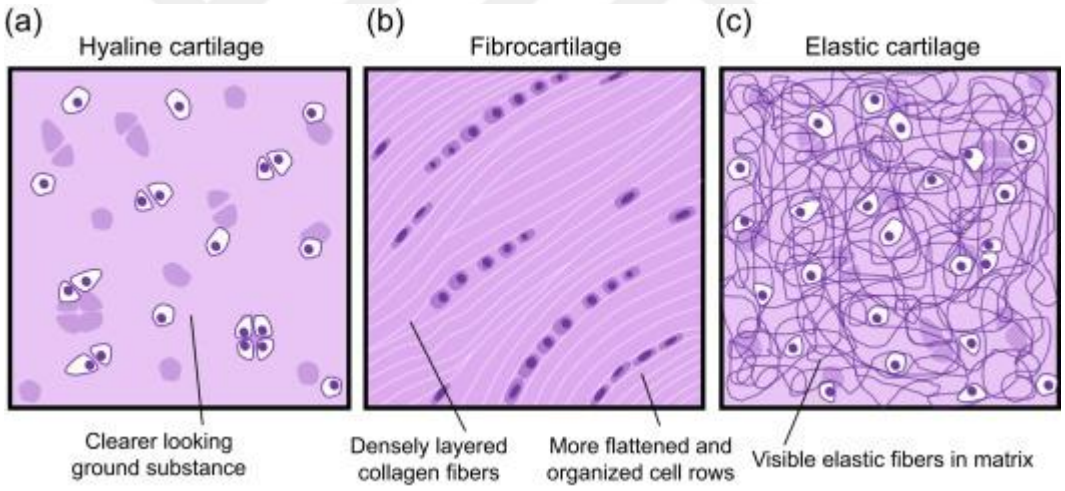
Şekil 1.6: Kemik hücrelerinin şematik gösterimi (Michael H. Ross, 1930-2020).

1.2.1.2. Kıkırdak Doku ve Özellikleri

Kıkırdak, insan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunan esneklik ve destek görevi gören bir dokudur. Kıkırdak temel olarak su, tip II kolajen, proteoglikanlar ve diğer proteinlerden oluşmaktadır (Çakmak, 2018). Her bir bileşenin, kıkırdağın destek işlevinin korunmasında önemli bir rolü bulunur. Kıkırdak ECM'sinde bulunan proteoglikanlara bağlı GAG'lar, yüksek yoğunlukta negatif yüke sahiptir. Bu negatif yükler, su içerisindeki aktif katyonları kendisine çeker. Fazla su daha sonra turgora neden olarak ECM'nin yüksek sıkıştırıcı kuvvetlere karşı koyabilmesini sağlar (Richards ve ark., 2018). Kıkırdak dokusu bileşenlerine göre fibröz kıkırdak, elastik kıkırdak ve hiyalin kıkırdak olarak sınıflandırılır (Şekil 1.7). Hiyalin kıkırdak, insan vücudunda en çok bulunan ve özellikle eklem bölgelerini oluşturan kıkırdak yapıdır (Çakmak, 2018). Hiyalin kıkırdak genellikle trakea, burun, epifiz büyüme plağı, göğüs kemiği ve kaburgaların ventral bölümlerinde bulunur. Hiyalin kıkırdak, minimum sürtünmeyle esnek bir yüzey oluşturur. Ayrıca eklem kıkırdağı basınca karşı mükemmel bir direnme kabiliyetine sahiptir (Loy ve ark., 2018). Elastik kıkırdak kulak, epiglottis ve östaki borusunda bulunur. Esneklik sağlar ve baskıya dayanıklıdır (Safshekan, Tafazzoli-Shadpour, Abdouss, ve Shadmehr, 2017). Fibröz kıkırdakta tip I kolajenden bol miktarda bulunur ve hiyalin kıkırdaktan önemli ölçüde daha az proteoglikan içerir. Yüksek derecede gerilme ve sıkıştırmaya dayanabilir. Genellikle tendonlarda, bağlarda, intervertebral disklerde, bazı kemiklerin eklem yüzeylerinde ve menisküslerde bulunur.

Diğer kıkırdakların aksine fibröz kıkırdağın perikondriumu yoktur (S. Chen ve ark., 2017).

En çok kıkırdağın bulunduğu bölge olan eklemlerde; eklem kıkırdağı, ECM içine gömülü tek bir hücre tipi kondrositten oluşan bir dokudur. Bununla birlikte, yapı daha karmaşıktır ve derinliğe bağlı üç katman içerir: (i) yüzeysel bölge, (ii) orta bölge ve (iii) derin bölge. Orta bölgede, kıkırdak dokusu serttir, avaskülerdir ve GAG ve tip II kolajenden oluşan bir ECM ile çevrili düşük yoğunluklu yuvarlak kondrositlere sahiptir (Wong ve Carter, 2003). Travmaya bağlı kıkırdak hasarı tipik olarak fokal bir kusur olarak başlar ve daha sonra lezyon çevreleyen kemikle temas ettiğinde tam kalınlıkta bir defekte ilerler. Düşük hücresellik, düşük vaskülarizasyon, yerleşik kondrositlerin minimum proliferatif kapasitesi ve hasar alanlarına düşük hücre göçü nedeniyle, eklem kıkırdağı özünde kendini onaramaz (T. A. E. Ahmed ve Hincke, 2010).



Şekil 1.7: Farklı kıkırdak türleri ve arasındaki farklılıklar: (a) Hiyalin kıkırdak, lakunada yuvarlak kondrositler gösterir ve mevcut kolajen lifleri olmasına rağmen, matriste gözle görülür şekilde boyanmaz, (b) Fibröz kıkırdak, aralarında kondrosit sıraları bulunan kalın, üst üste katmanlanmış kolajen demetleri gösterir ve (c) Elastik kıkırdak, hiyalin kıkırdağa benzer görünür, ancak matriste koyu lekeli elastik lifler görünür (M. Y. Hu ve Nukavarapu, 2019).

1.2.2. Osteokondral Doku İskelelerinde Aranan Özellikler

İdeal bir OC iskelesi, doğal hücrelerin büyümesi ve doku yenilenmesini teşvik etmesi için uygun bir mikro ortam sağlamalıdır. Doku iskelesinin yüzeyi ve malzeme

özellikleri hücre bağlanmasını ve farklılaşmasını etkilerken, iskelenin mikroyapısı hücre yapışmasını, göçünü ve farklılaşmasını etkilemektedir. Bu nedenle hücrelere uygun bir mikro ortam sağlamak için, iskelelerin onlara üç boyutlu bir boşluk sağlaması, çoğalması ve orada uygun doku tipine farklılaşmasını sağlaması gerekmektedir (Chang ve Wang, 2011). Aynı zamanda osteokondral yapı iskelelerinin mekanik özellikleri, implantasyon bölgesindeki konak dokulara uyacak şekilde uyarlanmalıdır.

Osteokondral doku, biyolojik yapı, kompozisyon ve mekanik özelliklerde önemli farklılıklar gösteren kıkırdak ve subkondral kemiğin kombinasyonunu içerir. Bu doku avasküler olduğundan kıkırdak dokusu kendi kendini yenilemede kısıtlılık gösterir (Lima ve ark., 2004). Osteokondral greft iskelelerinde, canlı hücreler hem kıkırdak hem de subkondral kemikte ECM yapısını oluşturmalıdır (Sonny Bal ve ark., 2010). Osteokondral yapı iskelesi, konakçı doku ile entegre olmalı ve *in vivo* implantasyon sırasında hücrenin hayatta kalmasını ve fenotipini korumalıdır. Osteokondral doku mühendisliği için mezenkimal kök hücreler önerilmiştir (T. A. E. Ahmed ve ark., 2010. Eklem kıkırdağının işlevi kısmen subkondral kemiğin mekanik desteğine bağlıdır. Osteokondral doku mühendisliği için yapı iskelelerinin ek bir karmaşıklığı, subkondral matriksin, sıkıştırıcı yüklere dayanmak için uygun mekanik mukavemete sahip süngerimsi kemiği taklit eden bir yapıya sahip olması ve eklem kıkırdağını yenilemek için kullanılan daha yumuşak malzemeye bağlanma yeteneğine sahip olmasıdır (Sonny Bal ve ark., 2010). Tüm doku mühendisliği stratejilerinde olduğu gibi, osteokondral yapı iskelelerinin hücre büyümesini desteklemesi, besinleri taşınması ve metabolik atıkları uzaklaştırabilmesi için birbirine bağlı 3 boyutlu bir gözenek ağı ile oldukça gözenekli bir yapıda olması gereklidir (Hutmacher, 2000a).

1.2.2.1. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, bir biyomalzemenin en önemli özelliği olup, vücut ile uyuşabilirlik olarak tanımlanmaktadır (Xiaoying Zhang ve Zhang, 2015). Biyomalzemeler, kendilerini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu vb.) oluşturmayan malzemelerdir. Araştırmacılar, biyouyumluluk terimini biraz genişleterek, biyomalzemenin yapısal ve yüzey uyumluluğunu ayrı ayrı tanımlamışlardır. Yüzey uyumluluğu, bir biyomalzemenin vücut dokularına fiziksel, kimyasal ve biyolojik

olarak uygun olmasıdır. Yapısal uyumluluk ise, malzemenin vücut dokularının mekanik davranışına sağladığı optimum uyumdur (F.-M. Chen ve ark., 2016).

Bir doku mühendisliği ürünü için bir yapı iskelesi veya matrisinin biyouyumluluğu, moleküler ve mekanik sinyalleme sistemlerinin kolaylaştırılması dahil olmak üzere uygun hücresel aktiviteyi destekleyecek bir substrat olarak performans gösterme kabiliyetini ifade eder (Williams, 2008).

1.2.2.2. Biyobozunurluk

Biyobozunur polimerler, doku mühendisliği uygulamaları için devrim yaratmıştır. Doku iskelesinin bozunması, dokunun implante edilen bölgede yeniden şekillenmesinde enzimler gibi fiziksel veya kimyasal süreçleri içeren mekanizmalar yoluyla meydana gelebilir. Biyobozunur doku iskelesi, iskeleye ekilmiş hücrelerden oluşan yeni dokular ile yer değiştirmek üzere kademeli olarak bozunur (Rusk, 1950). Bozunma, iskelenin degredasyonu ve iskele yüzey tiplerinde bozulma yoluyla malzemenin çözünmesine neden olur (Middleton ve Tipton, 2000). Toplu bozunmaya uğrayan polimerik yapı iskeleleri, yapı iskelesinin iç yapısını parçalama ve böylece moleküler kütleyi azaltma eğilimindedir (Woodruff ve Hutmacher, 2010). Esas olarak, yüzey bozulmasına maruz kalan polimerik yapı iskelesinin yüzey bozulma hızı genellikle sabittir. Bu nedenle, iskele boyutu küçülse bile toplu yapı korunur. Bu tür yıkım, doku iskelelerini, dokunun yenilenmesi için daha uzun mekanik stabilite sağlar (Katti ve ark., 2002).

Osteokondral doku iskeleleri konakçı dokuya benzer mekanik özelliklere sahip olmakla birlikte, tercihen kontrollü bir emilebilme hızıyla *in vivo* ortamda bozunabilmeli ve sonunda yeni kemik ve kıkırdak dokunun büyümesi için alan yaratabilecek şekilde şekillenmelidir (Henkel ve ark., 2013).

1.2.2.3. Gözeneklilik

Gözenek ara bağlantısı, gözeneklilik ve gözenek boyutu, iskele üretimi için çok önemli parametreleri temsil eder. Her üç özellik de hücresel penetrasyona, vaskülarizasyona, yapı içindeki hücrelere besin ve oksijenin yeterli difüzyonuna ve hücre canlılığını sağlayan neo-oluşturulmuş hücre dışı matrikse izin verir. Özellikle gözenek boyutu, iskele verimliliği için önemli bir unsurdur. Aslında, gözeneklerin,

hücrelerin iskele yapısı içine nüfuz etmesine ve göç etmesine izin verecek kadar büyük, ancak aynı zamanda kritik sayıda hücrenin bağlanmasına izin verecek kadar da küçük olması gerekir. Gözenekler boyutlarına göre mikro gözenekler (0.1–2 nm), mezo gözenekler (2–50 nm) ve makro gözenekler (> 50 nm) olarak sınıflandırılmaktadır. Doku mühendisliği için kullanılan tüm yapı iskeleleri, konakçı doku tipinin bir fonksiyonu olarak, belirli bir gözenek boyutuna olmalıdır. Özellikle, hepatosit ve fibroblast büyümesi için 20 mikron gözenek boyutu gerekirken, yumuşak doku iyileşmesi için gözenek boyutu 20-150 mikron civarında olmalıdır. Kemik dokusu mühendisliği için araştırmacılar, 200 ila 400 mikron arasında bir gözenek boyutu aralığı önermektedir (Hutmacher, 2000b; Yu ve ark., 2015; Tirrell ve ark., 2002; Babensee ve ark., 1998; Tabata, 2009).

1.2.2.4. Mekanik Özellikler

Bir doku mühendisliği uygulamasında kullanılacak bir biyomateryal için uygun mekanik özellikler, implantın başarısı için kritik öneme sahiptir. Birçok yapı iskelesinin biyostabilitesi, malzeme arayüzündeki mukavemet, elastikiyet ve absorpsiyon ve kimyasal bozunması gibi faktörlere bağlıdır. Doku iskelesi, dokunun hızlı yenilenmesini teşvik etmek için biyoaktif yüzey ile uygun mekanik özelliklere ve bozulma hızına sahip olmalıdır (Nair ve Laurencin, 2007). Kemik ve kıkırdak gibi sert, yük taşıyan dokuların rekonstrüksiyonu için implantasyondan sonra iskele yapısının mekanik mukavemetini korumak son derece önemlidir. Doku mühendisliğinde başarılı bir şekilde kullanılmak için, bir biyomateryal iskelenin yeni dokunun nihai olarak taşıyacağı yüklere ve gerilimlere geçici olarak dayanması ve iletmesi çok önemlidir. Bu nedenle; elastik modül, eğilme modülü, çekme mukavemeti ve maksimum gerilimden oluşan reolojik parametrelerden bir veya daha fazlasının değerlendirilmesi önemlidir (Tran ve ark., 2018).

1.3. Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler

1.3.1. Biyopolimerler

Doku mühendisliği iskelesi geliştirmek için, daha çok biyolojik olarak bozunabilir polimerler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılanlar; geleneksel poli(vinil pirolidon) (PVP), poli(etilen oksit)(PEO)/poli(etilen glikol) (PEG), Poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA), poli(vinil alkol) (PVA),

(poliglikolik asit (PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polilaktid (PLA) ve poliüretan (PU) gibi sentetik polimerler ve kitosan, selüloz, fibrin, elastin, hyaluronik asit, dekstran, elastin, aljinat, kolajen ve jelatin gibi doğal polimerler bulunur (Goldberg ve ark., 2007). Bu polimerler, iyi biyouyumluluk, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, kolaylıkla bulunabilirlik ve immünojenik olmama gibi uygun özelliklere sahiptir (Ulery, Nair, ve Laurencin, 2011). Bu polimerler, zayıf mekanik özelliklerinden dolayı genellikle sentetik polimerlerle birlikte kullanılır. (Nishida ve Tokiwa, 1993). Uyaranlara duyarlı, kontrollü biyolojik tanıma ve salım yapabilen, çapraz bağlanabilen, degrade olabilir yapı ve mekanik kullanıma sahip üstün özellikli doku iskeleleri geliştirilmektedir. Bu iskeleleri elde etmek için peptit kaynaklı malzemeler RGD (hücre bağlanmasına aracılık eden tripeptid Arg - Gly - Asp dizisi), DNA içeren malzemeler, elektrik iletken polipirol ve poliyanilin bazlı malzemeler biyopolimerlere eklenebilmektedir (G. Chan ve Mooney, 2008).

Doğal biyomürekkeplerin geliştirilmesine daha çok protein (örn. kollajen, elastin, fibroin vb.) veya polisakkarit (örn. glikozaminoglikanlar, aljinat, kitosan vb.) içerikli polimerler tercih edilmektedir. Aşağıda bu alanda kullanılan polimerlerin yapısı ve özellikleri detaylıca açıklanmıştır.

Kolajen, memelilerde bulunan en yaygın proteinlerden biridir. Vücutta en bol bulunan protein olduğu ve eklem kıkırdağı ile menisküs ECM'nin ana bileşeni olduğu için mükemmel biyouyumluluğa sahiptir. Kolajen, hücre yapışmasını ve yenilenmesini destekler (Cen ve ark., 2008). Yapısı iyi viskoelastik özelliklere sahip liflidir ve kemik ve deri gibi dokuların mekanik stabilitesini arttırır. 28'den fazla farklı kolajen türü vardır. Tip I, II, III ve V, kemik, kıkırdak, tendon, deri ve kastaki kolajenin temel bölümünü oluşturan başlıcalarıdır. Kemik yapısında >%90'dan tip I kolajen bulunmaktadır (G. Chan ve Mooney, 2008; Cen ve ark., 2008). Bu nedenle kolajen hidrojellerinin çoğu tip I kolajenden üretilir. Kollajenin biyouyumluluğu, stabilitesi, gözenek yapısı ve hidrofilikliği gibi özellikleri doku rejenerasyonu uygulamalarında tercih edilmesine rağmen, kollajenin mekanik mukavemeti yüksek değildir (Tanzer, 1973).

Fibrinojen, pıhtılaşma sürecinde yer alan bir kan proteinidir. Fibrin, dokuya yapışma özelliği olan ve hücre çoğalmasını destekleyen bir polimerdir. Biyouyumluluğu çok yüksektir, ancak fibrinojen hidrojellerinin mekanik özellikleri çok zayıftır. Bu

sınırlamaların üstesinden gelmek için yazdırılabilir biyomalzemelerle karıştırılabilir ve biyoaktivitesini ve işlevselliğini etkilemeden farklı yöntemlerle çapraz bağlanabilir (de Melo ve ark., 2020).

İpek fibroin genellikle ipekböceği Bombyx mori'den elde edilir. Mükemmel biyouyumluluk ve güçlü mekanik özelliklere sahiptir (S. S. Silva ve ark., 2017). İpek fibroin, baskın sekansı GXGXGX (G = glisin, X = alanin veya serin) ile 12 tekrarlayan alandan oluşan bir ağır zincire sahip amfifilik bir blok kopolimerdir (Nagarkar ve ark., 2010). İpek bazlı yapı iskeleleri, yüksek biyouyumluluk ve hücre proliferasyon özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nagarkar ve ark., 2010; Kasoju ve Bora, 2012).

Hyaluronik asit (Hyaluronan), esas olarak kıkırdak ve bağ dokularının ECM'sinde bulunan lineer, anyonik ve sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır. Yüksek miktarda su emer. Hyaluronik asit çözeltileri, düşük konsantrasyonlarda bile yüksek viskoziteye sahiptir, ancak çok düşük mekanik mukavemet ve yavaş jelleşme gösterir. Bu nedenle Hyaluronik asit genellikle diğer düşük viskoziteli biyomürekkeplere destekleyici bir malzeme olarak eklenir. Hyaluronik asit, çapraz bağlanabilir jeller üretmek için metakrilatlanır ve bu metakrilatlanmış hyaluronik asit temelli hidrojeller, kimyasal olarak veya UV veya ısı uygulamasıyla çapraz bağlanabilir (W. Lee ve ark., 2020; Y. Xue ve ark., 2020). Hyaluronik asitin kendisi hücreler tarafından tercih edilmez ve yaygın olarak bazı hücreye yapışan moleküllerle (örneğin, protein bazlı hidrojeller, yani jelatin içeren RGD gibi) kullanılır (Khunmanee ve ark., 2017; Lam ve ark., 2019).

Aljinat, çoğunlukla deniz yosunundan elde edilen, suda çözünür, doğal bir lineer polisakkarittir. Kalsiyum iyonlarıyla işlenerek fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojel yapıları kolayca oluşturabilir. Hidrojelin gücü, aljinatın konsantrasyonuna ve çapraz bağlanma derecesine bağlıdır. Ortamın pH'ının değiştirilmesi, zincirlerin etkileşimlerini bozabilir ve aljinat hidrojel çözünür hale gelir. Aljinat, menisküs dokusu için doku iskelesi tasarımında yaygın olarak kullanılan polisakkaritlerden biridir (Poveda-Reyes ve ark., 2016), (Cheng ve ark., 2018).

Selüloz, bitkilerin ana bileşenlerinden biridir. Nanofiber yapısı ile ECM'ye benzemektedir. Kalsiyum iyonları ile kolayca çapraz bağlanabilir. Hücre yüklü selüloz

iskeleleri, sadece selüloz çözeltilerine kalsiyum klorür eklenerek kolayca hazırlanabilir (Markstedt ve ark., 2017). Selüloz, istenen son ürünü elde etmek için kolayca yıkanıp ortamdan uzaklaştırılabildiği için karmaşık yapılar oluşturmak için doku iskelerlerinde kullanılmaktadır. Diğer polimerlerin viskozitesini ayarlamak için de kullanılmaktadır (Frost ve ark., 2019).

Sentetik biyomürekkepler, laboratuvarlarda üretilen hidrofilik polimerlerden yapılır. Modifikasyon kolaylığı, mekanik dayanım ve ayarlanabilirlik özellikleri nedeniyle bazı uygulamalarda tercih edilebilirler. Sentetik biyomürekkepler ECM'yi sağlamak için nano-fibril ağları olarak hazırlanır. Birçok uygulamada biyomürekkep olarak doğal ve sentetik hidrojellerin bir karışımı kullanılır (Daniel E Shumer, 2017).

Poli(etilen glikol) (PEG), biyouyumlu ve immünojenik olmayan sentetik bir hidrofilik polimerdir. Doğrusal, dallı veya yıldız şeklinde sentezlenebilir ve biyomürekkep üretmek için kullanılmaktadır. Çok çeşitli mekanik ve reolojik özelliklere sahip ayarlanabilir biyomürekkeplerin üretilebilmesi için reaktif grupların eklenmesiyle etkinleştirilebilir. Bu tip biyomürekkepler; hücreleri tutabilir ve hücrelere herhangi bir zarar vermeden basılabilir (Daniel E Shumer, 2017). PEG, biyolojik olarak kontrol edilebilir bozunma hızlarında bulunmaktadır (Sheean, 2013a).

Pluronik, merkezinde iki hidrofilik blok arasında bir hidrofobik zincire sahip olan üç bloklu kopolimerlerdir. Zincirlerin uzunluğu, nihai ürünün istenen özelliklere sahip olabilmesi için uyarlanabilir. Eşsiz yapısı nedeniyle poloksamerler termo jelleşme özelliğine sahiptir. Düşük sıcaklıklarda akışkandırlar ve tersine çevrilebilir bir işlemde oda sıcaklığında kolaylıkla jel oluşturabilirler (kendiliğinden). Ek olarak, ilaç taşıyıcı sistemler olarak da kullanılmaktadır (Raval ve ark., 2017).

Polikaprolakton (PCL), biyolojik olarak rezorbe olabilen, yarı kristal polyester bir malzemedir. Hem yumuşak hem de sert doku için uyumlu bir materyal olarak kabul edilmektedir (Malikmammadov, Tanir, Kiziltay, Hasirci, ve Hasirci, 2018). PCL, diğer polyesterlere göre elastiktir ve film, lif veya mikropartikül gibi çeşitli formlarda kullanılır. Nispeten yavaş bir bozulma hızına sahiptir (2-4 yıl). PCL, fizyolojik koşullar altında ester bağlarının hidrolizi ile parçalanır (Masayuki Shimao, 2001). PCL, suda çözünmez bir polimerdir (Okada, 2002). PCL kendi başına zayıf hücresel yapışma özelliklerine sahiptir. Biyoaktivitesini geliştirmeye yönelik yaklaşımlar arasında

kopolimerizasyon, yüzey işlevselleştirme veya kompozit oluşturma yer alır (Yoo ve ark., 2009). Gözenekli PCL doku iskelelerinde, kondrositlerin doğal fenotiplerini koruduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, doku mühendisliği uygulamaları için gözenekli PCL doku iskelelerinin uygulanabilirliğini ve doğal doku ortamını taklit etme yeteneklerini ve daha iyi biyoaktivite için PCL yapı iskelelerinin işlevselleştirilmesi için kapasitelerini göstermiştir (Yoo ve ark., 2009; Stratton ve ark, 2016).

Poli vinil alkol (PVA), kristalize hidrojeller oluşturan, yüksek oranda hidratlı, suda çözünür sentetik bir polimerdir. PVA hidrojelleri, azaltılmış bir protein bağlama eğilimi ve nispeten daha yüksek elastikiyet gösterir. Özellikle, tıbbi cihazlarda biyouyumlu, toksik olmayan, kanserojen olmayan, şişme özellikleri ve biyo-yapışkan özellikleri nedeniyle biyomalzeme olarak tercih edilmektedir. PVA'nın en yaygın tıbbi kullanımlarından bazıları yumuşak kontakt lensler, göz damlaları, yapay kıkırdak ve menisküstür (Baker ve ark., 2012).

Tablo 1.1: Biyopolimerlerin avantaj ve dezavantajları (Ashley N. Leberfinger ve ark., 2017).

Biyopolimer	Tip	Avantaj	Dezavantaj
Agaroz	Doğal	Yüksek mekanik güç, düşük maliyet	Düşük hücre yapışması
Aljinat	Doğal	Hızlı jelleşme, düşük maliyet, iyi stabilite	Zayıf hücre bağlanması, yüksek konsantrasyonlarda basım zorluğu
Kitosan	Doğal	Antibakteriyel ve antifungal özellikte	Yavaş jelleşme, zayıf mekanik özellikler
Kolajen I	Doğal	Hücre yapışmasını destekler, iyi baskı yetenekleri, RGD dizisine sahip	Zayıf mekanik kararlılık, yavaş jelleşme, zor basılma
Jelatin	Doğal	Hücre yapışmasını destekler	Kararsız / kırılgan, değişiklik yapılmadan zayıf yeterlilik
Hyaluronik Asit	Doğal	Çoğalmayı ve anjiyogenezi destekler, hızlı jelleşir	Hızlı bozulma, zayıf mekanik kararlılık
Matrijel	Doğal	Farklılaşmayı destekler	Basımda sırasında tıkanma sorunu, tümör hücrelerinden yapılma
GelMA (Jelatin metakrilat)	Modifiye doğal	Kolay parçalanabilir, yüksek mekanik dayanım	Yavaş jelleşme, jelleşme için ışığa ihtiyaç duyar

Pluronik	Sentetik	Tersinir jel yapısı	Zayıf mekanik stabilite, hızlı bozunma, termal kontrol gerektirir
PEG (Polietilen glikol)	Sentetik	Kompozit olarak kullanımında başarılı doku iskelesi eldesi	Düşük hücre çoğalması ve yapışması, zayıf mekanik dayanım
İpek fibroin	Doğal	Biyouyumlu, iyi mekaniksel dayanım, immünojenik değil	Yüksek maliyet, yüksek viskozite
Fibrin	Doğal	Anjiyogenezi, hızlı jelleşmeyi destekler	Zayıf mekaniksel stabilite, zor basılma

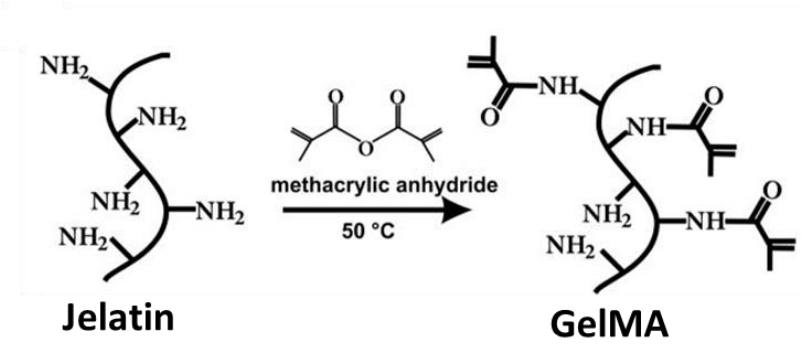
1.3.1.1. Jelatin Metakrilat (GelMA)

Jelatin, hücre dışı matrisin ana bileşeni olarak memelilerin kıkırdak, kemik ve derisinde bulunan denatüre, kısmen hidrolize ve çözünür kolajen formudur. Hidroliz işleminin termal denatürasyonu veya parçalanması nedeniyle konformasyonu kolajenden tamamen farklıdır. Kollajen ile karşılaştırıldığında jelatinin avantajları arasında daha iyi çözünürlük ve daha az antijenite bulunur. Biyouyumluluğu nedeniyle doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bahcecioglu ve ark., 2019). Yapısında bulunan RGD dizisi saysinde integrin reseptörleri aracılığıyla hücre yapışmasını sağlamaktadır (Tran ve ark., 2018; Goldberg ve ark., 2007). Bu, jelatini doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelelerinde kullanılan biyoaktif ajanları taşımak için ilgi çekici bir malzeme yapar (Ulery ve ark., 2011; Nishida ve Tokiwa, 1993). Malzemelerin biyouyumluluklarını artırmak jelatin ile kaplama yapılabilmektedir. Jelatinin kimyasal çapraz bağlaması ile elde edilen gözenekli doku iskeleleri, gelişmiş yüzey özellikleri nedeniyle osteoblastların, endotel hücrelerinin veya kök hücrelerin bağlanmasını ve çoğalmasını desteklemektedir (Nianli ve ark., 2016).

Jelatin, sulu ortamda, 25–35 °C'nin altındaki sıcaklıklarda jelleşen, termo-tersinir bir hidrojel oluşturur. Bu nedenle, oda sıcaklığında, konsantrasyon yeterince yüksekse, polipeptit zincirleri birbirleriyle etkileşir, alfa sarmal yapılarında birbirine sarılır ve 3B ağ yapısı ile bir jel oluşturur. Sol-jel işlemi termo-tersinirdir. Bu ısıya duyarlı geçiş, jelatinin biyolojik baskısında bir avantaj sağlamaktadır. Çünkü baskıdan sonra şeklini korur. Jelatinin erime noktası (üst kritik çözelti sıcaklığı) insan vücut sıcaklığının altındadır, dolayısıyla vücutta erir. Bu nedenle jelatin, şeklini korumak için baskı sonrası diğer polimerler ile birleştirilerek veya çapraz bağlanarak modifiye

edilmelidir. En yaygın yol, bir fotobaşlatıcı (Irgacure gibi) varlığında UV radyasyonuna maruz kaldığında çapraz bağlanabilen jelatin metakrilat (GelMA) oluşturmak için doymamış metakrilamit yan grupları eklemektir (Şekil 1.8). GelMA içeren prepolimer solüsyonu, 3B-biyobasım için tercih edilen bir kesme incelmesi davranışı gösterir. GelMA ile yapılan çalışmalar, GelMA biyomürekkeplerinin çapraz bağlanmasının 3B-biyobasımdan sonra şeklini koruduğunu ve hücre canlılığını iyileştirdiğini göstermektedir. Hücreler, baskıdan sonra olumsuz etkiler yaşamadan biyomürekkep içerisinde sağlıklı bir şekilde çoğalır ve farklılaşır (Ottani ve ark., 2001; Tanzer, 1973).

GelMA, jelatinin 50°C'de fosfat tamponunda metakrilik anhidrit (MA) ile doğrudan reaksiyonu ile sentezlenir. Bu reaksiyon, amino asit kalıntılarının reaktif amin ve hidroksil grupları üzerinde metakriloil ikame gruplarını tanıtır (Van Den Bulcke ve ark., 2000). Farklı mekanik özelliklere sahip GelMA üreten reaksiyon karışımına eklenen MA miktarı ayarlanarak GelMA'da farklı derecelerde metakrilasyon elde edilebilir. Reaksiyon sırasında daha yüksek bir pH'ın korunması, amin ve hidroksil gruplarının reaktivitesini arttırır, böylece daha yüksek derecede metakrillenmeye yol açar (Hoch ve ark., 2012).



Şekil 1.8: Jelatinin metakrilanması ile GelMA polimerinin eldesi.

1.3.1.2. Kitosan Metakrilat (ChitMA)

Kitosan, kabukluların dış iskeletlerinde ve kabuklarında bulunan bir N-asetilglukozamin polimeri olan kitinden elde edilir. Yaygın bir kitin kaynağı, yengeç ve karides kabuklarıdır. Kitosan, kitinin %50'den fazla asetil gruplarının uzaklaştırıldığı ve

amin grupları ile değiştirildiği malzemedir. Kitin sulu ortamda çözünür olmasa da kitosan asidik çözeltilerde çözünür (Kiziltay ve ark., 2019). Kitosan, doku mühendisliği alanında ve ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak çalışılan polisakkaritlerden biridir (Ucar ve ark., 2016). Antibakteriyel özellikleri onu çekici kılar ve bu nedenle diğer polimerler veya metaller üzerinde kaplama malzemesi olarak kullanılır (H. E. Park, ve ark., 2020; Schuurman ve ark., 2013). Kitosanın 3B-baskısı, şeklini stabilize etmek için yeterli mekanik dayanıma sahip olmadığı için çok kolay değildir. Kitosan, özelliklerini iyileştirmek için genellikle diğer polimerlerle birleştirilir. Örneğin, poli(N-izopropilakrilamid) ve β-gliserol fosfat tuzu ile kombinasyonu kitosana ısıya duyarlı özellikler katmaktadır (Yin ve ark., 2018; Van Den Bulcke ve ark., 2000).

Kitosan hidrojelleri, genel olarak iyi biyouyumlulukları ve mükemmel biyolojik özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar için oldukça ilgi çekici malzemelerdir (Hoch ve ark., 2012), (Kiziltay ve ark., 2019). Birkaç yazar, biyoyapay çözeltilere foto-çapraz bağlanabilir özellikler kazandırmak için ışıkla sertleşebilen polimerlerle (örn. PEGDA) harmanlanmış kitosan temelli çözelti önermiştir (Xiaodan Zhang, Yang, ve Nie, 2008). Bununla birlikte, son protokoller, metakrilatlanmış kitosanın sentezini bildirmiştir (Kara ve ark., 2015; Kara ve ark., 2016). Foto-çapraz bağlanabilir kitosan hidrojelleri, yumuşak ve sert dokular, transmukozal ilaç teslim sistemleri, doku rejenerasyonu için doku iskelesi ve hücre enkapsülasyonu için hücre yüklü hidrojeller ve biyo-yapışkanlar olarak üzerinde sıklıkla çalışılan malzeme grubu içerisindedir (B. Shin ve ark., 2018; Tonda-Turo ve ark., 2020). Foto-çapraz bağlanabilir kitosanın işlenebilirliği, kürlenme özellikleri, biyouyumluluğu, hücre-yüklü biyomürekkep ve doku iskelelerinin 3B-biyobasım potansiyelleri üzerinde araştırmalar sürmektedir. ChitMA sentezi için kitosan oda sıcaklığında asetik asit çözeltisinde çözülür ve solüsyon 50ºC'de metakrilit anhidrit ilavesi ile reaksiyon gerçekleştirilir, ardından çözelti diyaliz edilmektedir (Schneible ve ark., 2019; Van Den Bulcke ve ark., 2000).

1.3.2. Biyoseramikler

Biyoseramikler, kas-iskelet sisteminin hastalıklı ve hasarlı kısımlarının ve periodontal anomalilerin onarımı ve rejenerasyonu için kullanılan inorganik ve metalik olmayan seramikler olarak sınıflandırılabilir (Klemens ve ark., 2016). Biyoseramiklerin mükemmel osteoiletkenlik, kimyasal korozyon direnci ve sert bir kırılgan yüzey ile biyomineralizasyonu desteklediği bilinmektedir. Bununla birlikte, sınırlamalar arasında

kırılganlık, zayıf kırılma tokluğu, çok düşük elastikiyet ve aşırı yüksek sertlik yer alır (Hasan ve ark., 2013). Biyoseramikler, implantasyondan sonra canlı dokularla bağlanma yeteneklerine bağlı olarak şu şekilde sınıflandırılır: (a) biyoinert seramikler (örneğin, alümina ve zirkonya) implantasyondan sonra çevresindeki doku ile etkileşime girmez. Makul bir kırılma tokluğuna ve korozyona ve aşınmaya karşı dirence sahiptirler, (b) biyoaktif seramikler (örneğin, biyocamlar ve cam-seramikler), bağlanma osteogenezi modeli ile canlı dokularla doğrudan bağlanır ve (c) biyolojik olarak emilebilir seramikler (örn. kalsiyum fosfatlar (CaP'ler), kalsiyum fosfat çimentoları (CPC'ler), kalsiyum karbonatlar ve kalsiyum silikatlar) *in vivo* ortamda yavaş yavaş emilir. Eşsiz özellikleri göz önüne alındığında, biyoseramikler, doku mühendisliği ve biyomedikal uygulamalarda, özellikle doğal dokuları taklit edebilen 3B doku iskeleleri geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Hasan ve ark., 2013), (Pina, Oliveira, ve Reis, 2015). Doğal biyoseramikler mercan türevli malzemeleri, süngerleri, sedefleri ve hayvan (balık ve tavuk) kemiklerini içerir ve bol miktarda kalsiyum bileşiklerine (örneğin, kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat) sahiptir (T. H. Silva ve ark., 2012). Sentetik biyoseramikler, alümina ve zirkonyayı, biyoaktif gözenekli camları ve cam seramikleri ve sinterlenmiş seramikler, kaplamalar ve çimento macunları şeklindeki CaP temelli malzemeleri kapsar (Oliveira ve ark., 2009). Kemik, kıkırdak ve osteokondral doku onarımı için biyoseramiklerin mevcut klinik kullanımı, kemik aşılama, mikrokırık, artroskopik mozaikplasti, periosteal ve perikondriyal transplantasyon, otolog kondrosit implantasyonu, ilaç dağıtımı ve gen transfeksiyonu içerir (Oliveira ve ark., 2009), (Vallet-Regí ve Arcos, 2013). Otolog greftler en ideal tedavi olmasına rağmen, morbidite oranı ve istenilen şekil için greftlemenin zorluğu bu tekniğin önemli dezavantajlarıdır (Panseri ve ark., 2012; Shekhar ve ark., 2016; Sherman ve ark., 2017).

1.3.3. Nanomalzemeler

Nanomalzemeler yaklaşık 1 ile 1000 nm boyut aralığına sahip, 1 ila 100 nm aralığında en az bir boyutu olan ve boyuta bağlı belirgin özellik sergileyen malzemeler olarak isimlendirilir (Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, ve Danquah, 2018). Nano boyuta inildikçe maddelerin yüzey alanının hacmine oranı artar ve bu özellikleri onların küçük olmalarına karşın temas ettikleri alanın fazla olmasını sağlar. Malzemeler nano boyuta indikçe manyetik, optik, termal, elektriksel, mekanik, kimyasal özellikleri

ve özgül yüzey alanları değişmektedir (Jeevanandam ve ark., 2018). Örneğin mikro seviyede malzemede gözlenmeyen kataliz özellik, nano seviyede açığa çıkmaktadır. Bu, kuantum etkisi olarak da bilinir. Bu durumun ortaya çıkması biyomalzeme uygulamalarını etkilemektedir (Ateş, 2015). Bu nedenle günümüzde nano boyutlardaki malzemeler üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Pitkethly, 2004). Nanoteknolojinin gelişmesi ile nano boyutta biyomalzemeler, insan sağlığını iyileştirmek için ilaç teslimi ve doku mühendisliği alanlarında kullanılmaktadır (Goldberg ve ark., 2007). Nanomalzemeler ECM'yi taklit etmek ve hasarlı doku ve organların işlevini geri getirmek için kullanımları araştırılmaktadır. Terapötik ajanlar ve ilaç salınımı ile birlikte kapsüllenmiş ilaçlar, proteinler, aşı, nükleotid ve faktörlerin kontrollü ve sürekli salımı nanopartiküller ile yapılabilmektedir (Jayaraman ve ark., 2015). Doku yenilenmesi ve onarımını başarılı bir şekilde sağlayan iskeleleri tasarlamak için biyomalzemenin işlevselliğini korumak ve doku iskelesindeki biyoaktif ajanların kontrollü salınımını ayarlamak çok önemlidir (Ramier ve ark., 2014).

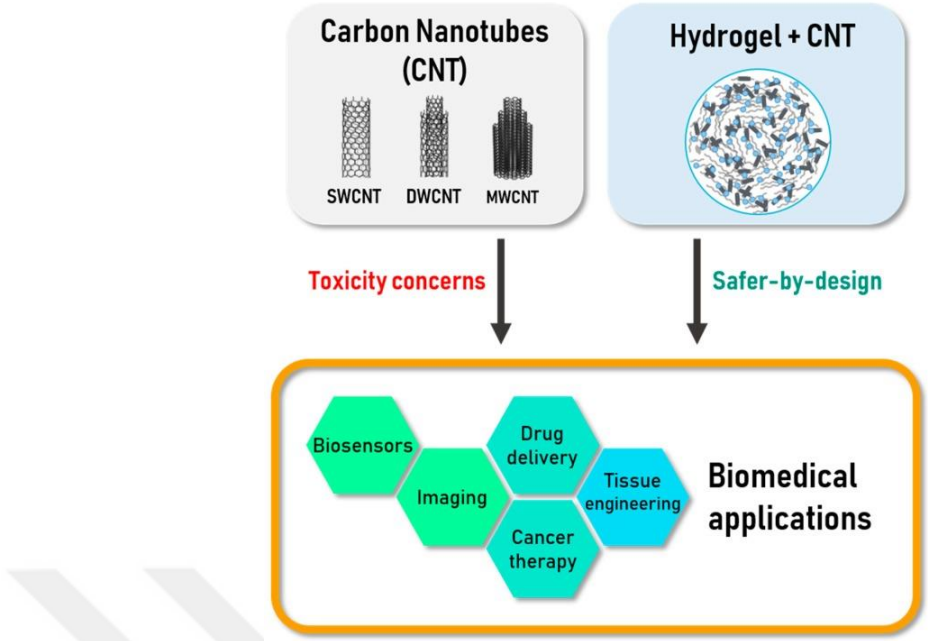
En çok bilinen ve kullanılan nanomalzemeler; nanoparçacıklar, lipozomlar, karbon nanotüpler, quantum dotlar, nanotabakalar ve nanopor malzemelerdir (Mody ve ark., 2014).

Karbon nanotüpler (CNT) karbonun allotropik bir formudur. Biyomedikal uygulamalar için temel malzeme olarak CNT kullanımı arttıkça, CNT'nin canlı hücreler üzerindeki etkisi giderek dikkat çekmektedir (Simon, Flahaut, ve Golzio, 2019). CNT'ler, tek veya çok duvarlı CNT'ler olarak sınıflandırılır. Her iki CNT türü de biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar için araştırılmıştır. CNT'lerle ilgili sorunlardan biri, hidrofilik polimerlerle sınırlı etkileşimle sonuçlanan hidrofobik yapılarıdır. Bu dezavantajı aşmak için, CNT'lerin nanokompozit ağ içindeki dağılımını arttırmak için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Örneğin, CNT yüzeyleri, hidrofilik polimerlerde dağılmalarını kolaylaştırmak için aminler (NH_2), hidroksiller (OH) ve karboksil (COOH) gibi çeşitli polar gruplar kullanılarak modifiye edilir (Ma, Siddiqui, Marom, ve Kim, 2010). Yüksek elektriksel iletkenlikleri nedeniyle, CNT'lerle güçlendirilmiş nanokompozitler, sinir, kas ve kalp dokuları gibi bir dizi elektriksel olarak iletken dokuyu tasarlamak için kullanılabilir. Shin ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir ön çalışmada, hibrit nanokompozit hidrojeller üretmek için GelMA polimeri çok duvarlı –COOH ile fonksiyonelleştirilmiş CNT ile güçlendirilmiştir. GelMA

hidrojellerine ağırıkça %0,5 oranında CNT eklenmesi çekme modülünde neredeyse üç kat artışa neden olmuştur. CNT-GelMA nanokompozit hidrojellerine ekilen kardiyomiyositlerin, tek başına GelMA hidrojellerine ekilen hücrelere kıyasla spontan vuruş frekanslarında üç kat artış olmuşturr. Ek olarak, CNT-GelMA hidrojellerine ekilen kardiyomiyositler, sıkı hücreler arası bağlantılara sahip yüksek düzeyde hizalanmış sarkomerik yapılar göstermiştir (S. R. Shin ve ark., 2012).

Farklı karbon allotropları arasında grafen, biyomedikal bilimlerde ve biyoteknolojide uygulaması yeni yeni ve potansiyel olarak yararlı bir nanomalzemedir. Grafen, altıgen olarak bağlanmış karbon atomlarından oluşan iki boyutlu nano tabakadır. Olağanüstü elektron taşıması, fizikokimyasal ve mekanik özellikleri ve yüksek yüzey alanı nedeniyle biyosensörler, doku mühendisliği ve ilaç dağıtımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için araştırılmıştır (Hasanzadeh vr ark, 2014; Saghatforoush ve ark., 2014). Grafen bazlı kompozitler, kök hücrelerin osteojenik ve kondrojenik olarak farklılaşmasını indükleyebildiği için kemik onarımı veya rejenerasyonunda kullanıldıklarında büyük avantajlara sahiptir. Diğer takviye dolgu maddeleri ile karşılaştırıldığında, grafen düşük içerikte kompozitin mekanik özelliklerini büyük ölçüde artırabilir ve yüksek elastikiyeti ve esnekliği sağlar. Ayrıca, kimyasal ve fiziksel modifikasyonlarla, grafen levhalar, her biri benzersiz ayarlanabilir özelliklere sahip olan tek ve çok katmanlı grafen, grafen oksit (GO) ve indirgenmiş GO (rGO) gibi grafen ile ilgili malzemelere dönüştürülebilir (Nayak ve ark., 2011; W. C. Lee ve ark., 2011).

Son yıllarda, mezankimal kök hücreleri (MSC) grafen tek tabakaları üzerinde basitçe kültürleyerek, MSC'lerde kardiyomiyojenik farklılaşmayı uyarma kabiliyeti araştırılmışmıştır (J. Park ve ark., 2015). MSC'ler GO ile birlikte implante edildikten sonra, GO hücreleri *in vivo* olarak reaktif oksijen türlerinden koruduğu için MSC'lerin hayatta kalma oranları önemli ölçüde arttırmıştır. Bir çalışmada, MSC sferoidleri içine rGO dahil edilmesinin, hücre sinyal moleküllerinin ekspresyonunu değiştirdiği ve kardiyak spesifik belirteçlerin ekspresyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (J. Park ve ark., 2015).



Şekil 1.9: Karbon nanotüplerin biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları (Simon ve ark., 2019).

1.3.3.1. Çift Tabakalı Hidroksit Bileşikleri (LDH)

Çift tabakalı hidroksit bileşikleri (LDH) eşsiz özellikleriyle nanotıp ve biyomühendislik alanında sıkça kullanılan nanomalzemelerden biridir. Hidrotalsit benzeri bileşikler veya anyonik killer olarak da bilinen LDH'lar son zamanlarda çok dikkat çeken katmanlı seramik sınıfına aitlerdir. Anyonik değişim kapasitesi ve organik / inorganik anyonik interkalasyon kabiliyeti onları büyük bir inorganik taşıyıcı yapar (Fayyazbakhsh ve ark., 2017). Depolama matrisi (barındırma) olarak kullanılabilen ve farklı anyonik türlerin salınımını kontrol edebilen materyaldir (Benício ve ark., 2015). Su içeriği (hidro) ve talk (talkite) benzerliği nedeniyle LDH'nin adı hidrotalsit olarak da anılmaktadır. LDH'nin çoğunun yapısı, doğal bir magnezyum-alüminyum hidroksil karbonat olan hidrotalsit ile benzerdir (Griffiths, 2012).

LDH'nin yapısı ve özellikleri, ilk olarak Allmann (1968) ve Taylor (1969) tarafından toz X-ışını kırınımı yoluyla gösterilmiştir (Mishra ve ark., 2018). LDH bileşikleri, $[(M^{II})_{1-x}(M^{III})_x(OH)_2]^{x+}(A^{m-}_{x/m})\cdot nH_2O$ olarak ifade edilir, burada iki değerlikli katyonlar (M^{2+}); Mg^{2+}, Fe^{2+} veya Co^{2+} 'dir. Üç değerlikli katyonlar (M^{3+}); Al^{3+}, Fe^{3+} veya Gd^{3+}; ve değiştirilebilir anyonlar ise (A^{n-}) Cl^-, CO_3^{2-}, NO_3^-, vb. LDH bileşiklerinin yapısında M^{2+} anyonları kısmen M^{3+} ile yer değiştirir. LDH bileşikleri pozitif yüklüdür (Yan ve ark., 2019).

LDH'ların doku mühendisliği uygulamalarında polimerik matrikse dahil edilmesi hücresel tepkileri uyarabilir. pH'a bağlı çözünürlük, iyon değiştirme kapasitesi, termal kararlılık, biyouyumlu olması ve endositoz ile hücrede içselleştirilmesi özellikleriyle çok dikkat çeken malzemelerdir. Bu nedenle ilaç teslimi, gen teslimi, moleküler terapi ve doku mühendisliği de dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımı araştırılmaktadır (Shafiei ve ark., 2016). LDH'lerin kimyasal bileşimi, fizokimyasal yapıları, boyut, morfoloji, yük ve yüzey ligandları ayarlanabilmektedir. Bununla birlikte LDH'ler kolayca hazırlanabilen düşük maliyetli malzemelerdir. Yüksek anyon değişim kapasitesi ve yük yoğunluğu nedeniyle katmanlarına ya da yüzeylerine yerleştirilen terapötik ajanları etkili biçimde taşıyıp salım yapabilirler (Cao ve ark., 2020).

LDH'lerin biyouyumluluğu hücre canlılığı testleri, hemoliz deneyi, tromboz deneyi, laktat dehidrojenaz aktivitesi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve apoptoz testleri ile *in vitro* deneylerle araştırılmıştır. LDH'lerin *in vivo* biyouyumluluğu ve terapötik etkisi histolojik kesit analizleriyle, enflamatuar testleriyle ve dokularda birikim dağılım oranlarına bakılarak yapılmaktadır. Sonuçlar LDH'ın *in vitro* ve *in vivo* deneylerde toksik etki göstermediğini ve rejeneratif tıpta kullanıma uygun olduğunu kanıtlamaktadır (Cunha ve ark., 2016). Son zamanlarda LDH kolay üretimi ve kimyasal bileşen çeşitliliğiyle aynı zamanda düşük sitotoksik özelliği sayesinde polimerik matrislerin içerisine farklı içeriği ve ağırlıklarıyla eklenmektedir. LDH ilavesinin doku iskeleleri üzerinde fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri değerlendirilmektedir (Mochane ve ark., 2020).

Tez kapsamında nano boyutlu LDH bileşikleri kullanılmıştır.

1.4. Hidrojeller

Hidrojeller, kimyasal bağlar veya moleküler içi ve moleküller arası fiziksel çekimlerle bir arada tutulan karboksil, amid, amino ve hidroksil grupları gibi polar kısımlarca zengin çapraz bağlı hidrofilik yapılardır. İlk hidrojeller, Wichterle ve Lim tarafından çapraz bağlı 2-hidroksietil metakrilat içerikli (HEMA) olarak geliştirilmiştir (Gibas ve Janik, 2010). Hidrojeller, yüksek miktarda su veya biyolojik sıvıyı absorblayabilme ve çözülmeden şişme kabiliyetine sahiptirler. Doğal (polipeptitlerden ve polisakkaritlerden yapılmış), sentetik (geleneksel polimerizasyonla elde edilmiş) ve

yarı sentetik olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca katyonik, anyonik, nötr veya amfoterik olabilen amorf veya yarı kristal yapıdadırlar. Biyolojik bir sistemdeki stabilitelerine bağlı olarak, kimyasal-fiziksel modifikasyona uğramazlarsa dayanıklı veya daha sonra vücuttan atılan oligomerlere indirgenirlerse biyolojik olarak parçalanabilirler. Son yıllarda, akıllı hidrojeller, yapılarını ve mekanik özelliklerini pH veya sıcaklık gibi çevresel uyaranlara göre değiştirme imkanı ile öne çıkmaktadır (E. M. Ahmed, 2015). Doku mühendisliği uygulamalarında çok sayıda avantajları nedeniyle en çok tercih edilen yapılardır (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2: Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türlerinin avantaj ve dezavantajları (Dolcimascolo ve ark., 2019).

Biyomalzeme türleri	Avantajlar	Dezavantajlar	Klinik kullanımlar
Seramikler	- Sert yüzey - Yüksek mekanik mukavemet - Kimyasal ve fiziksel olarak ısıya dayanıklılık - Yüksek biyouyumluluk - Osteoindüktivite	- Gevreklik - Yavaş bozulma - İşleme zorlukları	- Kalça protezi - Diş protezi - Kemik ve kıkırdak
Doğal polimerler	-Biyouyumluluk -Biyoaktivite	- Zayıf mekanik dayanım - Hızlı biyolojik bozunma	- Kemik ve kıkırdak - Tendon ve ligament
Sentetik polimerler	- Sentez sırasında gözeneklilik ve mekanik özellikleri modüle etme imkanı.	- Düşük biyouyumluluk (iyonların ve diğer polimerizasyon kalıntılarının olası salınımı) - Düşük mekanik mukavemet	- Dikişler - Kateterler - Kardiyovasküler protezler - Kemik dolguları
Metaller	- İyi mekanik özellikler: yüksek elastik modül, akma dayanımı ve yüksek dövülebilirlik	- Yüzeylerine daha az hücre yapışması - Biyolojik sıvının aracılık ettiği olası korozyon	- Diş hekimliği ve ortopedik protezler
Kompozitler	- Biyouyumluluk - Üstün mekanik özellikler	- İşleme zorlukları	- Sert ve yumuşak doku
Hidrojeller	- Biyouyumluluk - *In vivo* kontrollü biyobozunma - Parametrelerini modüle etme imkanı (çapraz bağlanma yoğunluğu, gözeneklilik, gözenek boyutu ve bütünlük)	-	- Sert ve yumuşak doku

1.4.1. Nanokompozit Hidrojeller

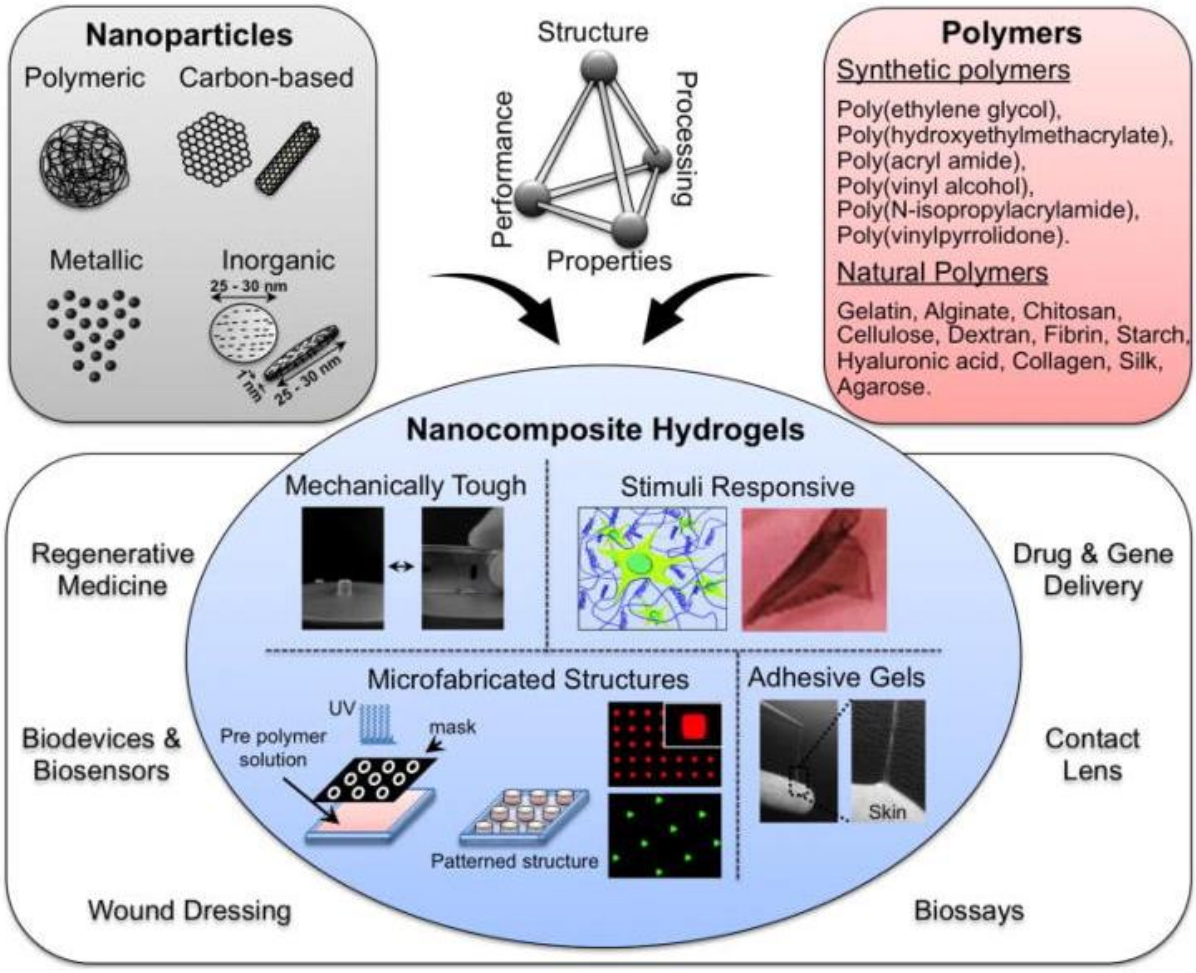
Hidrojeller, gözenekli ve hidratlı moleküler yapıları nedeniyle doğal doku mikro ortamını mükemmel bir şekilde taklit etme kabiliyetine sahiptirler. Polimerik hidrojelleri güçlendirmek ve çoklu işlevsellikleri kazandırmak için uygulanan en etkin yaklaşım, hidrojel ağı içinde nanopartiküller dahil edilmektedir. Karbon bazlı, polimerik, seramik ve metalik nanomalzemeler gibi çok çeşitli nanoparçacıklar, üstün özelliklere ve özel işlevselliğe sahip nanokompozitler hidrojel ağları elde etmek için yapıya entegre edilir. Nanokompozit hidrojeller, üstün fiziksel, kimyasal, elektriksel ve biyolojik özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanabilir. Hibrit hidrojeller olarak da bilinen nanokompozit hidrojeller, birbirleriyle ve/veya nanopartiküller veya nanoyapılarla fiziksel veya kovalent olarak çapraz bağlanmış hidratlı polimerik ağlar olarak tanımlanabilir. Karbon bazlı nanomalzemeler (CNT, grafen, gibi), polimerik nanoparçacıklar (dendrimerler, aşırı dallanmış polyesterler gibi), inorganik/seramik nanoparçacıklar (hidroksiapatit, silika, silikatlar, kalsiyum fosfat), ve metal/metal oksit nanoparçacıkları (altın, gümüş, demir oksit) polimerik ağ ile birleştirilerek nanokompozit hidrojeller elde edilmektedir (Panseri ve ark., 2012; Ng ve Bernhard, 2017).

CNT'ler ve grafen, sentetik veya doğal polimerlere yüksek mekanik, elektriksel iletkenlik ve optik özellikler gibi çok işlevliliği dahil etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, hem CNT'ler hem de grafen bazlı nanokompozit hidrojeller, aktüatörler, iletken bantlar, biyosensörler, doku mühendisliği iskeleleri, ilaç teslim sistemleri ve biyomedikal cihazlar gibi uygulamalar için kullanımları araştırılmaktadır. CNT'lerle güçlendirilmiş nanokompozitler, sinir, kas ve kalp dokuları gibi bir dizi elektriksel olarak iletken dokuyu tasarlamak için kullanılabilir (Cha ve ark., 2013).

Dendritik nanopartiküller, polimerik zincirlerle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla hidrojel ağını güçlendirmek için kullanılabilir. Örneğin, poliamidoamin (PAMAM) dendritik nanopartiküller, yapısal bütünlüğü ve mekanik sertliği geliştirmek için kolajen yapı iskelelerine fiziksel olarak entegre edilmiştir (Avula, 2014). İlginç bir şekilde, PAMAM nanoparçacıklarının eklenmesi, kolajen hidrojellerinde insan konjonktival fibroblast proliferasyonunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Gelişmiş hücresel çoğalma, nanoparçacıkların eklenmesi nedeniyle nanokompozit ağ sertliğinin artmasından kaynaklanmaktadır (Avula, 2014).

Biyolojik dokularda bulunan biyoaktif nanomalzemelerden ilham alan araştırmacılar, inorganik seramik nanoparçacıkları doğal veya sentetik polimerlerle birleştirerek yeni nesil gelişmiş biyomalzemeler geliştirmişlerdir. Son birkaç on yılda, biyomedikal uygulamalar için nano hidroksiapatit (nHA), sentetik silikat nanopartiküller, biyoaktif camlar, silika, kalsiyum fosfat, cam seramik ve β-wollastonit dahil olmak üzere bir dizi biyoaktif nanopartikül ile bilimsel çalışmalar yapılmıştır (Larry L ve Julia M, 2002). Örneğin, nHA, yüksek oranda elastomerik nanokompozit hidrojeller elde etmek için PEG matrisi içine dahil edilmiştir. nHA ilavesi, PEG hidrojellerinegelişmiş hücre adezyon özellikleri kazandırmıştır. nHA, silika nanoküreler ile değiştirildiğinde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Gaharwar ve ark., 2013).

Biyomedikal uygulamalar için nanokompozit hidrojelleri imal etmek için kullanılan çeşitli metalik nanoparçacık türleri arasında altın (Au), gümüş (Ag) ve diğer soy metal nanoparçacıkları bulunurken, metal oksit nanoparçacıkları arasında demir oksit (Fe_3O_4, Fe_2O_3), titanyum dioksit (TiO_2), alümina ve zirkonya bulunmaktadır. Metal ve metal oksit nanoparçacıklarının, elektriksel iletkenlik (Au nanoçubuklar), manyetik özellikler (demir oksitler) ve antimikrobiyal özellikler (Ag nanoparçacıkları) gibi istenen fiziksel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, metal veya metal oksit nanoparçacıkları içeren nanokompozit hidrojeller, görüntüleme ajanları, ilaç dağıtım sistemleri, iletken yapı iskeleleri, giyilebilir elektronikler, aktüatörler ve sensörler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.10) (Goenka ve ark., 2014). Yakın tarihli bir çalışmada, araştırmacılar, polimerik ağın elektrik iletkenliğini arttırmak için makro gözenekli aljinat hidrojellerin içine Au nanotellerini katmışlardır. İletken hidrojel ağı içinde neonatal sıçan kardiyomiyositleri, elektrikle uyarıldığında eşzamanlı olarak büzülmüşlerdir. Ayrıca, aljinat hidrojeline Au nanotel ilavesi, aljinat hidrojelleri ile karşılaştırıldığında, kalp hücrelerinde kardiyak belirteçlerin (troponin I ve connexin 43 gibi) daha yüksek eksprese edildiğini göstermiştir (Dvir ve ark., 2011).



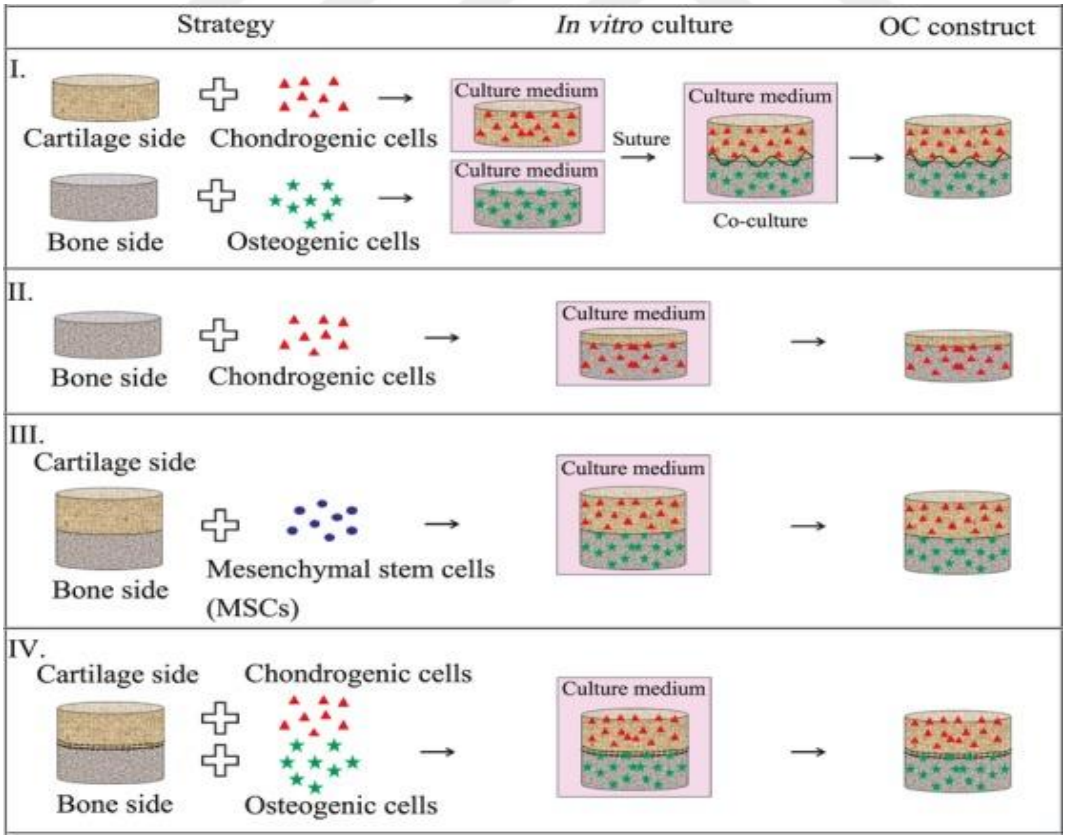
Şekil 1.10: Nanokompozit hidrojellerin biyomedikal uygulamaları (Gaharwar ve ark., 2014).

1.5. Osteokondral Doku İskeleleri

1.5.1. Tek Fazlı Doku İskeleleri

Osteokondral hasarların tedavisinde doku mühendisliği yaklaşımı yıllardır kullanılmaktadır. Bu alandaki ilk tedavi yöntemleri tek fazlı doku iskeleleriyle gerçekleştirilmiştir. Hidroksiapatit, PCL, PLGA gibi polimerler osteokondral hasarların tedavisi için tek fazlı iskeleler olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Çakmak, 2018). Bu malzemelerin her biri, uygun gözeneklilik, bozunma hızı, mukavemet, gibi özellikleri sağlayacak şekilde üretilebilmektedir. Chu ve diğerleri (1995), ticari olarak satılan poli-L-laktik asit (PLLA) kullanarak osteokondral bir doku iskelesi üretmişlerdir (Chu ve ark., 1995). Bu doku iskelelerine, perikondrositler ekmişler, *in vitro* ve *in vivo*

deneylerle incelemişlerdir. *In vivo* implantasyon sonrası, hücreler tarafından üretilen kolajenin %81'inin tip I kolajen olduğu, bu doku iskelesinin hücre yapışmasını ve perikondriyal hücrelerin iskele içerisindeki canlılıklarını desteklediğini raporlamışlardır. Kollajen osteokondral iskelelerde sıklıkla tercih edilen bir malzemedir. Zhou ve arkadaşları (2011) dondurarak kurutma yöntemiyle kolajen (COL) ve kolajen/hidroksiapatitten (COL/HA) oluşan iki farklı doku iskelesi üretip ve bu iskelelere hMSC ekmişlerdir. Kondrojenik ortamda COL doku iskelesinin ECM oluşumu yönünden iyi sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. Osteojenik ortamda ise hidroksiapatitin varlığına bağlı olarak COL/HA doku iskelelerinde çok daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir (Zhou ve ark., 2011). Sonuç olarak, tek fazlı doku iskelelerinin kondrosit ve kemik hücrelerinin yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Fakat yapılan çalışmalar bu iskelelerin osteokondral doku tedavisinde veya rejenerasyonunda fiziksel yapılarındaki eksikliklerden dolayı yeterli olmadıkları belirtilmiştir (Çakmak, 2018).



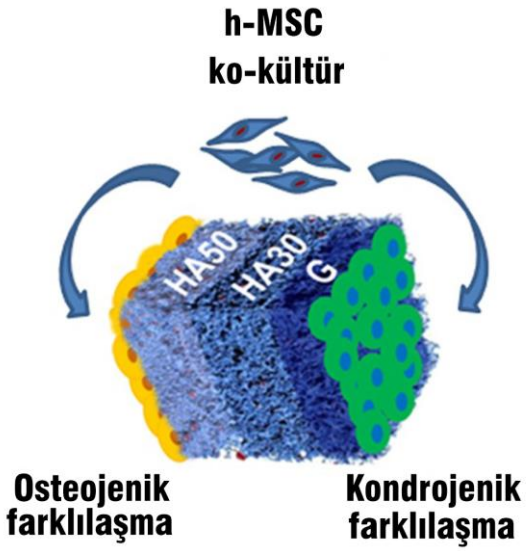
Şekil 1.11: Osteokondral doku mühendisliğinde tek ve iki fazlı doku iskelesi yaklaşımları (Nooeaid ve ark., 2012).

1.5.2. İki Fazlı ve Çok Fazlı Doku İskeleleri

Osteokondral doku mühendisliği stratejilerinde, osteokondral dokunun doğal yapısı ve kompleksliğine benzer şekilde hem kıkırdağı hem de kemiği taklit edebilen, her iki bölümünde de farklı materyaller, morfolojiler ve özellikler kombinasyonları içeren iki katmanlı doku iskelelerinin çok fazlı tasarımları ön plana çıkmaktadır. Osteokondral dokunun dış kısımda bulunan kıkırdak tabakası daha düşük mukavemetli iskelelerden, alt kısımda bulunan subkondral tabaka ise yüksek mukavemetli iskelelerden oluşmaktadır. En ideal bifazik doku iskeleleri, katmanlara yüklenen hücrelerle birlikte kondrojenik ve osteojenik iki büyüme faktörünü içeren iskelelerdir. Mevcut osteokondral tabanlı araştırmalar, dört ana malzeme grubunun kullanımına odaklanmıştır: doğal ve sentetik polimerler, metalik malzemeler, inorganik malzemeler (seramikler, camlar) ve bunların kompozitleridir (Nooeaid ve ark., 2012).

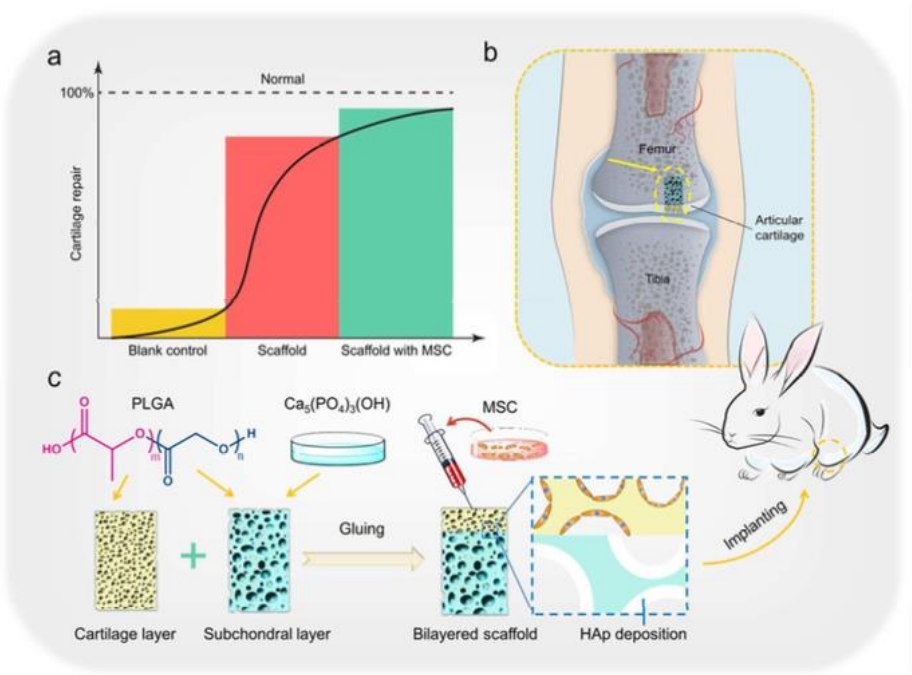
Critchley ve ekibi (2020) fiberle güçlendirilmiş kıkırdak yapıların, translasyonel *in vivo* hayvan modelinde kritik boyutlu osteokondral kusurların rejenerasyonunu destekleyebildiği, eklem yüzeyinde stabil hiyalin kıkırdak gelişimini ve altta yatan subkondral bölgede endokondral kemik gelişimini destekleyebildiğini göstermişlerdir. Çift fazlı işlevsel doku iskelelerini üretmek için, MSC yüklü aljinat hidrojellerini mekanik olarak güçlendirmek PLA, PCL ve farklı oranlarda PLGA (65:35 ve 85:15) içeren biyopolimerler ile sağlanmıştır. Bu kapsamda 3B-baskı tekniği kullanılmışlardır. Bu yapıların mekanik özellikleri ve şişme özellikleri, MSC'lerin *in vitro* kondrojenezi destekleme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Farelerde implantasyonu takiben, bu iki fazlı kıkırdak yapıların, fenotipik olarak stabil kıkırdak ile örtülü vaskülarize endokondral kemiğin gelişimini desteklediği bulunmuştur. Bu iki fazlı kıkırdak doku iskeleleri, daha sonra osteokondral keçi modelinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar kritik boyuttaki keçi osteokondral kusurlarında hiyalin benzeri kıkırdağın rejenerasyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir (Critchley ve ark., 2020). Bittner ve ekibi (2019) çalışmalarında çok malzemeli ekstrüzyon 3DP sistemi aracılığıyla entegre dikey gözenekli ve seramik içerikli gradyan yapıda PCL ve hidroksiapatit (HA) içerikli doku iskelelerinin imalatını gerçekleştirmişlerdir. 3B yapılar daha sonra iskele gözenekliliği, seramik içeriği ve sıkıştırma modülü ve akma gerilimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için tek eksenli mekanik sıkıştırmaya tabi tutulmuştur. Sonuçlar, geliştirilen doku iskelelerinin doğal osteokondral ünitede ve aynı zamanda insan

trabeküler kemik uygulamalarında kullanılabileceğinin göstermiştir (Bittner ve ark., 2019). Li ve ekibi (2018) hasarlı osteokondral dokuyu başarılı bir şekilde yeniden yapılandırmak için hem kıkırdağı hem de kemiği yenileyebilen bir biyomateryal iskele geliştirmişlerdir. İpek biyopolimerinden yapılmış bir kıkırdak fazı ve ipek-seramik kompozit materyalinden yapılmış bir kemik fazı ile iki fazlı bir doku iskelesi geliştirmişlerdir. Elde edilen doku iskelelerinin özellikleri elektron mikroskobu, mekanik test, *in vitro* ve *in vivo* testler ile karakterize edilmiştir. Geliştirilen İki fazlı doku iskelesi; kıkırdak, kemik ve arayüzey segmentlerindeki osteokondral dokunun rejeneratif gereksinimlerini karşılamak için farklı özelliklere ve geçiş arayüzüne kıkırdak ve kemik fazlarına sahip olup 21 gün boyunca gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar; iki fazlı doku iskelesinin iki fazında da bulunan hBMMSC'nin büyümesini ve bölgeye özgü farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Amodori ve ekibi (2015); farklı miktarlarda jelatin ve hidroksiapatit nanokristalleri içeren çok katmanlı doku iskeleleri geliştirmişler ve bu katmanları birbirleri ile birleştirmek için jelatin temelli bir solüsyonu yapıştırıcı olarak kullanmışlardır (Şekil 1.12). Doku iskeleleri, birbirine bağlı bir gözenekli yapı ve üstün mekaniksel özellikler sergilemişlerdir. *In vitro* testler, doku iskelelerinin farklı katmanlarının MSC hücrelerini kondrojenik ve osteojenik farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Aynı zamanda *in vitro* sonuçlar, ko-kültürde inkübe edilen doku iskelelerinde osteojenik ve kondrojenik farklılaşma ve MSC'lerin birbirlerinin davranışını etkilediğini göstermiştir (Amadori ve ark., 2015).

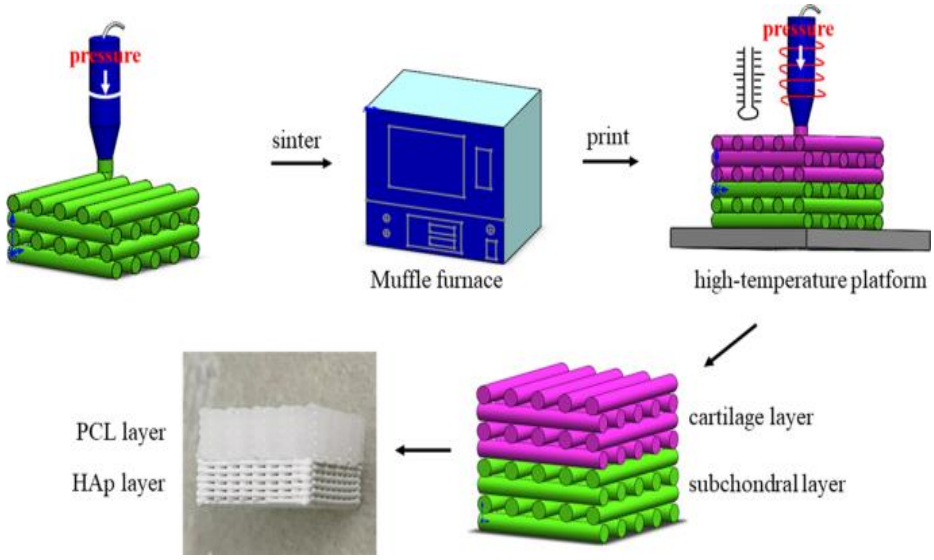


Şekil 1.12: Farklı oranlarda hidroksiapatit içeren çok katmanlı doku iskelesinin şematik görünümü (Amadori ve ark., 2015).

Liang ve ekibi (2018) tarafından çift tabakalı PLGA/PLGA-HAAP kompozit doku iskeleleri geliştirilmiştir. Kök hücre içeren ve içermeyen çift-tabakalı doku iskelelerinin *in vivo* tavşan diz eklem modelinde osteokondral kusurlarda kullanım potansiyelleri araştırılmıştır (Şekil 1.13). Doku iskeleleri, tavşan diz eklemlerine implante edilip 16 hafta boyunca tatmin *edici in vivo* etkinlik sergilemiştir. Biyomekanik analizler, mikro-CT gözlemleri, histolojik gözlemler ve Western blot analiz sonuçları, iki katmanlı PLGA/PLGA-HAp kompozit doku iskelelerinin osteokondral defekt rejenerasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir (Liang ve ark., 2018).



Şekil 1.13: PLGA/PLGA-HAp iki katmanlı iskelelerinin in vivo tavşan diz eklem modelinde değerlendirilmesi: (A) Etkinliğin, (B) defekt ve implantın bulunduğu yerin şematik gösterimi. (C) Geliştirilen iki katmanlı, gözenekli kompozit doku iskelesi (Liang ve ark., 2018).



Şekil 1.14: Bifazik HAp/PCL doku iskelelerinin üretim süreci (Suo ve ark., 2021).

1.6. Doku İskelesi Üretim Teknikleri

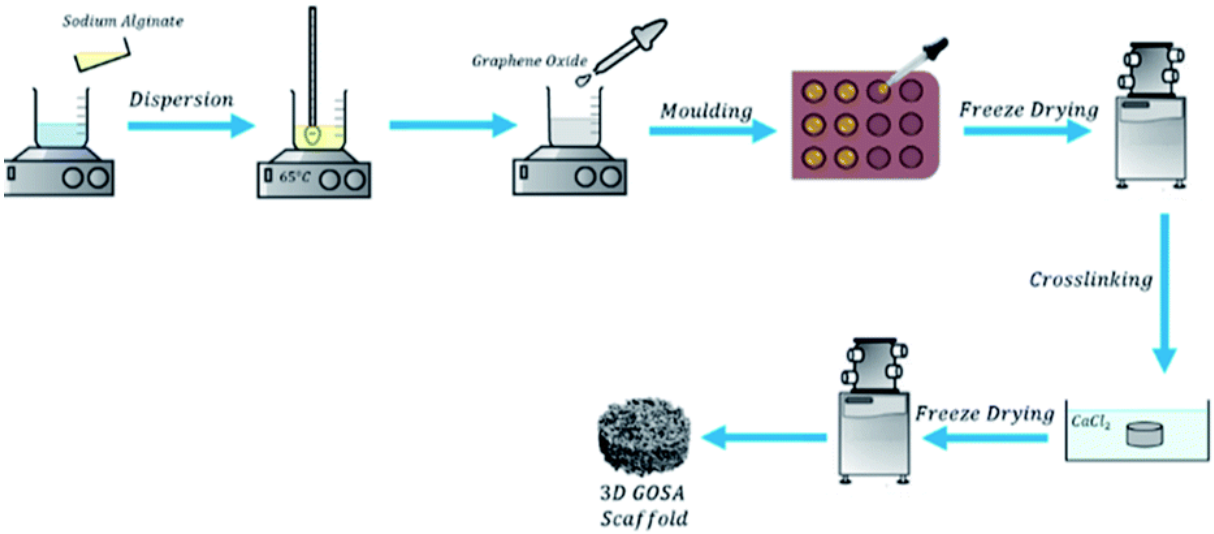
1.6.1. Çözücü Döküm Yöntemi

Çözücü dökümü yöntemde, polimerler organik bir çözücü içinde çözülür. Polimer çözeltisini çözmek için belirli bir boyutta homojen olarak dağılmış tuz parçacıkları ile birleştirilmiş bir çözücü kullanılır. Hazırlanan çözelti uygun bir kalıba dökülerek, çözücüsünün buharlaştırılması sağlanır. Çözücü, tuz parçacıkları içeren bir matris bırakarak buharlaşır. Matris daha sonra suya batırılır ve tuz yüksek gözenekli bir yapı oluşturmak için süzülür. Bu yöntemle geliştirilen doku iskeleleri %50 ile %90 arasında bir gözenekliliğe sahiptir (Hutmacher, 2000a). Bu teknik nispeten kolay ve düşük maliyetlidir. Bu tekniğin ana faydalarından biri, üretilen doku iskelesinin yüksek gözenekli olması ve gözenek boyutunu ayarlama kabiliyetine sahip olmasıdır, bu da yapıyı hücrelerin üç boyutlu gelişimi ve büyümesi için uygun hale getirir (Sanz-Herrera ve ark., 2009).

1.6.2. Dondurarak Kurutma Yöntemi (Freeze Drying)

Dondurarak kurutma işlemi liyofilizasyon olarak da bilinir. Polimer uygun bir çözücü içinde çözülür ve elde edilen polimer çözeltisi donma noktasının altında soğutulur. Bu teknik, polimer çözeltisinin dondurulmasına ve kullanılan çözücünün uygulanan vakum ve ısıtma koşulları sebebiyle sübliminasyonuna dayanmaktadır.

Donmuş çözücü doğrudan katı fazdan gaz fazına geçer buharlaşan katı bir çözücü ile sonuçlanır ve çok sayıda birbirine bağlı gözenekli katı bir doku iskelesi oluşur (Şekil 1.15) (Roseti ve ark., 2017). Bu teknikte, çözelti donma noktasına soğutulduğunda, çözünenler buz fazında ayrılabilir ve bu da buzu çevreleyen maddede buz kristallerinin alanında küçük gözenekli bir yapı elde edilmesini sağlamaktadır. Bu tekniğin yararı, entegre biyolojik faktörlerin aktivitesini azaltabilecek yüksek sıcaklıkları önleme yeteneğidir. Ayrıca, gözenek boyutu kontrollü ve dondurma yöntemi değiştirilerek yönetilebilir (Aranaz ve ark., 2014).



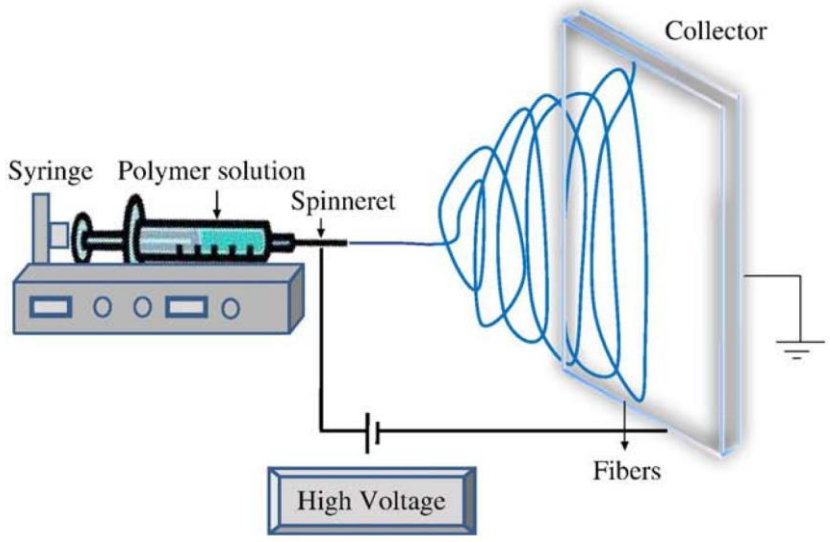
Şekil 1.15: Dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskelesi üretimi (Mansouri ve ark., 2019).

1.6.3. Elektrospinning (Elektro-eğirme) Yöntemi

Elektro-eğirme tekniğinde, yüksek voltajla oluşturulan yüksek elektrik alan içerisinde polimer çözeltilerinden nano ölçekten mikro ölçeğe kadar değişen polimerik fiber üretimi için elektrostatik kuvvet kullanılmaktadır. Bu işlem, zıt kutuplu elektrik yüklerine sahip iki elektrot arasındaki yüksek yoğunluklu elektrik alan tarafından kontrol edilir (Subia ve ark., 2010). Bir elektrot, şırıngadaki polimer çözeltisine, diğeri ise kollektöre yerleştirilir. Gerekli yüksek voltaj yüksek gerilim güç kaynağından 10-40 kV mertebelerinde uygun hazırlanmış polimer çözeltisine verilir. Genellikle polimer çözeltisi pompalanarak bir damla çözelti oluşturulur. Yüksek voltajın oluşturduğu elektrik alan içerisinde bu polimer çözeltisi karşı kutuba doğru spin hareketi ile

incelerek nanolif membran yüzey oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 1.16) (J. Xue ve ark., 2019).

Elektro-eğirme, kolajen, elastin, fibrinojen ve ipek fibroin gibi çeşitli matris proteinlerinden, polisakkaritlerden ve poli(epsilon-kaprolakton) gibi malzemelerden, yüksek düzeyde biyouyumlu mikro ve nano lifli yapı iskelelerinin, karbon nanofiberlerin yeni nesil üretimini mümkün kılmaktadır. Elektrospun malzemeler, doğal ECM'de bulunanların aralığında lif çaplarına sahiptir ve genellikle hidrojellerden daha fazla mekanik mukavemet sergilemektedir (Furth ve ark., 2014). Elektrospun doku iskeleleri, çeşitli nano lifli yapılar kullanılarak birleştirilebilir ve hücre yapışmasını, büyümesini ve farklılaşmasını teşvik etmek için bükülmüş liflerde veya kaplamalarda belirli kolajen alt tipleri, glikozaminoglikanlar ve laminin gibi ECM bileşenlerini içerebilmektedir. Bu teknik; ilaç veya biyoaktif faktör dağıtımı için hapsolmuş malzemelerin kontrollü salımı gibi, arttırılmış mukavemet veya diğer uygun özelliklere sahip doku iskelelerinin tasarlanmasına fırsat vermektedir (Furth ve ark., 2014).

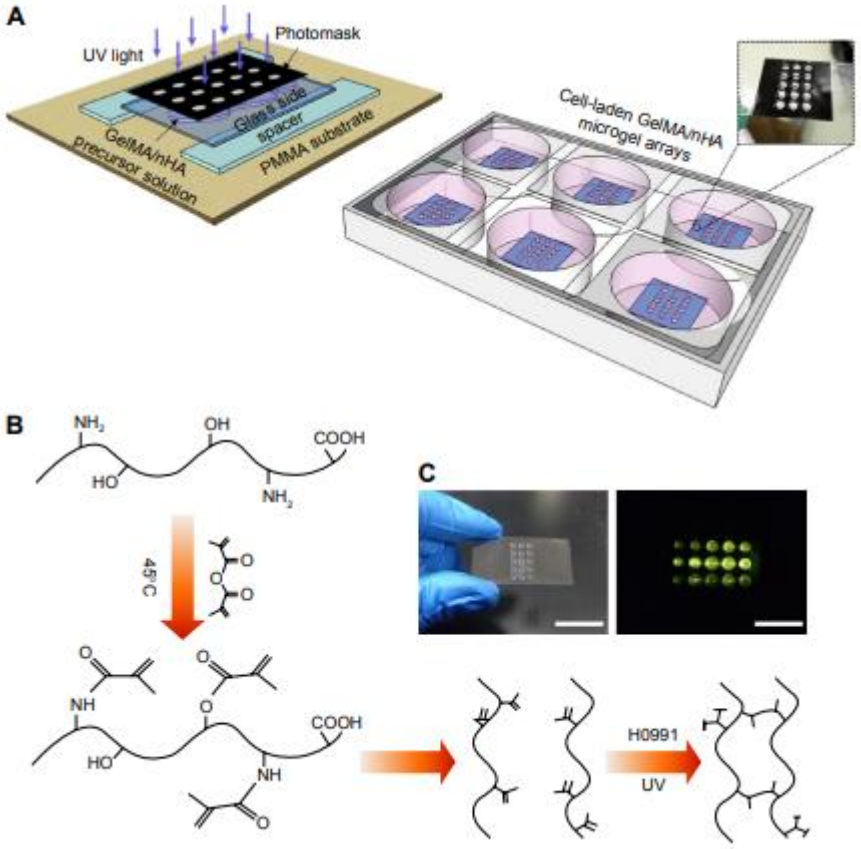


Şekil 1.16: Elektro-eğirme yöntemi kullanılarak nanofiber üretiminin şematik görünümü (Zhu ve **Che, 2013).**

1.6.4. Mikro-Kalıplama (Mikro-molding) Yöntemi

Mikro-kalıplama, hem düzlemsel hem de düzlemsel olmayan yüzeylere sahip desenli hidrojellerin uygun maliyetli imalatına yönelik basit ve tekrarlanabilir bir yaklaşımdır. Hidrojeller üzerinde ortaya çıkan mikro desenlerin şekil ve boyutları, 1

mikrometrenin altındaki kalıplar tarafından belirlenir. Genel olarak, kalıplar metal ve plastik gibi farklı malzemelerden yapılabilir. Polidimetilsiloksan (PDMS) elastomerleri ayrıca ayarlanabilir mekanik mukavemetleri, optik şeffaflıkları ve biyouyumlulukları nedeniyle kalıplaları imal etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. PDMS kalıplarının yüzey özellikleri, farklı sıvıların ıslanabilirliğini değiştirmek ve üretilen hidrojellerin kolay ayrılmasını sağlamak için değiştirilebilir. Önpolimer solüsyonları mikro desenli kalıp ile temas edecek şekilde yerleştirildiğinde, jel içinde desenler oluşturmak için farklı çapraz bağlama mekanizmaları kullanılabilir. Desenli JelMA yapılarını imal etmek için foto-çapraz bağlama, önpolimer çözeltilerini hidrojellere dönüştürmek için en uygun çapraz bağlama stratejisidir ve birçok çalışmada mikro-kalıplama teknikleriyle birlikte kullanılmıştır (Şekil 1.17) (J. He ve ark., 2013).



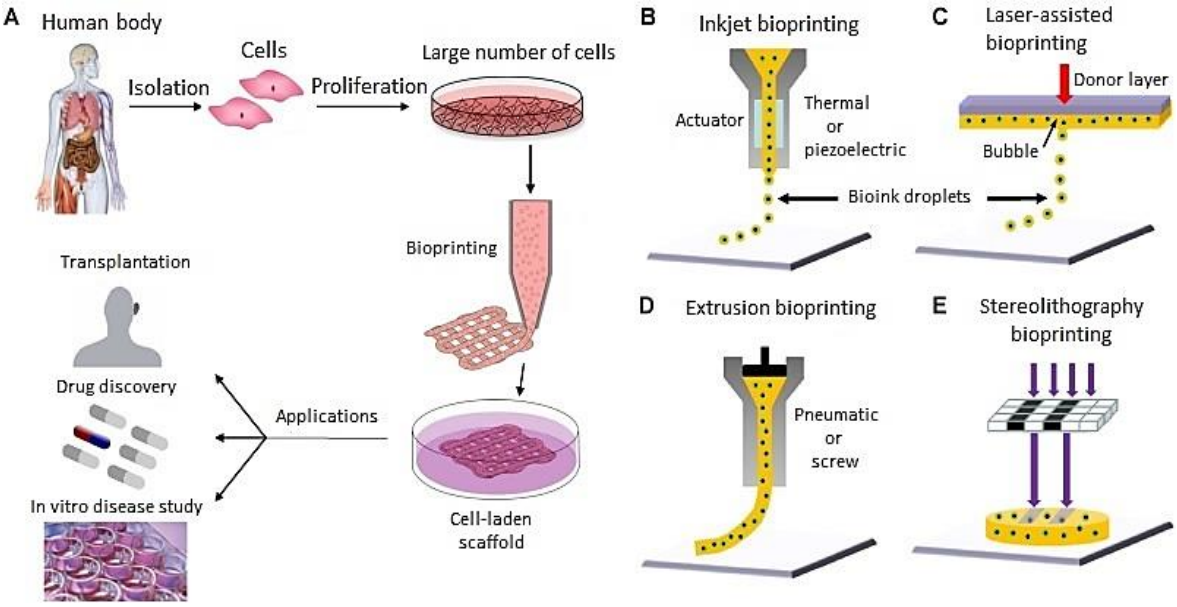
Şekil 1.17: JelMA/nHA nano kompozit hidrojelden UV ışığı altında mikro-kalıpma yöntemi ile doku iskelesi üretimi (Xi Chen ve ark., 2016).

1.6.5. 3B-Biyoyazıcı

3B-biyobaskı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta organları ve dokuları taklit edecek karmaşık doku yapıları geliştirmek için kullanılan en son teknolojilerden biridir. 3B-biyobaskı, işlevsel dokular veya organlar oluşturmak için önceden belirlenmiş bir yapısal mimaride hücre yüklü biyomalzemelerin katman katman biriktirilmesini içerir. Bu teknik, karmaşık yapılar oluşturmak için biyomateryalleri, canlı hücreleri ve kontrollü motor sistemlerini bütünleştirir. Mevcut olan diğer yöntemlerden daha gelişmiş yapılar üretebilmektedir (X. Liu ve ark., 2005; Xiliang Chen ve Shi, 2013). Karmaşık 3B doku iskeleleri, bilgisayar destekli tasarımda (CAD) tasarlanabilir ve geliştirilebilir. Biyomedikal alanında 3B-biyobaskı kullanmanın avantajları arasında kişiselleştirilmiş hastaya özel tasarımların geliştirilmesi, yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve kısa sürede karmaşık yapıların isteğe bağlı olarak oluşturulması yer almaktadır (H. E. Park ve ark., 2020; Schuurman ve ark., 2013). Kaynaştırılmış biriktirme modelleme (FDM), doğrudan mürekkeple yazma (DIW), mürekkep püskürtmeli biyobaskı, seçici lazer sinterleme (SLS), stereolitografi (SLA) ve lazer kaynaklı ileri aktarım (LIFT) gibi şu anda kullanılan 3B-baskı teknolojileri arasında DIW ve mürekkep püskürtmeli biyobaskı, canlı hücrelerin 3B baskısı için sıklıkla tercih edilmektedir (Ozbolat ve ark., 2016). DIW'de, yüksek viskoziteli çözeltiler, hidrojel veya hücre süspansiyonları 3B yapılar elde etmek için ekstrüde edilir (Jakus ve ark., 2016). Mürekkep püskürtmeli biyobaskı, bir substrat üzerine katmanlı 2B veya 3B yapılar oluşturmak için pikolitre seviyesinde biyomürekkep damlacıklarını kullanan temassız bir tekniktir (Gudapati ve ark., 2016). Ticari bir matbaa yapısına benzerliği nedeniyle düşük maliyet, paralel çalışma modunu destekleme kabiliyeti ile yüksek baskı hızı ve yüksek hücre canlılığı (%80-90) gibi birçok avantajı vardır. Ancak, yöntemin malzeme seçiciliği, sık sık yazıcı kafası tıkanması (Abdelaal, 2013) ve damlacık oluşumu için biyolojik malzemeyi sıvı formda tutma gibi başlıca zorlukları vardır (Murphy ve Atala, 2014).

Mikroekstrüzyon biyobaskı, x, y ve z eksenleri boyunca hareket edebilen, sıcaklıkla yönetilen bir malzeme işleme ve dağıtma sistemi vardır. İstenilen geometrilerde doku iskeleleri üretmek için malzemeyi bir şırıngadan dışarı çıkarmak gerekir, bunun için basınç kullanır. Farklı viskozitelere sahip biyomateryaller, basınç ayarlanarak basılabilir, ancak yüksek basınçların hücrelere zarar verme olasılığı

nedeniyle yüksek basınçlardan kaçınılmaktadır (Morris ve ark., 2017). 3B biyobasımın önemli bileşenlerinden biri, baskı için kullanılan biyomürekkeptir. Bu biyomürekkep canlı hücrelere uyum sağlamak için yüksek düzeyde biyouyumlu olmalı, baskıdan sonra mekanik olarak kararlı olmalı ve baskı sırasında yüksek çözünürlük sağlamalıdır. Farklı biyomalzemeler arasında hidrojeller, 3B-biyobasımda biyomürekkep olarak kullanılan en belirgin materyallerdir. Bunun başlıca nedeni canlı hücreleri tutma yetenekleri, değiştirilebilir kimyasal yapıları, ayarlanabilir mekanik ve biyolojik bozunma özellikleridir ve baskı sırasında iyi bir çözünürlük sağlayabilmeleridir (Topuz ve ark., 2018).



Şekil 1.18: 3B-biyoyazıcı ile hücre yüklü doku iskelesi üretimi ve uygulama alanları, (b) Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, dokuları oluşturmak için sırayla küçük hücre damlacıkları ve hidrojel çıkarır, (c) Lazer tabanlı biyoyazıcılar, donör katmandaki (üstte) bir bölgeyi buharlaştırmak için bir lazer kullanır, (d) Ekstrüzyon biyoyazıcıları, bir sıvı hücre-hidrojel çözeltisini sürekli olarak ekstrüde etmek için pnömatik veya manuel güç kullanır, (e) Stereolitografik yazıcılar, biyomürekkepleri düzlemden düzleme seçici olarak çapraz bağlamak için bir dijital ışık projektörü kullanır (Mandrycky ve ark., 2016).

1.7. Osteokondral Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Tipleri

1.7.1. Osteoblast

Osteoblastlar, kemik yüzeyi boyunca yer alan ve toplam yerleşik kemik hücrelerinin %4-6'sını oluşturan kübik hücrelerdir ve büyük ölçüde kemik oluşturma işlevleriyle bilinir (Capulli ve ark., 2014). Bu hücreler, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve belirgin golgi aparatının yanı sıra çeşitli salgı vezikülleri de içeren protein sentezleyen hücrelerin morfolojik özelliklerini gösterir (Capulli ve ark., 2014; Marks ve Popoff, 1988). Polarize hücreler olarak, osteoblastlar osteoidi kemik matriksine doğru salgılarlar (Damoulis ve Hauschka, 1997). Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden (MSC) elde edilir. MSC'nin osteoprogenitor hücrelerine farklılaşması, kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP'ler) ve Wingless (Wnt) yolaklarının üyelerinin sentezi dahil olmak üzere spesifik genlerin ekspresyonunu gerektirir (Grigoriadis ve ark., 1988). Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörleri-2, Distalsiz homeobox-5 (Dlx5) ve osterix (Osx) ifadeleri osteoblast farklılaşması için çok önemlidir (Capulli ve ark., 2014; Ducy ve ark., 1997). Ek olarak, Runx2 geni ile yapılan çalışmalarda Runx2 geninin osteoblast farklılaşmasının ana geni olduğu ve Runx2 geni susturulmuş farelerin osteoblastlardan yoksun olduğu gösterilmiştir (Ducy ve ark., 1997; Komori ve ark., 1998). Runx2 geninin ColIA1, ALP, BSP, BGLAP ve OCN gibi osteoblast ile ilişkili genlerin aktivitesini artırdığını göstermiştir (Fakhry, 2013).

Osteoblast farklılaşması sırasında Runx2 ve ColIA1 ifade eden bir osteoblast progenitör havuzu oluşturulduktan sonra, bir proliferasyon aşaması vardır. Bu aşamada, osteoblast progenitörleri alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi gösterir ve preosteoblast olarak kabul edilir (Capulli ve ark., 2014). Preosteoblastların olgun osteoblastlara geçişi, Osx ekspresyonunda ve osteokalsin (OCN), kemik sialoprotein (BSP) I / II ve kolajen tip I gibi kemik matriks proteinlerinin sekresyonunda bir artış ile karakterize edilir. Morfolojik değişikliklere uğrar, büyük ve kübik hücrelere dönüşür (Ducy ve ark., 1997; Sierra ve ark., 2005).

1.7.2. Kondrosit

Kıkırdak oluşumundan sorumlu hücrelerdir ve kemik gelişimi için faydalı olan endokondral kemikleşme süreci için çok önemlidir. Ayrıca, kondrositler iskelet gelişimini taklit ederek kırık onarımında kritik bir rol oynarlar. Kondral hücreler,

osteoblast üreten aynı çok potansiyelli mezenkimal hücrelerden türer. Kondrositlerin erken öncüleri, proteoglikanları ve tip II kollajeni sentezler. Sox transkripsiyon faktörleri ailesi, kondrogenez için kritik öneme sahiptir. Özellikle, Sox9, tip II kollajen dahil olmak üzere kıkırdak matris proteinlerinin ekspresyonunu uyararak, mezenkimal progenitörlerin kondrojenik soyuna bağlılığı için önemlidir. Sox9 ayrıca kondrosit proliferasyonunu destekler ve Sox5 ve Sox6 üretimini düzenleyerek farklılaşmayı veya hipertrofiyi engeller. Kıkırdak olgunlaşması ilerledikçe, kondral hücre proliferasyonu azalır ve hücreler prehipertrofik bir morfolojiye geri döner (Franceschetti ve Delany, 2014). Kondral hücrelerin metabolizmasını etkileyen faktörler arasında, paratiroid hormonu ile ilişkili peptit (PTHrP), kondrositlerin çoğalan fazdan çoğalmayan hipertrofik faza ilerlemesini negatif olarak düzenler. Kondrositler hipertrofiye başladıkça, hipertrofik kıkırdak matris proteini tip X kollajen sentezini destekleyen Runx2 transkripsiyon faktörünü eksprese ederler. Runx2 ayrıca kan damarı istilası ve mineralize kıkırdak matrisinin kemik ile değiştirilmesi için kritik olan VEGF'nin (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ekspresyonunu da destekler (Karsenty ve ark., 2009).

1.7.3. Kök Hücreler

Kök hücreler, yaşamın embriyonik, fetal ve yetişkin dönemlerinde bulunurlar. Doku ve organların yapı taşları olan farklılaşmış hücreleri oluşturan farklılaşmamış hücrelerdir. Yaşamın doğum sonrası ve yetişkinlik dönemlerinde, dokuya özgü kök hücreler farklılaşmış organlarda bulunur. Kök hücrelerin temel özellikleri kendini yenileme, (yoğun şekilde farklılaşmadan çoğalma yeteneği) ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğidir. Bu özellikler, çeşitli kök hücreler arasında farklılık gösterebilmektedir (Kolios ve Moodley, 2012). Tüm kök hücreler, farklılaşma potansiyellerine göre totipotent veya omnipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak 5 gruba ayrılır (Smith, 2006).

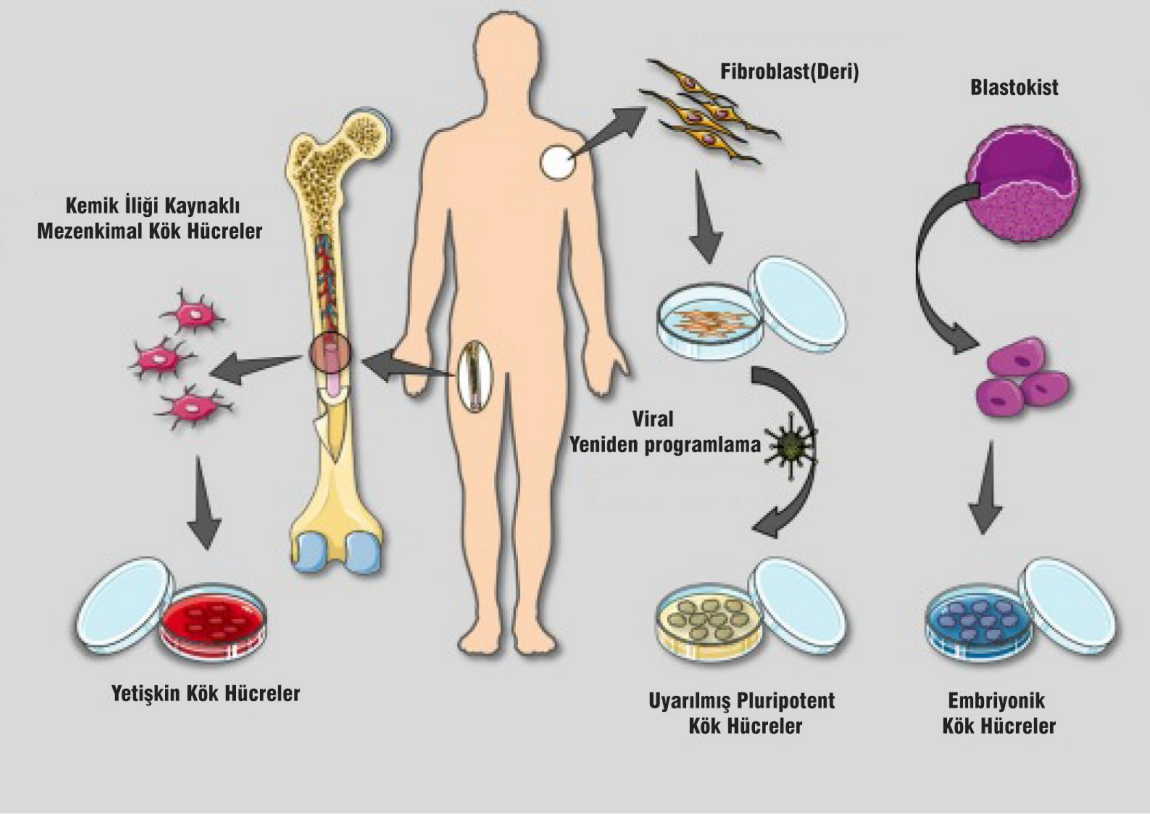
Totipotent veya omnipotent hücreler, en farklılaşmamış hücrelerdir ve erken gelişimde bulunurlar. Hem embriyonik hem de ekstra-embriyonik dokuları oluşturdukları için totipotent hücrelerdir (Rossant, 2001). Pluripotent kök hücreler, tüm doku ve organların geliştiği 3 germ katmanı ektoderm, endoderm ve mezodermi oluşturan hücrelere farklılaşabilmektedir (de Miguel ve ark., 2010). Embriyonik kök hücre (EKH) olarak adlandırılan pluripotent kök hücreler ilk olarak blastosistin iç hücre

kütlesinden türetilmiştir (Kaufman ve Evans, 1981). EKH ile benzer özellikler gösteren, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPSC) ise Prof. Yamanaka tarafından yeni bir hücre tipi olarak geliştirilmiştir. iPSC ilk olarak, fare fibroblastlarında dört transkripsiyon faktörünün (Oct4, Sox-2, c-Myc ve Klf-4) genetik yeniden programlama yoluyla üretilmiştir (Morales, 2014). İPSC kullanmanın başlıca avantajları şunlardır: yetişkin kök hücrelerin aksine geniş ölçekte kendini yenileme, pluripotensiye sahip olma, otolog kaynak ile elde edilebilme, somatik hücrelerden elde edilme, bağışıklık reddi sorununun üstesinden gelme ve EKH ile karşılaştırıldığında etik sorunlar ortaya çıkarmamasıdır. İPSC ve EKH'nin transkripsiyonel profilleri neredeyse aynıdır (Bilic ve Izpisua Belmonte, 2012). Multipotent kök hücreler çoğu dokuda bulunur ve tek bir germ tabakasından hücrelere farklılaşır (Ratajczak ve ark., 2012). Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) en çok tanınan multipotent hücredir. Kemik iliği, yağ dokusu, kemik, Wharton jeli, göbek kordonu kanı ve periferik kan dahil olmak üzere çeşitli dokulardan türetilebilirler (Augello ve ark., 2010). MSC'ler, hücre kültürü kaplarına yapışır ve spesifik yüzey hücre markörleri ile karakterize edilir. Bu hücreler, yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve kas gibi mezoderm kaynaklı dokulara farklılaşabilir (Bruder ve ark., 1997; Horn, 1897). Oligopotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve belirli bir doku içinde 2 veya daha fazla soy oluşturabilir (Majo ve ark., 2008). Hematopoietik kök hücreler, hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabildikleri için oligopotent kök hücrelerin tipik bir örneğidir (Marone ve ark., 2002). Unipotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve yalnızca belirli bir hücre tipine dönüşebilir (Overturf ve ark., 1997).

Doku kök hücreleri, doku veya organın terminal olarak farklılaşmış ve özelleşmiş hücrelerine yol açtıkları için progenitör hücreler olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler doku içinde uykuda olabilir, ancak yaralanma ve onarım koşulları altında çoğalmaktadır (He S. ve ark., 2009; Loscalzo, 2011). Doku kök hücrelerinin veya progenitör hücrelerin dinamikleri dokudan dokuya değişir. Örneğin; kemik iliğinde, karaciğerde, akciğerde ve bağırsakta, kök hücreler normal döngü veya yaralanma sırasında hücreleri desteklemek için düzenli olarak çoğalırken, pankreas, kalp veya sinir sisteminde yaralanmanın ardından hasarlı hücrelerin yerini almak için çoğalırlar (Kwee ve ark., 2017).

Kemik iliği kök hücreleri (BMMSC), kemik iliğinde bulunan bir tür yetişkin kök hücreleridir. Yetişkin kök hücreler çok yeteneklidir ve "kök hücre nişi" adı verilen bir alanda bulunur. Normal dokuları korumak veya hastalıklı ve yaralı dokuları onarmak için aktive olana kadar hareketsiz kalırlar. Tipik olarak küçük miktarlarda bulunurlar ve *in vitro* proliferasyon konusunda sınırlı kapasiteye sahiptirler. Farklılaşmış hücrelerin transplantasyonundan sonra reddine neden olmayacakları ve böylece birçok sert yan etkiye sahip immünosüpresif ilaçlara olan ihtiyacı ortadan kaldıracakları düşünülmektedir. Kemik iliği hem hematopoetik kök hücreleri hem de stromal kök hücreleri içerir. Stromal kök hücreler kemik iliğinin küçük bir bölümünü oluşturur ve birçok doku türü oluşturabilir (Marquez-Curtis ve ark., 2015). EKH'lerden ve iPSC'lerden daha az *in vitro* manipülasyon gerektirirler ve iPSC'lerden çok daha düşük tümörleşme oranına sahiptirler (Wagner ve ark., 2010). Bununla birlikte, BMMSC'leri yaşlandıkça farklılaşma potansiyelleri azalır ve izolasyonları ağrılı bir prosedür gerektirir (Im, 2017).

Yağdan türetilmiş kök hücreler (AdMSC), beyaz adipoz (yağ) dokusunda bol bulunan başka bir yetişkin kök hücre türüdür. Kolay erişilebilirlİği ve izolasyonu ile kıkırdak ve kemik mühendisliği için optimal sonuçlar gösteren alternatif bir kök hücre kaynağıdır (Tangchitphisut ve ark., 2016). AdMSC'ler çok sayıda bulunur ve BMMSC'lerden daha uzun ömürlüdür (Locke ve ark., 2009). BMMSC'ler ile karşılaştırıldığında kök hücre veriminde beş kata kadar artış sunarlar (Bunnell ve ark., 2005). MSC'ler, *in vitro* olarak osteoblastlara, adipositlere veya kondroblastlara farklılaşma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, miyositler, tendositler, bağ hücreleri, düz kas hücreleri, endotelyal hücreler, kardiyomiyositler, hepatositler ve nöral benzeri hücreler dahil olmak üzere başka hücre türleri de olabilirler ve *in vitro* olarak uzun süre kültüre edilerek varlığını sürdürebilir (Nombela-Arrieta ve ark., 2011). Farklılaşmamış MSC'ler allogreft implantasyonu için kullanılabilir. Ayrıca, farklılaşmamış MSC'ler, transplantasyonu takiben greft reddi riskini azaltabilen immünomodülatör özelliklere sahiptir (Gao ve ark., 2016).



Şekil 1.19: Kök hücre kaynakları (Ashley N. Leberfınger ve ark., 2017).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kimyasal Malzemeler

- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Bioindustrial Engineering

- 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), Invitrogen

- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma

- Alexa Flour 488594, Thermo Fisher

- Alizarin Red S, Sigma

- Alcian Blue, Sigma

- Alüminyum nitrat nonahidrat [$Al(NO_3)_3 9H_2O$], Sigma-Aldrich

- Bovin serum albumin (BSA), Sigma

- Glikozaminoglikan test kiti, Chondrex

- CellTracker™ Red CMTPX Dye, Invitrogen

- CellTracker™ Blue CMHC Dye, Invitrogen

- COL II antikor, MyBioSafe

- Fosfo-Runx2 antikor, MyBioSafe

- Fuor 594 sekonder antikor Ig G, MyBioSafe

- Deksametazon, Sigma

- Sodyum pirüvat, Sigma

- MEM Nonessential amino asides, Multicell

- ITS^{TM+} Premix, Corning

- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma

- Etanol, Tekkim

- Fetal bovin serumu (FBS), Gibco

- Fibroblast Growth Factor 2 (bFGF), GenScript

- Fosfat tuz tamponu (PBS), PAN-Biotech

- Hematoksilen&Eosin, GBL

- Von Kossa kalsiyum kiti, GBL

- Toluidin mavisi, GBL

- Hidrojen klorür (HCI), Merck

- High Glucose DMEM, Lonza

- Irgacure 2959, Sigma-Aldrich

- Jelatin, Sigma

- Kitosan, Sigma

- Ksilen, Merck

- L- Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n- Hydrate, Cayman Chemical Company

- L-DMEM, Capricorn

- L-glutamin, Gibco

- Live&Dead kit, Thermo Fisher

- Magnezyum nitrat tetrahidrat [$Mg_2(NO_3)_26H_2O$], Sigma-Aldrich

- Metakrilit anhidrit, Sigma-Aldrich

- Parafin, Merck

- Paraformaldehit (PFA), Sigma-Aldrich

- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco

- PrestoBlue, Invitrogen

- Sodyum hidroksit (NaOH), Sigma

- Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sigma

- Triton X-100, Biofroxx

- β- Glycerophosphate Disodium Salt Pentahydrate, Chem Cruz

-Tween-20, Sigma

2.2. Sarf Malzemeler

- 10-200-1000 µl'lik pipet uçları, İsolab

- 175 cm^2 'lik kültür kabı, Nest

- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject

- 6, 12, 24, 48 ve 96 kuyulu kültür kapları, TPP

- 75 cm^2 'lik kültür kabı, Nest

- Diyaliz membran, Sigma-Aldrich

- Kriyoviyal, Nest

- Lam SuperFrost Menzel, Thermo ScientificMikroskop lamı, Nest

- Lamel SuperFrost Menzel, Thermo Scientific

- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), İsolab

- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millipore SigmaCorning

- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA

- Bistüri ucu, Beybi

2.3. Hücre Hatları

Tez kapsamında ATCC 'den satın alınan insan kemik iliği mezenkimal kök hücre hattı (hBMMSC) kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücrelerin pasaj

numaraları farklılaşma deneylerinde P4-P5 ‘tir. Diğer deneylerde P7 hBMMSC hücreler ve LDH nanopartikülünün sitotoksisite analizleri için P7 osteoblast hücreleri kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Cihazlar

- Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı, NanoZS Malvern Instrument

- Hidrotermal Reaktör, Kent Kimya

- Buzdolabı, Panasonic

- Etüv, Nüve FN055

- Floresans mikroskobu, Zeiss Axio

- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

- Hücre kültürü inkübatörü (CO_2 inkübatörü), Panasonic

- Inverted mikroskop, Nikon

- Liyofilizatör, Christ, Alpha 1-2 LSPLUS

- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech

- Mikropipet, Rainin

- Mikroplaka okuyucu, Spektrostar Nano, BMG Labtech

- Mikrotom cihazı, Leica

- Otoklav, Nüve, OT120M

- pH metre, Ohaus

- Santrifüj, Hitachi

- Spektroflorometre, Jasco, FP 8300

- Steril kabin, Telstar

- UV Işık kaynağı, Omnicure S2000, Excelitas Technologies

2.5. hBMMSC'lerin *In Vitro* Çalışmalar için Hazırlanması

2.5.1. hBMMSC'lerin Stoktan Çıkartılması

Hücreler -80º'den çıkarılarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. Hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), %1 L-Glutamin ve 10 ng/ml bFGF içeren L-DMEM besiyeri içerisine alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Takiben süpernatant kısım aspire edilmiş ve hücre peleti üzerine 2 ml besiyeri ilave edilerek mikropipet ile pipetaj yapılarak hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Akabinde 175 cm^2 'lik kültür kaplarının içerisine hücre süspansiyonu ve 18 ml besiyeri eklenerek 37ºC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir.

2.5.2. hBMMSC'lerin Pasajlanması

Deneylerde kullanılacak olan hücreler kültür kabında %90 konfluent olduklarında kültür kabı içerisindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücrelerin fetal bovin serumundan arındırılması için 175 cm^2 'lik kültür kabı içerisine 10 ml PBS ilave edilmiş ve hücrelerin yüzeylerinin 10 ml'lik serolojik pipetle hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Sonrasında adeziv hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 6 ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiş ve hücreler 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası inverted mikroskopla bakılarak hücrelerin yüzeyden kalkma durumu kontrol edilmiştir. Tripsinin aktivitesini inhibe etmek için tripsinin miktarında (6 ml) besiyeri ilave edilmiştir. Bu uygulama tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücrelerin membranlarına zarar vermesini engellemek için yapılmaktadır. Kültür kabı içerisindeki hücre süspansiyonu, falkon tüp içerisine alınarak 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısım aspire edilmiş ve elde edilen hücre peleti 2 ml hücre besiyerinde süspanse olduktan sonra 18 ml 10 ng/ml bFGF içeren L-DMEM besiyeri içerisine ilave edilerek 175 cm^2 'lik kültür kaplarına alınmıştır. 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyon için bırakılmıştır. Pasajlama işlemi, hücrelerin deneyler için kullanılacak yeterli sayıya ulaşması amacıyla yapılmıştır.

2.5.3. hBMMSC'lerin Stoklanması

Hücreler kültür kabı yüzeyini tamamen kapladıklarında hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası inverted mikroskopla bakılarak hücrelerin yüzeyden kalkma durumu kontrol edilmiştir. Hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için tripsin miktarı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Kültür kabı içerisindeki hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpler içerisine alınmıştır. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edilmiştir. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1 ml hücre dondurma solüsyonu (%10 DMSO + %65 FBS + %25 L-DMEM) ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisinde -80°C'ye kaldırılmştır.

2.5.4. Thoma Lamı ile hBMMSC Sayımı

Hücre sayımı için süspanse haldeki hücrelerden 10 µl alınmış ve üzerine 10 µl %0,5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) konularak mikropipet ile iyice homojen hale getirilmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına dikkatlice koyulmuş ve üzerine lamel kapatılarak mikroskopta lam üzerinde 16 karelik alanda hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılmış ve besiyeri içerisinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.

2.6. LDH Nanopartiküllerinin Sitotoksisite Analizi

Tez kapsamında kullanılan LDH nanopartiküllerinin sitotoksisite analizi kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tetrozolyum tuzlarıyla yapılan bu testte, hücrelerin mitokondrisinde tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenirken, tuzların formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlar ve renk değişikliğine neden olur (Püren Akgüner ve Bal Öztürk, 2020)**.** MTT çözeltisi stok olarak 5 mg MTT, 1 ml PBS içerisinde çözdürülmüştür. Çözelti, -20°C'de karanlıkta saklanmıştır. Pasaj 7 osteoblast hücreleri, $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 150 µl L-DMEM besiyeri ile ekilmiştir. Hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla kültür kapları 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonra besiyeri ortamdan

uzaklaştırılmıştır. Önceden farklı konsantrasyonlarda L-DMEM ile hazırlanmış (0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 15 mg/mL) LDH nanopartikülleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 48 saat 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir. Takiben kuyucuklardaki nanopartikül içeren hücre medyumu PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa %10 MTT solüsyonu içeren besiyeri ilave edilmiştir. 4 saat boyunca 37°C'de alüminyum folyaya sarılı şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki MTT solüsyonu uzaklaştırılmış, 150 µl DMSO ilave edilmiş ve 20 dakika daha karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından plakalar 570 nm'de mikroplaka okuyucuda okunmuştur. Test edilen farklı konsantrasyondaki nanopartiküller ile kontrol grubunun absorbans değeri karşılaştırılarak % canlılık hesaplanmıştır. Nanopartikül uygulanmamış kontrol grubunun absorbans değeri, hücre canlılığı cinsinden %100 kabul edilmiştir.

2.7. LDH Nanopartiküllerine Büyüme Faktörleninin Yüklenmesi ve Salım Çalışmaları

2.7.1. LDH nanopartiküllerine BMP-2 veya TGF-β1 yüklenmesi

LDH nanopartiküllerine BMP-2 veya TGF-β1 yüklenmesi için, belirli miktar LDH nanopartikülü BMP-2 (5 ug/ml) veya TGF-β1 (2 ug/ml) çözeltisi içerisinde 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, nanopartiküllere yüklenmeyen serbest BMP-2 veya TGFβ1 miktarını belirlemek için elde edilen süpernatanta ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testi uygulanmıştır.

ELISA sonrası enkapsülasyon verimliliğini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Nanopartikül enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{(A1 - A2)}{A1} \text{x} 100$$

Bu formülde A1, başlangıçta eklenen BMP-2 veya TGF-β1 miktarı, A2 ise su fazında serbest BMP-2 veya TGF-β1 miktarıdır.

BMP-2 miktar tayini için ELISA testi uygulanmıştır. Kullanılan ELISA kiti, Sandwich-ELISA prensibini kullanmaktadır. Kullanılan kitin hassasiyeti 37,5 pg/mL'

dir. Deteksiyon limiti 62,5-4000 pg/mL'dir. TGF-β1 miktar tayini için kullanılan ELISA kiti, Sandwich-ELISA prensibini kullanmaktadır. Kullanılan kitin hassasiyeti 1 ng/L' dir. Deteksiyon limiti 10 ng/L-200 ng/L'dir.

TGF-ß1 ve BMP-2 yükleme çalışmalarına başlamadan önce standart eğriler hazırlanmıştır.

BMP-2 Standart Eğrisinin Hazırlanması: BMP-2'nin 2000 pg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlamış, tamamen çözündükten sonra 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 0 pg/mL olacak bir seri seyreltme yapılmıştır. Kit protokolünde detaylıca verilen adımlar izlenerek 450 nm 'de mikroplaka okuyucu ile okumalar yapılmıştır. R^2 değeri 0,997 değeri elde edilmiştir.

TGF-β1 Standart Eğrisinin Hazırlanması: TGF-β1'in 48 ng/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlamış, tamamen çözündükten sonra 48, 32, 16, 8, 4, 0 ng/mL olacak bir seri seyreltme yapılmıştır. Kit protokolünde detaylıca verilen adımlar izlenerek 450 nm 'de mikroplaka okuyucu ile okumalar yapılmıştır. R^2 değeri 0,9852 değeri elde edilmiştir.

2.7.2. LDH nanopartiküllerinden BMP-2 veya TGF-β1 Salımı

BMP-2 veya TGF-β1 içeren LDH nanopartiküllerden, büyüme faktörlerinin salımı için belirlenen miktar nanopartikül, belirli miktar fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ile dispers edilmiştir ve 37±0,5 °C sıcaklıkta ve 100 rpm sabit hızda karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında numune alınarak, ortamda sink koşulunu sağlamak üzere eksilen miktar fosfat tamponu ile tamamlanmıştır. Alınan numunelerdeki büyüme faktörü miktarı ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

2.8. Biyomürekkeplerin Hazırlanması

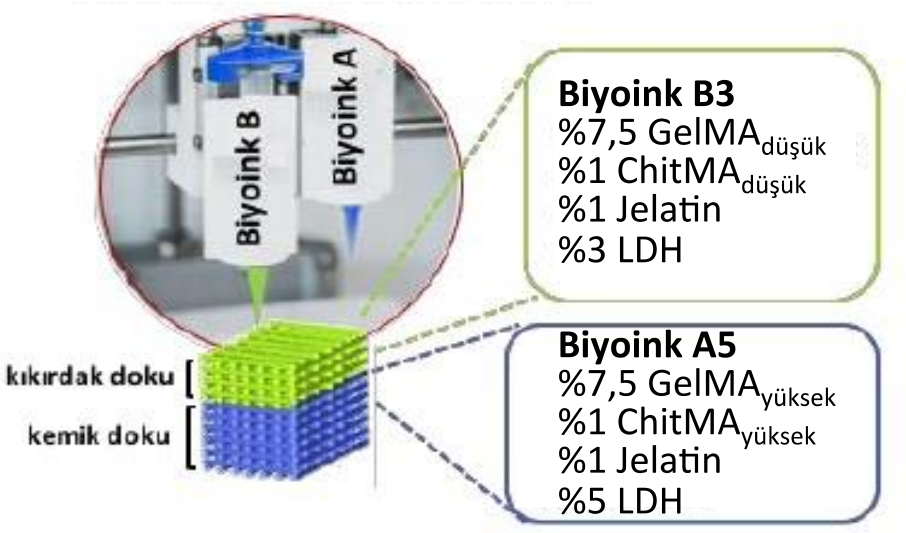
Kemik: $GelMA_{yüksek}$/$ChitMA_{yüksek}$/LDH (Biyoink A) Biyoinklerinin Hazırlanması

Biyoinklerin hazırlanması iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle steril santrifüj tüp içeresinde besiyeri ile birlikte PI (fotobaşlatıcı: Irgacure 2959) çözeltisi hazırlanmıştır. Birinci adımda; 20 mg ChitMA-5 (ağırlıkça %2'lik) 1 ml PI çözeltisi (2,5 mg/ml) içerisinde manyetik balık yardımıyla 50°C su banyosunda 1 saat ve takiben oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmıştır. Eş zamanlı bir şekilde 8,5 mg LDH

nanopartikülleri 1 ml PI çözeltisi (2,5 mg/ml) içerisinde 50°C su banyosunda 2 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 150 mg GelMA (ağırlıkça %15'lik) ve 10 mg Jelatin (ağırlıkça %1'lik) bu karışıma ilave edilmiş 50°C su banyosunda 1 saat, takiben oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmıştır. Ertesi gün bu iki hazırlanan çözelti 50°C su banyosunda 2 saat birbirleriyle karıştırılmıştır. Biyobasım için hazır hale getirilmiştir.

Kıkırdak: $GelMA_{düşük}$/$ChitMA_{düşük}$/LDH (Biyoink B) Biyoinklerinin Hazırlanması

Biyoink B serisinin hazırlanması iki aşamada Biyoink A serisi hazırlandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyoink B serisi formülasyonunun hazırlanması aşamasında ilk olarak steril santrifüj tüp içeresinde besiyeri ile birlikte PI (fotobaşlatıcı: Irgacure 2959) çözeltisi hazırlanmıştır. Birinci adımda; 20 mg ChitMA-4 ($ChitMA_{düşük}$) 1 ml PI çözeltisi (2,5 mg/ml) içerisinde manyetik balık yardımıyla 50°C su banyosunda 1 saat ve takiben oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmıştır. Eş zamanlı bir şekilde 5,1 mg LDH nanopartikülleri 1ml PI çözeltisi (2,5mg/ml) içerisinde 50°C su banyosunda 2 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 150 mg $GelMA_{düşük}$ ve 10 mg Jelatin (ağırlıkça %1'lik) bu karışıma ilave edilmiş 50°C su banyosunda 1 saat takiben oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmıştır. Ertesi gün bu iki hazırlanan çözelti 50°C su banyosunda 2 saat birbirleriyle karıştırılmıştır. Biyobasım için hazır hale getirilmiştir.

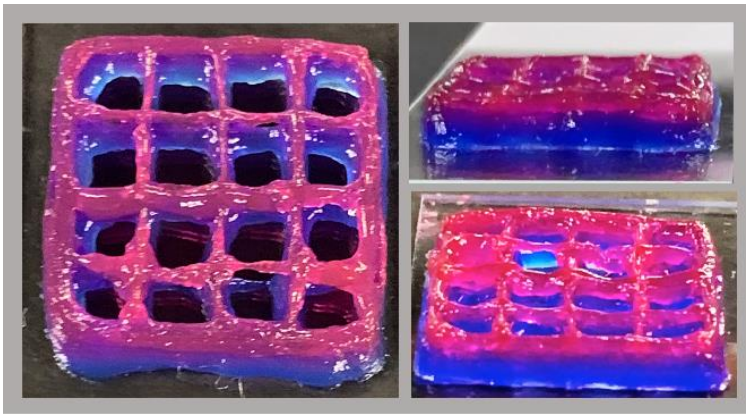


Şekil 2.1: Biyoink A (kemik) ve Biyoink B (kıkırdak) formülasyon içeriği.

Tez kapsamında sonuçların takibinin kolay olması için, kemik kısmını mimik edecek olan biyoink formülasyonuna ‘’Biyoink A5’’, BMP yüklü LDH biyoink formülasyonu için “Biyoink A5BMP”, kıkırdak kısmını mimik edecek olan biyoink formülasyonuna ‘’Biyoink B3’’, TGF yüklü LDH biyonik formülasyonu için “Biyoink B3TGF” kodları verilmiştir. Kontrol grubu olarak ise LDH nanopartiküllerinin etkisinin araştırılması için LDH içermeyen formülasyonlara ‘’Biyoink A0’’ ve ‘’Biyoink B0’’ kodları verilmiştir.

2.9. 3B-Biyoyazıcı ile Tek ve Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Üretimi

Çift-tabakalı biyobasım çalışmalarında hücre kültürü çalışmalara başlamadan önce biyomürekkepler iki farklı renk boya (metilen mavisi ve rhodamine B) ile boyanarak basım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen biyomürekkep formulasyonları Biyoink A5 ve Biyoink B3 ile basılan çift tabakalı doku iskelesi ile çift tabakalı doku iskeleleri sorunsuz bir şekilde basılabilmiştir (Şekil 2.2). Steril şartlarda hazırlanan Biyoink A ve Biyoink B biyomürekkepleri, hBMMSC’ler ile süspanse edilmiş ardından Axobioprint 3B-biyoyazıcı sistemi (Axolotl Biosystems, Türkiye) için özel şırınga sistemine (EFD Syringe Barrel) aktarılmıştır (Şekil 2.3). 16°C’de 3B-Biyobasım işlemi gerçekleştirilmiştir. Önce Biyoink A ile belirli bir kata kadar yapılmış, üzerine Biyoink B basımı yapılarak çift tabakalı doku iskelesi oluşturulmuştur. Tek katmanlı basılan örneklerin foto-polimerizasyonu için 2,5 mW/cm^2 güçte 40 saniye boyunca UV ışığına (Omnicure S2000) maruz bırakılmıştır.



Şekil 2.2: 3B-Biyobasım sonrası çift-tabakalı doku iskelesinin görünümü (alt katman: 10 kat Biyoink A5, üst katman: 10 kat Biyoink B3) (Rhodamin B ve metilen mavisi kullanılmıştır).



Şekil 2.3: Proje kapsamında satın alınan Axobioprint 3B-Biyoyazıcı sistemi (Axolotl Biosystems, Türkiye).

2.10. hBMMSC'lerin Doku İskelelerinde Adezyon Davranışlarının Belirlenmesi

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hidrojellerin steril olması gerektiği için sterilizasyon işlemi biyomürekkep solüsyonu hazırlandıktan sonra otoklav ile gerçekleştirilmiştir. LDH nanopartikülleri UV ile 30 dakika steril edildikten sonra biyomürekkep solüsyonuna eklenmiştir. Örnekler 15 ml steril santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. Tüpler alüminyum folyo ile sarılıp, kapakları parafilmlendikten sonra cam beher içerisinde otoklavın 121^{o}C 20 dakika süren programında steril edilmiştir.

Geliştirilen biyomürekkeplerin, hücre adezyon özelliklerini değerlendirmek için; her bir kuyucuğa 75 µL biyoinklerden pipetleme yapılmış ve 60 sn UV ışığı altında çapraz bağlanarak hazırlanan doku iskelelerinin üzerine hBMMSC'ler ekilmiştir. Hücre adezyon testi 48-kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri steril şartlarda 48-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanmıştır. Her bir kuyucukta $3x10^4$ hücre olacak şekilde doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Analizler için belirli süreler boyunca 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

2.10.1. Çoğalma Hızı Analizi

PrestoBlue® reaktifi, hücrelerin proliferasyonunu kantitatif olarak ölçmek için canlı hücrelerin indirgeme gücünü kullanarak hücre canlılığı göstergesi olarak işlev gören resazurin bazlı bir çözümdür. PrestoBlue® reaktifi, mavi renkli ve floresan

olmayan hücreye nüfuz eden bir bileşik olan resazurin içerir. Hücrelere eklendiğinde, canlı hücrenin indirgeyici ortamı tarafından modifiye edilerek kırmızı renkli resorufine indirgenir ve floresan hale gelir. Bu dönüşüm, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır (canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir) ve böylelikle kantitatif olarak ölçüm yapılabilmektedir.

Doku iskelelerinin üzerine ekilen hBMMSC'lerin çoğalma hızları PrestoBlue testi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bölüm 2.10 'da açıklandığı şekilde hazırlanıp üzerine hBMMSC ekilen doku iskeleleri, kültürün belirli günlerinde kültür ortamı çekildikten sonra her bir kuyucuğa hacimce %10'luk PrestoBlue boyası (taze besiyeri ile seyreltme yapılmıştır) eklenmiş, 1 saat karanlık ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası toplanan besiyeri 560ex/ 590em nm değerinde okunmuştur. Hücreler üzerinde kalan PrestoBlue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmış ve taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Aynı işlem inkübasyon sürelerinin 3, 5 ve 7. günleri için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.10.2. DAPI/Actin Analizi

Doku iskelelerinin üzerine ekilen hBMMSC'lerin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Alexa-Fluor 488 ve DAPI ile boyanmıştır. Öncelikle doku iskeleleri steril şartlarda 48-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanmıştır. Her bir kuyucukta $3x10^4$ hücre olacak şekilde 48-kuyucuklu kültür kaplarında bulunan doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Belirli süreler sonrasında (1. 3. ve 7. günlerde) hücreler distile su ile hazırlanmış %4'lük paraformaldehit (pH 7,4) ile kuyucuklardaki besiyerler uzaklaştırılıp 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra laminer kabin içerisinde kuyucuk başı 300 µl PFA ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0,1 TritonX-100 ile 30 dakika muamele edilmiş ve takiben %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile bloklanmıştır. Karanlıkta sırasıyla Alexa Flour 488 (1 saat) ve DAPI ile boyanarak (30 dakika) PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile hücreler görüntülenmiştir.

2.11. 3B-Biyobaskı ile hBMMSC Yüklü Tek katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi

Steril şartlarda hazırlanan Biyoink A ve Biyoink B biyomürekkepleri, $3x10^6$ hücre/mL olacak şekilde hBMMSC'ler ile süspanse edilmiş ardından Axobioprint 3B-

biyoyazıcı sistemi (Axolotl Biosystems, Türkiye) için özel şırınga sistemine (EFD Syringe Barrel) aktarılmıştır. Basım işlemi, steril şartlarda 16ºC'de gerçekleştirilmiştir. Basılan örneklerin foto-polimerizasyonu için 2,5 mW/cm^2 güçte 40 saniye boyunca UV ışığına (Omnicure S2000) maruz bırakılmıştır. Hücre yüklü doku iskeleleri 37°C'de %5 CO_2 atmosferi içeren inkübatörde analizler için gereken süreler boyunca inkübe edilmiştir. Kültür ortamı her iki günde bir; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin) %1 L-Glutamin içeren L-DMEM besiyeri ile tazelenmiştir.

2.12. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

2.12.1. hBMMSC Canlılık Analizi

Bölüm 2.11'de açıklandığı şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü doku iskeleleri 37°C'de %5 CO_2 atmosferi içeren inkübatörde belirli bir süre (1, 3, 7 gün) kültüre edilmiştir. Kültür ortamı her iki günde bir tazelenmiştir. İnkübasyon süreleri sonrası Calcein AM (1:500 seyreltme) ve Ethidium homodimer-1 (1:250 seyreltme) ile karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiş ve PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra Inverted Fluoresan Mikroskobu ile görüntüler alınmıştır. %Hücre canlılığı, doku iskelelerinin farklı bölgelerden alınan görüntülerin ImageJ yazılımı kullanarak hesaplanmıştır.

2.12.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi

Doku iskelelerinde 3B-biyobasım yöntemiyle enksapsüle edilen hBMMSC'lerin çoğalma hızları PrestoBlue testi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. hBMMSC-yüklü doku iskeleleri Bölüm 2.11'de detaylı bir şekilde açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Kültürün belirli günlerinde kültür ortamı çekildikten sonra her bir kuyucuğa hacimce %10'luk PrestoBlue boyası (taze besiyeri ile seyreltme yapıldı) eklenmiş, 1 saat karanlık ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası toplanan besiyeri 560ex/ 590em nm değerinde okunmuştur. Hücreler üzerinde kalan PrestoBlue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmış ve taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Aynı işlem inkübasyon sürelerinin 1, 3, 5 ve 7. günleri içinde aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.12.3. hBMMSC DAPI/Actin Analizi

3B-Biyobasım yöntemi ile hazırlanan hBMMSC-yüklü doku iskelelerinde enkapsüle edilen hücrelerin morfolojisini görüntülemek için, belirli bir süre boyunca (1, 3 ve 7 gün) 37°C'de %5 CO_2 atmosferinde inkübasyona bırakılmışlardır. Kültür ortamı her iki günde bir tazelenmiştir. İnkübasyon süresi sonrası doku iskeleleri Alexa-Fluor 488 ve DAPI ile boyanmıştır. İlk olarak, kuyucuklardaki besiyerler uzaklaştırılıp 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, %4'lük PFA ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0,1 TritonX-100 ile 30 dakika muamele edilmiş ve takiben %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile bloklanmıştır. Karanlıkta sırasıyla Alexa Flour 488 (1 saat) ve DAPI ile boyanarak (30 dakika) PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile 20x ve 40x'te hücreler görüntülenmiştir.

2.13. 3B-Biyobaskı ile hBMMSC Yüklü Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi

Çift katmanlı hBMMSC yüklü doku iskeleleri alt katmanda kemik, üst katmanda kıkırdak biyoinkleri olacak şekilde hazırlanmıştır (Biyoink A0/Biyoink B0 ve Biyoink A5/Biyoink B3). Biyoinkler içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin yoğunluğu $3x10^6$ hücre/ml 'dir. 3 tekrarlı hazırlanan doku iskeleleri 37°C'de %5 CO_2 atmosferi içeren inkübatörde analizler için gereken süreler boyunca (1, 3, 7 gün) inkübe edilmiştir. Kültür ortamı her iki günde bir; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin) %1 L-Glutamin içeren L-DMEM besiyeri ile tazelenmiştir.

2.14. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi

Bölüm 2.13'deki gibi hazırlanan çift katlı doku iskelelerinin canlılık analizi Bölüm 2.12.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır ve bistüri yardımıyla doku iskelelerinden ince kesitler alınarak floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile 10x'te hücreler görüntülenmiştir.

2.14.1. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi

Bölüm 2.13'de anlatıldığı şekilde hazırlanan çift katlı doku iskelelerinin canlılık analizi Bölüm 2.12.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Analiz sonuçları inkübasyon sürelerinin 1, 3 ve 7. günlerinde yapılmıştır.

2.14.2. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi

Bölüm 2.13'de anlatıldığı şekilde hazırlanan doku iskeleleri enkapsüle edilen hücrelerin morfolojisini görüntülemek için, belirli bir süre boyunca (1, 3 ve 7 gün) 37°C'de %5 CO_2 atmosferinde inkübasyona bırakılmışlardır. Kültür ortamı her iki günde bir tazelenmiştir. İnkübasyon süresi sonrası doku iskeleleri Bölüm 2.12.3'de ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde boyanmış ve bistüri yardımıyla doku iskelelerinden ince kesitler alınarak floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile 20x ve 40x'te hücreler görüntülenmiştir.

2.14.3. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell-Tracker ile İncelenmesi

Çift tabakalı doku iskelesinde hücrelerin birbiri ile etkileşimi ve hidrojel içerisindeki hareketliliğini gözlemlemek için kırmızı ve mavi olmak üzere iki farklı cell-tracker kullanılmıştır. Konfluent olmuş T 175 cm^2'lik flasktan hücreler kaldırılmış ve $3x10^6$ hücre/ml olacak şekilde sayılıp santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Mavi tracker 10 µM/ml olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiştir. 3 ml mavi trackerlı besiyeri santrifüj edilmiş $3x10^6$ hücre peleti üzerine eklenerek pipetaj yapılmış ve 30 dakika boyunca alüminyum folyo ile sarılarak inkübe edilmiştir. Eş zamanlı olarak kırmızı tracker 2 µM/ml olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiştir. 3 ml kırmızı trackerlı besiyeri santrifüj edilmiş $3x10^6$ hücre peleti üzerine eklenerek pipetaj yapılmış ve 30 dakika boyunca alüminyum folyo ile sarılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edillen hücrelerin trackerlı besiyerleri tüpten uzaklaştırılmıştır. Kırmızı trackerlı hücreler Biyoink A5, mavi trackerlı hücreler Biyoink B3 biyomürekkeplerine yüklenmiştir. Bölüm 2.13'de anlatıldığı şekilde doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kültür ortamı her iki günde bir; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin) %1 L-Glutamin içeren L-DMEM besiyeri ile tazelenmiştir. 0, 1, 3 ve 7. günlerde bistüri yardımıyla doku iskelesinden boyuna kesitler alınarak floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile 5x'te hücreler görüntülenmiştir.

2.15. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaştırma için Kültürlenmesi

Osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma çalışmaları kapsamında, hBMMSC yüklü doku iskeleleri hazırlarken $10x10^6$ hücre/ml - $15x10^6$ hücre/ml olacak hücre yoğunluğu kullanılmıştır.

Tek katmanlı doku iskelelerinde osteojenik farklılaştırma çalışmaları için; osteojenik farklılaşma besiyeri olarak; %10'luk fetal bovin serum, %1'lik penisilin/streptomisin, 50 µg/ml L-Askorbik Asit Fosfat Magnezyum Tuzu n-Hidrat, 10mM B-gliserofosfat disodyum tuzu pentahidrat, 10^{-7} M deksametazon içeren H-DMEM kullanılmıştır. *In vitro* kültür boyunca hücre kültürü besiyeri her iki günde bir yarı yarıya değiştirilmiştir.

Tek katmanlı doku iskelelerinde kondrojenik farklılaştırma çalışmaları için; kondrojenik farklılaşma besiyeri olarak %1'lik penisilin/streptomisin, %1'lik ITS, %1'lik 100mM sodyum piruvat, 10^{-7}deksametazon, %1'lik non-essential amino asit, %1'lik L-askorbik asit fosfat içeren H-DMEM kullanılmıştır. *In vitro* kültür boyunca hücre kültürü besiyeri her iki günde bir yarı yarıya değiştirilmiştir.

Çift katmanlı doku iskelelerinde ise osteojenik ve kondrojenik farklılaşma besiyerleri hacimce 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

2.16. Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları

Tek katmanlı doku iskelelerinde osteojenik farklılaşma çalışmaları için Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP biyomürekkepleri kullanılmıştır. Doku iskeleleri içerisinde $10x10^6$ hücre/ml - $15x10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre yoğunluğu kullanılmıştır. Hazırlanan hücre yüklü doku iskeleleri UV ışığı altında 40 saniye süreyle çapraz bağlanmıştır. Her örnekten 3 tekrarlı hazırlanan doku iskeleleri, 800 µL osteojenik hücre besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakalarda 21 gün boyunca inkübe edilmiştir.

Çift katmanlı doku iskeleleri, alt katmanda kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) üst katmanda kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinkleri olacak şeklide hazırlanmıştır. Doku iskeleleri içerisinde $10x10^6$ hücre/ml - $15x10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre yoğunluğu kullanılmıştır. Alt katman 10 saniye,

üst katman 40 saniye UV ışığı altında çapraz bağlanmıştır. 3 tekrarlı hazırlanan örnekler 24 kuyucuklu plakada 500 µL osteojenik 500 µL kondrojenik besiyeri ile 21 gün boyunca Bölüm 2.15'de açıklandığı şekilde inkübe edilmiştir.

2.16.1. Histolojik Boyamalar

Belirli süreler boyunca kültüre edilen doku iskeleleri %4'lük paraformaldehit içerisine alınarak bir gece 4^{O}C'de fikse edilmiştir. Ardından yükselen alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, birkaç saniye süreyle ksilende tutularak şeffaflaştırılmış, 60°C'lik etüvde parafinde 3 saat bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan yaklaşık 10 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Takiben, morfolojik değerlendirme ve histopatolojik analiz yapabilmek için Hematoksilen ve Eosin (H&E) ve Von Kossa boyası ile boyanan dokular ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

2.16.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması

Hematoksilen alkali pH'a sahip bir boya maddesi olup hücre çekirdeğini (nükleik asit) ve kalsiyum çöküntülerini boyar. Eosin ise sitoplazma, protein birikimi, amiloid gibi yapıları boyamaktadır. Hematoksilen mavi-mor renk, veren Eosin ise pembemsi kırmızı renk vererek hücreleri boyamaktadır. Deney gruplarındaki hücrelerin tayini ve morfolojilerinin belirlenmesi için Hematoksilen ve Eosin boyaması yapılmıştır.

Bölüm 2.16.1'de belirtilidiği şekilde hazırlanan doku iskelelerinin kesitinden parafini arındırmak için 30 dakika ksilende bekletilmiştir. Hidrasyon işlemi için azalan alkol serileri (%100, %90, %80, %70) uygulanmıştır. Ardından 5 dakika hematoksilen içinde bekletilmiştir. 5 dakikanın ardından mordanlama işlemi için akan musluk suyunda 15 dakika yıkanmıştır. İşlemin devamında %1'lik Eosin Y çözeltisinde 2 dakika bekletilmiştir. Distile su ile yapılan yıkamanın ardından artan alkol konsantrasyonunda (%70, %80, %90, %100) dehidre edilmiş ve ksilen içinde bekletilmiştir. Dokular uygun kapama maddesi ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.16.1.2. Alizarin Red S Boyaması

Mezenkimal kök hücreler, farklılaşma öncesinde hücre dışı kalsiyum birikmesine sahip değildir. Farklılaşma protokolü uygulanmasının ardından

osteoblastlara dönüşen hücrelerde kalsiyum birikmesi görülmektedir. Bu da hücrelerin kemik oluşumu ve osteoblastlara başarılı şekilde farklılaşabildiğinin göstergesidir. Oluşan kalsiyum birikmesi, Alizarin Red boyaması ile kırmızı-turuncumsu bir renkte gözlemlenebilmektedir.

Osteojenik farklılaşma çalışmaları kapsamında kültürlenen hBMMSC-yüklü doku iskeleleri 14. ve 21. günlerde %4'lük parafolmaldehit çözeltisi ile 30 dakika inkübe edilerek fikse edilmiştir. Takiben PBS ile 3 kere yıkanmış ve oda sıcaklığında karanlıkta ortamda 30 dakika boyunca Alizarin Red boyası ile inkübe edilmiştir. Ardından dikkatlice doku iskeleleri üzerinden çekilen çözelti, bir hafta boyunca distile su ile yıkanmış ve ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir.

Çalışma kapsamında tek tabakalı (BiyoinkA0 ve BiyoinkA5 doku iskeleleri) ve çift tabakalı doku iskeleleri (BiyoinkA0/BiyoinkB0 ve BiyoinkA5/BiyoinkB3) kullanılmıştır. Tek tabakalı doku iskelelerinde sadece osteojenik medyum, çift tabakalı doku iskelelerinde ko-kültür medyum (1:1 oranında osteojenik ve kondrojenik medyum karışımı) kullanılmıştır.

2.16.1.3. Von Kossa Boyaması

Von Kossa boyaması, osteojenik farklılaşma çalışmalarında kalsiyum birikimlerinin mikroskobik olarak ortaya konmasında kullanılan histopatolojik bir boyama yöntemidir. Bölüm 2.16.1'de belirtilidiği şekilde hazırlanan doku iskelelerinin kesitinden parafini arındırmak için 30 dakika ksilende bekletilmiştir. Hidrasyon işlemi için azalan alkol serileri (%100, %90, %80, %70) uygulanmıştır. Takiben 10 dakika %1'lik gümüş nitrat solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitler %5'lik sodyum tiyosülfat içerisinde 5 dakika bekletilmiş, yıkamanın ardından fast red ile boyanmıştır. Tekrar distile su ile yıkanan kesitler dehidre edilmiş ve uygun kapama maddesi ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.16.2. İmmunfloresan Boyamalar

Bölüm 2.16'da belirtildiği gibi osteojenik farlılılaştırılan tek katlı ve çift katlı doku iskeleleri 14. ve 21. günün sonunda kuyucuklardaki besiyerler uzaklaştırılıp 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, %4'lük PFA ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0,1 TritonX-

100 ile 30 dakika muamele edilmiş ve takiben %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile bloklanmıştır. Bistüri ile boyuna ince kesitler alınan örnekler bundan sonraki aşamada;

- Runx2 (MyBioSafe) rabbit monoklonal 1:100

oranında %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile hazırlanmıştır. Primerler örneklerin üzerine kapatacak şekilde 48 kuyucuklu plakada çalışılmıştır. Primerler ile kaplanan örnekler bir gece 4ºC'de inkübe edilmiştir. Boyama işlemi, devamında preparatların 3 kez PBS tamponu ile 5'er dakika yıkanması ardından sekonderlerin inkübasyonu ile devam etmiştir. Kullanılan sekonder;

- Fluor 594 goat anti rabbit (MyBioSafe) 1:100

oranında %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile hazırlanmıştır. Örneklerin üzerini kapatacak şekilde sekonderin eklenmesinden sonra 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Tekrardan 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, DAPI çekirdek boyası ile 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

2.17. Kondrojenik Farklılaşma Çalışmaları

Tek katmanlı doku iskelelerinde osteojenik farklılaşma çalışmaları için Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF biyomürekkepleri kullanılmıştır. Doku iskeleleri içerisinde $10x10^6$ hücre/ml - $15x10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre yoğunluğu kullanılmıştır. Hazırlanan hücre yüklü doku iskeleleri UV ışığı altında 40 saniye süreyle çapraz bağlanmıştır. Her örnekten 3 tekrarlı hazırlanan doku iskeleleri, 800 µL kondrojenik hücre besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakalarda 21 gün boyunca inkübe edilmiştir.

Çift katmanlı doku iskeleleri ise, alt katmanda kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) üst katmanda kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinkleri olacak şeklide hazırlanmıştır. Doku iskeleleri içerisinde $10x10^6$ hücre/ml - $15x10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre yoğunluğu kullanılmıştır. Alt katman 10 saniye, üst katman 40 saniye UV ışığı altında çapraz bağlanmıştır. 3 tekrarlı hazırlanan örnekler 24 kuyucuklu plakada 500 µL osteojenik 500 µL kondrojenik besiyeri ile 21 gün boyunca Bölüm 2.15'de açıklandığı şekilde inkübe edilmiştir.

2.17.1. Histolojik Boyamalar

Belirli süreler boyunca kültüre edilen doku iskeleleri, %4'lük paraformaldehit içerisine alınarak bir gece 4ºC'de fikse edilmiştir. Ardından yükselen alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, birkaç saniye süreyle ksilende tutularak şeffaflaştırılmış, 60°C'lik etüvde parafinde 3 saat bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan yaklaşık 10 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Takiben morfolojik değerlendirme ve histopatolojik analiz yapabilmek için Hematoksilen ve Eosin (H&E) ve Toluidin mavisi boyası ile boyanan dokular ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

2.17.1.1. Alcian Blue Boyaması

Alcian Blue boyaması sülfatlanmış glikozaminoglikanları (GAG) görselleştirmek için kullanılan bir yöntemdir. Alcian Blue, kıkırdağa özgü ECM oluşumunu göstermek için yapıda bulunan GAG'ları boyamaktadır.

Kondrojenik farklılaşma çalışmaları kapsamında kültürlenen hBMMSC -yüklü doku iskeleleri 14. ve 21. günlerde %4'lük parafolmaldehit çözeltisi ile 30 dakika inkübe edilerek fikse edilmiştir. Takiben PBS ile 3 kere yıkanmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika boyunca Alcian Blue boyası ile inkübe edilmiştir. Ardından dikkatlice doku iskeleleri üzerinden çekilen çözelti, bir hafta boyunca PBS ile yıkanmış ve ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir.

Çalışma kapsamında tek tabakalı (BiyoinkB0 ve BiyoinkB3 doku iskeleleri) ve çift tabakalı doku iskeleleri (BiyoinkA0/BiyoinkB0 ve BiyoinkA5/BiyoinkB3) kullanılmıştır. Tek tabakalı doku iskelelerinde sadece kondrojenik medyum, çift tabakalı doku iskelelerinde ko-kültür medyum (1:1 oranında osteojenik ve kondrojenik medyum karışımı) kullanılmıştır.

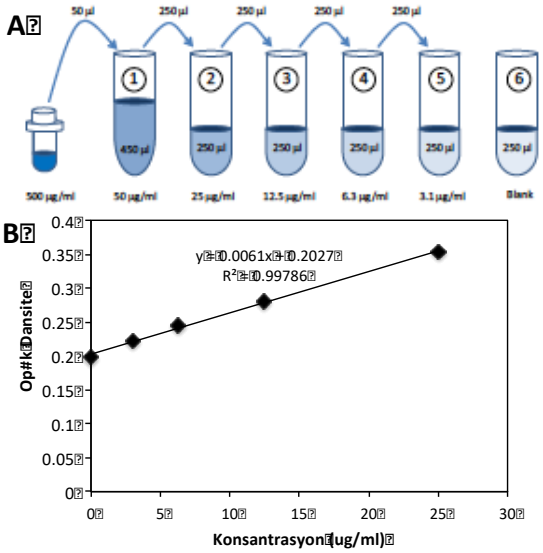
2.17.1.2. Toluidin Mavisi Boyaması

Toluidin mavisi boyaması, Bazik bir boya olan toluidin mavisi ile maviden mora değişen tonlarda sülfatlanmış proteoglikanları görselleştirmek için kondreojenik farklılaşma çalışılan örneklere boyama uygulanmıştır.

Hematoksilen ve Eosin boyanmasında olduğu gibi hidrasyon uygulanan kesitlere 5 dakika süreyle toluidin mavisi boyası uygulanmış ve distile su ile yıkamanın ardından dehidre edilen kesitler uygun kapama maddesi ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.17.2. GAG Analizi

Kondrojenik farklılaşma çalışılan örneklerde besiyeri içerisine salınan glikozaminoglikan miktarını tayin etmek için GAG analizi yapılmıştır. Çalışma kapsamında, katyonik boya 1,9 dimetilmetilen mavisi (DMB) kullanan sülfatlanmış bir GAG Test Kiti kullanılmıştır. İlk olarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kapsamda kitin içerinden çıkan standart çözeltiden 50 µl alınmış ve 450 µl PBS ile seyreltilmiştir (50 µg/ml). Ardından hazırlanan bu çözeltiden 250 µl alınarak 250 µl PBS ile seyreltilmiştir (25 µg/ml). Aynı işlem 12,5, 6,3 ve 3,1 µg/ml çözeltilerin hazırlanması için üç kez daha tekrarlanmıştır (Şekil 2.4A). Ardından test için ön hazırlık aşamasına geçilmiştir. Test kapsamında kullanılacak kitin içerisinde bulunan tüm materyallerin oda sıcaklığına gelmesi için bir süre beklenmiştir. Takiben standart eğri için kullanılan kuyulara 100 µL standart eklenmiştir ve ardından 100 µL DMB Boya çözeltisi eklenmiştir. Plaka 5 dakika içinde 525 nm'de okunmuştur. R^2 değeri 0,9978 değeri elde edilmiştir (Şekil 2.4B).



Şekil 2.4: (A) GAG Kiti seyreltme protokolü ve (B) GAG standart eğrisi.

2.17.3. İmmunfloresan Boyamalar

Bölüm 2.17'de belirtildiği gibi kondrojenik farlılılaştırılan tek katlı ve çift katlı doku iskeleleri 14. ve 21. günün sonunda kuyucuklardaki besiyerler uzaklaştırılıp 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, %4'lük PFA ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0,1 TritonX-100 ile 30 dakika muamele edilmiş ve takiben %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile bloklanmıştır. Bistüri ile boyuna ince kesitler alınan örnekler bundan sonraki aşamada;

- Col II (MyBioSafe) rabbit monoklonal 1:100

oranında %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile hazırlanmıştır. Primerler örneklerin üzerine kapatacak şekilde 48 kuyucuklu plakada çalışılmıştır. Primerler ile kaplanan örnekler bir gece 4^{o}C'de inkübe edilmiştir. Boyama işlemi, devamında preparatların 3 kez PBS tamponu ile 5'er dakika yıkanması ardından sekonderlerin inkübasyonu ile devam etmiştir. Kullanılan sekonder;

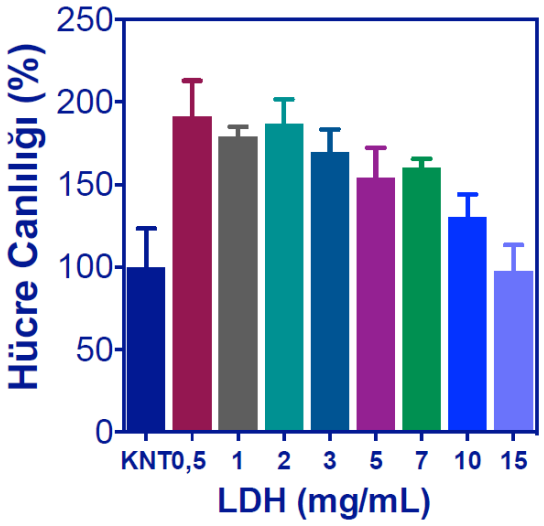
- Fluor 594 goat anti rabbit (MyBioSafe) 1:100

oranında %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile hazırlanmıştır. Örneklerin üzerini kapatacak şekilde sekonderin eklenmesinden sonra 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Tekrardan 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, DAPI ile 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. LDH Nanopartiküllerinden Sitotoksisite Analizi Sonuçları

LDH nanopartiküllerinin MTT analizi Bölüm 2.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: LDH nanopartiküllerinin MTT analizi sonuçları.

3.2. Büyüme Faktörü Yüklü LDH Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi Sonuçları

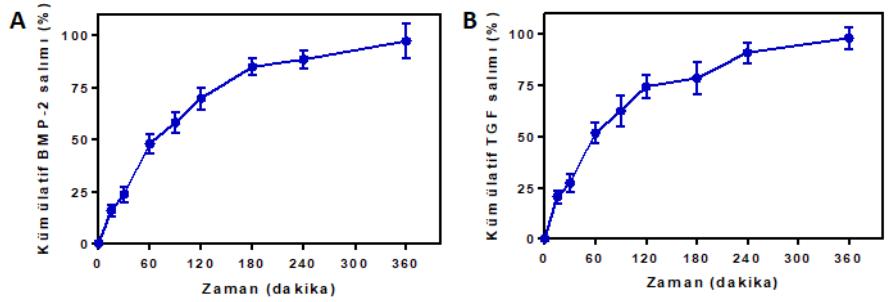
Bölüm 2.7.1'de belirtilen formül ile hesaplamalar sonucu BMP-2 veya TGF-β1 yüklenmiş nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimleri Tablo 3.1 'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: LDH nanopartiküllerine BMP-2 ve TGF-β1 yükleme miktarı.

	Enkapsülasyon Verimi (%)	İlaç Yükleme miktarı (/mg LDH)
BMP-2 yüklü LDH nanopartikülleri	48,05 ± 2,32	0,48 ± 0,0316 µg BMP-2/mg LDH
TGF-β1 yüklü LDH nanopartikülleri	51,8 ± 3,47	0,207 ± 0,0042 µg TGF-β1/mg LDH

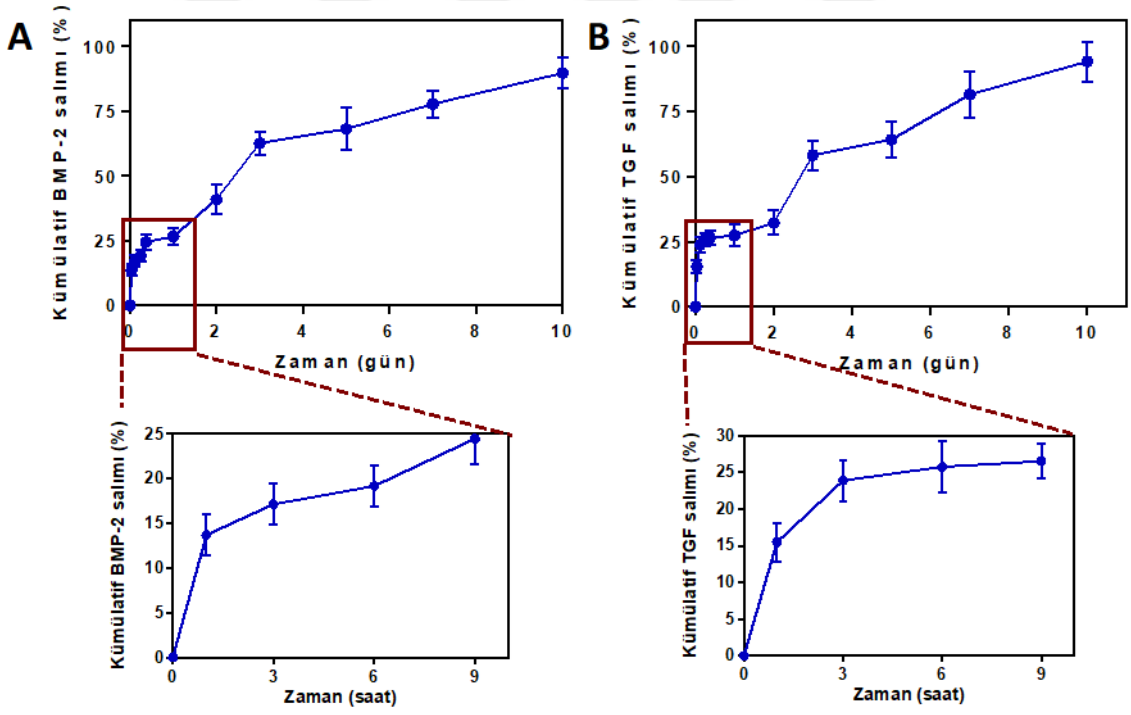
3.3. LDH Nanopartiküllerinden Büyüme Faktörü Salım Sonuçları

LDH nanopartiküllerinden BMP-2'nin *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2: LDH nanopartiküllerinden (A) BMP-2 ve (B) TGF-β1 kümülatif salımı

BMP-2 yüklü LDH nanopartikülü içeren doku iskelelerinden *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'de verilmiştir.

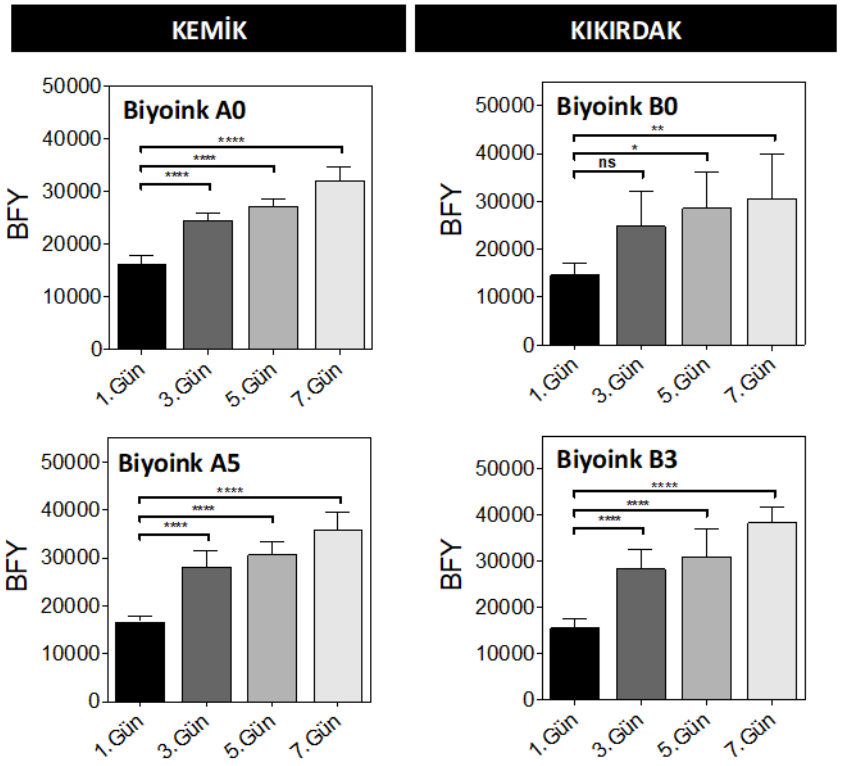


Şekil 3.3: (A) BMP-2 yüklü LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinden BMP-2'nin kümülatif salımı, (B) TGF-β1 yüklü LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinden TGF-β1'in kümülatif salımı.

3.4. Doku İskelelerinde hBMMSC Adezyonu Sonuçları

3.4.1. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları

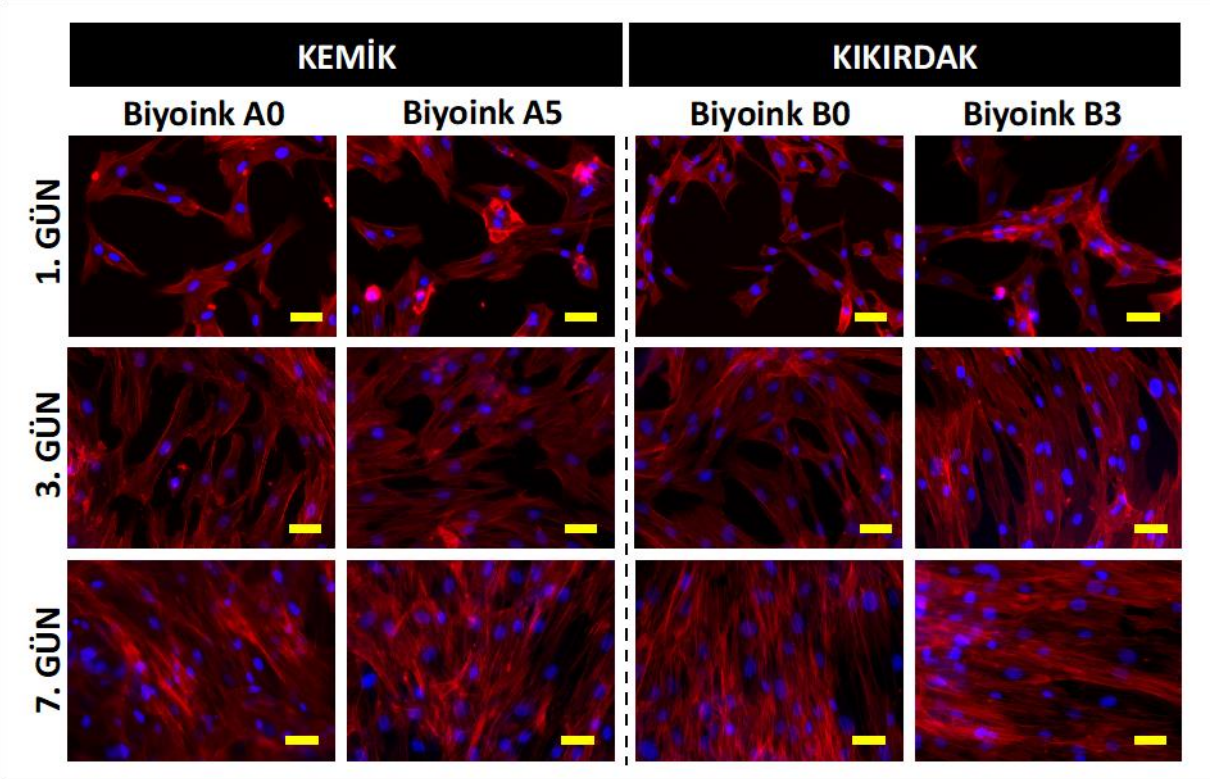
Bölüm 2.10'da açıklanlandığı şekilde doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin, Bölüm 2.10.1'de çoğalma hızı PrestoBlue testi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4: Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin 1, 3, 5 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivitesi sonuçları (proliferasyon hızı) (ns: p>0,05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001 , n=6) (BFY: bağıl floresan yoğunluk).

3.4.2. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları

Bölüm 2.10'da belirtildiği şekilde doku iskelelerine ekilen hBMMSC hücrelerinin *in vitro* adezyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerine ekilen hücrelerin 1., 3. ve 7. gündeki DAPI/Actin boyamaları Bölüm 2.10.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş, tüm sonuçlar Şekil 3.5'de verilmiştir.

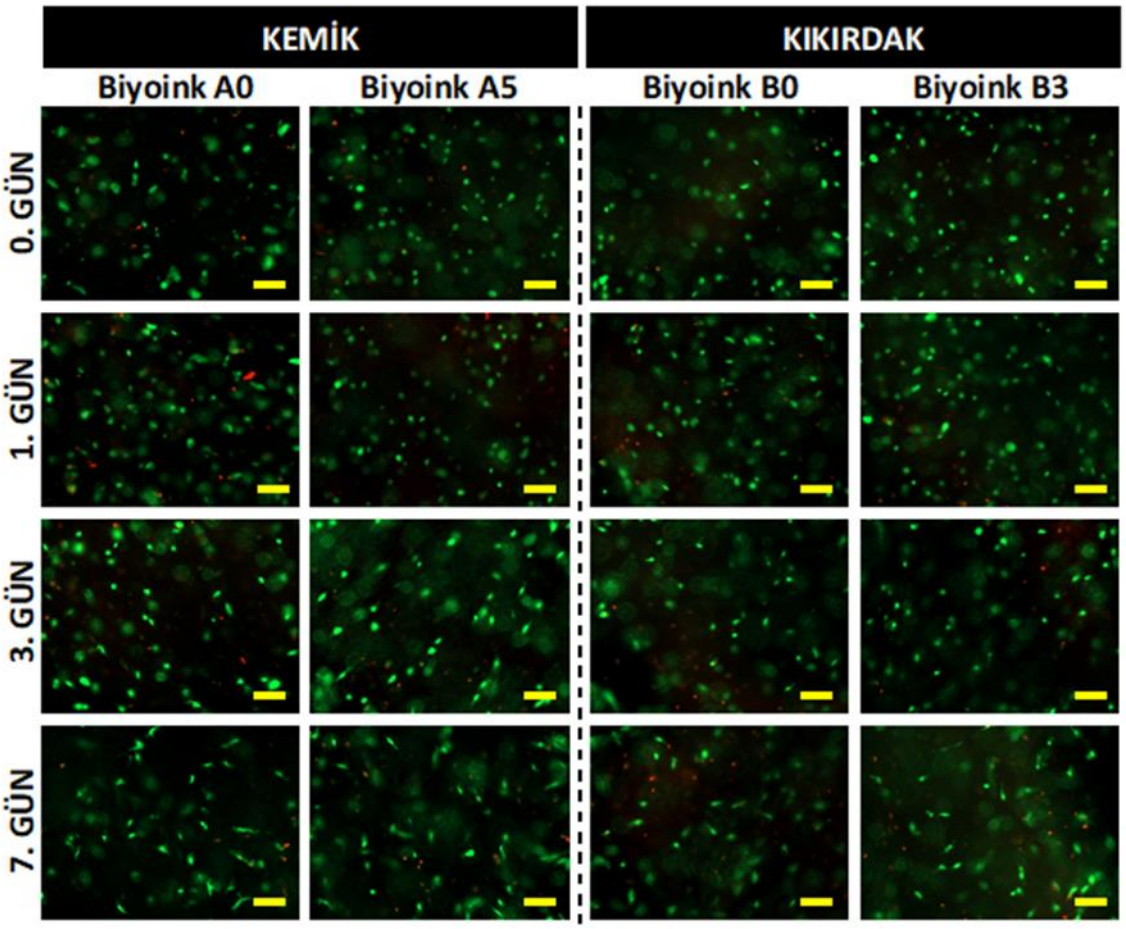


Şekil 3.5: Biyoink A ve BiyoinkB doku iskelelerinin in vitro hücre adezyonu sonuçları (ölçek çubuğu = 50 µm).

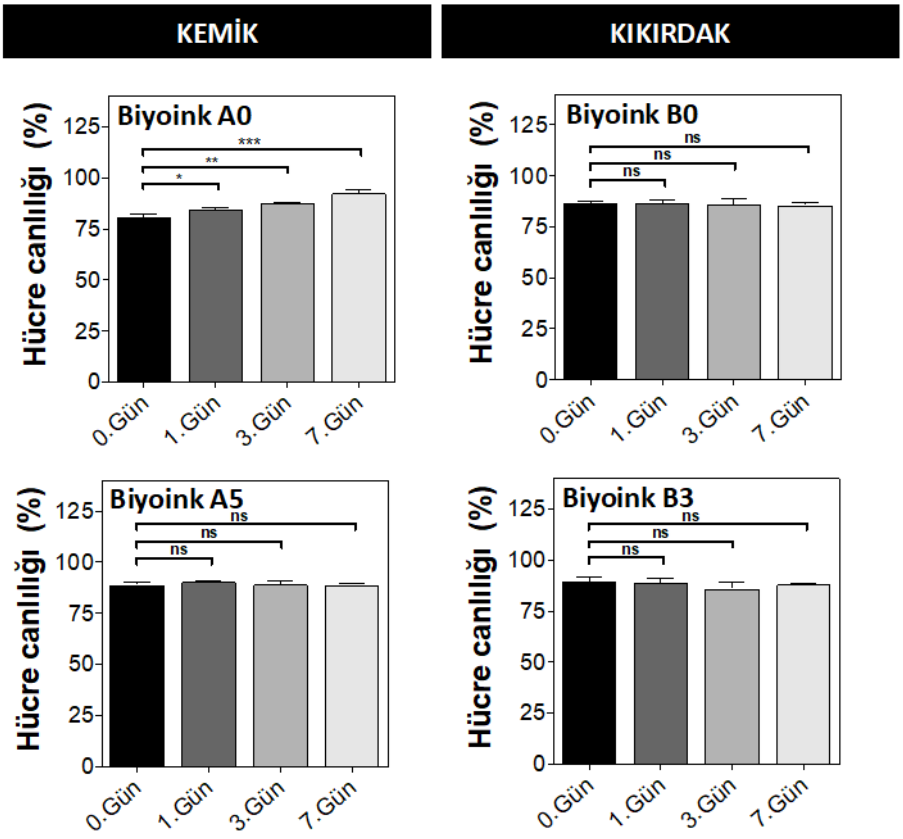
3.5. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.5.1. hBMMSC Canlılık Analizi Sonuçları

Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde Bölüm 2.12.1'de belirtildiği şekilde canlılık testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de verilmiştir.



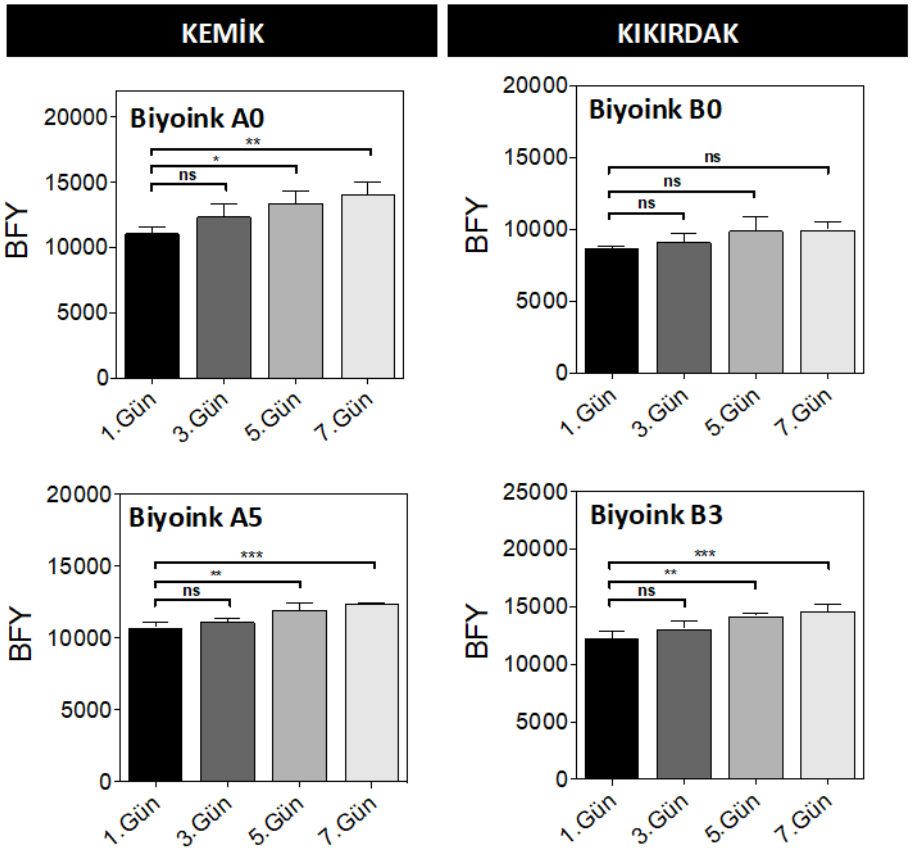
Şekil 3.6: hBMMSC-yüklü Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası canlılık analizi sonuçları (ölçek çubuğu = 100 µm).



Şekil 3.7: hBMMSC-yüklü doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası % hücre canlılığı sonuçları (ns: p>0,05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, *p < 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

3.5.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları

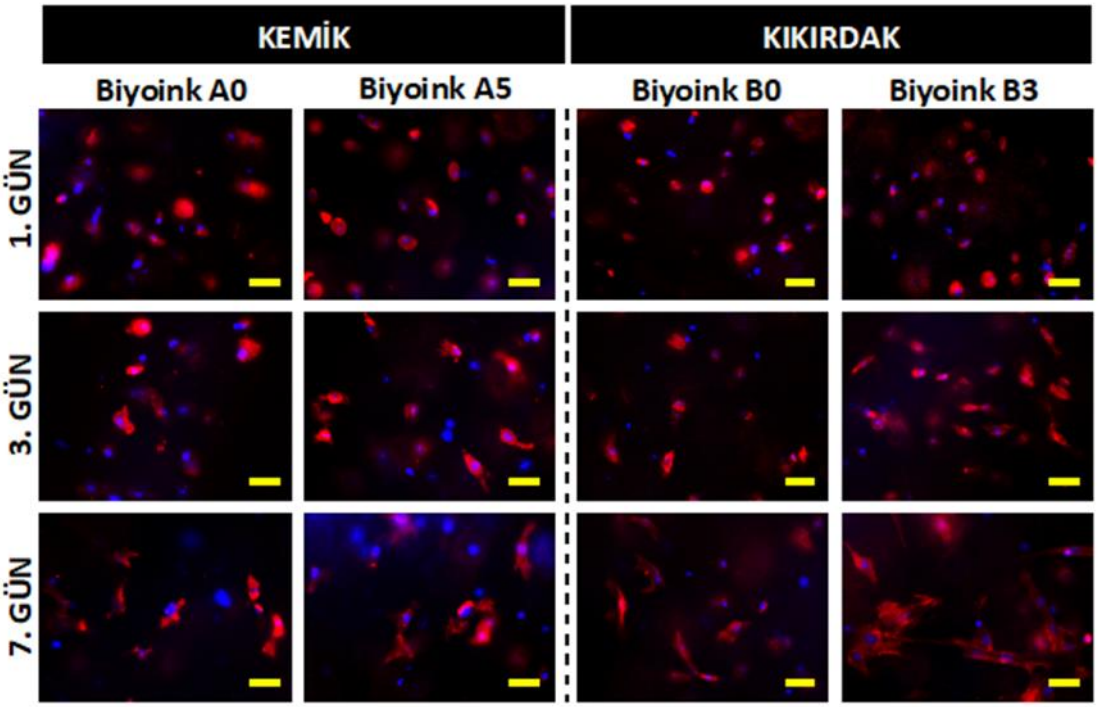
Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde Bölüm 2.12.2'de belirtildiği şekilde PrestoBlue analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de verilmiştir.



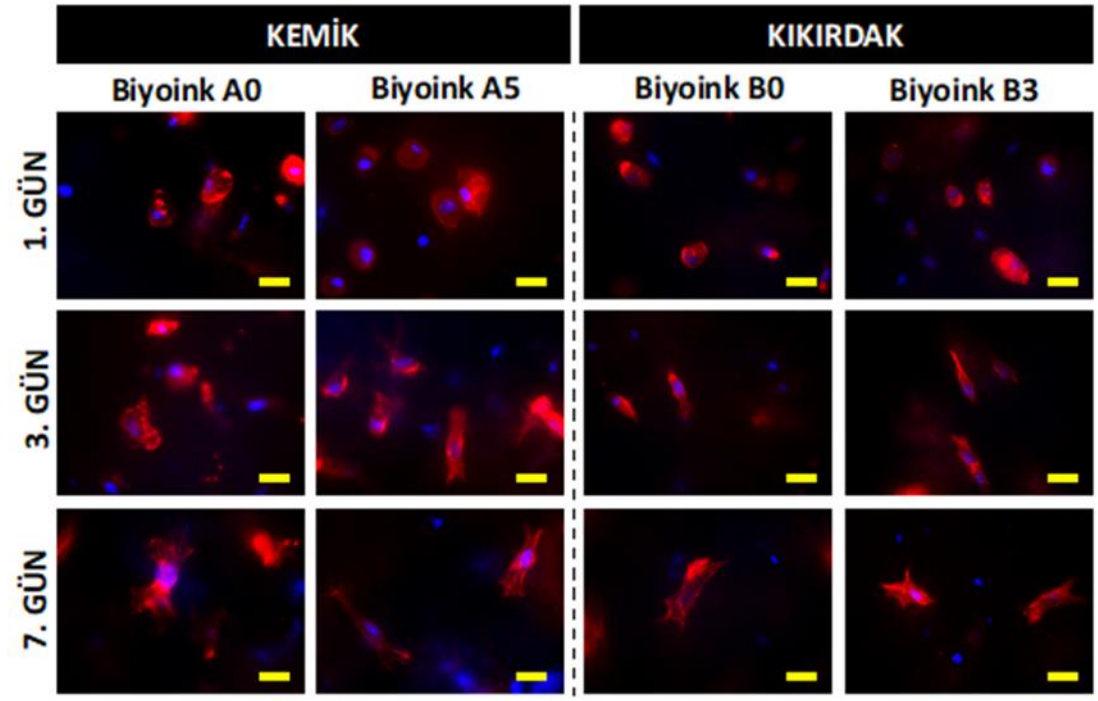
Şekil 3.8: Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 1, 3, 5 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivitesi sonuçları (proliferasyon hızı): (ns: p>0,05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001 , n=6) (BFY: bağıl floresan yoğunluk).

3.5.3. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları

Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde 3B-biyobasım sonrası Bölüm 2.12.3'de belirtildiği şekilde DAPI/Actin analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir.



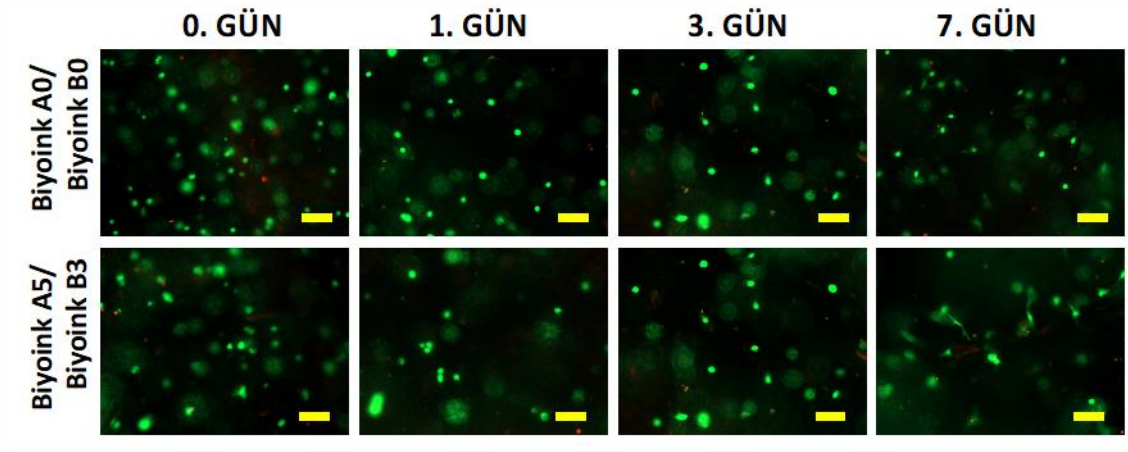
Şekil 3.9: hBMMSC-yüklü Bioyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası Alexa Fluor 488 /DAPI boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 µm)(20x büyütme).



Şekil 3.10: hBMMSC-yüklü Biyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası Alexa Fluor 488 /DAPI boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 25 µm) (40x büyütme).

3.5.4. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi

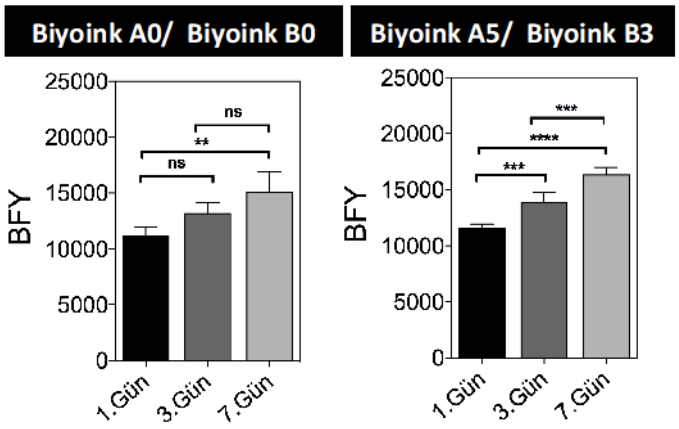
Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.14'de belirtildiği şekilde hazırlanan çift tabakalı doku iskelelerinde % canlılık testleri yapılmıştır. Canlılık testleri Bölüm 2.12.1.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası canlılık analizi sonuçları (ölçek çubuğu = 100 µm).

3.5.5. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi

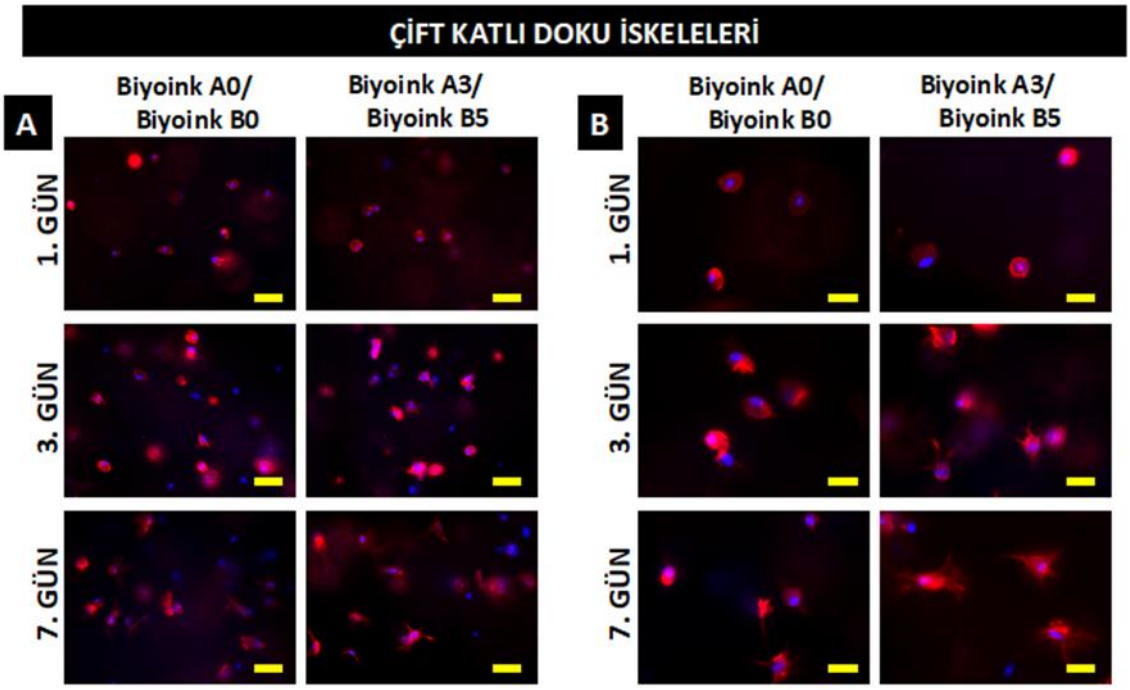
Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.14.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan çift tabakalı doku iskelelerinde PretoBlue analizi yapılmıştır. PrestoBlue analizi Bölüm 2.12.2.'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası çoğalma hızı analizi sonuçları (ns: p>0,05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001 , n=5) (BFY: bağıl floresan yoğunluk).

3.5.6. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi

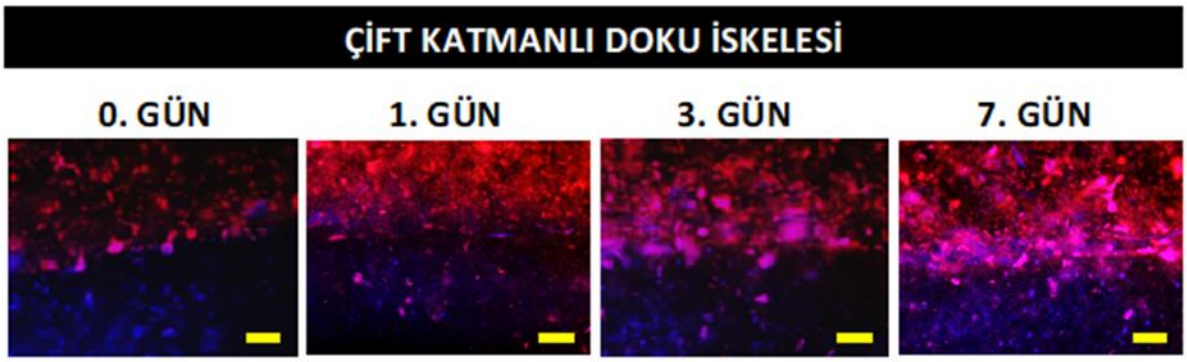
Bölüm 2.14.2'de açıklandığı şekilde kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.13'de belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü çift tabakalı doku iskelelerinde DAPI/Actin boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.12.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'de verilmiştir.



Şekil 3.13: hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 3B-Biyobasım sonrası DAPI/Actin analizi sonuçları. Ölçek çubuğu (A) 50 µm ve (B) 25 µm.

3.5.7. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell-Tracker ile Görüntülenmesi

Kemik (Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.13'de belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü çift tabakalı doku iskelelerinde (Biyoink A5/ Biyoink B3) hücreler iki farklı cell-tracker ile boyanmış ve hücrelerin katmanlar arasındaki geçişi Bölüm 2.14.3'de açıklandığı şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'de verilmiştir. Bu bölümde sadece LDH nanopartikülleri içeren biyoinkler kullanılmıştır.



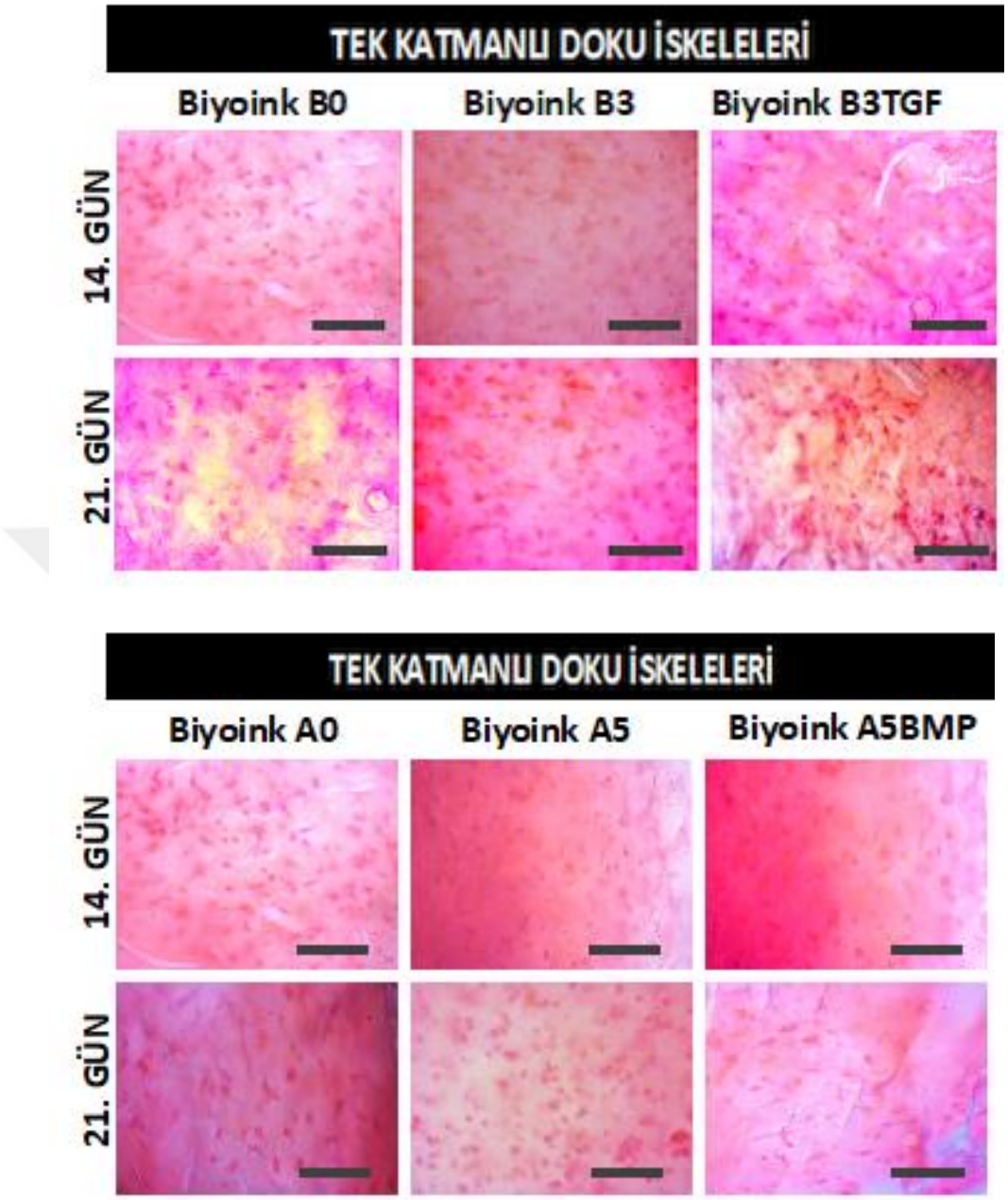
Şekil 3.14: Biyoink A5/ Biyoink B3 çift tabakalı doku iskelesinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin katmanlar arası geçişi (ölçek çubuğu: 200 µm).

3.6. Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

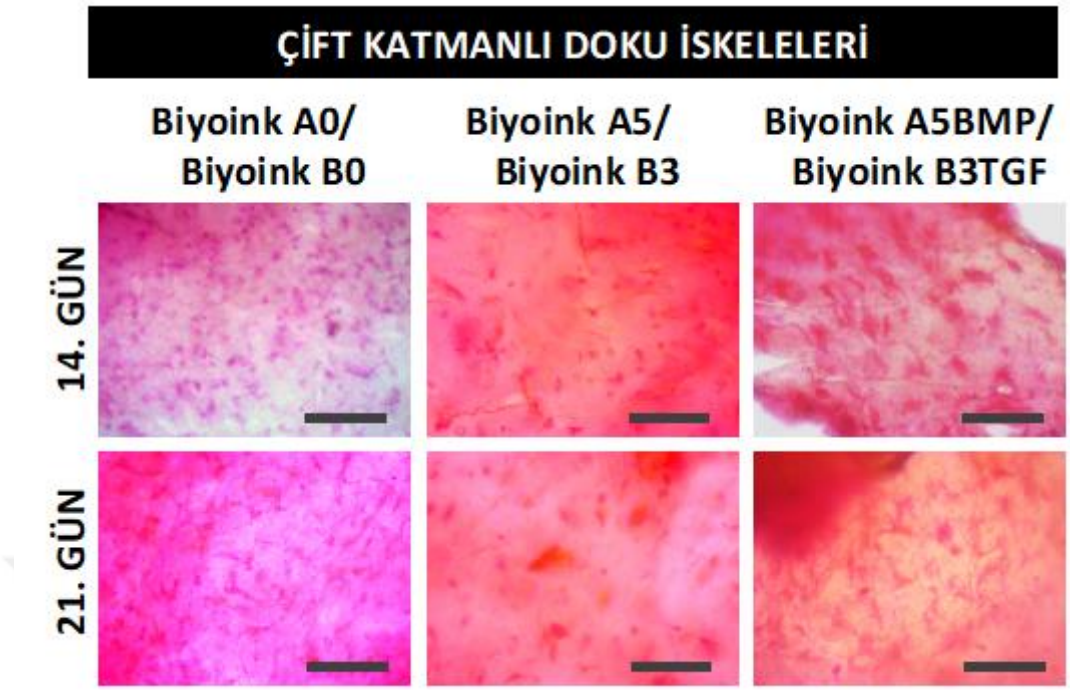
3.6.1. Histolojik Boyamalar

3.6.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Hemotoksilen Eosin boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.16.1.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin doku iskelesi içerisindeki yoğunluğu ve konumları incelenmiştir Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verilmiştir.



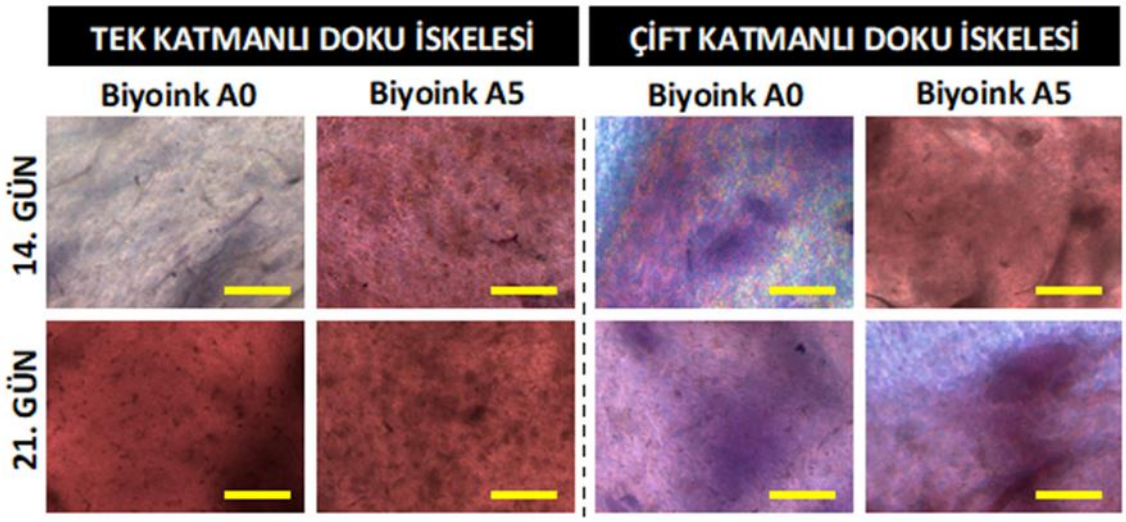
Şekil 3.15: Tek tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Hemotoksilen Eosin boyaması sonuçları (ölçek çubuğu = 20 µm).



Şekil 3.16: Çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Hemotoksilen Eosin boyaması sonuçları (ölçek çubuğu = 20 µm).

3.6.1.2. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları

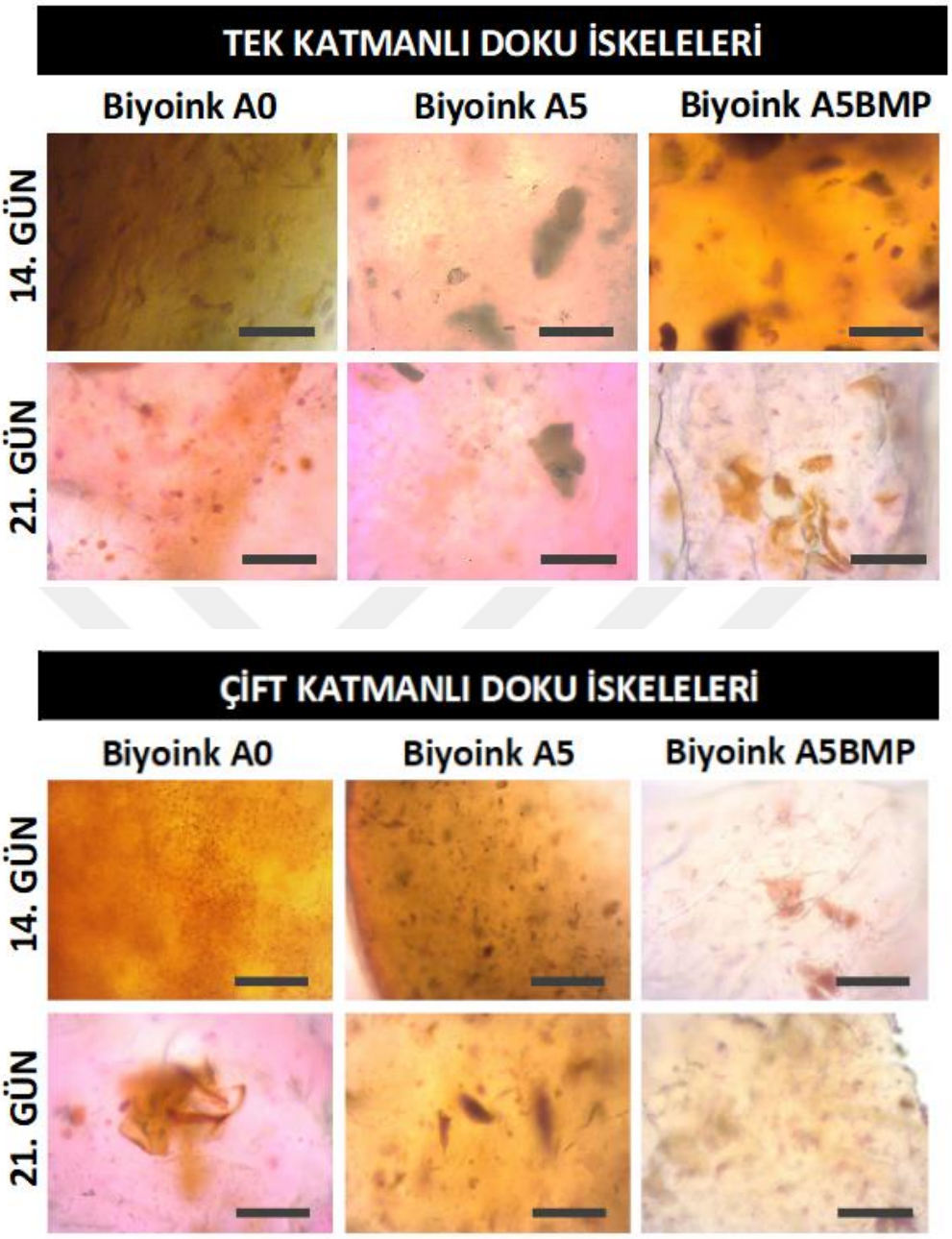
Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Alizarin Red S boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.16.1.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.17: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Alizarin Red S boyaması sonuçları (ölçek çubuğu = 200 µm).

3.6.1.3. Von Kossa Boyaması Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Von Kossa boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.16.1.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de verilmiştir.

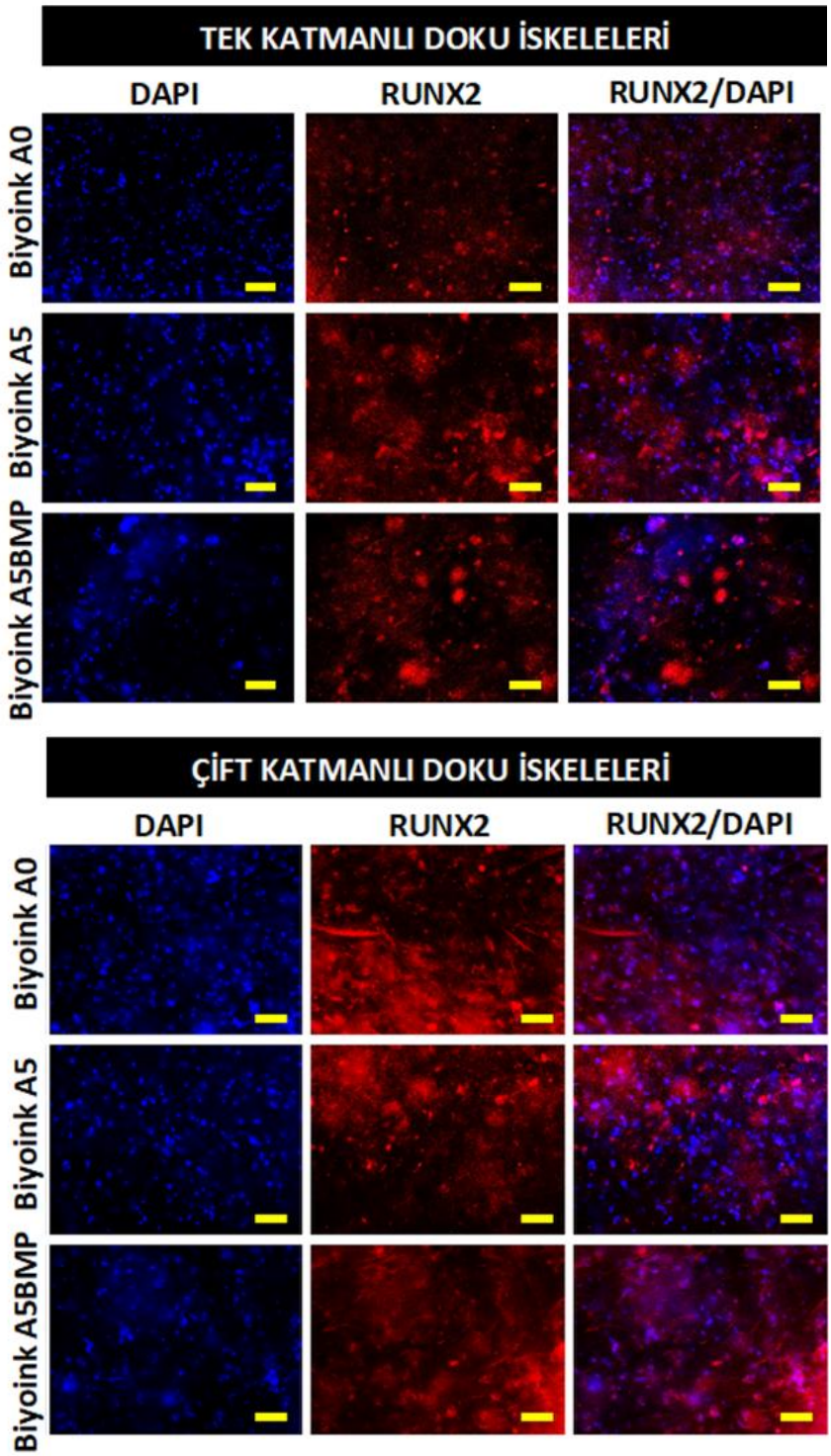


Şekil 3.18: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Von Kossa boyaması sonuçları (ölçek çubuğu = 20 µm).

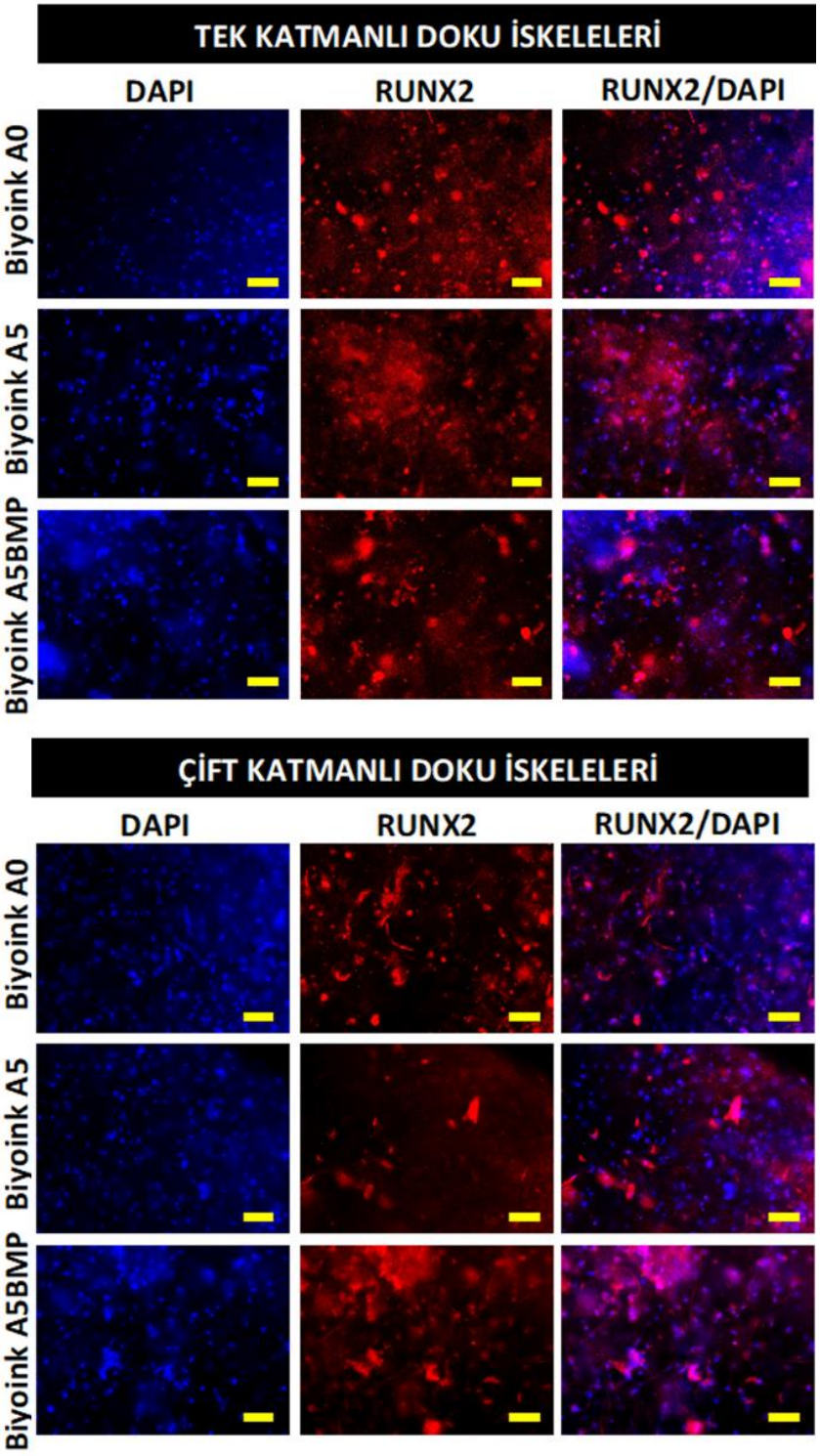
3.6.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde RUNX2/DAPI boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.16.2'de

belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'da verilmiştir.



Şekil 3.19: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14. gün inkübasyon sonrası DAPI/RUNX II boyama sonuçları (ölçek çubuğu: 100 µm).



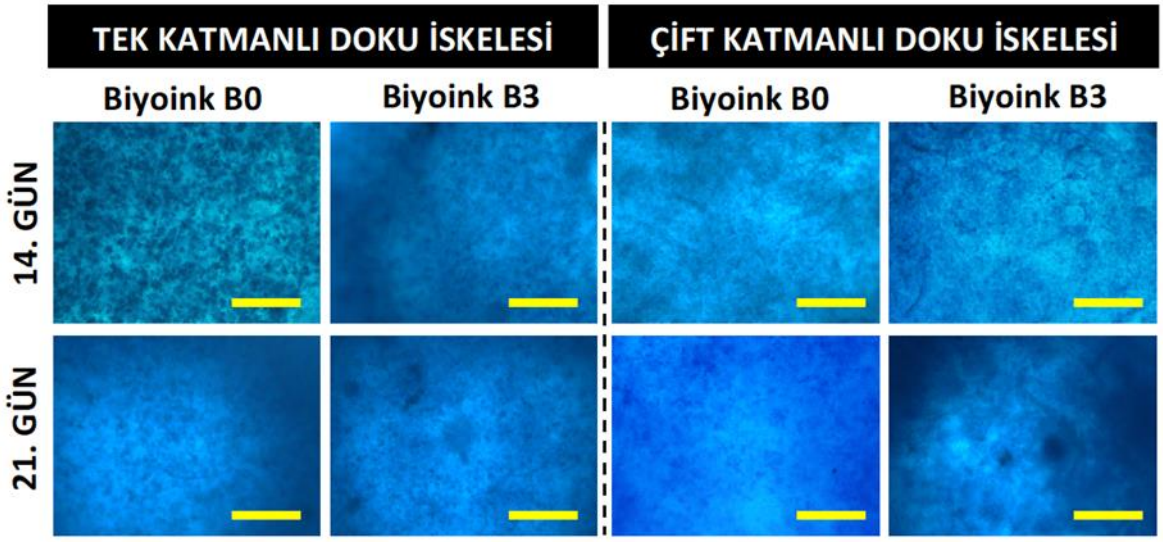
Şekil 3.20: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası DAPI/RUNX II boyama sonuçları (Ölçek çubuğu: 100 µm).

3.7. Kondrojenik Farklılaşma Sonuçları

3.7.1. Kondrojenik Histolojik Boyamalar

3.7.2. Alcian Blue Boyaması Sonuçları

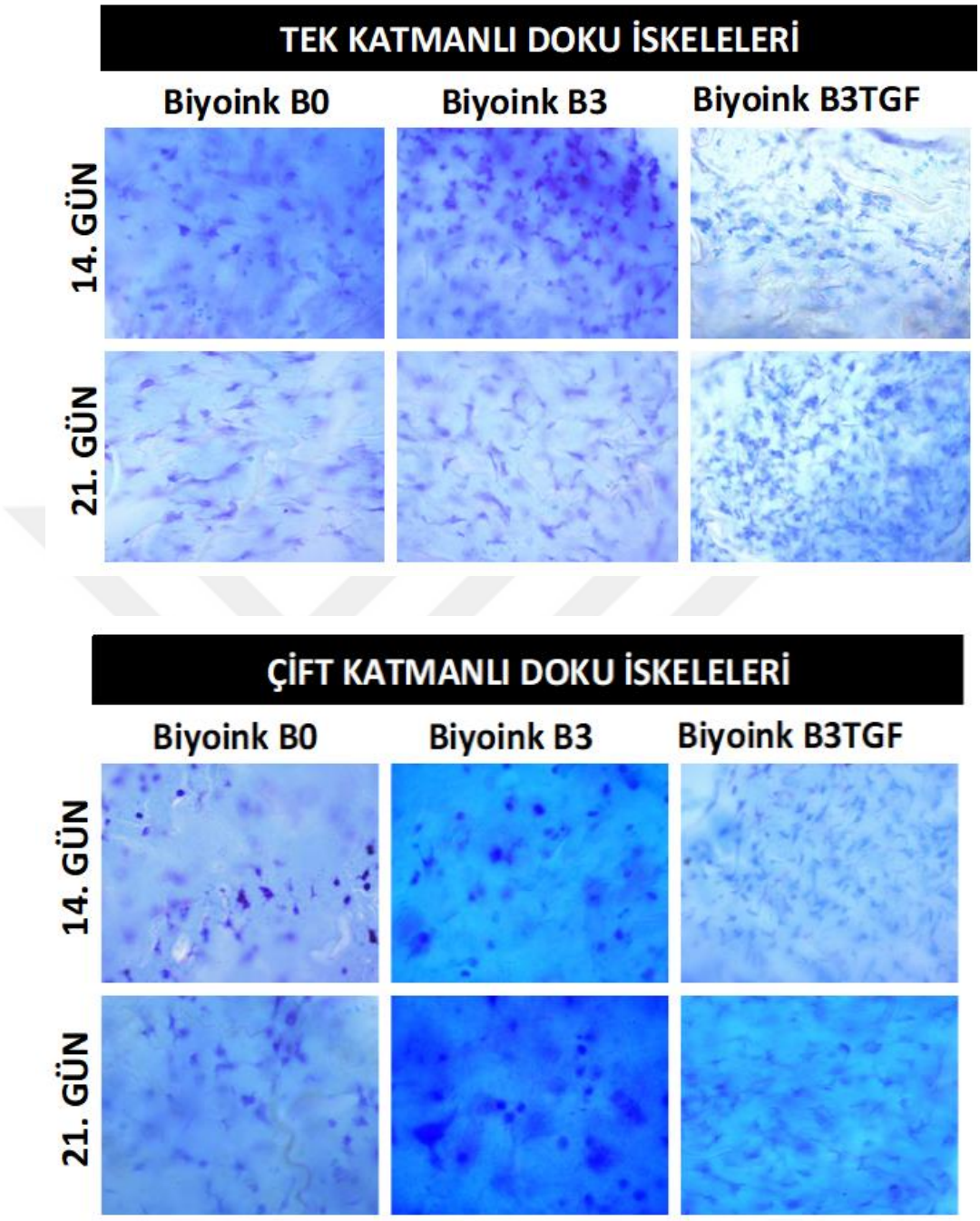
Kemik (Biyoink A0 ve Biyoink A5) ve kıkırdak (Biyoink B0 ve Biyoink B3) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Alcian Blue boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.17.1.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.21: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Alcian Blue boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 200 µm).

3.7.1.2. Toluidin Mavisi Boyaması Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Toluidin Mavisi boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.17.1.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22'de verilmiştir.

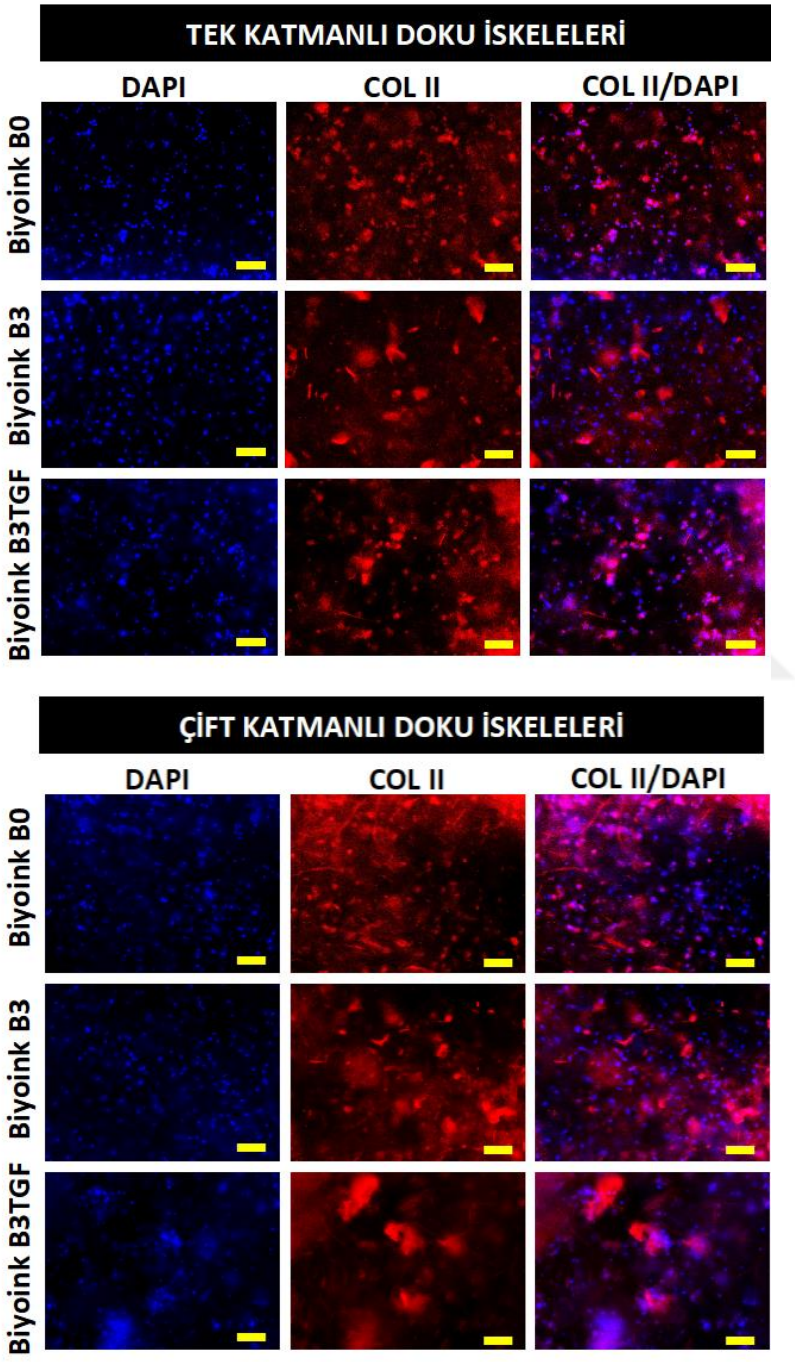


Şekil 3.22: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14 ve 21. gün inkübasyon sonrası Toluidin mavisi boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 20 µm).

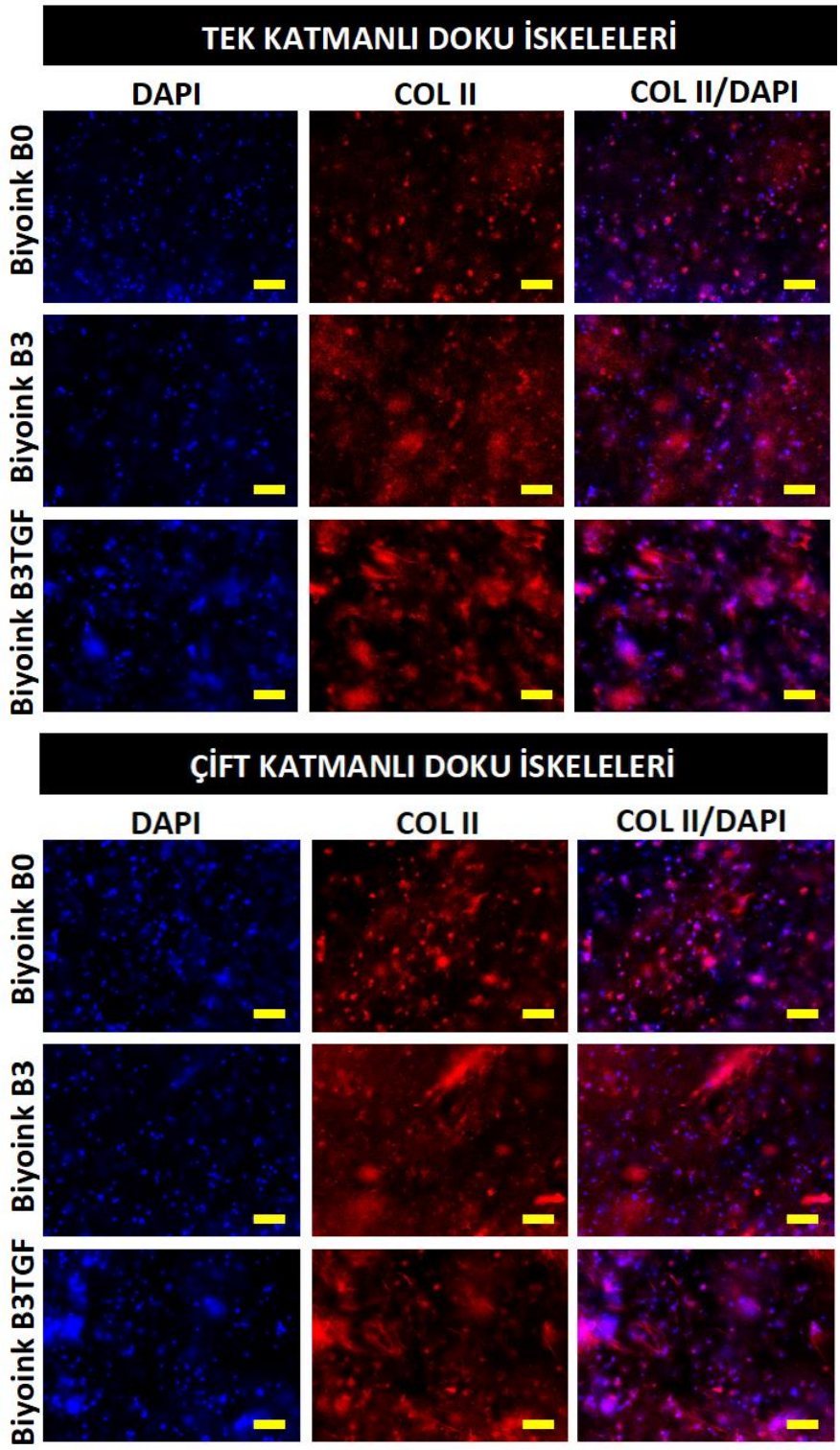
3.7.3. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm

2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde COLII/DAPI boyamaları yapılmıştır. Boyamalar Bölüm 2.17.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'de verilmiştir.



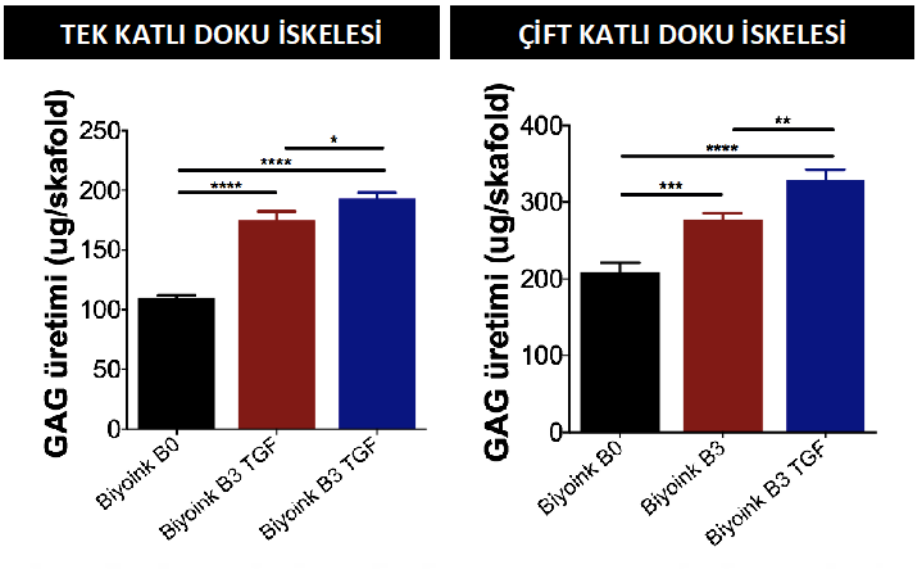
Şekil 3.23: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 14. gün inkübasyon sonrası DAPI/COL II boyama sonuçları (ölçek çubuğu: 100 µm).



Şekil 3.24: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası DAPI/COL II boyama sonuçları (ölçek çubuğu: 100 µm).

3.7.4. GAG Analiz Sonuçları

Kemik (Biyoink A0, Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP) ve kıkırdak (Biyoink B0, Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF) biyoinklerinin içerisinde enkapsüle edilerek Bölüm 2.16'da belirtildiği şekilde hazırlanan hBMMSC yüklü tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde Bölüm 2.15'de belirtildiği şekilde kültüre edilen örneklerin GAG salınım sonuçları Şekil 3.25'de verilmiştir.



Şekil 3.25: Tek ve çift tabakalı doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 21. gün inkübasyon sonrası GAG üretimi (ns: p>0,05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001).

4. TARTIŞMA

Osteokondral dokuda meydana gelen hasarların tedavisine yönelik çözümler oldukça kısıtlıdır. Eklem kıkırdağının avasküler yapıda olması iyileşme süreçlerini oldukça olumsuz etkilemektedir. Subkondral kemiğe kadar inen lezyonlarda, otogreft tedavi için sağlıklı alanın yetersizliği, allogreft ameliyatların immüjeniteye neden olması ve donör eksikliği nedeniyle kesin çözümlerini hastalar için sunamamaktadır. Rejeneratif tedaviler için doku mühendisliği çalışmaları ile birlikte bifazik doku iskelelerin üretimi ve kök hücreler ile başarılı bir şekilde birleştirilmesi sağlanmaktadır. Osteokondral dokuda yer alan kıkırdak ve kemik, birbirlerinden farklı yapı, mekanik ve biyokimyasal mikroçevrelere sahiptir bu nedenle uygun doku iskeleleri seçimi çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında osteokondral defektler için bifazik olarak tasarlanmış kemik ve kıkırdak hidrojelleri ile enkapsüle edilen kemik iliği kök hücreleri 3B Biyoyazıcı ile basılmıştır. Osteojenik ve kondrojenik farklılaşma çalışmaları yürütülmüştür. Bulgular tartışılarak değerlendirilmiştir.

4.1. LDH Nanopartiküllerinden Sitotoksisite Analizi Sonuçları

MTT sonuçlarına göre (Şekil 3.1), 48. saatin sonunda 0,5-15 mg/mL arasındaki dozların osteoblast hücrelerine karşı *in vitro* toksik etki göstermediği saptanmıştır. Ağırlıkça %5 LDH içeren Biyoink A5 ve ağırlıkça %3 LDH içeren Biyoink B3 doku iskelelerinde kullanılan LDH miktarlarının osteoblast hücreleri üzerinde toksik bir etki gözlenmemiştir. LDH nanopartikülleri hücrelerin proliferasyon hızını artırarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı sonuçlar vermiştir. 15 mg/ml LDH içeren besiyeri içerisindeki hücrelerin kontrol grubuna yakın yüzdede canlılık gösterdiği görülmüştür. Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, Wu ve arkadaşları çalışmalarında benzer içerkteki LDH nanopartiküllerinin (≈100nm) embriyonik kök hücrelerin yaşayabilirliği üzerindeki etkisini MTT analizi ile değerlendirmişler ve herhangi bir toksik etki (2-40 μg/mL) gözlemlememişlerdir (Wu ve ark., 2015). Bir başka çalışmada, LDH nanopartikülleri (≈100nm) ile preosteoblast hücreleri üzerinde çalışılmış ve 0,02 mg/mL konsantrasyona kadar toksik olmadığı sonucuna varılmıştır (Kang ve ark., 2018). Proje kapsamında elde edilen sonuçlar ve literatür sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, LDH

nanopartiküllerinin doku mühendisliği uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.2. Büyüme Faktörü Yüklü LDH Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi Sonuçları

Bölüm 2.7.1'de belirtilen formül ile hesaplamalar sonucu BMP-2 veya TGF-β1 yüklenmiş LDH nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Tablo 3.1'e göre BMP-2 yüklü LDH nanopartikülleri % yükleme verimi 48,05 ± 2,32 ve ilaç yükleme miktarı 0,48 ± 0,0316 µg BMP-2/mg LDH olarak bulunmuştur. TGF-β1 yüklü LDH nanopartikülleri % yükleme verimi ise 51,8 ± 3,47 ve ilaç yükleme miktarı 0,207 ± 0,0042 µg TGF-β1/mg LDH olarak bulunmuştur.

4.3. LDH Nanopartiküllerinden Büyüme Faktörü Salım Sonuçları

LDH nanopartiküllerinden BMP-2'nin *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.2'de verilmiştir. Buna göre salım çalışmalarının yüklenen BMP-2'nin %48,01'i ilk 60 dakika sonunda serbestleşmiştir. 120 dakika sonra %69,71 oranında BMP-2 serbestleşmiştir. 6. saat sonunda yüklenen BMP-2'nin %97,21'i serbestleşmiştir.

LDH nanopartiküllerinden TGF-β1'nin *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.3'de verilmiştir. Buna göre salım çalışmalarının yüklenen TGF-β1'in %51,65'i ilk 60 dakika sonunda serbestleşmiştir. 120 dakika sonra %74,37 oranında TGF-β1 serbestleşmiştir. 6. saat sonunda yüklenen TGF-β1'in %98,08'i serbestleşmiştir.

BMP-2 veya TGF-β1 içeren LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinden, büyüme faktörlerinin salımı için belirlenen miktar nanopartikül, belirli miktar PBS çözeltisi (pH 7.4) ile dispers edilmiştir ve 37 ± 0,5°C sıcaklıkta ve 100 rpm sabit hızda karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında numune alınarak, ortamda sink koşulunu sağlamak üzere eksilen miktar fosfat tamponu ile tamamlanmıştır. Alınan numunelerdeki büyüme faktörü miktarı ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. BMP-2 yüklü LDH nanopartikülü içeren doku iskelelerinden *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.3'de verilmiştir. Buna göre salım çalışmalarının

yüklenen BMP-2'nin %26,595'i ilk 24 saatin sonunda serbestleşmiştir. 7 gün sonra %77,72 oranında BMP-2 serbestleşmiştir. 10. Gün sonunda yüklenen BMP-2'nin %89,74'ü serbestleşmiştir. TGF-β1 yüklü LDH nanopartikül içeren doku iskelelerinden *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.3'de verilmiştir. Buna göre salım çalışmalarının yüklenen TGF-β1'in %27,44'ü ilk 24 saatin sonunda serbestleşmiştir. 7 Gün sonra %81,51 oranında TGF-β1 serbestleşmiştir. 10. gün sonunda yüklenen TGF-β1'in %94,17'si serbestleşmiştir.

Elde edilen sonuçlardan da anlaşılacağı üzere büyüme faktörü yüklü LDH nanopartikülleri bulundukları doku isklelerinden kontrollü bir şekilde BMP-2 ve TGF-β1 salımı yapabilmişlerdir.

4.4. Doku İskelelerinde hBMMSC Adezyonu Sonuçları

4.4.1. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları

Şekil 3.4'de PrestoBlue analizi ile doku iskelelerinin üzerine ekilen hBMMSC'lerin proliferasyon hızları sonuçları verilmiştir. Kemik dokuyu taklit etmek üzere geliştirilen doku iskelelerine bakıldığında; Biyoink A0 doku iskelelerinde 1. günde 16308 ± 1661 floresan yoğunluk gözlemlenirken 7. günde 32126 ± 2573 floresan yoğunluk değerlerine yükselmiştir (1 hafta sonunda 1,97 kat artış). Biyoink A5 doku iskelelerinde ise 1. günde floresan yoğunluk 16735 ± 1257 değerinden 7. günde 36006 ± 3546 değerine ulaşmıştır (1 hafta sonunda 2,15 kat artış). Kıkırdak dokuyu taklit etmek üzere geliştirilen doku iskelelerinde ise; Biyoink B0 doku iskeleleri 1. günde 14718 ± 2454 floresan yoğunluk gösterirken 7. günde 30741±9128 floresan yoğunluk göstermiştir (1 hafta sonunda 2,09 kat artış). Biyoink B3 doku iskelelerinde ise 1. günde 15702 ± 2027 değerinden 7. günde 38425 ± 3507 değerine ulaşılmıştır (1 hafta sonunda 2,45 kat artış).

Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, doku iskelelerine katılan LDH nanopartiküllerinin hücrelerin proliferasyon hızlarında artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.2. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları

Biyoink A ve Biyoink B doku iskelelerinin kök hücre adezyonu kabiliyetlerinin belirlemesi kapsamında Alexa Fluor 488/DAPI boyalamaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.5, hBMMSC'lerin doku iskelelerinin üzerine ekilmesinden sonraki 1., 3. ve 7. gündeki görüntülerini göstermektedir. hBMMSC'lerin doku iskelelerinin üzerine ilk ekimin ardından tüm örneklerin yüzeylerine kolayca bağlandığı gözlemlenmiştir (1. gün sonuçları). Görüntüler tüm doku iskelelerinin biyouyumlu olduğunu ve kök hücrelerin geliştirilen malzemelerin yüzeylerine bağlanıp çoğalabildiğini ve morfoloji aldığını göstermektedir.

4.5. hBMMSC Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.5.1. hBMMSC Canlılık Analizi Sonuçları

3B-Biyobaskı işleminin doku iskelelerinde enkapsüle edilen hücrelerin canlılığına etkisini bilmek için, 3B-biyobasım sonrası canlılık testleri gerçekleştirilmiştir. ImageJ programı kullanılarak kantitatif hesaplamalar yapılmıştır (Fomby ve Cherlin, 2011). Şekil 3.6'da görüldüğü üzere, hBMMSC yüklü Biyoink A0 ve Biyoink A5 doku iskelelerinde basım sonrası (0. Gün) % hücre canlılıkları sırasıyla 80,8 ± 1,4 ve 88,9 ± 1,3 olarak hesaplanmıştır. Biyoink B0 ve Biyoink B3 doku iskelelerinde ise sırasıyla 86,7 ± 0,98 ve 89,4 ± 2,20'dir. Basım sonrası % hücre canlılığı sonuçlarındaki bu iyileşmenin yapıya katılan LDH nanopartiküllerinin basım sırasında oluşan kesme gerilimine karsı tampon görevi görerek (shear-thining davranışı: kayma altında incelme) hücreleri koruduğu görülmektedir. Basım sonrası 1-7.gün sonuçları incelendiğinde, LDH nanopartiküllerinin olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuçlar basım sonrası 3B-yapıda enkapsüle edilen hücrelerin besin maddelerine kolaylıkla erişebildiğini göstermektedir.

4.5.2. hBMMSC Çoğalma Hızı Analizi Sonuçları

Şekil 3.8 'de PrestoBlue analizi ile doku iskelelerinde enkapsüle edilen kök hücrelerin proliferasyon hızları sonuçları görülmektedir. Kemik dokuyu mimik edecek doku iskelelerine bakıldığında, Biyoink A0 doku iskelelerinde 1. günde 11090 ± 469 floresan yoğunluk gözlemlenirken 7. günde 14070 ± 943 floresan yoğunluk değerlerine yükselmiştir (1 hafta sonunda 1,27 kat artış). Biyoink A5 doku iskelelerinde ise 1.

günde floresan yoğunluk 10729 ± 356 değerinden 7. günde 12378 ± 58 değerine ulaşmıştır (1 hafta sonunda 1,15 kat artış). Kıkırdak dokuyu mimik edecek doku iskelelerinde ise; Biyoink B0 doku iskeleleri 1. günde 8737 ± 118 floresan yoğunluk gösterirken 7. günde 9995 ± 529 floresan yoğunluk göstermiştir (1 hafta sonunda 1,14 kat artış). Biyoink B3 doku iskelelerinde ise 1. günde 11955 ± 435 değerinden 7. günde 14610 ± 604 değerine ulaşılmıştır (1 hafta sonunda 1,22 kat artış). LDH nanopartiküllerinin hücrelerin proliferasyon hızlarında olumsuz bir etkiye neden olmadığı görülmüştür.

4.5.3. hBMMSC DAPI/Actin Analizi Sonuçları

Şekil 3.9 – Şekil 3.10'da hBMMSC yüklü doku iskelelerinde 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrası hücre morfolojileri görülmektedir. Doku iskelelerinde enkapsüle edilen hBMMSC'lerin 1. günleri arasında morfolojik açıdan bir fark görülmemektedir. 3. günlere bakıldığında ise, LDH nanopartikül içeren doku iskelelerinde (Biyoink A5 ve Biyoink B3) hücrelerin morfoloji almaya başladıkları gözlemlenmiştir. 7. günün sonunda ise tüm gruplardaki hücrelerin morfoloji alarak jel içerisine konumlandıkları gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar, geliştirilen doku iskelelerinde kullanılan LDH nanopartiküllerin hücrelerin morfoloji almalarına destek olduğu sonucunu göstermiştir.

4.5.4. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Canlılık Analizi

Çift tabakalı doku iskelelerinde basımdan hemen sonra (0. gün) 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrasında (Şekil 3.11) Live&Dead kiti ile analizler yapılmış ve 0. günde özellikle Biyoink A5/Biyoink B3 grubunda ölü hücre sayısının Biyoink A0/Biyoink B0 grubuna göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç yapıya katılan LDH nanopartiküllerinin basım sırasında oluşan kesme gerilimine karsı tampon görevi görerek (shear-thining davranışı: kayma altında incelme) hücreleri koruduğunu göstermiştir. 1, 3 ve 7. günlerde ölü-canlı hücre oranlarında büyük farklar görülmemektedir. Hücre içi esteraz aktivitesini göstermek için yeşil floresan Calcein-AM ve plazma membran bütünlüğü kaybını belirtmek için kırmızı floresan Ethidium homodimer-1 ile aynı anda boyayarak canlıyı ölü hücrelerden hızla ayırt eden bu yöntemde biyobasım sırasında hücre canlılığının korunduğu ve özellikle LDH grupları içeren çift tabakalı doku iskelesinde 7. günde hücrelerin bir araya gelerek uzantılar

oluşturduğu görülmektedir. Her iki doku iskelesi de hBMMSC'ler için biyouyumlu bir ortam oluşturmuştur.

4.5.5. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Çoğalma Hızı Analizi

Şekil 3.12'de PrestoBlue analizi ile doku iskelelerinin üzerine ekilen hBMMSC'lerin proliferasyon hızları sonuçları verilmiştir. Osteokondral dokuyu taklit etmek üzere geliştirilen çift tabakalı doku iskelelerine bakıldığında; Biyoink A0 /Biyoink B0 doku iskelelerinde 1. günde 11230 ± 699 floresan yoğunluk gözlemlenirken 7. günde 15121 ± 1812 floresan yoğunluk değerlerine yükselmiştir (1 hafta sonunda 1,34 kat artış). Biyoink A5 /Biyoink B3 çift katmanlı doku iskelelerinde ise 1. günde floresan yoğunluk 11566 ± 369 değerinden 7. günde 16357 ± 636 değerine ulaşmıştır (1 hafta sonunda 1,41 kat artış).

Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, osteokondral dokuyu taklit etmek üzere geliştirilen çift katmanlı doku iskelelerinde yapıya katılan LDH nanopartiküllerinin hücrelerin proliferasyon hızlarında artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5.6. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin DAPI/Actin Analizi

Biyoink A0/Biyoink B0 ve Biyoink A5/Biyoink B3 hBMMSC-yüklü çift tabakalı doku iskelelerinin 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrası hücre morfolojilerinin belirlenmesi kapsamında Alexa Fluor 488/DAPI boyalamaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.13'de hBMMSC'lerin doku iskelelerine enkapsüle edildikten sonra 1. günden itibaren sitoplazmalarının genişlemeye başladığı ve yuvarlak morfolojilerinin özellikle 3. günden itibaren sitoplazmik uzantılar göstermeye başladığı görülmektedir. 20x ve 40x görüntülemeler ile incelenen hücre morfolojilerinin 7. gün görsellerinde her iki doku iskelesindeki hücrelerin 3. güne kıyasla daha geniş sitoplazmik alana ve uzantılara sahip olduğu görülmektedir. Biyoink A5/Biyoink B3 çift katlı doku iskelesindeki hBMMSC hücrelerinin daha geniş uzun sitoplazmik çıkıntılarda bulunması LDH nanopartikülü içeren doku iskelelerinin hücrelerin morfolojik karakterlerini göstermesi için daha elverişli olduğunu göstermektedir. Tüm sonuçlar, geliştirilen doku iskelelerinde kullanılan LDH nanopartiküllerin hücrelerin morfoloji almalarına destek olduğu sonucunu göstermiştir.

4.5.7. hBMMSC Yüklü Çift Tabakalı Doku İskelelerinin Cell Tracker ile Analizi

Biyoink A0/Biyoink B0 ve Biyoink A5/Biyoink B3 hBMMSC-yüklü doku iskelelerinin 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrası hücrelerin hareketliliği ve doku iskeleleri arası birbirleri ile olan etkileşimlerinin incelenmesi için Cell Tracker Red ve Cell Tracker Blue boyalamaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.14'de kırmızı ile boyanan kemik doku ve mavi ile boyanan kıkırdak doku hücreleri basım sonrası (0. gün) ve 1. günde doku iskelesi içinde homojen ve yuvarlak formda görülmektedir. 3. günden itibaren hücrelerin morfoloji almaya başladıkları ve iki doku iskelesinin birleşme bölgesinde (orta bölge) mora kaçan renk değişimleri olduğu ve böylece hücrelerin jeller arasında geçiş yapmaya başladığı sonucuna varılmıştır. Kültürün 7. gününde ise hücrelerin morfolojilerinin daha uzun olduğu ve çift fazlı doku iskelesinin renklerinin 1. gündeki görüntülere göre farklı olduğu ve birleşme bölgesinde yoğun bir renk farkı ile hücrelerin etkileşiminin ve göçünün arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar çift tabakalı doku iskelesinin hücrelerin hareketliliği ve hücre sinyal iletimi ile birbirleriyle olan etkileşimine olanak sağladığını göstermiştir.

4.6. Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

4.6.1. Osteojenik Histolojik Boyamalar

4.6.1.1. Hemotoksilen Eosin Boyaması Sonuçları

Tek katmanlı doku iskeleleri içerisine enkapsüle edilen hücreler Hemotoksilen Eosin ile boyanmıştır. Osteojenik ve kondrojenik farklılaşma besiyerleri içerisinde 14 ve 21 güne kadar inkübe edilmiştir. Hücrelerin doku iskelesi içerisindeki yoğunluğu ve konumları incelenmiştir (Şekil 3.15). Kemik doku iskelelerinde 14. günlerde hücre uzantıları bulunmayan yuvarlak hücreler görülürken, 21. günde her 3 grupta da hücre uzantılarının artışı dikkat çekmektedir. Kıkırdak doku iskelelerinde 14. ve 21. günlerde ise, yassı karakterde ve uzantılara sahip hücreler görülmüştür. 21. günde Biyoink B3TGF doku iskelesindeki hücrelerin bir araya gelerek uzantılarını birleştirdikleri görülmektedir. İncelenen 6 farklı doku iskelesinde 21. gündeki görüntülerin 14. gündeki hücre görüntülerine kıyasla daha uzantılı morfoloji aldığı ve Biyoink B3TGF-yüklü hücrelerin 2B kültürdeki hBMMSC morfolojilerine benzer şekilde prolife oldukları

görülmüştür. LDH nanaopartikül içeren doku iskeleleri, LDH nanaopartikül içermeyen doku iskelelerine kıyasla hücreler için daha uyumlu ortam oluşturmuştur. Ek olarak, BMP ve TGF yüklü LDH nanopartikül içeren doku iskeleleri 21. günde en iyi hücre uzantısına sahip gruplardır.

Çift katmanlı doku iskelelerinde, Biyoink A0/Biyoink B0 grubunda enkapsüle edilen hücreler 14. günde yuvarlak morfolojide oldukları gözlemlenirken, 21. günde uzantılarının olduğu görülmektedir (Şekil 3.16). Biyoink A5/Biyoink B3 hücre-yüklü doku iskeleleri 14. günde sitoplazmik uzantılar göstermeye başlamıştır ve 21. günde hücre uzantılarının arttığı ve hücreleri bir araya geldiği görülmektedir. Biyoink A5BMP/Biyoink B3TGF hücre-yüklü doku iskelelerinde ise 14. günden itibaren hücre yoğunluğunun ve hücre uzantılarının fazla olduğu görülmektedir. 21. günde hücre sitoplazmalarının ve uzantılarının genişlediği görülmektedir. BMP ve TGF yüklü LDH nanopartiküllerin hücrelerin proliferasyonunu ve uzantı oluşturmalarını desteklediği sonucuna varılmıştır.

4.6.1.2. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları

Mezenkimal kök hücreler, farklılaşma öncesinde hücre dışı kalsiyum birikmesine sahip değillerdir. Farklılaşma protokolü uygulanmasının ardından osteoblastlara dönüşen hücrelerde kalsiyum birikmesi görülmektedir. Bu da hücrelerin kemik oluşumu ve osteoblastlara başarılı şekilde farklılaşabildiğinin göstergesidir. Oluşan kalsiyum birikmesi, Alizarin Red boyaması ile kırmızı-turuncumsu bir renkte gözlemlenebilmektedir. Şekil 3.17'de 14 ve 21 gün boyunca kültürlenen doku iskelelerinin Alizarin Red S boyama sonuçları görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde, LDH nanopartikül içeren grupta (Biyoink A5) kalsiyum birikiminde artış olduğu gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen Alizarin Red boyaması ile doku iskelelerin içerisinde bulunan LDH nanopartiküllerinin osteojenik farklılaşmayı indüklediği görülmüş olup, elde edilen sonuçların literatürü desteklediği sonucuna varılmıştır (Kang ve ark., 2018).

4.6.1.3. Von Kossa Boyaması Sonuçları

Von Kossa boyaması ile yoğunluğa göre kahverengiden siyaha kadar gözlemlenebilen kalsiyum birikiminin 14. günden itibaren tek katmanlı ve çift katmanlı doku iskelelerinde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). Tek katmanlı LDH

nanopartikülü içermeyen doku iskelelerinde (Biyoink A0) hücreler ve ECM'lerinde kahverengi tonlarında görüntüler gözlemlenirken, Biyoink A5 doku iskelelerinde kalsiyum birikimini gösteren Von Kossa ile daha geniş alanlarda ve koyu renkte boyanmış görüntüler elde edilmiştir. En yoğun kalsiyum birikimi Biyoink B5BMP doku iskelelerinde gözlemlenmiştir. BMP yüklü LDH nanopartikülü içeren grupta (Biyoink A5BMP), hücrelerde kalsiyum birikiminin fazla olması LDH partiküllerinden salınan BMP moleküllerinin hBMMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını yukarı yönde regüle ettiğini göstermiştir.

Çift katmanlı doku iskelelerinde 14. günden itibaren Von Kossa boyanma yoğunluğunun arttığı görülürken Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP gruplarında kontrole göre boyanma yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP doku iskelelerinde 21. günde hücrelerin ECM çevresinde boya birikiminin arttığı ve renklerinin sarıdan siyaha doğru döndüğü gözlemlenmiştir. LDH nanopartikülünün osteojenik farklılaşmayı kontrole göre artırdığı belirlenmiştir.

4.6.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

Osteojenik farklılaşma analizleri kapsamında immünofloresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kemik ile ilişkili Runx2 geni protein ekspresyon düzeyi incelenmiştir (Şekil 3.19-Şekil 3.20). 14. gün analiz sonuçlarına göre tek katmanlı doku iskelelerinde, Biyoink A0'nın sitoplazmasında Runx2 protein ekspresyon seviyesinin Biyoink A5 ve Biyoink A5BMP'ye göre daha az olduğu (daha az ışıma) gözlemlenmiştir (Şekil 3.19). hBMMSC-yüklü Biyoink A5 doku iskelesindeki hücrelerin bir araya gelerek kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda Runx2 protein sentezi gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. 14. gün Biyoink A5BMP gruplarında hücrelerin gen ekspresyonlarının diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür. En çok ekspresyon düzeyi BMP yüklü LDH nanopartikülleri içeren doku iskelelerinde (Biyoink A5BMP) iken, LDH nanopartikül içeren doku iskelelerinde (Biyoink A5) de kontrol grubuna göre (Biyoink A0) Runx2 protein ekspresyonunu artırıcı etkisi olduğu sonuna varılmıştır. Çift katmanlı doku iskelelerinde Runx2 aktivitesinin tek katmanlı doku iskelelerine kıyasla daha fazla olduğu ve daha geniş bir alanda sekonder bağlanmasına bağlı ışıma verdiği görülmüştür. Ek olarak, Biyoink A5BMP doku iskelelerinde hücrelerin daha geniş sitoplazmaya sahip olduğu görülmüştür.

21. gün immünofloresan sonuçlarına göre (Şekil 3.20), tek katmanlı ve çift katmanlı doku iskelelerinde hücrelerin Runx2 gen ekspresyon seviyelerinin 14. güne göre artış gösterdiği görülmüştür. Biyoink A5BMP doku iskelelerinde Runx2 seviyesinin daha yoğun olduğu görülmüştür. Çift katmanlı doku iskelesinde Biyoink A0 grubunda fazla sayıda yuvarlak morfolojide hücre boyanırken, Biyoink A5 grubundaki hücrelerin daha geniş bir yüzeye yayıldığı ve boya yoğunluğunun fazla olduğu görülmüştür. En anlamlı ve yoğun boyanma Biyoink A5BMP grubunda gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlar, yapıda bulunan BMP yüklü LDH nanopartiküllerinin osteojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermiştir.

4.7. Kondrojenik Farklılaşma Sonuçları

4.7.1. Kondrojenik Histolojik Boyamalar

4.7.1.1. Alcian Blue Boyaması Sonuçları

Şekil 3.21'de 14 ve 21 gün boyunca kültürlenen (Biyoink B0 ve Biyoink B3) doku iskelelerinin tek katmanlı ve çift katmanlı Alcian Blue boyama sonuçları görülmektedir. Tüm doku iskelelerinde GAG ekspresyonunun desteklendiği hücre sitoplazmalarının yoğun boyanması ile gözlemlenmiştir. Özellikle Biyoink B3 gruplarında lokal yoğun boyanmalar ECM dokusunda yoğun GAG ekspresyonunun olduğunu ve LDH nanopartiküllerinin GAG sentezini yukarı regüle ettiğini göstermiştir.

4.7.1.2. Toluidin Mavisi Boyaması Sonuçları

Tek katmanlı ve çift katmanlı kıkırdak doku iskelelerinde GAG birikimi tayini için yapılan Toluidin mavisi sonuçları Şekil 3.22'de gösterilmiştir. Tek katmanlı doku iskelelerinde 14. günde mavi renk yoğunluğunda görülen hücreler 21. günde renklerinin mora dönmesiyle GAG sentezinin arttığını nitel olarak göstermiştir. 21. günde hücre morfolojileri uzantılar yapmış ve boyayı daha yoğun olarak almıştır. En yoğun boyanma Biyoink B3TGF grubunda görülmüştür. 21. günde Biyoink B0 ve Biyoink B3 arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak, 14. günde Biyoink B3 doku iskelesinin Biyoink B0 grubuna göre hücrelerde daha fazla GAG birikimine sebep olduğu boyama yoğunluğu artışla gözlemlenmiştir.

Fibroin nanohibrit doku iskeleleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. JelMA/ChitMA temelli doku iskelelerine LDH nanopartikül katkısı ile doku

iskelelerininin mekaniksel özellikleri ve degredasyon hızları iyileştirilmiştir. Çift katmanlı Biyoink B0 ve Biyoink B3TGF doku iskelelerinde hücreler uzantılar oluşturarak boyayı yoğun bir şekilde almışlardır. 21. günde hücre uzantılarının arttığı görülmüştür. 14. ve 21. günde Biyoink B3 grubunun daha yoğun miktarda boya aldığı ama hücrelerin yuvarlak morfolojide kaldığı görülmüştür.

4.7.2. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

Kondrojenik farklılaşma analizleri kapsamında immünofloresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kıkırdak ile ilişkili Col-II geni protein ekspresyon düzeyi incelenmiştir (Şekil 3.23-Şekil 3.24). Tek katmanlı doku iskelelerinde 14. günde tüm gruplarda Col-II protein ekspresyonun yaklaşık olarak aynı seviyelerde olduğu görülmüştür. hBMMSC yüklü-Biyoink B3 doku iskelesindeki hücrelerin morfolojilerinin daha büyük ve uzantılı olduğu görülmüştür. Çift katmanlı doku iskelelerinde Col-II aktivitesinin tek katlı doku iskelelerine kıyasla daha yüksek seviyede olduğu ve daha geniş bir alanda sekonder bağlanmasına bağlı ışıma verdiği görülmüştür. Biyoink B3TGF doku iskelesinde, diğer gruplara göre daha yüksek Col-II geni protein ekspresyon düzeyinin bulunduğu düşünülmektedir. Biyoink B3 ve Biyoink B0 doku iskelesinde Col-II sentez miktarlarının benzer olduğu görülmüştür.

21. gün IF sonuçlarına göre (Şekil 3.24), tek katmanlı ve çift katmanlı doku iskelelerinde hücrelerin Col-II gen ekspresyon seviyelerinin 14. güne göre artış sağladığı görülmüştür. Her iki grupta da Biyoink B3TGF doku iskelelerinde Col-II aktivitesi daha yoğun olarak görülmüştür. Tek katmanlı doku iskelelerinde LDH nanopartikülü içeren doku iskelesinde (Biyoink A5) ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Çift katmanlı doku iskelesinde Biyoink B0 grubunda fazla sayıda yuvarlak morfolojide hücre boyanırken ve Biyoink B3 ve Biyoink B3TGF grubundaki hücrelerin daha geniş alana yayıldığı ve boya yoğunluğunun fazla olduğu görülmüştür. En anlamlı ve yoğun boyanma Biyoink B3TGF grubunda gerçekleşmiştir. Sonuçlar TGF yüklü LDH nanopartiküllerinin kondrojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermiştir.

4.7.3. GAG Analiz Sonuçları

Tek ve çift katmanlı doku iskelelerinin kondrojenik farklılaşma potansiyellerinin bir göstergesi olan GAG analizleri, kültür sırasında ortamdan alınan besiyeri

örneklerinin GAG kiti kullanılarak okunmasıyla gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin GAG salınımı sonuçları Şekil 3.25'de verilmiştir. 21 gün boyunca inkübe edilen hBMMSC-yüklü doku iskelelerinden GAG salınımı beklediğimiz düzeyde kontrol grubundan (Biyoink B0) TGF yüklü LDH nanopartikül içeren gruba (Biyoink B3TGF) doğru artış göstermiştir. Tek katmanlı doku iskelelerinde LDH nanopartikül içermeyen grupta (Biyoink B0), çift katmanlı doku iskelesine göre GAG salım miktarında yaklaşık 1,9 katlık bir azalma gözlenmiştir. Tek katmanlı doku iskelelerinde Biyoink B0 grubunda GAG salınımı 109,6 ± 2,2 µg/skafold seviyelerinde iken, Biyoink B3 grubunda 174,7 ± 7,7 µg/skafold seviyelerine yükselmiştir. Biyoink B3TGF grubunda ise 193 ± 5,1 µg/ml'lık en yüksek GAG salınımı gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, GAG salım miktarlarında doku iskelelerine LDH nanopartikül katkısıyla bir artış gözlemlenirken, TGF yüklü LDH nanopartiküllerde maksimum seviyelere ulaşılmıştır.

Çift katmanlı kıkırdak doku iskelelerinde her grup içerisinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Biyoink B0 grubunda GAG salınımı 208,6 ± 12,7 µg/skafold seviyelerinde, Biyoink B3 grubunda 277,4 ± 8,2 µg/skafold seviyelerinde ve Biyoink B3TGF grubunda ise 329,1 ± 13,7 µg/ skafold seviyelerinde gerçekleşmiştir. Tek katmanlı doku iskelesine göre çift katmanlı doku iskelesinden daha fazla miktarda GAG salınımı; çift katmanlı doku iskelesindeki biyomalzemelerin ve salınan BMP, TGF ve LDH'ın Mg^{2+} iyon ve moleküllerinin kondrogenezi olumlu yönde etkilediğini ve ortama GAG salınım miktarını artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

5. SONUÇ

Tez kapsamında osteokondral hasarların iyileştirilmesine yönelik LDH nanopartikül katkılı GelMA/ChitMA içeren çift katmanlı doku iskeleleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Alt katman kemik dokuyu üst katman kıkırdak dokuyu taklit edecek şekilde tasarlanan çift fazlı doku iskelesinde, alt katmanda yüksek üst katmanda ise düşük metakrilasyon derecesine sahip GelMA ve ChitMA polimerleri kullanılmıştır. Osteojenik farklılaşmayı artırmak için LDH nanaopartiküllerine BMP-2, kondrojenik farklılaşmayı artırmak için ise LDH nanopartiküllerine TGF-β1 yüklenmiştir. Büyüme faktörü yüklü LDH nanopartikülleri bulundukları doku isklelerinden kontrollü bir şekilde BMP-2 ve TGF-β1 salımı yapabilmişlerdir. Tek fazlı ve çift fazlı olarak çalışılan doku iskelelerinde, LDH nanopartikülünün kontrol gruplarına kıyasla osteojenik ve kondrojenik farklılaşmayı arttırdığı histolojik boyamalar ve IF boyamalar sonucunda gözlemlenmiştir. LDH nanopartikülüne yüklenen büyüme faktörlerinin sadece LDH nanopartikülü içeren doku iskelelerine oranla yüksek oranda farklılaşma sağladığı IF ve histolojik boyamalar ile beklenildiği şekilde daha iyi ve anlamlı sonuç vermiştir. Kemik ve kıkırdak doku iskelelerinde hücre canlılığı, çoğalma hızları inkübasyon süreleri boyunca artış göstermiştir ve DAPI/Actin boyama sonuçlarına göre doku iskelelerinin kök hücreler için uygun mikroçevreyi sağladığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, literatürde ilk defa sentezlenen büyüme faktörleri yüklü LDH nanopartikül katkılı GelMA/ChitMA nanohibrit çift katmanlı doku iskelelerinin osteokondral defektlerin onarımı için kullanılabileceği saptanmıştır.

KAYNAKÇA

Abdelaal, O. (2013). *Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials*. *29*(May). https://doi.org/10.1007/978-3-642-31470-4.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, *6*(2), 105–121. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006.

Ahmed, T. A. E., ve Hincke, M. T. (2010). Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *16*(3), 305–329. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0590.

Amadori, S., Torricelli, P., Panzavolta, S., Parrilli, A., Fini, M., ve Bigi, A. (2015). Multi-Layered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering: In Vitro Response of Co-Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. *Macromolecular Bioscience*, *15*(11), 1535–1545. https://doi.org/10.1002/mabi.201500165.

Aranaz, I., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., ve Del Monte, F. (2014). Preparation of chitosan nanocompositeswith a macroporous structure by unidirectional freezing and subsequent freeze-drying. *Marine Drugs*, *12*(11), 5619–5642. https://doi.org/10.3390/md12115619.

Arvidson, K., Abdallah, B. M., Applegate, L. A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., … Finne-Wistrand, A. (2011). Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(4), 718–746. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.

Ashley N. Leberfınger, Dıno J. Ravnıc, Aman Dhawan, B I. T. O. (2017). *Tıssue Engıneerıng And Regeneratıve Medıcıne Concise Review : Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication*. 1940–1948.

Ateş, H. (2015). Nano Parçacıklar ve Nano Teller. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *3*(1), 437–442.

Athanasiou, K. A., Zhu, C. F., Wang, X., ve Agrawal, C. M. (2000). Effects of Aging and Dietary Restriction on the Structural Integrity of Rat Articular Cartilage. *Annals of Biomedical Engineering*, *28*(2), 143–149. https://doi.org/10.1114/1.238.

Augello, A., Kurth, T. B., ve de Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells and Materials*, *20*, 121–133. https://doi.org/10.22203/eCM.v020a11.

Avula. (2014). CNT Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation. *Bone*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.1021/nn203711s.CNT.

Babensee, J. E., Anderson, J. M., McIntire, L. V., ve Mikos, A. G. (1998). Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *33*(1–2), 111–139. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00023-4.

Bahcecioglu, G., Hasirci, N., Bilgen, B., ve Hasirci, V. (2019). Hydrogels of agarose,

and methacrylated gelatin and hyaluronic acid are more supportive for in vitro meniscus regeneration than three dimensional printed polycaprolactone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 1152–1162. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.065.

Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., ve Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *100 B*(5), 1451–1457. https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694.

Benício, L. P. F., Silva, R. A., Lopes, J. A., Eulálio, D., dos Santos, R. M. M., De Aquino, L. A., … Tronto, J. (2015). Layered double hydroxides: Nanomaterials for applications in agriculture | Hidróxidos duplos lamelares: Nanomateriais para aplicações na agricultura. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, *39*(1), 1–13. https://doi.org/10.1590/01000683rbcs20150817.

Bilic, J., ve Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart? *Stem Cells*, *30*(1), 33–41. https://doi.org/10.1002/stem.700.

Bittner, S. M., Smith, B. T., Diaz-Gomez, L., Hudgins, C. D., Melchiorri, A. J., Scott, D. W., … Mikos, A. G. (2019). Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *90*, 37–48. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.041.

Bruder, S. P., Jaiswal, N., ve Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *64*(2), 278–294. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<278::AID-JCB11>3.0.CO;2-F.

Bunnell, B. A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., ve Ripoll, C. (2005). Anscombe G E M - The Collected Philosophical Papers of G E M Anscombe Vol 2 Metaphysics and The Philosophy of Mind (Blackwell,1981). *Methods*, *45*(2), 1–124. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

Çakmak, S. (2018). Osteokondral Doku Mühendisliği Osteochondral Tissue Engineering. *Natural ve Applied Sciences Journal*, *1*(1), 9–22.

Cao, Z., Li, B., Sun, L., Li, L., Xu, Z. P., ve Gu, Z. (2020). 2D Layered Double Hydroxide Nanoparticles: Recent Progress toward Preclinical/Clinical Nanomedicine. *Small Methods*, *4*(2), 1–20. https://doi.org/10.1002/smtd.201900343.

Capulli, M., Paone, R., ve Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *561*(May), 3–12. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003.

Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., ve Cao, Y. (2008). Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. *Pediatric Research*, *63*(5), 492–496. https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3.

Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R., ve Khademhosseini, A. (2013). Carbon-based nanomaterials: Multifunctional materials for biomedical engineering. *ACS Nano*, *7*(4), 2891–2897. https://doi.org/10.1021/nn401196a.

Chan, B. P., ve Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, *17*(SUPPL. 4). https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3.

Chan, G., ve Mooney, D. J. (2008). New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends in Biotechnology*, *26*(7), 382–392. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.03.011.

Chang, H.-I., ve Wang, Y. (2011). Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. https://doi.org/10.5772/21983.

Chen, F.-M., Liu, X., Polym, P., ve Author, S. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering HHS Public Access Author manuscript. *Prog Polym Sci*, *53*, 86–168. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.

Chen, S., Fu, P., Wu, H., ve Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 370). https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0.

Chen, Xi, Bai, S., Li, B., Liu, H., Wu, G., Liu, S., ve Zhao, Y. (2016). Fabrication of gelatin methacrylate/nanohydroxyapatite microgel arrays for periodontal tissue regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 4707–4718. https://doi.org/10.2147/IJN.S111701.

Chen, Xiliang, ve Shi, Q. (2013). Research on sol-gel transition process of gelatin. *Advanced Materials Research*, *683*, 474–478. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.683.474.

Cheng, X., Li, K., Xu, S., Li, P., Yan, Y., Wang, G., … Yang, X. (2018). Applying chlorogenic acid in an alginate scaffold of chondrocytes can improve the repair of damaged articular cartilage. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195326.

Chu, C. R., Coutts, R. D., Yoshioka, M., Harwood, F. L., Monosov, A. Z., ve Amiel, D. (1995). Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyteseeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): A tissue-engineering study. *Journal of Biomedical Materials Research*, *29*(9), 1147–1154. https://doi.org/10.1002/jbm.820290915.

Critchley, S., Sheehy, E. J., Cunniffe, G., Diaz-Payno, P., Carroll, S. F., Jeon, O., … Kelly, D. J. (2020). 3D printing of fibre-reinforced cartilaginous templates for the regeneration of osteochondral defects. *Acta Biomaterialia*, *113*(xxxx), 130–143. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.05.040.

Cunha, V. R. R., De Souza, R. B., Da Fonseca Martins, A. M. C. R. P., Koh, I. H. J., ve Constantino, V. R. L. (2016). Accessing the biocompatibility of layered double

hydroxide by intramuscular implantation: Histological and microcirculation evaluation. *Scientific Reports*, *6*(July), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep30547.

Damoulis, P. D., ve Hauschka, P. V. (1997). Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, *12*(3), 412–422. https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.3.412.

Daniel E Shumer, N. J. N. N. P. S. (2017). A Multi-Material Bioink Method for 3D Printing Tunable, Cell- Compatible Hydrogels. *Physiology ve Behavior*, *176*(12), 139–148. https://doi.org/10.1002/adma.201405076.A.

de Melo, B. A. G., Jodat, Y. A., Cruz, E. M., Benincasa, J. C., Shin, S. R., ve Porcionatto, M. A. (2020). Strategies to use fibrinogen as bioink for 3D bioprinting fibrin-based soft and hard tissues. *Acta Biomaterialia*, *117*, 60–76. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.024.

de Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., ve Alcaina, Y. (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. *Stem Cell Reviews and Reports*, *6*(4), 633–649. https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1.

Deng, C., Chang, J., ve Wu, C. (2019). Bioactive scaffolds for osteochondral regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, *17*, 15–25. https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.11.006.

Dolcimascolo, A., Calabrese, G., Conoci, S., ve Parenti, R. (2019). Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. *Biomaterial-Supported Tissue Reconstruction or Regeneration*. https://doi.org/10.5772/intechopen.83839.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., ve Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, *89*(5), 747–754. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3.

Dvir, T., Timko, B. P., Brigham, M. D., Naik, S. R., Karajanagi, S. S., Levy, O., … Kohane, D. S. (2011). Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*, *6*(11), 720–725. https://doi.org/10.1038/nnano.2011.160.

Fakhry, M. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*, *5*(4), 136. https://doi.org/10.4252/wjsc.v5.i4.136

Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Keshtkar, A., Shokrgozar, M. A., Dehghan, M. M., ve Larijani, B. (2017). Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study. *Materials Science and Engineering C*, *76*, 701–714. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.172.

Fomby, P., ve Cherlin, A. J. (2011). *Direct-write Bioprinting of Cell-laden Methacrylated Gelatin Hydrogels Luiz...read....* *72*(2), 181–204. https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/2/024105.

Franceschetti, T., ve Delany, A. M. (2014). miRNAs in Bone Repair. In *MicroRNA in Regenerative Medicine*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405544-5.00025-3.

Frost, B., Sutliff, B. P., Thayer, P., Bortner, M. J., ve Foster, E. J. (2019). Gradient poly(Ethylene glycol) diacrylate and cellulose nanocrystals tissue engineering composite scaffolds via extrusion bioprinting. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(OCT), 1–14. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00280.

Furth, M. E., Atala, A., Innovations, W. F., ve Carolina, N. (2014). Tissue Engineering : Future Perspectives. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edi). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00006-9.

Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., ve Khademhosseini, A. (2014). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. Biotechnology and bioengineering. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(3), 441–453. https://doi.org/10.1002/bit.25160.

Gaharwar, A. K., Rivera, C., Wu, C. J., Chan, B. K., ve Schmidt, G. (2013). Photocrosslinked nanocomposite hydrogels from PEG and silica nanospheres: Structural, mechanical and cell adhesion characteristics. *Materials Science and Engineering C*, *33*(3), 1800–1807. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.099.

Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., … Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death and Disease*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327.

Gibas, I., ve Janik, H. (2010). Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. *Chemistry ve Chemical Technology*, *4*(4), 297–304. https://doi.org/10.23939/chcht04.04.297.

Goenka, S., Sant, V., ve Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *173*(1), 75–88. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.017.

Goldberg, M., Langer, R., ve Jia, X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *18*(3), 241–268. https://doi.org/10.1163/156856207779996931.

Goldring, M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, *4*(4), 269–285. https://doi.org/10.1177/1759720X12448454.

Gomoll, A. H., Madry, H., Knutsen, G., van Dijk, N., Seil, R., Brittberg, M., ve Kon, E. (2010). The subchondral bone in articular cartilage repair: Current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *18*(4), 434–447. https://doi.org/10.1007/s00167-010-1072-x.

Gorbachova, T., Melenevsky, Y., Cohen, M., ve Cerniglia, B. W. (2018). Osteochondral lesions of the knee: Differentiating the most common entities at MRI. *Radiographics*, *38*(5), 1478–1495. https://doi.org/10.1148/rg.2018180044.

Griffiths, H. (2012). *Layered Double Hydroxides: Structure, Synthesis and Catalytic Applications*. (May 2012). https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2711.4480.

Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. M., ve Aubin, J. E. (1988). Differentiation of muscle,

fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of dexamethasone. *Journal of Cell Biology*, *106*(6), 2139–2151. https://doi.org/10.1083/jcb.106.6.2139.

Gudapati, H., Dey, M., ve Ozbolat, I. (2016). A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*, *102*, 20–42. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.012.

Hasan, M. S., Ahmed, I., Parsons, A. J., Rudd, C. D., Walker, G. S., ve Scotchford, C. A. (2013). Investigating the use of coupling agents to improve the interfacial properties between a resorbable phosphate glass and polylactic acid matrix. *Journal of Biomaterials Applications*, *28*(3), 354–366. https://doi.org/10.1177/0885328212453634.

Hasanzadeh, M., Pournaghi-Azar, M. H., Shadjou, N., ve Jouyban, A. (2014). A new mechanistic approach to elucidate furosemide electrooxidation on magnetic nanoparticles loaded on graphene oxide modified glassy carbon electrode. *RSC Advances*, *4*(13), 6580–6590. https://doi.org/10.1039/c3ra46973e.

He, J., Wang, Y., Liu, Y., Li, D., ve Jin, Z. (2013). Layer-by-layer micromolding of natural biopolymer scaffolds with intrinsic microfluidic networks. *Biofabrication*, *5*(2). https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/2/025002.

He, S., Nakada, D., ve Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 377–406. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.

Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., DIckinson, I. C., … Hutmacher, Di. W. (2013). Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective. *Bone Research*, *1*, 216–248. https://doi.org/10.4248/BR201303002.

Hoch, E., Schuh, C., Hirth, T., Tovar, G. E. M., ve Borchers, K. (2012). Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *23*(11), 2607–2617. https://doi.org/10.1007/s10856-012-4731-2.

Horn, E. C. (1897). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Development*, 1–6.

Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M., ve Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, *132*(1), 49–60. https://doi.org/10.1242/dev.01564.

Hu, M. Y., ve Nukavarapu, S. (2019). Scaffolds for cartilage tissue engineering. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00011-3.

Huey, D. J., Hu, J. C., ve Athanasiou, K. A. (2012). Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*, *338*(6109), 917–921. https://doi.org/10.1126/science.1222454.

Hutmacher, D. W. (2000a). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, *21*, 175–189. https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50021-6.

Hutmacher, D. W. (2000b). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* (Vol. 21). https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50021-6.

Im, G. Il. (2017). Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *105*(9), 2640–2648. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36089

Jacob, G., Shimomura, K., ve Nakamura, N. (2020). Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(November), 1–14. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580868.

Jakus, A. E., Rutz, A. L., ve Shah, R. N. (2016). Advancing the field of 3D biomaterial printing. *Biomedical Materials (Bristol)*, *11*(1), 14102. https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/014102.

Jayaraman, P., Gandhimathi, C., Venugopal, J. R., Becker, D. L., Ramakrishna, S., ve Srinivasan, D. K. (2015). Controlled release of drugs in electrosprayed nanoparticles for bone tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *94*, 77–95. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.007.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., ve Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*(1), 1050–1074. https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98.

Kang, H. R., da Costa Fernandes, C. J., da Silva, R. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J., ve Zambuzzi, W. F. (2018a). Mg–Al and Zn–Al Layered Double Hydroxides Promote Dynamic Expression of Marker Genes in Osteogenic Differentiation by Modulating Mitogen-Activated Protein Kinases. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(4), 1–12. https://doi.org/10.1002/adhm.201700693.

Kang, H. R., da Costa Fernandes, C. J., da Silva, R. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J., ve Zambuzzi, W. F. (2018b). Mg–Al and Zn–Al Layered Double Hydroxides Promote Dynamic Expression of Marker Genes in Osteogenic Differentiation by Modulating Mitogen-Activated Protein Kinases. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(4), 1–12. https://doi.org/10.1002/adhm.201700693.

Kara, F., Aksoy, E. A., Calamak, S., Hasirci, N., ve Aksoy, S. (2016). Immobilization of heparin on chitosan-grafted polyurethane films to enhance anti-adhesive and antibacterial properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, *31*(1), 72–90. https://doi.org/10.1177/0883911515598794.

Kara, F., Aksoy, E. A., Yuksekdag, Z., Aksoy, S., ve Hasirci, N. (2015). Enhancement of antibacterial properties of polyurethanes by chitosan and heparin immobilization. *Applied Surface Science*, *357*, 1692–1702. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.09.227.

Karsenty, G., Kronenberg, H. M., ve Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 629–648. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113308.

Kasoju, N., ve Bora, U. (2012). Silk fibroin in tissue engineering. *Advanced Healthcare Materials*, *1*(4), 393–412. https://doi.org/10.1002/adhm.201200097.

Katti, D. S., Lakshmi, S., Langer, R., ve Laurencin, C. T. (2002). Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(7), 933–961. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00052-2.

Kaufman, M. H., ve Evans, M. J. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(9), 154–156.

Keeney, M., ve Pandit, A. (2009). The osteochondral junction and its repair via bi-phasic tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *15*(1), 55–73. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0388.

Khunmanee, S., Jeong, Y., ve Park, H. (2017). Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering*, *8*. https://doi.org/10.1177/2041731417726464.

Kiziltay, A., Gündoğan, Z., Erel-Göktepe, I., ve Hasirci, N. (2019). Multilayer polymeric films for controlled release of ceftriaxone sodium. *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *76*(3), 303–312. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.85579.

Klemens, T., Świtlicka-Olszewska, A., Machura, B., Grucela, M., Janeczek, H., Schab-Balcerzak, E., … Lodowski, P. (2016). Synthesis, photophysical properties and application in organic light emitting devices of rhenium(i) carbonyls incorporating functionalized 2,2′:6′,2″-terpyridines. *RSC Advances*, *6*(61), 56335–56352. https://doi.org/10.1039/c6ra08981j.

Kolios, G., ve Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, *85*(1), 3–10. https://doi.org/10.1159/000345615.

Komori, T., Yagi, * H., Nomura, S., ve Yamaguchi, A. (1998). Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(15), 8692–8697. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21138vetool=pmcentrezverendertype=abstract.

Kon, E., Filardo, G., Robinson, D., Eisman, J. A., Levy, A., Zaslav, K., … Altschuler, N. (2014). Osteochondral regeneration using a novel aragonite-hyaluronate bi-phasic scaffold in a goat model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *22*(6), 1452–1464. https://doi.org/10.1007/s00167-013-2467-2.

Kotlarz, H., Gunnarsson, C. L., Fang, H., ve Rizzo, J. A. (2009). Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: Evidence from national survey data. *Arthritis and Rheumatism*, *60*(12), 3546–3553. https://doi.org/10.1002/art.24984.

Kwee, B. J., ve Mooney, D. J. (2017). Biomaterials for skeletal muscle tissue

engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, *47*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.05.003.

Lam, T., Dehne, T., Krüger, J. P., Hondke, S., Endres, M., Thomas, A., … Kloke, L. (2019). Photopolymerizable gelatin and hyaluronic acid for stereolithographic 3D bioprinting of tissue-engineered cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *107*(8), 2649–2657. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34354.

Larry L, H., ve Julia M, P. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, *295*(February), 1014–1017.

Lee, W. C., Lim, C. H. Y. X., Shi, H., Tang, L. A. L., Wang, Y., Lim, C. T., ve Loh, K. P. (2011). Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano*, *5*(9), 7334–7341. https://doi.org/10.1021/nn202190c.

Lee, W., Choi, J. H., Lee, S., Song, J. E., ve Khang, G. (2020). Fabrication and Characterization of Silk Fibroin Microfiber-Incorporated Bone Marrow Stem Cell Spheroids to Promote Cell-Cell Interaction and Osteogenesis. *ACS Omega*, *5*(29), 18021–18027. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01415.

Li, X., Ding, J., Wang, J., Zhuang, X., ve Chen, X. (2015). Biomimetic biphasic scaffolds for osteochondral defect repair. *Regenerative Biomaterials*, *2*(3), 221–228. https://doi.org/10.1093/rb/rbv015.

Liang, X., Duan, P., Gao, J., Guo, R., Qu, Z., Li, X., … Ding, J. (2018). Bilayered PLGA/PLGA-HAp Composite Scaffold for Osteochondral Tissue Engineering and Tissue Regeneration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, *4*(10), 3506–3521. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00552.

Lima, E. G., Mauck, R. L., Han, S. H., Park, S., Ng, K. W., Ateshian, G. A., ve Hung, C. T. (2004). Functional tissue engineering of chondral and osteochondral constructs. *Biorheology*, *41*(3–4), 577–590.

Liu, X., Won, Y., ve Ma, P. X. (2005). Surface modification of interconnected porous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *74*(1), 84–91. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30367.

Locke, M., Windsor, J., ve Dunbar, P. R. (2009). Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*, *79*(4), 235–244. https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2009.04852.x.

Loh, Q. L., ve Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *19*(6), 485–502. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437.

Loscalzo, D. E. H. R. C. J. (2011). Stem Cells in Tissue Repair and Regeneration. *Bone*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.1038/jid.2012.77.

Loy, B. N., Zimel, M., Gowda, A. L., Tooley, T. R., Maerz, T., Bicos, J., ve Guettler, J. (2018). A Biomechanical and Structural Comparison of Articular Cartilage and Subchondral Bone of the Glenoid and Humeral Head. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, *6*(7), 1–7. https://doi.org/10.1177/2325967118785854.

Ma, P. C., Siddiqui, N. A., Marom, G., ve Kim, J. K. (2010). Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *41*(10), 1345–1367. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.07.003.

Madry, H., van Dijk, C. N., ve Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *18*(4), 419–433. https://doi.org/10.1007/s00167-010-1054-z.

Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G. A., ve Barrandon, Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, *456*(7219), 250–254. https://doi.org/10.1038/nature07406.

Malikmammadov, E., Tanir, T. E., Kiziltay, A., Hasirci, V., ve Hasirci, N. (2018). PCL and PCL-based materials in biomedical applications. In *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (Vol. 29). https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1394711.

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., ve Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, *34*(4), 422–434. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011..

Mansouri, N., Al-Sarawi, S. F., Mazumdar, J., ve Losic, D. (2019). Advancing fabrication and properties of three-dimensional graphene-alginate scaffolds for application in neural tissue engineering. *RSC Advances*, *9*(63), 36838–36848. https://doi.org/10.1039/c9ra07481c.

Marks, S. C., ve Popoff, S. (1988). Bone Cell Biology : The Regulation of Development , Structure ,. *American Journal of Anatomy*, *183*(1), 1–44.

Markstedt, K., Escalante, A., Toriz, G., ve Gatenholm, P. (2017). Biomimetic Inks Based on Cellulose Nanofibrils and Cross-Linkable Xylans for 3D Printing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *9*(46), 40878–40886. https://doi.org/10.1021/acsami.7b13400.

Marone, M., De Ritis, D., Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G., ve Pierelli, L. (2002). Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: From isolation to activation. *Leukemia and Lymphoma*, *43*(3), 493–501. https://doi.org/10.1080/10428190290011967.

Marquez-Curtis, L. A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L. E., ve Elliott, J. A. W. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, *71*(2), 181–197. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.07.003.

Masayuki Shimao. (2001). Biodegradation of plastics Masayuki Shimao. *Current Opinion in Biotechnology*, 242–247.

Mehrasa, M., Asadollahi, M. A., Ghaedi, K., Salehi, H., ve Arpanaei, A. (2015). Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *79*, 687–695. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.050.

Mellor, L. F., Nordberg, R. C., Huebner, P., Mohiti-Asli, M., Taylor, M. A., Efird, W., … Loboa, E. G. (2020). Investigation of multiphasic 3D-bioplotted scaffolds for site-specific chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells for osteochondral tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *108*(5), 2017–2030. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34542.

Michael H. Ross, W. P. (n.d.). *Hıstology A Text and Atlas* (Vol. 148).

Middleton, J. C., ve Tipton, A. J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, *21*(23), 2335–2346. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00101-0.

Mishra, G., Dash, B., ve Pandey, S. (2018). Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. *Applied Clay Science*, *153*(June 2017), 172–186. https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.021.

Mochane, M. J., Magagula, S. I., Sefadi, J. S., Sadiku, E. R., ve Mokhena, T. C. (2020). Morphology, thermal stability, and flammability properties of polymer-layered double hydroxide (Ldh) nanocomposites: A review. *Crystals*, *10*(7), 1–26. https://doi.org/10.3390/cryst10070612.

Mody, N., Tekade, R. K., Mehra, N. K., Chopdey, P., ve Jain, N. K. (2014). Dendrimer, liposomes, carbon nanotubes and PLGA nanoparticles: One platform assessment of drug delivery potential. *AAPS PharmSciTech*, *15*(2), 388–399. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0073-3.

Mohamed, A. M. F. S. (2008). An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, *15*(1), 4–12.

Morales, E. E. (2014). Renal stem cell reprogramming: Prospects in regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, *6*(4), 458. https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.458.

Morris, V. B., Nimbalkar, S., Younesi, M., McClellan, P., ve Akkus, O. (2017). Mechanical Properties, Cytocompatibility and Manufacturability of Chitosan:PEGDA Hybrid-Gel Scaffolds by Stereolithography. *Annals of Biomedical Engineering*, *45*(1), 286–296. https://doi.org/10.1007/s10439-016-1643-1.

Murphy, S. V., ve Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 773–785. https://doi.org/10.1038/nbt.2958.

Nagarkar, S., Nicolai, T., Chassenieux, C., ve Lele, A. (2010). Structure and gelation mechanism of silk hydrogels. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *12*(15), 3834–3844. https://doi.org/10.1039/b916319k.

Nair, L. S., ve Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *32*(8–9), 762–798. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

Nayak, T. R., Andersen, H., Makam, V. S., Khaw, C., Bae, S., Xu, X., … Özyilmaz, B. (2011). Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of

human mesenchymal stem cells. *ACS Nano*, *5*(6), 4670–4678. https://doi.org/10.1021/nn200500h.

Ng, A., ve Bernhard, K. (2017). Osteochondral Autograft and Allograft Transplantation in the Talus. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, *34*(4), 461–469. https://doi.org/10.1016/j.cpm.2017.05.004.

Nianli Zhang and David H. KohnDepartment. (2016). Using Polymeric Materials to Control Stem Cell Behavior for Tissue Regeneration. *Physiology ve Behavior*, *176*(1), 139–148. https://doi.org/10.1002/bdrc.21003.

Nishida, H., ve Tokiwa, Y. (1993). Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, *1*(1), 65–80. https://doi.org/10.1007/BF01457654.

Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., ve Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(2), 126–131. https://doi.org/10.1038/nrm3049.

Nooeaid, P., Salih, V., Beier, J. P., ve Boccaccini, A. R. (2012). Osteochondral tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(10), 2247–2270. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01571.x.

Ochi, M., Uchio, Y., Tobita, M., ve Kuriwaka, M. (2001). Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial Organs*, *25*(3), 172–179. https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2001.025003172.x.

Oegema, T. R., Carpenter, R. J., Hofmeister, F., ve Thompson, R. C. (1997). The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microscopy Research and Technique*, *37*(4), 324–332. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970515)37:4<324::AID-JEMT7>3.0.CO;2-K.

Okada, M. (2002). Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *27*(1), 87–133. https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00039-9.

Oliveira, J. M., Costa, S. A., Leonor, I. B., Malafaya, P. B., Mano, J. F., ve Reis, R. L. (2009). Novel hydroxyapatite/carboxymethylchitosan composite scaffolds prepared through an innovative "autocatalytic" electroless coprecipitation route. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *88*(2), 470–480. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31817.

Ottani, V., Raspanti, M., ve Ruggeri, A. (2001). Collagen structure and functional implications. *Micron*, *32*(3), 251–260. https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00042-1.

Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Ou, C. N., Finegold, M., ve Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *American Journal of Pathology*, *151*(5), 1273–1280.

Ozbolat, I. T., Peng, W., ve Ozbolat, V. (2016). Application areas of 3D bioprinting.

Drug Discovery Today, *21*(8), 1257–1271. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.006.

Panseri, S., Russo, A., Cunha, C., Bondi, A., Di Martino, A., Patella, S., ve Kon, E. (2012). Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *20*(6), 1182–1191. https://doi.org/10.1007/s00167-011-1655-1.

Park, H. E., Gasek, N., Hwang, J., Weiss, D. J., ve Lee, P. C. (2020). Effect of temperature on gelation and cross-linking of gelatin methacryloyl for biomedical applications. *Physics of Fluids*, *32*(3). https://doi.org/10.1063/1.5144896.

Park, J., Kim, B., Han, J., Oh, J., Park, S., Ryu, S., … Kim, B. S. (2015). Graphene oxide flakes as a cellular adhesive: Prevention of reactive oxygen species mediated death of implanted cells for cardiac repair. *ACS Nano*, *9*(5), 4987–4999. https://doi.org/10.1021/nn507149w.

Park, J., Kim, Y. S., Ryu, S., Kang, W. S., Park, S., Han, J., … Kim, B. S. (2015). Graphene potentiates the myocardial repair efficacy of mesenchymal stem cells by stimulating the expression of angiogenic growth factors and gap junction protein. *Advanced Functional Materials*, *25*(17), 2590–2600. https://doi.org/10.1002/adfm.201500365.

Pina, S., Oliveira, J. M., ve Reis, R. L. (2015). Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Advanced Materials*, *27*(7), 1143–1169. https://doi.org/10.1002/adma.201403354.

Pitkethly, M. J. (2004). Nanometerials - The driving force. *Materials Today*, *7*(12 SUPPL.), 20–29. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00627-3.

Poveda-Reyes, S., Moulisova, V., Sanmartín-Masiá, E., Quintanilla-Sierra, L., Salmerón-Sánchez, M., ve Ferrer, G. G. (2016). Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromolecular Bioscience*, 1311–1324. https://doi.org/10.1002/mabi.201500469.

Püren Akgüner, Z., ve Bal Öztürk, A. (2020). Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg*, (X), 1–9. https://doi.org/10.5505/pajes.2020.63933.

Ramier, J., Bouderlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., … Grande, D. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, *38*(1), 161–169. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.046.

Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., ve Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences*, *57*(1), 1–17. https://doi.org/10.2478/v10039-012-0020-z.

Raval, A., Pillai, S. A., Bahadur, A., ve Bahadur, P. (2017). Systematic characterization of Pluronic® micelles and their application for solubilization and in vitro release of some hydrophobic anticancer drugs. *Journal of Molecular Liquids*, *230*, 473–481. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.065.

Re'Em, T., Witte, F., Willbold, E., Ruvinov, E., ve Cohen, S. (2012). Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone induced by spatially presented TGF-beta and BMP-4 in a bilayer affinity binding system. *Acta Biomaterialia*, *8*(9), 3283–3293. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.014.

Richards ve ark. (2018). Glycosaminoglycans Contribute to Extracellular Matrix Fiber Recruitment and Arterial Wall Mechanics. *Physiology ve Behavior*, *176*(5), 139–148. https://doi.org/10.1007/s10237-016-0811-4.

Risbud, M. V., ve Sittinger, M. (2002). Tissue engineering: Advances in in vitro cartilage generation. *Trends in Biotechnology*, *20*(8), 351–356. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02016-4.

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., ve Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C*, *78*, 1246–1262. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017.

Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *Stem Cells*, *19*(6), 477–482. https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477.

Rusk, R. D. (1950). Tissue Engineering. *Educational Forum*, *15*(1), 119–120. https://doi.org/10.1080/00131725009342110.

Safshekan, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Abdouss, M., ve Shadmehr, M. B. (2017). Viscoelastic Properties of Human Tracheal Tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, *139*(1), 1–9. https://doi.org/10.1115/1.4034651.

Saghatforoush, L., Hasanzadeh, M., ve Shadjou, N. (2014). ß-Cyclodextrin/graphene oxide grafted sulfonic acid: Application for electro-oxidation and determination of cadaverine in fish samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *714–715*, 79–84. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.12.021.

Sanz-Herrera, J. A., García-Aznar, J. M., ve Doblaré, M. (2009). On scaffold designing for bone regeneration: A computational multiscale approach. *Acta Biomaterialia*, *5*(1), 219–229. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.06.021.

Schneible, J. D., Singhal, A., Lilova, R. L., Hall, C. K., Grafmüller, A., ve Menegatti, S. (2019). Tailoring the Chemical Modification of Chitosan Hydrogels to Fine-Tune the Release of a Synergistic Combination of Chemotherapeutics. *Biomacromolecules*, *20*(8), 3126–3141. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00707.

Schuurman, W., Levett, P. A., Pot, M. W., van Weeren, P. R., Dhert, W. J. A., Hutmacher, D. W., … Malda, J. (2013). Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromolecular Bioscience*, *13*(5), 551–561.

https://doi.org/10.1002/mabi.201200471.

Shafiei, S. S., Shavandi, M., Ahangari, G., ve Shokrolahi, F. (2016). Electrospun layered double hydroxide/poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds for adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Applied Clay Science*, *127–128*, 52–63. https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.04.004.

Sheean. (2013a). Adaptable Poly(ethylene glycol) Microspheres Capable of Mixed-mode Degradation. *Bone*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.011.

Sheean. (2013b). Shean Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *Bone*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.jht.2011.08.003.

Shekhar, S., Roy, A., Hong, D., ve Kumta, P. N. (2016). Nanostructured silicate substituted calcium phosphate (NanoSiCaPs) nanoparticles — Efficient calcium phosphate based non-viral gene delivery systems. *Materials Science and Engineering C*, *69*, 486–495. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.076.

Sherman, S. L., Thyssen, E., ve Nuelle, C. W. (2017). Osteochondral Autologous Transplantation. *Clinics in Sports Medicine*, *36*(3), 489–500. https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.006.

Shin, B., Kim, J., Vales, T. P., Yang, S. K., Kim, J. K., Sohn, H., ve Kim, H. J. (2018). Thermoresponsive drug controlled release from chitosan-based hydrogel embedded with poly(N-isopropylacrylamide) nanogels. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, *56*(17), 1907–1914. https://doi.org/10.1002/pola.29073.

Shin, S. R., Bae, H., Cha, J. M., Mun, J. Y., Chen, Y. C., Tekin, H., … Khademhosseini, A. (2012). Carbon nanotube reinforced hybrid microgels as scaffold materials for cell encapsulation. *ACS Nano*, *6*(1), 362–372. https://doi.org/10.1021/nn203711s.

Sierra, A. M., Abarca, G. H., ve Portales, J. M. (1997). Tropical hyphomycetes of Mexico I. New species of Hemicorynespora, Piricauda and Rhinocladium. *Mycotaxon*, *63*, 155–167.

Silva, S. S., Fernandes, E. M., Pina, S., Silva-Correia, J., Vieira, S., Oliveira, J. M., ve Reis, R. L. (2017). 2.11 Polymers of Biological Origin ☆. *Comprehensive Biomaterials II*, *2*(June 2016), 228–252. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10134-1.

Silva, T. H., Alves, A., Ferreira, B. M., Oliveira, J. M., Reys, L. L., Ferreira, R. J. F., … Reis, R. L. (2012). Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*, *57*(5), 276–307. https://doi.org/10.1179/1743280412Y.0000000002.

Simon, J., Flahaut, E., ve Golzio, M. (2019). Overview of carbon nanotubes for biomedical applications. *Materials*, *12*(4), 1–21. https://doi.org/10.3390/ma12040624.

Smith, A. (n.d.). *A glossary for stem-cell biology*. 6.

Sonny Bal, B., Rahaman, M. N., Jayabalan, P., Kuroki, K., Cockrell, M. K., Yao, J. Q.,

ve Cook, J. L. (2010). In vivo outcomes of tissue-engineered osteochondral grafts. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *93*(1), 164–174. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31571.

Sophia Fox, A. J., Bedi, A., ve Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, *1*(6), 461–468. https://doi.org/10.1177/1941738109350438.

Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., ve Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, *1*(2), 93–108. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.11.001.

Subia, B., Kundu, J., ve C., S. (2010). Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering*, (3). https://doi.org/10.5772/8581.

Sultana, N., ve Khan, T. H. (2012). In vitro degradation of PHBV scaffolds and nHA/PHBV composite scaffolds containing hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/190950.

Suo, H., Chen, Y., Liu, J., Wang, L., ve Xu, M. (2021). 3D printing of biphasic osteochondral scaffold with sintered hydroxyapatite and polycaprolactone. *Journal of Materials Science*, *56*(29), 16623–16633. https://doi.org/10.1007/s10853-021-06229-x.

Tabata, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, *6*(SUPPL. 3). https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus.

Tamaddon, M., Wang, L., Liu, Z., ve Liu, C. (2018). Osteochondral tissue repair in osteoarthritic joints: clinical challenges and opportunities in tissue engineering. *Bio-Design and Manufacturing*, *1*(2), 101–114. https://doi.org/10.1007/s42242-018-0015-0.

Tangchitphisut, P., Srikaew, N., Numhom, S., Tangprasittipap, A., Woratanarat, P., Wongsak, S., … Tawonsawatruk, T. (2016). Infrapatellar Fat Pad: An Alternative Source of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Arthritis*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/4019873.

Tanzer, M. (1973). Cross-Linking of Collagen Endogenous aldehydes in collagen react in several ways. *Science*, *180*(May), 561–566.

Tirrell, M., Kokkoli, E., ve Biesalski, M. (2002). The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science*, *500*(1–3), 61–83. https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01548-5.

Tonda-Turo, C., Carmagnola, I., Chiappone, A., Feng, Z., Ciardelli, G., Hakkarainen, M., ve Sangermano, M. (2020). Photocurable chitosan as bioink for cellularized therapies towards personalized scaffold architecture. *Bioprinting*, *18*(December 2019), e00082. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00082.

Tonelli, F. M. P., de Cássia Oliveira Paiva, N., de Medeiros, R. V. B., Pinto, M. C. X.,

Tonelli, F. C. P., ve Resende, R. R. (2017). Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications*. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7.

TOPALOĞLU, U., KETANİ, M. A., ve SARUHAN, B. G. (2017). Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *10*(1), 62–71. Retrieved from https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd/363445.

Topuz, M., Dikici, B., Gavgali, M., ve Yilmazer, H. (2018). a Review on the Hydrogels Used in 3D Bio-Printing. *International Journal of 3D Printing Technologies and Digital Industry*, *2*(2), 68–75.

Tran, T. T., Hamid, Z. A., ve Cheong, K. Y. (2018). A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering: Aloe Vera Composites. *Journal of Physics: Conference Series*, *1082*(1). https://doi.org/10.1088/1742-6596/1082/1/012080.

Ucar, S., Ermis, M., ve Hasirci, N. (2016). Modified chitosan scaffolds: Proliferative, cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on Saos-2 cells and antimicrobial effect on Escherichia coli. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, *31*(3), 304–319. https://doi.org/10.1177/0883911515627471.

Ulery, B. D., Nair, L. S., ve Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, *49*(12), 832–864. https://doi.org/10.1002/polb.22259.

Vallet-Regí, M., ve Arcos, D. (2013). Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia*, *61*(3), 890–911. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.039.

Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., ve Berghmans, H. (2000). Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*, *1*(1), 31–38.

Wagner, W., Ho, A. D., ve Zenke, M. (2010). Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *16*(4), 445–453. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0825.

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, *29*(20), 2941–2953. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

Wong, M., ve Carter, D. R. (2003). Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone*, *33*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00083-8.

Woodruff, M. A., ve Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

Wu, Y., Zhu, R., Zhou, Y., Zhang, J., Wang, W., Sun, X., … Wang, S. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles promote self-renewal of mouse embryonic stem cells through the PI3K signaling pathway. *Nanoscale*, *7*(25), 11102–11114. https://doi.org/10.1039/c5nr02339d.

Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y., States, U., ve States, U. (2019). *Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications*. *119*(8), 5298–5415. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593.

Xue, Y., Chen, H., Xu, C., Yu, D., Xu, H., ve Hu, Y. (2020). Synthesis of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking the mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid and low-molecular-weight hyaluronic acid with 1,4-butanediol diglycidyl ether. *RSC Advances*, *10*(12), 7206–7213. https://doi.org/10.1039/c9ra09271d.

Yan, L., Gonca, S., Zhu, G., Zhang, W., ve Chen, X. (2019). Layered double hydroxide nanostructures and nanocomposites for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, *7*(37), 5583–5601. https://doi.org/10.1039/c9tb01312a.

Yang, P. J., ve Temenoff, J. S. (2009). Engineering orthopedic tissue interfaces. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *15*(2), 127–141. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0371.

Yin, J., Yan, M., Wang, Y., Fu, J., ve Suo, H. (2018). 3D Bioprinting of Low-Concentration Cell-Laden Gelatin Methacrylate (GelMA) Bioinks with a Two-Step Cross-linking Strategy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(8), 6849–6857. https://doi.org/10.1021/acsami.7b16059.

Yoo, H. S., Kim, T. G., ve Park, T. G. (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(12), 1033–1042. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.007.

Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., ve Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, *4*(9), 1268–1285. https://doi.org/10.1002/adhm.201400760.

Zhang, P. X., Han, N., Kou, Y. H., Zhu, Q. T., Liu, X. L., Quan, D. P., … Jiang, B. G. (2019). Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*, *14*(1), 51–58. https://doi.org/10.4103/1673-5374.243701.

Zhang, W., Lian, Q., Li, D., Wang, K., Hao, D., Bian, W., ve Jin, Z. (2015). The effect of interface microstructure on interfacial shear strength for osteochondral scaffolds based on biomimetic design and 3D printing. *Materials Science and Engineering C*, *46*, 10–15. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.042.

Zhang, Xiaodan, Yang, D., ve Nie, J. (2008). Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*(5), 456–462. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.010.

Zhang, Xiaoying, ve Zhang, Y. (2015). Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *72*(3), 777–782. https://doi.org/10.1007/s12013-015-0531-x.

Zhou, J., Xu, C., Wu, G., Cao, X., Zhang, L., Zhai, Z., … Wang, Y. (2011). In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomaterialia*, *7*(11), 3999–4006. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.040.

Zhu, N., ve Che, X. (2013). Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in*

Biomaterials Science and Biomedical Applications. https://doi.org/10.5772/54125.

İNTİHAL FORMU

OSTEOKONDRAL HASARLARIN ONARIMINA YÖNELİK 3BBİYOYAZICI İLE ÇİFT-TABAKALI NANOHİBRİT DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

14%	13%	1%	4%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES	
1 acikerisim.istinye.edu.tr Internet Source	9%
2 www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
3 dergipark.org.tr Internet Source	1%
4 tr.wikipedia.org Internet Source	<1%
5 molekulerbiyolojii.com Internet Source	<1%
6 Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	<1%
7 pt.scribd.com Internet Source	<1%
8 Submitted to Gaziosmanpasa Universitesi Student Paper	<1%