T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÖK HÜCRE YÜKLÜ İPEK FİBROİN-TEMELLİ NANOHİBRİT KEMİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ZEYNEP PÜREN AKGÜNER

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

KÖK HÜCRE YÜKLÜ İPEK FİBROİN-TEMELLİ NANOHİBRİT KEMİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ZEYNEP PÜREN AKGÜNER

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ AYÇA BAL ÖZTÜRK

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİMDALI

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

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. Erdal KARAÖZ İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emine ALARÇİN Marmara Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum,“ Kök Hücre Yüklü İpek Fibroin-Temelli Nanohibrit Kemik 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.

Zeynep Püren Akgüner

İTHAF

Bilime gönül vermiş tüm insanlara...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca benden desteğini, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, duruşuna ve çalışmalarına hayran olduğum duyduğum, her daim yanımda olan ve yol gösteren sevgili danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK'e,

Kök hücre ve doku mühendisliği alanını seçmemdeki en büyük sebeplerden birisi olan, bilgisi ve tecrübesine saygı duyduğum, her zaman desteğini ve bilgeliğini benden esirgemeyen çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e,

Bölüme geldiğim günden bugüne kadar bana destek olan, kendime güvenmemi ve bu alanda gelişmemi sağlayan, bilgisi ve inceliğiyle her zaman yanımda olan, bana her daim yol gösteren sevgili Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI'ya,

Tez çalışmam boyunca hem benimle yorulup hem de aldığım her sonuçta mutluluğumu benimle paylaşan, yardımlarını hiç esirgemeyen, deneyimleri ile bana ışık tutan canım çalışma arkadaşlarım Elif SÖZEN, Ayça KARAGÖZ KÖROĞLU, Hüseyin AYHAN, Berkay CİVAN, Burçin İZBUDAK, Elif YÜCE ve Sheriff DOMİNGO'ya,

Bana her zaman inanan ve bir ilkokul öğretmeninden çok bana aile olan sevgili öğretmenim Cennet KARAKAYA'ya,

Hayatımın baş kahramanları, bugünlere gelmemi sağlayan, hayallerimin sonsuz destekçileri, benim sınırlarımı daraltmak yerine her zaman sınırlarımın ötesine gitmem için elinden ne geliyorsa yapan, en önemlisi de beni ben yapan sevgili annem Mehtap AKGÜNER, babam Bülent AKGÜNER, abim Volkan AKGÜNER, ablam Türkan AKGÜNER GİRGİN ve bana ikinci abla olan Fatma AKGÜNER'e,

En zor zamanlarımda bile bana neler başarabileceğimi unutturmayan, bana benden çok inanan, başarılarıyla bana ilham olmuş ve olmaya devam eden, hayallerimin ve hayatımın destekçisi Onur Samet YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
ETİK BEYANI ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ XV
ÖZET ..... XVİİİ
ABSTRACT ..... XİX
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Doku Mühendisliği 3
1.2. Kemik Doku Mühendisliği 5
1.2.1. Kemik Doku ve Özellikleri 6
1.2.2. Kemik Hasarlarının Tedavisi İçin Güncel Yaklaşımlar 9
1.2.3. Kemik Doku İskelelerinde Aranan Özellikler 10
1.2.3.1. Biyouyumluluk 11
1.2.3.2. Mekanik Özellikler 12
1.2.3.3. Gözeneklilik 13
1.2.3.4. Biyobozunurluk 14
1.3. Kemik Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler 14
1.3.1. Metaller 14
1.3.2. Biyoseramikler 14
1.3.3. İnorganik Nanopartiküller 15
1.3.4. Çift Katmanlı Hidroksit Bileşikleri (LDH) 16
1.3.5. Sentetik Polimerler 17
1.3.6. Doğal Polimerler 18
1.3.6.1. Jelatin 18
1.3.6.2. İpek Fibroin 19

1.4. Hidrojeller 20
1.4.1. Nanokompozit Hidrojeller 22
1.4.2. İpek Fibroin Bazlı Hidrojeller 25
1.4.3. JelMA Bazlı Hidrojeller 26
1.5. Doku İskelesi Üretim Teknikleri 28
1.5.1. Çözücü Döküm Yöntemi 28
1.5.2. Dondurarak Kurutma (Freeze Drying) 29
1.5.3. Elektrospinning (Elektro-eğirme) Yöntemi 30
1.5.4. 3B-Biyoyazıcı 31
1.5.5. Mikro-Kalıplama (Mikro-molding) Yöntemi 32
1.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Tipleri 34
1.6.1. Kök Hücreler 34
1.6.2. Mezenkimal Kök Hücreler 37
1.6.2.1. Wharton Jeli Kök Hücreler 39
2. MATERYAL VE METOD 43
2.1. Kimyasal Malzemeler 43
2.2. Sarf Malzemeler 44
2.3. Hücre Hatları 45
2.4. Kullanılan Cihazlar 45
2.5. İpek Kozalarından İpek Fibroin İzolasyonu 46
2.6. Jelatin Metakrilat (JelMA) Sentezi 47
2.7. Çift Tabakalı Hidroksit Bileşiklerinin (LDH) Sentezi ve Nanopartiküllerinin Eldesi 48
2.8. JelMA Polimerinin Karakterizasyonu 49
2.9. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu 49
2.10. Doku İskelelerinin Optimizasyon Çalışmaları 50
2.11. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Sentezi 51
2.12. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 52
2.13. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitelerinin Belirlemesi 52
2.14. Doku İskelelerinin Degradasyon Hızlarının Belirlenmesi 52
2.15. Doku İskelelerinin Mekaniksel Dayanımlarının Belirlenmesi 53
2.16. WJMKH'nın *In Vitro* Çalışmalar için Hazırlanması 53

2.16.1. WJMKH'nın Stoktan Çıkartılması....53
2.16.2. WJMKH'nın Pasajlanması....53
2.16.3. WJMKH'nın Stoklanması....54
2.16.4. Hemositometre ile WJMKH'nın Sayımı....54
2.17. LDH Nanopartiküllerin Sitotoksisite Analizi....55
2.18. Doku İskelelerinde Hücre Adezyonu ve DAPI/Actin Analizi....55
2.19. Doku İskelelerinde Hücre Enkapsülasyonu ve Canlılık Analizi....57
2.20. Doku İskelelerinde Enkapsüle Edilen Hücrelerin Çoğalma Hızı Analizi....58
2.21. Osteojenik Farklılaştırma Çalışmaları....58
2.21.1. Alizarin Red Analizi....58
2.21.2. Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi....59
2.21.3. Biçinkoninik Asit (BCA) Analizi....59
2.21.4. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Toksisite Analizi....59
2.21.5. Histolojik Analiz....60
2.21.5.1. Hematoksilen Eosin Boyaması....60
2.21.5.2. Masson Trikom Boyaması....60
2.21.6. İmmün Floresan Boyama....61
2.22. Hücre Yüklü Doku İskelelerinde SEM Analizi....61
3. BULGULAR....63
3.1. JelMA Polimerinin Karakterizayonu....63
3.2. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu....64
3.3. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyonu....68
3.3.1. Doku İskelelerinin Yapısal Karakterizasyon Sonuçları....68
3.3.2. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesi Sonuçları....71
3.3.3. Doku İskelelerinin Degredasyon Hızı Sonuçları....72
3.3.4. Doku İskelelerinin Mekaniksel Dayanım Sonuçları....72
3.3.5. *In vitro* Hücre Kültürü Sonuçları....73
3.3.5.1. Hücre Adezyonu Sonuçları....73
3.3.5.2. Hücre Enkapsülasyonu Sonuçları....75
3.3.5.3. Hücre-Yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları....77
3.3.5.4. Hücre-Yüklü Doku İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları....85
4. TARTIŞMA....87

4.1. JelMA Polimerinin Karakterizayon Sonuçları 89
4.1.1. FTIR Analizi Sonuçları 89
4.1.2. ^{1}H NMR Analizi Sonuçları 90
4.2. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Sonuçları 90
4.2.1. FTIR Analizi Sonuçları 90
4.2.2. XRD Analizi Sonuçları 91
4.2.3. ICP-MS Analizi Sonuçları 91
4.2.4. Partikül Boyu, Zeta Potansiyeli ve TEM Analizi Sonuçları 91
4.2.5. MTT Analizi Sonuçları 92
4.3. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyon Sonuçları 92
4.3.1. FTIR Analizi Sonuçları 92
4.3.2. SEM Analizi Sonuçları 93
4.3.3. Su Tutma Kapasitesi Sonuçları 93
4.3.4. Degredasyon Hızı Sonuçları 94
4.3.5. Mekaniksel Dayanım Sonuçları 94
4.3.6. Hücre Adezyonu Sonuçları 96
4.3.7. Hücre Enkapsülasyonu Sonuçları 96
4.3.7.1. Live/Dead Analizi Sonuçları 96
4.3.7.2. PrestoBlue Analizi Sonuçları 97
4.3.7.3. DAPI/Actin Analizi Sonuçları 98
4.4. Hücre-yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları 98
4.4.1. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları 98
4.4.2. ALP Aktivitesi Sonuçları 99
4.4.3. LDH Analizi Sonuçları 99
4.4.4. BCA Analizi Sonuçları 100
4.4.5. Histolojik Analiz Sonuçları 100
4.4.6. İmmünFloresan Boyama Sonuçları 101
4.5. Hücre-yüklü Doku İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları 102
5. SONUÇ 104
KAYNAKÇA 105

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1: Farklı tipteki kök hücrelerin karakteristik özellikleri (Herberts ve ark., 2011). 36
Tablo 2.1: Geliştirilen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin formülasyon adları, bileşim oranları ve UV süreleri. 51
Tablo 3.1: Sentezlenen LDH nanopartiküllerinin ICP-MS analiz sonucu..... 65
Tablo 3.2: Mg-AI LDH nanopartiküllerinin 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrası % hücre canlılığı sonuçları. 68
Tablo 3.3: Doku iskelelerinin PrestoBlue analizi sonuçları (BFY: Bağıl floresan yoğunluk). 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Üç boyutlu (3B) üretim tekniği ile doku mühendisliği yaklaşımı 3
Şekil 1.2: Kemik yapısının komponentleri 7
Şekil 1.3: Kemiğin hiyerarşik organizasyonu 8
Şekil 1.4: Kemiğin morfolojik yapısı 9
Şekil 1.5: (A) Doku mühendisliği için gerekli olan biyomalzemelerin belirgin özelliklerinin gösterimi ve (B) Doku mühendisliği ile ilişkili biyomalzemeler, hücre ve büyüme faktörlerinin (sinyalizasyon) kombinasyonu 11
Şekil 1.6: Doku iskelelerin sahip olması gereken özellikler: (a) Polimerik sistemin hidrasyonu önemlidir. Hücrelere besin maddesi ve atık taşınmasını sağlar. (b) Degradasyon mekanizması, hücresel göçü ve doku rejenerasyonunu etkilemek üzere ayarlanabilir olmalıdır. (c) Viskoz polimer çözeltileri, 3B-Biyoyazıcı sisteminde nozul içerisindeki kesme kuvvetlerinden hücreleri daha iyi korur. Düşük viskoziteli polimer çözeltileri ise hücrelerin yerleşmesine izin vermeyebilir. (d) Çapraz bağlanma mekanizması polimer türüne, hücre yaşayabilirliğine ve istenen yapı özelliklerine bağlıdır. (e) Hücre yapışması hücrenin kaderini belirler. Polimer türü veya işleme yoluyla kontrol edilebilir. (f) Doku iskelesinin kararlılığı, doğal dokuyu mekanik olarak taklit ettiği ve hücre büyümesini düzenleyerek şeklini koruduğu için hayati önem taşımaktadır 13
Şekil 1.7: LDH yapısının ve sinyal faktörü (BMP-2) yüklü LDH yapısının şematik gösterimi. 16
Şekil 1.8: (A) İpek filamentinin bileşimi, (B) İpek amino asitlerin tekrarlanan birimleri. 20
Şekil 1.9: Çeşitli nanomaddeler ve polimer zincirleri, doku mühendisliği farklı tipleri için nanokompozit hidrojeller oluşturmak üzere birleştirildiğinin şematik gösterimi 24
Şekil 1.10: Jelatinin metakrilanması ile JelMA eldesi. 27
Şekil 1.11: Dondurarak kurutma yöntemi 29
Şekil 1.12: Elektro- eğirme yöntemi kullanılarak elde edilen PLGA bazlı nanofiberlerin üretiminin şematik görünümü 31
Şekil 1.13:Işık altında çapraz-bağlanabilir kitosan bazlı hidrojel ile mikro-kalıplama teknolojisini kullanarak sferoid üretim şeması 33

Şekil 1.14: JelMA polimerinden UV ışığı altında mikro-kalıpma yöntemi ile hidrojel doku iskelesi üretimi. 33
Şekil 1.15: Kök hücre sınıflandırmasına genel bir bakış. Totipotensi: Döllenmeden sonra, embriyonik kök hücreler (EKH'ler) üç germ katmanını ve ekstraembriyonik dokuları veya plasental hücreleri oluşturma yeteneğini koruduğu grup. Pluripotensi: Blastosist aşamasının totipotent hücrelerle karşılaştırıldığında daha özelleşmiş hücreleri, kendi kendini yenileme ve üç germ katmanına farklılaşma yeteneğine sahip olmasıyla birlikte plasental hücreleri veya ekstraembriyonik dokuları oluşturmaz. Multipotensi: Yetişkin veya somatik kök hücrelerden oluşan grup. Doğum sonrası dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Kendi kendilerini yenileme yeteneği pluripotent hücrelere göre daha sınırlıdır 35
Şekil 1.16: Kök hücrelerin ve dokuya özgü mezenkimal progenitörlerin organizasyonunun şekil üzerinde gösterimi 38
Şekil 1.17: Mezenkimal kök hücrelerin çoğalma, soy, farklılaşma ve maturasyonunu gösteren süreç. Varsayılan mezenkimal kök hücreden (MKH) farklılaşmış fenotiplere hücresel geçişler aşamalı şekilde şematik olarak tasvir edilmiştir 39
Şekil 1.18: Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerinin (WJMKH) çeşitli dokulardaki rejeneratif etkileri 40
Şekil 2.1: İpek fibroin eldesinin şematik gösterimi 47
Şekil 2.2: JelMA sentezinin şematik gösterimi. 48
Şekil 2.3: Mikro-kalıplama tekniği ile doku iskelelerinin üretimi 50
Şekil 3.1: Jelatin ve JelMA polimerlerinin FTIR sonuçları. 63
Şekil 3.2: Jelatin ve JelMA polimerlerinin ^{1}H NMR sonuçları. 63
Şekil 3.3: LDH nanopartiküllerinin FTIR sonuçları. 64
Şekil 3.4: LDH nanopartiküllerinin XRD analizi sonuçları. 65
Şekil 3.5: LDH nanopartiküllerinin partikül boyu analiz sonuçları (A), zeta potansiyeli sonuçları (B) ve TEM görüntüleri (C). 66
Şekil 3.6: LDH nanopartiküllerinin MTT sonuçları: (A) 24 saat ve (B) 48 saat inkübasyon süresi. 67
Şekil 3.7: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin FTIR sonuçları. 69
Şekil 3.8: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM sonuçları. 70
Şekil 3.9: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin şişme oranı sonuçları. 71

Şekil 3.10: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin PBS ortamında degredasyon hızı sonuçları. 72
Şekil 3.11: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin mekaniksel dayanım sonuçları: fiziksel ve mekaniksel özellikleri: (A) gerilme-genirim eğrileri, (B) elastik modülleri, (C) sıkıştırma dayanımları ve (D) kopma anında uzama değerleri. 73
Şekil 3.12: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin hücre adezyonu sonuçları (ölçek çubuğu = 100 μm). 74
Şekil 3.13: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 3 ve 5 gün inkübasyon süreleri sonrası canlılık analizi sonuçları. Yeşil noktalar canlı hücreleri, kırmızı noktalar ölü hücreleri göstermektedir (ölçek çubuğu =100 μm). 75
Şekil 3.14: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivite sonuçları (proliferasyon hızı) (BFY: Bağıl floresan yoğunluk). 76
Şekil 3.15: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrası Rhodamine-Phalloidin/DAPI ile boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 25 μm). 77
Şekil 3.16: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 14 ve 21 gün inkübasyon süreleri sonrası Alizarin Red S boyama sonuçları ölçek çubuğu = 250 μm). 78
Şekil 3.17: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2-21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* ALP aktivitesi sonuçları (*p< 0,05). 79
Şekil 3.18: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2- 21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* LDH aktivitesi sonuçları (*p< 0,05). 80
Şekil 3.19: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2- 21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* BCA aktivitesi sonuçları. 80
Şekil 3.20: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine ait Hematoksilen-Eozin boyama sonucu elde edilen görüntüler (ölçek çubuğu = 100 μm). 81
Şekil 3.21: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine ait Massom-Trikrom boyama sonucu elde edilen görüntüler (ölçek çubuğu = 100 μm). 82
Şekil 3.22: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası Col1A immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 μm). 83

Şekil 3.23: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası Kemik Sialoprotein immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 μm). 84
Şekil 3.24: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası osteokalsin immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 μm) 85
Şekil 3.25: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası SEM analizi sonuçları. 86

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

%SD : % şişme miktarı

^{1}H NMR : Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

2B : İki boyutlu

3B : Üç boyutlu

ADKH : Adipoz kaynaklı kök hücreler

$Al(NO_3)9H_2O$: Alüminyum nitrat nonahidrat

ALP : Alkalen fosfataz

BCA : Biçinkoninik asit

BSA : Sığır serum albumin

BSP : Kemik sialoprotein

CNT : Karbon nanotüp

Col : Kolajen

COL1A : Kolajen Tip 1 Alfa

DAPI : 4’ 6, 6-diamidino-2-fenilindol

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

FDA : ABD Gıda ve İlaç İdaresi

FTIR : Fourier Transforn Infrared Spektroskopisi

GNP : Altın nanoparçacık

GO : Grafen oksit

H&E : Hematoksilen & Eosin

HA : Hidroksiapatit

HCI : Hidrojen klorür

HKH **:** Hematopoetik kök hücreler

ICP-MS **:** İndüktif Eşleşmiş Plazma ve Kütle Spektrometresi

IF **:** İpek fibroin

iWJKH **:** İnsan göbek kordonu wharton jeli

JelMA **:** Jelatin metakrilamid

KiMKH **:** Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri

LDH **:** Çift katmanlı hidroksit bileşikleri

LDH **:** Laktat dehidrogenaz

LiB **:** Lityum bromür

$Mg_2(NO_3)_26H_2O$ **:** Magnezyum nitrat tetrahidrat

MKH **:** Mezenkimal kök hücre

MKKH **:** Menstural kan kök hücreleri

MTT **:** Metilltiazoldifeniltetrazolyum bromür

Na_2CO_3 **:** Sodyum karbonat

NaOH **:** Sodyum hidroksit

NKH **:** Nöral kök hücreler

OCN : Osteokalsin

PAM **:** Poliakrilamid

PBS **:** Fosfat tuz tamponu

PCL **:** Polikaprolaktan

PEG **:** Polietilen glikol

PEO : Plazma elektrolitik oksidasyon

PFA **:** Paraformaldehit

PGA **:** Poliglikolik asit

PHEMA **:** Poli-hidroksietilmetakrilat

PLA **:** Polilaktik asit

PLGA **:** Polilaktit-ko-glikolid

PLLA **:** Poli L-laktik asit

RGD **:** Arjinin-glisin-aspartik asit

rhFGF2 **:** Rekombinant insan fibroblast büyüme faktörü 2

rMKH **:** Sıçan kaynaklı mezenkimal kök hücreler

RNA **:** Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)

SEM **:** Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)

TAX **:** Paklitaksel

UV **:** Ultraviyole

Wi **:** Doku iskelelerinin kuru haldeki ağırlığı

WJ **:** Wharton jeli

WJMKH **:** Wharton jeli mezenkimal kök hücreleri

Ws **:** Doku iskelelerinin belirli zaman aralıklarında bulunan ağırlığı

XRD **:** X-Işını Difraktometresi

YKH **:** Yetişkin kök hücreler

ÖZET

Akgüner, Z.P. (2021). Kök Hücre Yüklü İpek Fibroin-Temelli Nanohibrit Kemik Doku İskelelerinin Geliştirilmesi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tez çalışması kapsamında, farklı oranlarda çift katmanlı hidroksit bileşikleri (LDH) içeren bir seri jelatin-metakrilat (JelMA)/ İpek fibroin (J/IF LDH) doku iskeleleri hazırlanmış, LDH nanopartiküllerinin fiziksel, kimyasal, mekaniksel ve biyolojik özellikleri üzerine etkileri ve kemik doku mühendisliğinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Mg-Al LDH nanopartikülleri hidrotermal metot kullanılarak sentezlenmiş, FTIR, XRD, ICP-MS, TEM, partikül boyu ve zeta potansiyeli analizleri ile karakterize edilmiştir. Mg-Al LDH nanopartiküllerinin sitotoksisitesi Wharton jeli mezenkimal kök hücreleri (WJMKH) kullanılarak MTT testi ile belirlenmiştir. J/IF LDH doku iskeleleri, fotobaşlatıcı varlığında UV ışığı altında mikro-kalıplama tekniği ile hazırlanmıştır. Yapıları FTIR ve SEM analizi, şişme, degredasyon ve mekaniksel dayanım testleri ile karakterize edilmiştir. WJMKH hücrelerinin doku iskeleleriyle olan etkileşimlerinin incelenmesi için WJMKH hücreleri J/IF LDH doku iskelerinin üzerine ekilmiş, yapışma ve çoğalma davranışları incelenmiştir. Takiben doku iskelelerine enkapsüle edien WJMKH hücrelerinin canlılığı, çoğalma hızları ve morfolojileri Live/Dead, PrestoBlue, DAPI/Actin analizleri ile incelenmiştir. Geliştirilen doku iskelelerinin osteojenik farklılaştırma kapasiteleri; Alkalen Fosfataz, Biçinkoninik asit, Alizarin Red S, Hematoksilen & Eosin, Masson Trikrom ve immünfloresan boyamaları ve SEM analizleri ile değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar, geliştirilen Mg-Al LDH nanopartikül katkılı JelMA/IF temelli nanohibrit doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için yapay kemik üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, İpek fibroin, JelMA, LDH nanopartikülleri, Wharton jeli mezenkimal kök hücreleri

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

ABSTRACT

Akgüner, Z.P. (2021). Development of Stem Cell Loaded Silk Fibroin-Based Nanohybrid Bone Tissue Engineered Scaffolds. Istinye University, Institute of Health Science, Department of Stem Cell and Tissue Engineering, Master Thesis. Istanbul.

Within the scope of the thesis study, a series of gelatin-methacrylate (JelMA)/ Silk fibroin (J/IF LDH) tissue scaffolds containing layered double hydroxide compounds (LDH) in different proportions were prepared, the effects of LDH nanoparticles on physical, chemical, mechanical and biological properties and their usability in bone tissue engineering were investigated. Mg-Al LDH nanoparticles were synthesized using hydrothermal method and characterized by FTIR, XRD, ICP-MS, TEM, particle size and zeta potential analyzes. Cytotoxicity of Mg-Al LDH nanoparticles was determined by MTT assay using Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJ-MSCs). J/IF LDH tissue scaffolds were prepared by micro-molding technique under UV light in the presence of the photoinitiator. Their structures have been characterized by FTIR and SEM analysis, swelling, degradation and mechanical strength tests. In order to examine the interaction of WJ-MSCs with tissue scaffolds, WJ-MSCs were seeded on J/IF LDH tissue scaffolds, and their adhesion and proliferation behaviors were examined. Subsequently, viability, proliferation rate and morphology of WJ-MSCs- laden tissue scaffolds were examined by Live/Dead, PrestoBlue, DAPI/Actin analyzes. Osteogenic differentiation abilities of the developed tissue scaffolds were evaluated by Alkaline Phosphatase, Bicinchoninic acid, Alizarin Red S, Hematoxylin & Eosin, Masson's Trichrome and immunofluorescence staining and SEM analyzes. All results showed that the developed JelMA/IF- based nanohybrid tissue scaffolds containing Mg-Al LDH nanoparticles can be used in the production of artificial bone for bone tissue engineering applications.

Key Words: Bone tissue engineering, Silk fibroin, JelMA, LDH nanoparticles, Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells

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

GİRİŞ

Kemik yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip bir doku olsa da kritik boyutun üzerindeki hasarlar medikal müdahalelere ihtiyaç duymaktadır. Dünyada her yıl milyonlarca insan, kritik kırıklar, kemik tümörleri veya travmaların neden olduğu kemik kusurları ile karşı karşıyadır. Otogreft transplantasyonu, kemik kusurları için altın standart tedavi olarak kabul edilse de doku donör yetersizliği ve donör bölge morbiditesi gibi dezavantajları nedeniyle klinik uygulamalar sınırlı kalmaktadır (Zheng ve ark., 2018). Son yıllarda, kemik dokusu mühendisliği alanında doğal kemiğin yapısını ve kimyasal bileşimlerini taklit edebilecek biyouyumlu ve biyomimetik kemik doku iskelelerinin geliştirilmesi kapsamında araştırmalar devam etmektedir (Ramanathan ve ark., 2018; Zheng ve ark., 2018). Doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen ideal bir doku iskelesi; hücre adezyonunu, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemeli, biyouyumlu, gözenekli, gerekli mekaniksel dayanıma sahip ve biyobozunabilir olmalıdır (Shafiei ve ark., 2016). Aynı zamanda kemik doku mühendisliğinde, kemik doku iskelesi yapay bir hücre dışı matris sağlamalı, osteokonduktif ve osteoinduktif olmalı, hücrelerin farklılaşmasını ve mineralize kemik oluşumunu destekleyen düzenleyici faktörleri içermelidir (Kang ve ark., 2018). Jelatin, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılan biyouyumlu, biyobozunur, yapısında hücre bağlama motifleri (RGD) bulunduran ve kolajenin hidrolizi ile türetilen doğal bir polimerdir (Zheng ve ark., 2018). Jelatin polimerinin metakrilik anhidrit ile modifiye edilmesiyle jelatin-metakrilat (JelMA) polimeri elde edilmektedir. JelMA polimeri, modifiye edilmiş doğal ECM bileşenlerinden oluşan fotopolimerize edilebilir bir yapıya sahiptir ve bu da onu doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir malzeme haline getirmektedir (Yue ve ark., 2015). Ancak, yalnızca JelMA temelli olan doku iskeleleri zayıf mekanik özellikler ve hızlı biyobozunma davranışı göstermektedirler (Fayyazbakhsh ve ark., 2017b). Bu zorlukların üstesinden gelmek için, çeşitli inorganik ajanlar yapıya entegre edilerek, biyo-mineralizasyonu arttırmaya yol açan kalsiyum iyonlarının difüzyonunu modüle ederek JelMA temelli hidrojellerin biyoaktivitesi iyileştirilmektedir. Brusit benzeri malzemeler olarak bilinen çift katmanlı hidroksit bileşikleri (LDH) diğer inorganik nanopartiküllere kıyasla mükemmel biyouyumluluk, yüksek ilaç yükleme kapasitesi,

biyoaktivite, biyobozunurluk ve pH'a duyarlı özelliklere sahiptir (Piao ve ark., 2019). Yaklaşık 100 nm boyutlara sahip LDH nanopartiküllerinin içeriğinde bulunan Mg^{+2} iyonları, kök hücrelerin üzerinde alkalen fosfataz (ALP) aktivitesini arttırma ve osteogenez yolları üzerinde sinerjik bir etkiye sahiptir (Kang ve ark., 2017).

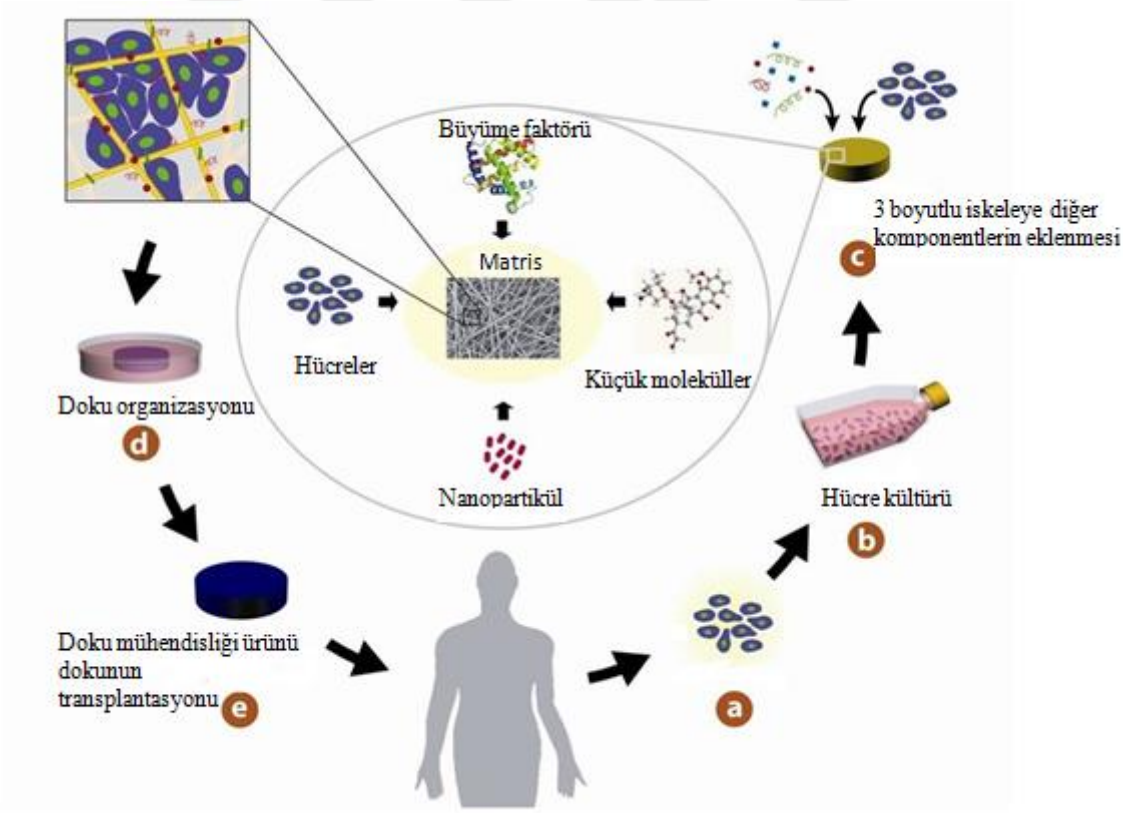
Bombyx mori'den türetilen ipek fibroin (IF), doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için iyi mekanik mukavemet, biyouyumluluk, yüksek çözünmüş oksijen ve su buharı geçirgenliği ve direnç gibi birçok önemli malzeme özelliklerine sahip, kendiliğinden birleşen yapısal bir proteindir. IF'nin hidrojel sistemleri için önemli bir avantajı, herhangi bir kimyasal modifikasyon olmaksızın fiziksel olarak çapraz bağlanma kabiliyetidir ve mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını destekleme yeteneği sayesinde kemik dokusu mühendisliği için uygun bir iskele malzemesi haline gelmiştir (Xiao ve ark., 2011; Melke ve ark., 2016).

Tüm bunlar ışığında tez çalışmasının amacı yeni bir nanohibrit LDH nanopartikülü ile güçlendirilmiş bir JelMA/IF doku iskelesi üretmek ve *in vitro* karakterizasyonunun yapılarak kemik doku mühendisliğinde kullanımını araştırmaktır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Doku Mühendisliği

Vücutta kaza, travma veya kanser gibi herhangi bir sebepten dolayı meydana gelen hasarlar için tıbbi tekniklerdeki önemli ilerlemelere rağmen tedavi amaçlı doku ve organ nakli hala yaygın olarak kabul gören bir tedavi biçimidir. Bununla birlikte, otolog nakil, alınabilecek dokunun sınırlı olması veya ikincil cerrahi sebepleriyle hastalarda ağrı ve enfeksiyona sebep olabilmekte bu da yöntemi sınırlamaktadır. Başka insanlardan veya hayvanlardan alınan alternatif doku kaynakları da kullanılmakta, fakat bu da hastalarda oluşabilecek immünojenik tepkiler nedeniyle sorun oluşturmaktadır. Bu sebepler göz önünde bulundurularak, doku ve organların doğrudan yenilenmesine katkı sağlamak için ortaya çıkan doku mühendisliği, hastaları minimal invazyon ve acı ile tedavi etmek umuduyla birçok bilim insanı ve cerrahın umudu olmuştur (Shin ve ark., 2003).



Şekil 1.1: Üç boyutlu (3B) üretim tekniği ile doku mühendisliği yaklaşımı (Anonim, 2020).

Doku mühendisliği, doku ve organ fonksiyonlarının yeniden düzenlenmesini amaçlayan (Vats ve ark., 2003), doku yenilenmesini teşvik etmek için biyouyumlu malzemeler ile hücreleri birleştirerek hasarlı dokuyu yenileyen veya doku işlevini geliştiren biyolojik sinyalleri yönlendirmek üzere mühendislik ve yaşam bilimlerinin temellerini uygulayan disiplinler arası bir alandır (Langer ve Vacanti 1993; O'Brien, 2011) (Şekil 1.1). Bu alanın kullanım amacı arasında iki ana yaklaşım gösterilmektedir. Bunlardan birincisi; doku iskelelerinin hücre popülasyonlarının *in vitro* koşullarda bağlanabildiği bir destek ve hücre dağıtım aracı olarak kullanılabilmesidir. Yani hücreler daha sonra nakil için bir dokunun temellerini oluşturmak amacıyla ekstrasellüler matris oluşturmaya teşvik edilmektedir. İkinci yaklaşım ise, iskeleyi bir substrat veya lokalize bölgedeki belirli hücresel işlevi etkinleştirmek için ilaç salımı aracı olarak kullanmayı içermektedir. Böylece doku iskelesi, vücuda implante edilen hücreleri kendi bölgesine almasını ve hücrelerin ekstrasellüler matris oluşturarak yeni doku oluşturmasını desteklemektedir. Bu iki yaklaşım birbirinden farklı değildir ve kolayca birleştirilebilmektedir (Howard ve ark., 2008).

Doku mühendisliği ayrıca, yeni doku oluşumu ile ilgili olan yapı-işlev ilişkisinin yönlerini araştırmaya ve spesifik bir tıbbi tedavinin klinik sonucunu tahmin etmeye yönelik eşsiz fırsatlar sunmaktadır. Doku mühendisliği kavramına dayanarak hasarlı organ veya dokuların başarılı bir şekilde yenilenmesini sağlamak için bazı maddeler göz önünde bulundurulmalıdır; bunlar hücre büyümesine yönelik mekanik bir destek görevi gören biyomateryal iskeleler, spesifik hücre tiplerine göre farklılaştırılabilen progenitör hücreler ve büyüme fakörleri gibi birçok kritik unsurlardır (Shin ve ark., 2003).

Biyomateryaller, doku mühendisliği stratejileri için çok önemli roller oynamaktadır (Hubbell, 1995). Biyomateryallerin doku mühendisliğinde kullanımı için biyolojik olarak parçalanabilen gözenekli iskeleler kritik önem taşımaktadır. (Ma, 2008). Bu gözenekli iskeleler doku için bir destek sağlamanın yanı sıra, yeni doku oluşumunu, vaskülerizasyonu, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemelidir. Yani hücreler için uygun bir ortam sağlamalıdır. Bu nedenle, kimyasal bileşim, fiziksel yapı ve biyolojik olarak fonksiyonel kısımlar doku mühendisliği yapı iskeleleri için önem taşımaktadır (Liu ve ark., 2012). İdeal bir doku iskelesi, ayarlanabilir bozunma davranışı göstermeli, toksik olmayan bozunma ürünleri ile biyolojik olarak uyumlu olmalı ve biyolojik olarak bozunabilir bir yapıda olmalıdır. Besin ve atık taşımayı

kolaylaştırmak için 3B, çok gözenekli ve birbirine bağlı bir gözenek ağına sahip olmak; yenilenmeyi desteklemek için mekanik bütünlüğün olması; ve hücrelerle pozitif etkileşim için uygun yüzey kimyasına ve yüzey topografisine sahip olmak gibi özellikleri içerisinde barındırması doku mühendisliği yapı iskeleleri için çok önemlidir (Guo ve Ma., 2014).

Sonuç olarak, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskeleleri, hücrelerin farklılaşması ve çeşitli dokuların yenilenmesi amacıyla optimum mikro ortamı sağlamakla görevlidir.

1.2. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik, ağırlıklı olarak organik bir bileşen olan tip-1 kolajen ve inorganik bileşen olan hidroksiapatitten oluşan, bir bireyin yaşamı boyunca yeniden şekillenmeye devam eden dinamik ve vaskülerize bir dokudur. Vücudun hareketinde rol oynamakla birlikte, iskeletin yeterli taşıma kapasitesine sahip olmasını sağlar ve iç organları koruyucu bir kılıf görevi görür (Weiner ve Wagner, 1998; Stevens, 2008).

Kemik dokusunun mekanik kuvveti vücudun çeşitli yüklere dayanabilmesi için önemli bir özelliktir, bu nedenle kemik dokusu biyomalzemelerin kusurlu bölgede fizyolojik rolü olmasını ister (Shrivats ve ark., 2014). Doku mühendisliği ile kemik oluşumu için, biyomalzemenin bozunma süresini kontrol etmek, hücreler için biyouyumlu özellik sağlamak ve matris birikimini mümkün kılmak temel konulardır. Biyomalzemeler doğal ve sentetik bileşenlerden hazırlanan organik ve inorganik malzemeler halinde sınıflandırılmaktadır. Sentetik polimerler kontrollü koşullar altında üretilmektedir. Bunlara örnek olarak polikaprolaktan (PCL), poliglikolik asit (PGA) gibi malzemeler gösterilebilir. Kontrollü koşullar ile üretilen bu polimerlerin, gerilme direnci, elastik modülü ve bozunma hızı gibi mekanik ve fiziksel özellikleri tekrarlanabilir fakat vücut tarafından reddedilme ve uzun süreli bozunmama gibi kısıtlamalar içermektedirler. Genel olarak, hiyalüronik asit, kolajen, ipek ve aljinat gibi doğal olarak elde edilen biyomalzemeler sentetik malzemelerle karşılaştırıldığında; biyouyumluluk, hücre yapışması ve göçü ayrıca osteokondüktiviteyi sağlama gibi avantajlara sahiptir (Hutmacher., 2000).

Kemik onarımı veya yenilenmesi, birçok molekülü ve hücreyi içeren karmaşık bir dinamik olayın parçasıdır. Doku iskelesi implantasyonundan sonra gerçekleşen terapötik eylemler, vücutta gelişen biyolojik olaylarla uyumlu olmalı ve daha iyi bir iyileşme sürecini kolaylaştırmalıdır. Aktif iyileşme sürecindeki önemli olaylar arasında doku reddi olmayan fakat hafif enflamatuar reaksiyonlar, kan damarları oluşturmak için önemli bir nokta olan anjiyogenez, progenitör / kök hücrelerin alınması ve bu hücrelerin osteojenik soylara doğru ilerletilmesi ve matris olgunlaşmasının tamamlanması gösterilebilir. Bu nedenle, iskelelerin bu biyolojik işlemlere yardımcı olması, hücrelerin uyarılması ve kişi için uyarlanması iskele temelli kemik doku mühendisliğinde önemli bir kilometre taşıdır (Perez ve ark., 2015).

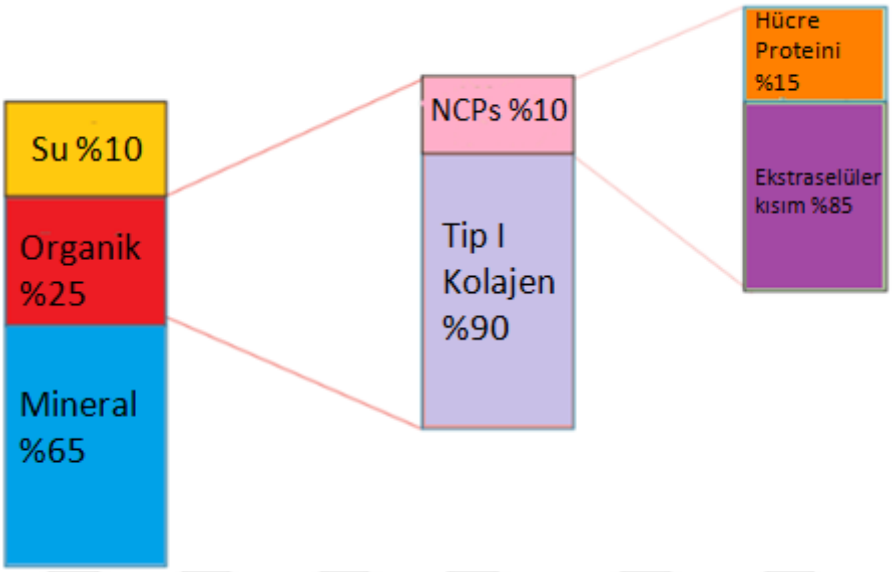
1.2.1. Kemik Doku ve Özellikleri

Kemik, iz bırakmadan iyileşme ve yeniden şekillenme gibi benzersiz bir kapasiteye sahip, sert, dinamik, bol damarlı ve bağlayıcı bir dokudur. Kemik, iskeletin stabilitesini sağlamadaki birincil işlevi nedeniyle, en çok araştırılan biyolojik materyallerden biridir. Mekanik kuvvetler dahil olmak üzere farklı yerel uyaranlara karşı hassastır ve mekanik özelliklerini çevresel değişikenlere uyarlama konusunda mükemmel yeteneklere sahiptir (Müller, 2009; Kasoju ve Bora, 2012).

Kemik yapının yaklaşık %65'i mineral bileşenler, %25'i organik yapılar ve ekstrasellüler matris bileşenleri ve geri kalan %10'luk kısmı ise su ve lipitlerden oluşmaktadır (Clarke, 2008). İnorganik bir yapı olan hidroksiapatit (HA) ile organik yapıların %90'ını oluşturan, hücrelerin yapışmasını destekleyen, dokuya sertlik ve esneklik veren kolajen gibi yapılar ise, kemik yapısında gereken basınç dayanımı ve kemiğin tokluğunun ayrılmaz bir parçasıdır. Ek olarak, kolajen olmayan yapılar arasında bulunan 200'den fazla farklı tipte matris proteini (glikoproteinler, proteoglikanlar, sialoproteinler, osteokalsin, osteonektin vb.) hücre dışı ortamda sinyallere katkıda bulunur (Stevens, 2008; Sabir ve ark., 2009).

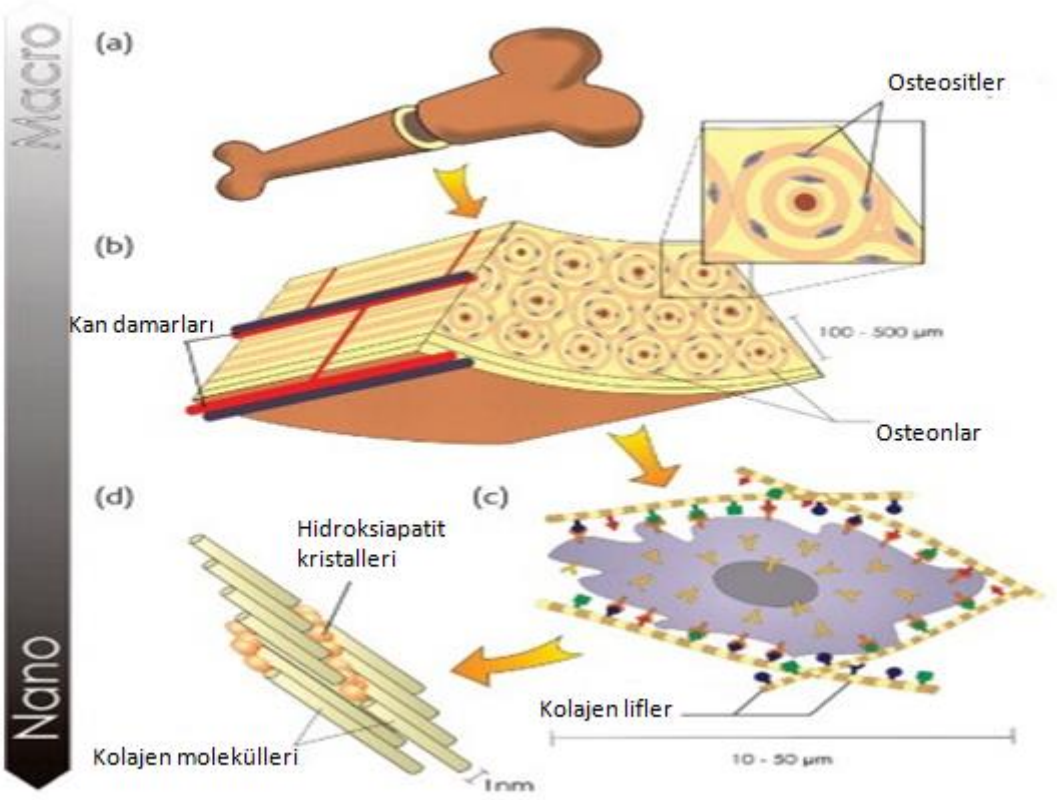
Kemik, yaklaşık %50 ila %70 oranında mineralden oluşur. Kemiğin inorganik içeriği çoğunlukla, magnezyum, az miktarda karbonat ve hidroksiapatittir. İnorganik yapıdaki hidroksiapatit kristalleri; matris olgunlaşması, alkalenfosfataz ve osteokalsin, osteopontin ve kemik sialoproteinini içeren çeşitli kolajen dışı proteinlerin ekspresyonu

ile ilişkilidir. Bu kalsiyum ve fosfat bağlayıcı proteinlerin, oluşan hidroksiapatit kristallerinin miktarını ve boyutunu ayarlayarak mineral birikimini düzenlemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Kemik minerali, kemiğe mekanik sertlik ve yük dayanımı sağlarken, organik matrise esneklik ve rahat hareket kabiliyeti sağlar (Clarke, 2008).



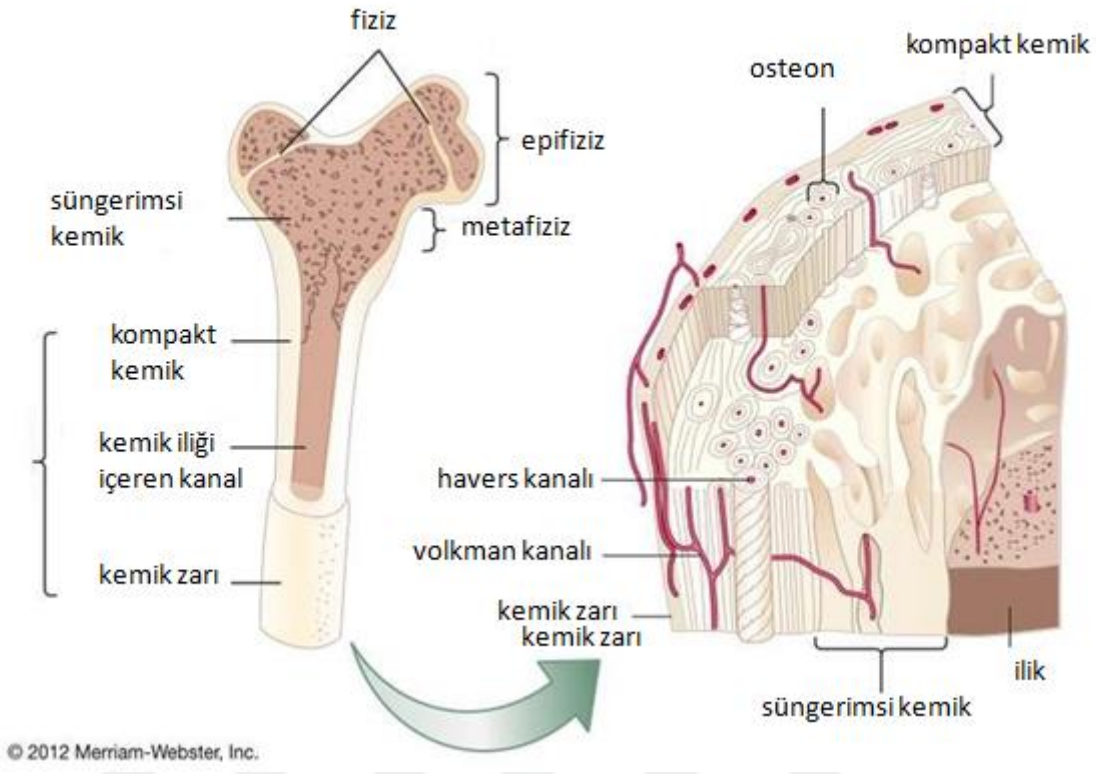
Şekil 1.2: Kemik yapısının komponentleri.

Kemik dokusu, destek hücreleri olan osteoblastlar ve osteositler ile yeniden şekillenmeden sorumlu hücreler olan osteoklastlardan oluşur (Kini ve Nandeesh., 2012). Osteoblastlar, kemik iliği stromasının mezenkimal kök hücrelerinden olan osteoprogenitör hücrelerden köken almaktadır. Mononükleer olan osteoblastlar, osteoid adı verilen kemik matris sentezi ve sonrasında gerçekleşen mineralizasyonunda görevlidir. Osteoblastlar ayrıca osteoklastların düzenlenmesinden ve kemik matrisinin birikmesinden sorumludur (Mackie, 2003). Osteositler terminal olarak osteoblastlardan farklılaşan, kemiğin temel hücre tipidir. Kemikte en bol bulunan hücrelerdir; bu hücreler kemik yapısını ve metabolizmayı desteklemek için birbirleriyle ve çevre ortamla plazma zarlarının uzantılarıyla iletişim kurarlar (Manolagas, 2000; Boulpaep ve Boron, 2005). Makrofajlardan oluşan osteoklastlar ise medüller (kemik iliği) boşluğunu oluşturmak için çeşitli proteolitik enzimler ile süngerimsi kemik yıkımını sağlar (Kini ve Nandeesh, 2012). Kemik yapının devamlılığı için osteoblastlar ve osteoklastların aktivitesi denge halinde olmalıdır (İnsal ve Pişkin, 2017).



Şekil 1.3: Kemiğin hiyerarşik organizasyonu (Narayanan ve ark. 2016)

Kemik morfolojisine bakıldığında, yetişkin insan iskeleti, genel olarak %80 kortikal kemik ve %20 trabeküler kemikten oluşmaktadır. Hem kortikal hem de trabeküler kemiğin temel yapı taşları osteonlardır (Clarke, 2008). Kemik iliğini çevrelemek ve korumak ile görevli kortikal kemik, yoğun ve oldukça sıkı bir yapıdadır. Trabeküler kemik ise süngerimsi, bal peteğine benzer gözenekli bir yapıya ve metabolik olarak daha aktif olması sağlayan geniş yüzey alanına sahiptir. Kortikal kemik içerisinde kan damarları, kan damarlarını taşıyan Havers kanalları, sinir lifleri, osteoblastlar ve osteoklastlar bulunmaktadır. Bu yapı kemik oluşumu sırasındakemiği korur, besin alışverişini sağlar ve kemiği destekler (Clarke, 2008; Walsh, 2015).



Şekil 1.4: Kemiğin morfolojik yapısı (Anonim, 2012)

1.2.2. Kemik Hasarlarının Tedavisi İçin Güncel Yaklaşımlar

Kemik greftleri ortopedide kemik rejenerasyonunu arttırmak için sık kullanılan cerrahi yöntemlerden biridir. Tüm klinik greft uygulamaları arasında, otolog kemik uygulaması hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Sebebi ise otolog uygulamanın kemik yenilenmesinde osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenezis açısından gerekli özellikleri sağlama kapasitesidir. Bununla birlikte otolog uygulamalarda sınırlı tedarik bölgesi, ağrı, donör alanı morbiditesi ve ikincil cerrahi ihtiyacı sınırlamaları hala devam etmektedir (Wang W. ve Yeung, 2017).

Ksenograftlar (hayvan kaynağı) ve allogreftlerle (insan kadavralarından veya yaşayan donörlerden) ilgili problemler ise alıcının vücudu tarafından patojen iletimi veya immün reddi gibi kısıtlamaları beraberinde getirir. Eklem protezleri, plakalar ve vidalar gibi metal implant stratejileri şu anda eklem artroplastileri, uzun kemik ile

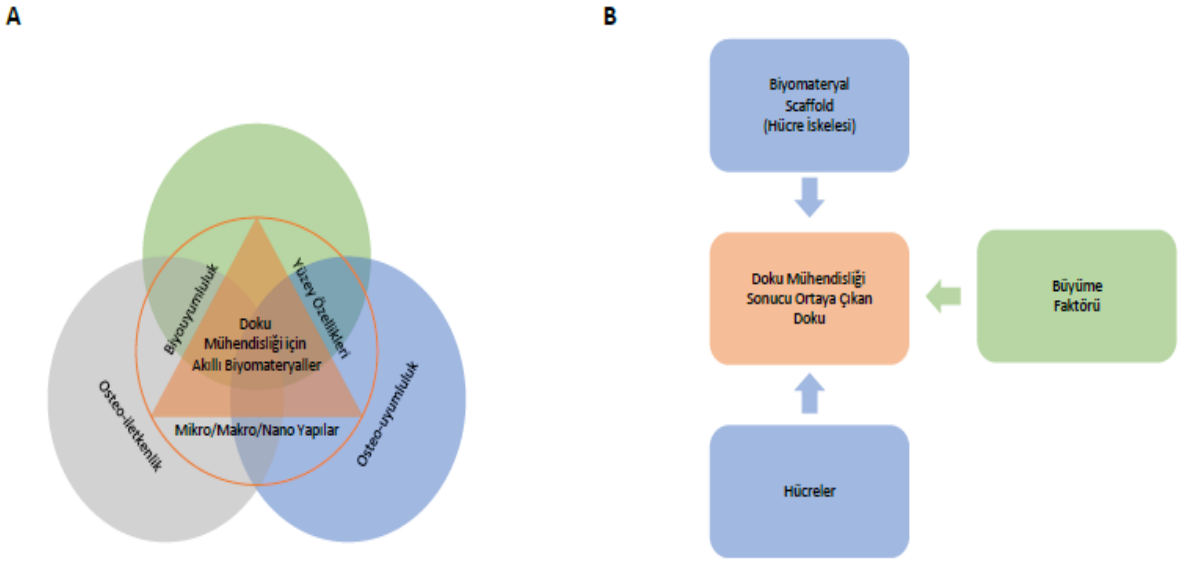
omurga kırıkları için mekanik ve yapısal destek sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu tür implantların parçalanamayan ve yüksek oranda sert olmaları bazı sınırlamaları beraberinde getirmektedir. Bunlar; hastada yorgunluk, ağrı, kırık riski, konakçı dokuya entegrasyon eksikliği ve enfeksiyon gibi sorunlardır. Son yıllarda, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki çalışmalar, geleneksel tekniklerle ilişkili komplikasyonları aşmak amacıyla kemik rekonstrüksiyonu için umut verici stratejiler olarak ortaya çıkarmaktadır. Özellikle son zamanlarda, organ nakli için sürekli artan talep ve aynı zamanda ciddi oranlarda donör eksikliği sorunu söz konusudur. Bu sorunların üstesinden gelmek için doku mühendisliği alanında biyouyumlu materyaller ve hücreler bir araya getirilerek 3B doku iskeleleri geliştirilmektedir (Roseti ve ark., 2017).

Doku mühendisliğinin rejeneratif tıpta uygulanabilir bir yaklaşım olarak başarısı büyük ölçüde doğal ekstraselüler matrise (ECM) benzer 3B doku iskeleleri üretme kabiliyetine dayanmaktadır. Araştırmaların çoğu, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan cihazlarda hali hazırda kullanılan polimerlere odaklanmaktadır, ancak büyük yeni polimer kütüphanelerinin hücre fenotipi üzerindeki etkisini doğrudan değerlendirmek için yüksek verimli tarama yaklaşımları da devam etmektedir (Stevens, 2008). Yüksek su tutma kabiliyeti, biyouyumluluk ve kontrol edilebilir biyobozunurluk gibi özelliklere sahip protein bazlı hidrojeller, 3B ECM benzeri iskeleler üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, besin, atık ve metabolitlerin taşınması için yüksek geçirgenlikleri, hücrelere desteklerindeki yüksek başarıları hidrojellerin kullanımını çekici kılmaktadır. Anlatıldığı gibi protein bazlı hidrojellere verilebilecek en iyi örneklerinden biri kolajen bazlı hidrojellerdir**.** Kolajenden elde edilen ve daha ucuz ve kolay erişilebilen bir materyal olan jelatin hidrojelleri de çoğunlukla tercih edilmektedir. Yüksek biyouyumluluk ve şişme oranına ek olarak, jelatin hidrojelleri, hücreleri 3B kapsülleme için elverişli kılmaktadır (Sadat-Shojai ve ark., 2015).

1.2.3. Kemik Doku İskelelerinde Aranan Özellikler

Kemik dokusu mühendisliğinde temel amaç, ECM'yi taklit edebilecek 3B iskeleler geliştirmek ve yeni kemik oluşumuna yardımcı olacak mekaniksel desteği sağlamaktır. Kemik doku iskelelerinin, hücreleri yönlendirmesi, hücrelerin organizasyonuna yardımcı olması ve hücre davranışını yönlendirmek için uyarlanmış biyofaktörler yoluyla *in vivo* olarak fonksiyonel kemik dokusu oluşumunu uyarması istenir. İdeal bir iskele; biyouyumlu ve kontrollü olarak biyobozunur olmalı,

vaskülerizasyonu ve besin alışverişini sağlayabilmesi için gözenekli bir yapıya sahip olmalı ve bunlara ek olarak dokuya destek sağlayabilecek yeterli mekaniksel güce sahip olmalıdır (Hutmacher, 2000). Kemik doku mühendisliğinde, geliştirilen doku iskelelerinden beklenen iki önemli özellik, osteoindüktif ve osteokondüktif olmalarıdır (Şekil 1.5). Osteoindüktiviteye sahip bir materyal, hasarlı bölgenin onarımı için dokuyu uyarırken, osteokondüktiviteye sahip materyal 3B yapının oluşmasını kılcal damarlar ve hücrelere destek olarak sağlamaktadır. (Burg ve Kellam, 2000)



Şekil 1.5: (A) Doku mühendisliği için gerekli olan biyomalzemelerin belirgin özelliklerinin gösterimi ve (B) Doku mühendisliği ile ilişkili biyomalzemeler, hücre ve büyüme faktörlerinin (sinyalizasyon) kombinasyonu (Hecht ve ark., 2019, değiştirilerek alınmıştır).

1.2.3.1. Biyouyumluluk

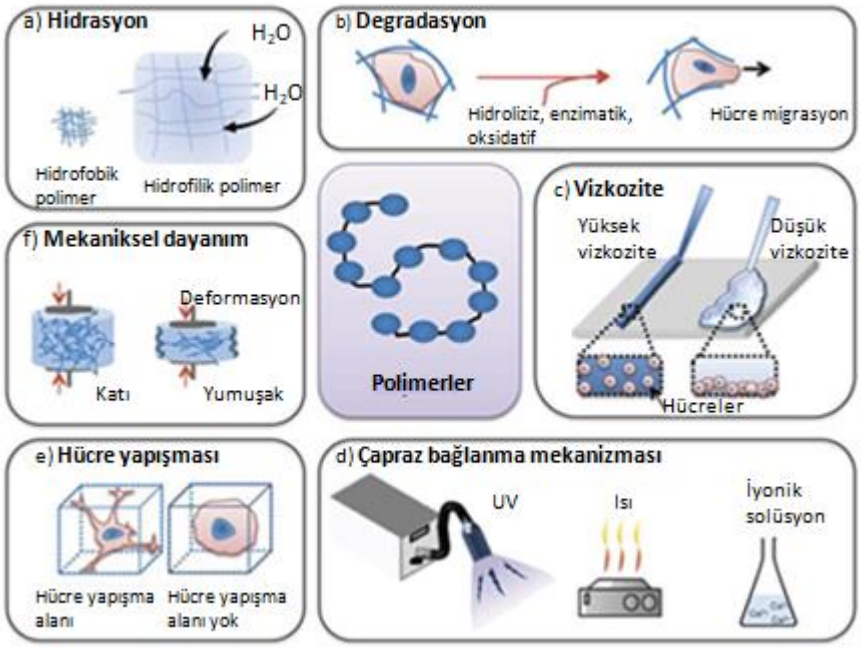
Doku mühendisliğinin öncül gereksinimlerinden biri biyouyumluluktur. Doku mühendisliği iskelesinin biyouyumluluğu, konak doku üzerinde ve endojen sıvılarda herhangi bir lokal ve sistematik toksik etki yaratmadan moleküler sinyalleri ve hücrenin normal aktivitesini destekleme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır. Doku kusurlarını onarmak ve defektli bölgelerde doku yenilenmesini sağlamak için kullanılan bu malzemeler biyolojik olarak uyumlu olmalıdır. Yani, *in vivo* ortamda hücrelere, dokulara veya organlara herhangi bir enflamatuar veya aşırı immünojenik bir yanıt

vermemeli ve sitotoksik etki göstermemelidir. Ayrıca zaman içerisinde bozunmasını istediğimiz bu implantların degredasyon ürünleri de vücuda zararlı hiçbir bileşen içermemelidir (Cheung ve ark., 2007; Bose ve ark., 2012).

İdeal bir doku mühendisliği kemik iskelesi, kemik hücrelerinin malzeme yüzeyine ve gözeneklerine yapışmasını, çoğalmasını ve hücre dışı matris oluşturmasını sağlamalı, osteokondüktif olmalıdır. İskele ayrıca, moleküler sinyal ve yeni progenitör hücrelerin alınmasıyla yeni kemik oluşumunu indükleyebilmelidir, yani osteoindüktif özellik taşımalıdır. Son olarak ideal bir iskele; besin, oksijen ve atık taşınımını aktif olarak desteklemelidir. Bu sebeple implantasyondan sonra implant içinde veya çevresinde kan damarları oluşturmalıdır (Bose ve ark., 2012).

1.2.3.2. Mekanik Özellikler

İdeal bir doku iskelesi, konakçı dokunun gösterdiği mekanik özelliklerle uyumlu mekaniksel dayanıma sahip olmalıdır. Kemik iskelelerinde konakçı dokuyu taklit ve uygun yük transferi önemlidir. Kemiğin mekanik özellikleri süngerimsi kemikten kortikal kemiğe kadar değişkenlik göstermektedir. Kortikal kemiğin young modülü 15 ila 20 GPa arasında olmakla birlikte süngerimsi kemikte 0,1 ila 2 GPa arasındadır. Basınç kuvveti kortikal kemik için 100 ile 200 MPa arasında ve süngerimsi kemik için 2 ile 20 MPa arasında değişmektedir. Kemik doku mühendisliğinde ideal kemik iskelesini tasarlamak için değişken geometri ve dokuya özgü özellikler göz önünde bulundurulmalıdır (Olszta ve ark., 2007).



Şekil 1.6: Doku iskelelerin sahip olması gereken özellikler: (a) Polimerik sistemin hidrasyonu önemlidir. Hücrelere besin maddesi ve atık taşınmasını sağlar. (b) Degradasyon mekanizması, hücresel göçü ve doku rejenerasyonunu etkilemek üzere ayarlanabilir olmalıdır. (c) Viskoz polimer çözeltileri, 3B-Biyoyazıcı sisteminde nozul içerisindeki kesme kuvvetlerinden hücreleri daha iyi korur. Düşük viskoziteli polimer çözeltileri ise hücrelerin yerleşmesine izin vermeyebilir. (d) Çapraz bağlanma mekanizması polimer türüne, hücre yaşayabilirliğine ve istenen yapı özelliklerine bağlıdır. (e) Hücre yapışması hücrenin kaderini belirler. Polimer türü veya işleme yoluyla kontrol edilebilir. (f) Doku iskelesinin kararlılığı, doğal dokuyu mekanik olarak taklit ettiği ve hücre büyümesini düzenleyerek şeklini koruduğu için hayati önem taşımaktadır (Carrow ve ark., 2015).

1.2.3.3. Gözeneklilik

Doku mühendisliğinde doku iskelelerinin gelişimi, doku, kendi ECM'sini oluşturana kadar geçici olarak görev yapan 3B iskelelerin gözenekliliğiyle bağlantılıdır. Hedef dokunun oluşturulması için kullanılan hücrelerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkinlikleri büyük oranda içinde bulundukları doku iskelesinin özelliklerine bağlıdır. Bu kapsamda; doku iskelelerinin öncelikle gözenekli ve bu gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı olması gerekmektedir. Böylelikle hücrelerin göçü, besin maddelerinin ve hücresel atıkların taşınması sağlanmaktadır (Hutmacher, 2000). Özellikle 100-150 μm boyutundaki gözenekler hücrelerin doku iskelesinin iç kısımlarına doğru ilerlemesini izin vermektedir (Chatzinikolaidou ve ark., 2017;

Nommeots-Nomm ve ark., 2017). Ayrıca, bazı çalışmalar hem mikro hem de makro gözenek içeren yapı iskelelerinin sadece makro gözenekli yapı iskelelerinden daha iyi performansa sahip olduklarını göstermiştir. Ne yazık ki, gözeneklilik; basınç dayanımı gibi mekaniksel özellikleri olumsuz etkilemektedir (Wu ve Ding, 2005; Bose ve ark., 2012).

1.2.3.4. Biyobozunurluk

Biyobozunurluk, doku mühendisliğindeki en önemli faktörlerden biridir. İdeal bir iskeleden doku oluşum hızına benzer şekilde *in vivo* bozunma hızı beklenmektedir (Wu ve Ding, 2005). İskelelerin bozulması, uygun bir iskele tasarımında çok önemli bir faktördür. İdeal iskele yapısı, istenen doku yenilenmesine kadar mekaniksel ve biyokimyasal stabiliteyi sağlamalı ve ardından, iskelenin doku oluşumuyla tutarlı bir zamanlama ve hızla tamamen parçalanması beklenmektedir. Kemik doku iskeleleri konakçı dokuya benzer mekanik özelliklere sahip olmakla birlikte, tercihen kontrollü bir emilebilme hızıyla *in vivo* ortamda bozunabilmeli ve sonunda yeni kemik dokusunun büyümesi için alan yaratabilecek şekilde şekillenmelidir (Bose ve ark., 2012; Bachtiar ve ark., 2016).

1.3. Kemik Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler

1.3.1. Metaller

Kemik doku mühendisliği yapı iskeleleri için metal ve seramikler mekanik özellikleri ve biyolojik uygunlukları nedeniyle eklem protezleri, vidalar ve plakalar olarak tercih edilmektedir. Titanyum, paslanmaz çelik ve kobalt krom gibi metaller biyolojik olarak uyumlu, güçlü, işlenebilir ve nispeten ucuzdur. Bununla birlikte, metaller genel olarak, kırılgandırlar ve ek ameliyat gerektirebilirler. Ayrıca doğal doku büyümesini engelleyebilen ve biyobozunur olmayan bu yapılar kemikten daha yüksek bir mukavemete sahiptir (Porter ve ark., 2009; Roseti ve ark., 2017).

1.3.2. Biyoseramikler

Kemiğin mineral fazının bileşimine benzer olan çok çeşitli biyoaktif inorganik maddeler klinikte ilgi çekmektedir. Biyoaktif ve inorganik malzemeler olan seramikler, hem seramik implantlar hem de implant kaplamaları şeklinde ortopedik uygulamalar için biyomateryal olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak; trikalsiyum

fosfat (TCP), hidroksiapatit, biyoaktif camlar ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır. Seramik tabanlı yapı iskeleleri yüksek mekaniksel dayanımlıdırlar ve porozlu yapılar oluşturabilirler, böylece vaskülarizasyon, besin iletimi ve kemik büyümesini arttırırlar. Bununla birlikte, seramik bazlı yapı iskelelerinin klinik uygulaması, düşük yük taşıma performansları sebebiyle sınırlıdır (Stevens, 2008; Cheng ve ark., 2019).

1.3.3. İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller, organik ve polimerik nanopartiküllere kıyasla benzersiz özellikler sunduğundan terapötik ve tanısal amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. İnorganik nanopartiküller, şu anda klinikte ortaya çıkan benzersiz zorlukların üstesinden gelmek amacıyla ilaç dağıtım ve görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi için heyecan verici bir fırsatı temsil etmektedir. Silika, kalsiyum fosfat, LDH gibi inorganik nanopartiküllerin yanı sıra; altın, demir oksit, gümüş veya silika dahil inorganik nanopartiküller, birçok hastalığın tedavisi, teşhisi ve tespiti için hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda araştırılmaktadır (Huang ve ark., 2011; Li ve ark., 2012; Anselmo ve Mitragotri, 2015). Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, birçok inorganik nanopartikül biyolojik fonksiyonlarını daha da arttırmak için biyopolimerler ile birlikte dizayn edilebilir ve sentezlenebilir (Anselmo ve Mitragotri, 2015).

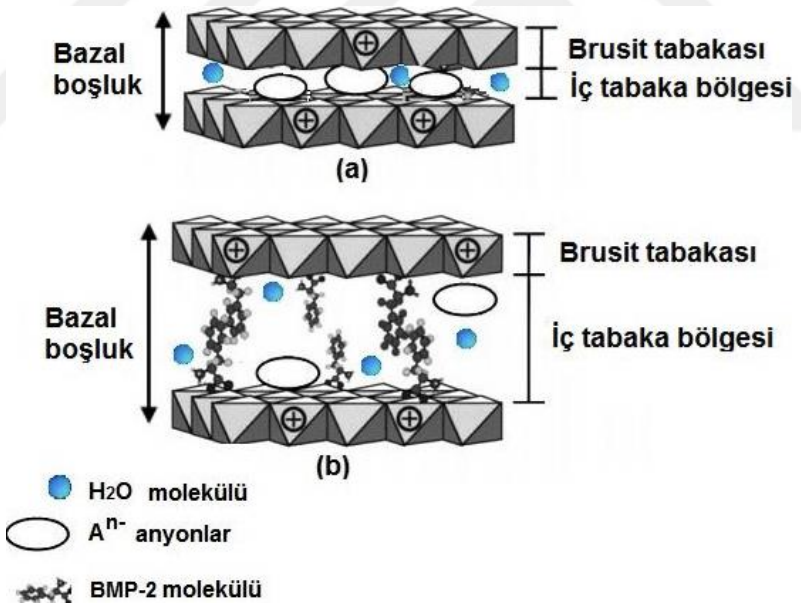
Hidroksiapatit nanoparçacıkları, mükemmel biyouyumlulukları, biyopolimerlere afiniteleri ve yüksek osteojenik potansiyelleri nedeniyle biyomalzemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sadat-Shojai ve ark., 2013a; Sadat-Shojai ve ark., 2013b). Hidroksiapatit nanoparçacıklarının herhangi bir lokal veya sistemik toksisite, iltihaplanma veya yabancı cisim tepkisi vermeden osteokondüksiyon mekanizması yoluyla yeni kemik büyümesini destekleyebileceği literatüre geçmiştir. (Sadat-Shojai ve ark., 2015)

Altın ve demir oksit nanopartikülleri kansere karşı mücadelede birçok avantaj sunmaktadır. Örneğin altın nanopartiküller fototermal terapiler için avantajlıdır, absorbsiyon arttılarak tümörün lokalize olduğu altın nanopartikülleri ısıtır ve çevredeki sağlıklı dokuları zarar görmeden bırakarak kanser dokularını öldürmektedir. Benzer şekilde demir oksit nanoparçacıkları da MRI kullanılarak vücut içinde izlenebilmektedir (Cole ve ark., 2011; Abdalla ve ark., 2011).

Gözenekli silika nanopartikülleri geniş yüzey alanına ve gözenek hacmine sahiptirler. Bu sebeple çeşitli ajanlar için etkili taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır. Silika nanopartiküllerin, moleküler, supramoleküler veya polimer kısımları ile işlevsel hale getirilmesi, ilaç dağıtım görevlerini gerçekleştirirken malzemeye çok yönlülük sağlar ve bu da etken madde teslim süresini kontrol edilebilir kılar. (Li ve ark., 2012)

1.3.4. Çift Katmanlı Hidroksit Bileşikleri (LDH)

Genel olarak anyonik kil olarak da bilinen ve hidrotalsit benzeri bileşikler olan LDH bileşikleri, iyi biyouyumluluk, anyon değişim kapasitesi, yüksek kimyasal kararlılık ve akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımına yardımcı olan pH'a bağlı çözünürlük gibi kendine has özellikleri ile bilinmektedir (Kuthati ve ark., 2015). LDH'ler düşük maliyetleri, kolay sentezleri, ısıl kararlılıkları ve kimyasal çok yönlülüğü nedeniyle çeşitli potansiyel uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Daud ve ark., 2016).



Şekil 1.7: LDH yapısının ve sinyal faktörü (BMP-2) yüklü LDH yapısının şematik gösterimi.

LDH'ler, genellikle M^{2+} ve M^{3+} katyonlarının brusit içerisine yerleştirildiği, $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_{x}\ (OH)_2]^{x+}\ (A^{m-})_{x/m}\square nH_2O$ (burada x=0,2-0,33 M^{2+}/M^{3+}molar oranı 2-4'tür) formülü ile ifade edilen sentetik malzemelerin bir sınıfıdır (Şekil 1.7). LDH

malzemelerinin stabilitesi ve biyolojik uyumluluğu yanı sıra kimyasal bileşimdeki çok yönlülük nedeniyle, ilaç / gen teslimatı ve biyolojik kompozit malzemeler alanlarında kullanımları geniş bir şekilde araştırılmaktadır. İlk olarak, üstün biyouyumluluk ve düşük sitotoksisite, LDH'leri ideal bir nano-taşıyıcı sistem yapar. İkincisi, ilaçlar, genler ve bazı hedeflenecek malzemeler (örneğin antikorlar, proteinler, peptitler, aptamerler, nükleik asitler), ligand değişim reaksiyonu ve yüzey modifikasyonu olmadan doğrudan interkalasyon yöntemiyle LDH'lere yüklenebilir. Ek olarak, LDH'ler, farmasötik etki için gerekli olan interlameller ilacın / genin kontrollü salımını da sağlamaktadırlar (Liang ve ark., 2014).

Günümüzde hidrotermal sentez yöntemleri ile çeşitli hidrodinamik çaplarda (20 nm-10μ'ye kadar) LDH nanopartiküllerini üretmek mümkündür. (Gu ve ark., 2015). Yaklaşık 100 nm boyuta sahip LDH'lerin silika ve altın dahil diğer inorganik partiküllere kıyasla, mükemmel biyouyumluluk, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyoaktivite, hücresel sitoplazmada biyobozunurluk ve pH-duyarlı özelliğinin olması nedeniyle oldukça avantajlı olduğu kanıtlanmıştır (Piao ve ark., 2019). LDH partikülleri her ne kadar ilaç / gen salım çalışmaları için kullanılsa da farklı çalışmalar kemik doku mühendisliği için de umut verici bir materyal olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin; Romeo ve arkadaşları, Mg-Al LDH içeren PCL-bazlı elektrospun nano elyaflarının basılabilme kabiliyetini arttırdığını göstermiştir (Romeo ve ark., 2007). Ramanathan ve ark. (2018), LDH ve poli (3-hidroksibutirik asit)-poli(N-vinilpirolidon) kullanarak yaptıkları nanoelyaflı matrisin elektroeğirme yöntemiyle kemik dokusu mühendisliği için greft olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Grup yaptığı çalışmada LDH ile kaplı implantı, kontrol grubu ile karşılaştırmış ve LDH içeren implantın kontrol grubuna oranla hücre yapışmasın ve proliferasyonunun daha iyi olduğunu göstermiştir.

1.3.5. Sentetik Polimerler

En yaygın kullanımı olan sentetik polimerler, poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), polilaktit-ko-glikolid (PLGA) ve polikaprolaktondur (PCL). Sentetik polimerlerin temel avantajları, yapısal özelliklerinin modifiye edilebilmesi yeteneğindedir. Sentetik polimerlerden imal edilen doku iskelelerinde, bozulma oranının kontrol edilebilmesi, mekanik özelliklerin ayarlanması, istenilen desen ve yapıda iskele üretilebilmesi mümkündür. Her ne kadar modifiye edilebilseler de sonucunda biyoaktivitelerinin azalması nedeniyle doku tarafından reddedilme riski gibi

dezavantajları vardır. Ek olarak, PLLA ve PGA'nın hidroliz yoluyla parçalandıkları, karbondioksit ürettikleri ve dolayısıyla hücre ve doku nekrozu ile sonuçlanabilecek sonuçlar doğurabilme ve lokal pH'ı düşürdükleri için bozunma süreci hakkında endişeler söz konusudur (O'brien, 2011; De Witte ve ark., 2018; Cheng ve ark., 2019).

1.3.6. Doğal Polimerler

Doğal polimerler doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü doğal ECM'lere benzer makro moleküler özelliklere ya da bileşenlere sahiptirler**.** Doğal polimerler arasında kolajen, jelatin, ipek fibroin, kitosan, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, agaroz, aljinat ve fibrin sayılabilir. Sentetik polimer bazlı doku iskelelerinin aksine, doğal polimerler biyolojik olarak aktiftir ve mükemmel hücre yapışmasını ve büyümesini desteklerler. Ayrıca, biyolojik olarak çözünebilirdirler. Bu nedenle zaman içinde konak hücrelerinin kendi hücre dışı matrislerini üretmesini ve bozulan iskeleyi değiştirmesini sağlarlar. Bununla birlikte, doğal polimerlerden türetilen hidrojeller genellikle vücut sıvılarıyla ya da ortamlarıyla temas ettiklerinde hızlı bir şekilde bozulur. Etkili bir strateji olarak, doğal polimerlere hücreler, büyüme faktörleri, proteinler ve biyoaktif inorganik maddeler gibi biyoaktif türlerin dahil edilmesi ve sonucunda, optimum hücre tepkisi için biyoaktif fonksiyonlara sahip biyomimetik hidrojel yapı iskelelerinin elde edilmesi ortaya çıkmıştır (Tan ve Marra, 2010; O'brien, 2011).

1.3.6.1. Jelatin

Kolajen, doğal ECM'nin ana bileşeni ve memeli dokularında en bol bulunan protein olduğu için biyomedikal uygulamalar için çokça tercih edilen bir malzemedir (Lee ve ark., 2001; Tan ve ark., 2008). Jelatin ise, kolajenin doğal üçlü sarmal yapısının hidrolizi ile oluşan, kolajen türevidir (Tan ve ark., 2009).

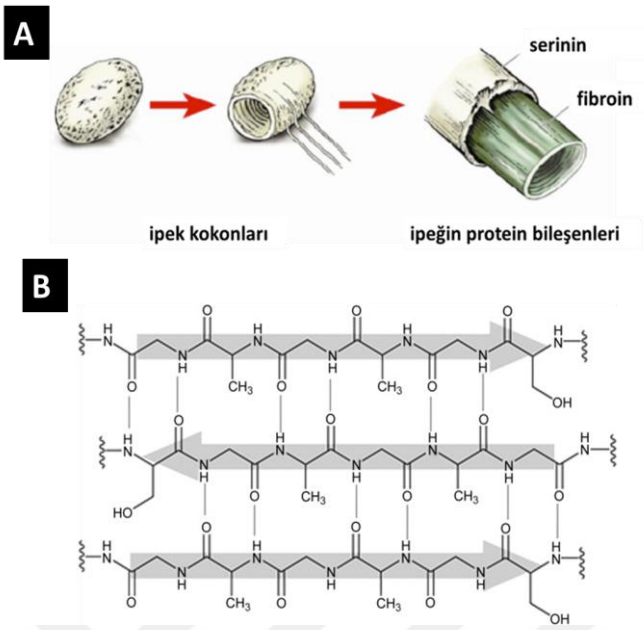
Jelatin yapısında arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid yapısını içermekte, böylece hücre yapışmasını, göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Jelatilen polimeri ile, doku mühendisliği alanında kullanılmak üzere çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcılar varlığında jelatin hidrojelleri oluşturulabilmekte ve mekaniksel özellikleri arttırılabilmektedir (Huang ve ark., 2005; Pina ve ark., 2015).

JelMA ise jelatinin metakrilat gruplarıyla modifiye edilmesiyle elde edilen ve ışık altında çapraz-bağlanma özelliğine sahip sitotoksik olmayan ve biyobozunur bir

hidrojeldir. JelMA bazlı hidrojeler, temelde kolajen denatürasyonu ile elde edildiğinden yüksek oranda biyouyumludurlar ve ışık altında çapraz bağlanabildikleri için geniş ölçüde ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri sebebiyle özellikle doku mühendisliği uygulamalarında çok tercih edilmektedir (Ying ve ark., 2018). Bölüm 1.4.3.'de JelMA hidrojeline detaylıca değinilmiştir.

1.3.6.2. İpek Fibroin

Bombyxmori (ipek böceği) 'den elde edilen ipek, tarihsel olarak sağlamlığı ve parlaklığı ile tanınan eşsiz bir malzemedir. Hekimler ipeği yüzyıllar boyunca dikiş malzemesi olarak kullanmış ve son zamanlarda biyolojik uyumluluğu, kimyasal olarak değiştirilebilme kolaylığı, *in vivo* yavaş bozunma hızı ve sulu bir çözelti veya organik bir çözücüden çok sayıda malzeme formatına işlenebilme gibi özelliklerden dolayı biyomateryal olarak dikkat çekmeye başlamıştır. Doğal ipek, serisin ile kaplı ipek fibroin proteininden oluşur. Tekstil endüstrisinden tıbbi uygulamalara kadar birçok farklı alanda kullanılan ipeğin ham formu, %25-%30'luk ağırlığını kapsayan bir glikoprotein olan serisinden oluşmaktadır (Şekil 1.8). İpeğin immün yanıt oluşturmaması için içeriğindeki serisinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Serisinden uzaklaştırılan ipek fibroin proteininin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak mükemmel biyouyumluluk gösterdiği bilinmektedir. İpek fibroin, hidrofobik β-tabaka ve hidrofilik bloklara sahip doğal amfifilik blok kopolimer yapısındadır. İpek fibroin ile yüksek mekanik mukavemet, elastikiyet ve tokluğa sahip protein bazlı materyaller elde edilebilir. İpek fibroin bir hafif zincirden (26 kDa) ve disülfür bağıyla bağlanmış bir ağır zincirden (390 kDa) oluşur. İpek fibroin yapısındaki kristalin bölgeler glisin, serisin, alanin ve tirozin açısından zengin bölgelerdir. β-tabakaları içindeki metil grupları ve hidrojen grupları karşılıklı olarak, kristallerde istiflenen ara tabaka oluşturmak için etkileşime girecek şekilde düzenlenir. Güçlü hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri termodinamik olarak kararlı bir yapı oluşturur. İpek ipliğin bozulma hızı, β- tabaka kristallerin içeriği ve kristal olmayan alanların organizasyon derecesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Genel olarak, bozunma hızı, yapıdaki β- tabaka içeriğindeki artışla azalır. İpek fibroinin tüm bu özellikleri, ipeği, biyomedikal uygulamalarda malzeme olarak kullanılması için uygun kılmaktadır (Vepari ve Kaplan, 2007; Rockwood ve ark., 2011; Kasoju ve Bora, 2012).



Şekil 1.8: (A) İpek filamentinin bileşimi, (B) İpek amino asitlerin tekrarlanan birimleri.

Şimdiye kadar ipek fibroin temelli malzemeler; filmler, lifler, ağlar, iplikler, süngerler, hidrojeller vb. formunda üretilmiştir ve ligament, kıkırdak, tendon ve kemik dahil çeşitli dokuların yenilenmesindeki etkileri araştırılmıştır. Doku mühendisliğinde ipek fibroinin doku iskelesi olarak kullanımına ilişkin çalışmaların sayısı ve önemi her geçen gün artmaktadır (Hardy ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009; Kasoju ve Bora, 2012).

1.4. Hidrojeller

Hidrojeller, büyük miktarda su veya biyolojik sıvıyı tutabilen çapraz bağlı hidrofilik polimer yapılardır. Hidrojellerin su tutabilme kabiliyeti polimerik ana zincire bağlı hidrofilik fonksiyonel gruplardan kaynaklanırken, çözünmeye karşı dirençleri ise ağ zincirleri arasındaki çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır. Biyomedikal uygulamalar için hidrojellerin kullanımı, 1960 yılında Wichterle ve Lim'in çapraz bağlı poli (hidroksi etil metakrilat) (PHEMA) kullanarak geliştirdikleri ilk sentetik hidrojelleri kontakt lenslerin üretimi için kullanmasına dayanmaktadır (Maitra ve Shukla, 2014; Ahmed 2015).

Hidrojeller, doğal ECM'yi taklit etme kabiliyetleri ve yüksek oranda su tutma yeteneğine sahip çapraz bağlanmış bir 3B ortam sunma yeteneklerinden dolayı doku mühendisliği ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu özellikler, kapsüllenen hücrelerin göçünü, çoğalmasını ve farklılaşması sağlarken aynı zamanda atıkların uzaklaşmasına ve besin alışverişine izin verir (Hölzl ve ark., 2016; Jessop ve ark., 2016). Kolajen, hiyaluronik asit, jelatin veya aljinat gibi doğal olarak türetilmiş polimerlerin kullanılması, genellikle polietilen glikol (PEG) veya pluronik gibi sentetik ağlara kıyasla daha üstün hücresel etkileşimler ve biyouyumlulukla sonuçlanır (Malda ve ark., 2013; Mehrban ve ark., 2016). Çoğu doğal polimer, ligand konjugasyonu, çapraz bağlama ve polimerin farklı klinik uygulamalar için uyarlanmış olmasını sağlayan diğer modifikasyonlar ve uygun reaktif bölgeler içermektedir. Doğal polimerler de genellikle iyi biyouyumluluğa sahiptir ve bu da onları doku mühendisliği iskele uygulamaları için popüler seçimler haline getirir (Dang ve Leong 2006).

Farklı teknikler sayesinde, hidrojeller; doku mühendisliği uygulamaları için hücrelerin varlığında kolayca çapraz bağlanabilmektedir. Xiao ve ark., (2019) JelMA ve ipek fibroin kullanarak geliştirdikleri hidrojellere MC3T3-E1 hücrelerini enkapsüle ederek yaptıkları çalışmada geliştirdikleri hidrojelin, hücreler için yüksek biyouyumluluğunu kanıtlamış ve yumuşak doku, kemik ve kıkırdak gibi dokularda kullanılabileceğini göstermişlerdir. ECM'nin önemli bir bileşeni olan kolajen, doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Rodrigues ve ark., (2003) yılında yaptığı bir çalışmada kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hidroksiapatit (HA) ve kolajen hibrit doku iskeleleri geliştirilmiş, tasarlanan doku iskelelerinde hücrelerin kolajen liflere yapışarak yayıldığını ve iskelenin ostekondüktif ve osteoindüktif bir iskele olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Aljinat hidrojeller, hücre kapsüllenmesi için üzerinde çokça çalışılan malzemelerden biridir ve çeşitli araştırma grupları kıkırdak oluşumunu sağlamak için aljinat hidrojelleri ve kondrosit hücreleri ile birlikte çalışmalar yapmışlardır. Park ve ark., (2017) geliştirdikleri PCL ve aljinat bileşimli iskele ile kondrositlerin işlevselliğini arttırmak istemişlerdir. Daha sonrasında, tavşan kulaklarında rejenerasyonu geliştirmek için kullanılan bu iskele ile kondrositleri kapsülleyen aljinat biyo-mürekkebinin mikro-çevrelerinin, kondrositlerin *in vitro* hayatta kalma ve işlevselliğini geliştirdiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde

Kamil ve ark., (2004) yaptığı bir çalışmada ise bir kulak kepçesi oluşturmak için kalıp kullanma tekniğini kullanarak otojen kondrositlerle birlikte aljinat, pluronik f127 ve PLGA kullanılmış ve bu kalıplar, bir kontrol ile birlikte, 10 hayvanın (domuz ve koyun) karın bölgesine deri altından implante edilmiştir. Yapılar 8 ila 20 hafta sonra çıkarılmış ve morfolojik ve histoloji olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak incelenen yapılarda PLGA ve pluronik f127 ile yeterli ve yararlı bir kıkırdak oluşturulamazken, özellikle aljinat ile yapılan çalışmada yaklaşık %60 oranında kıkırdak elde edilmiş ve 5 aylık *in vivo* büyümeden sonra hala kıkırdağın mevcut olduğu gözlemlenmiştir.

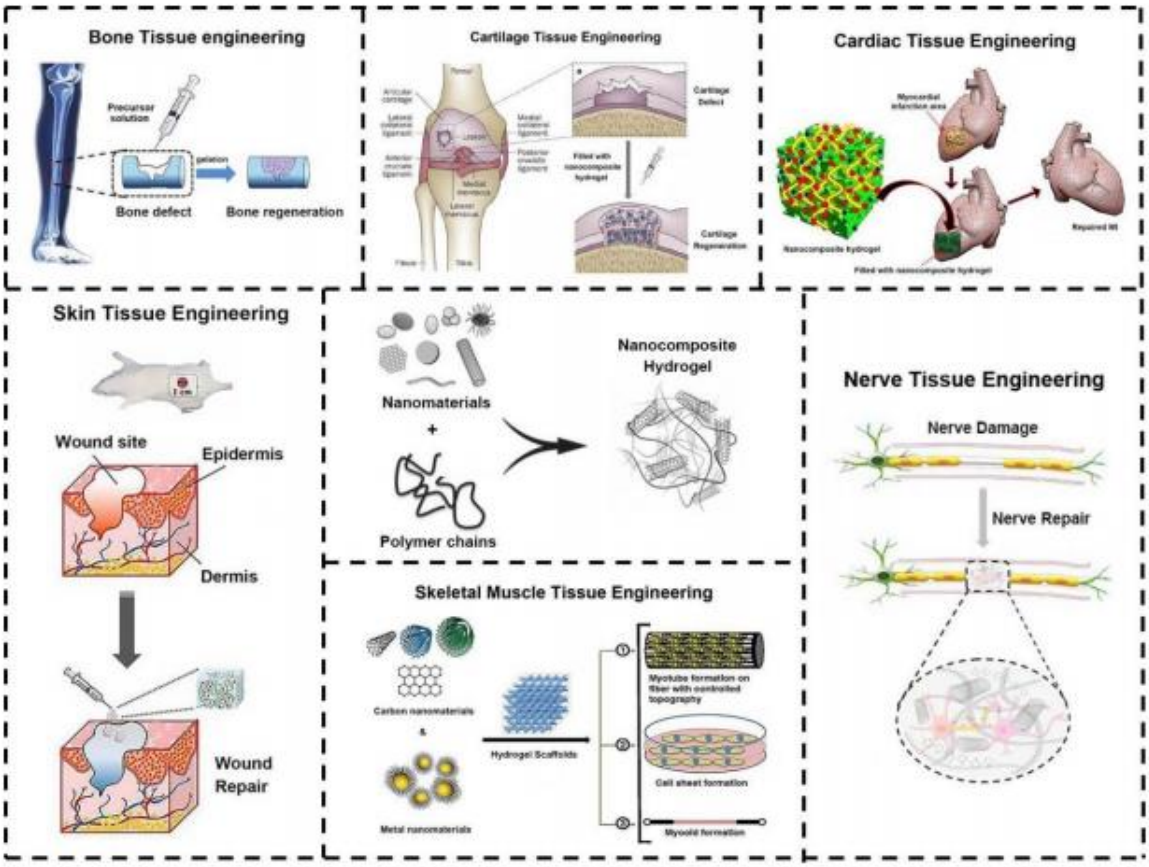
Foto-polimerize olabilen polimerler, kolay ayarlanabilen ağ özellikleri ve kontrol edilebilir mekaniksel davranışları nedeniyle özelikle doku mühendisliği uygulamalarında üzerinde çok sık çalışılan malzemeler grubundadır. Bu polimerler görünür ışık veya UV ışını ile foto-başlatıcılar varlığında çapraz bağlanabilir. Işık yoğunluğu ve ışığa maruz kalma süresi ile hidrojelin mekaniksel özellikleri istenilen şekilde uyarlanabilir (Nguyen ve West, 2002; Pereira ve Bártolo, 2015). UV ışığından kaynaklanan hücre hasarını azaltmak için uygun bir foto başlatıcı kullanımı ve bunun yanı sıra ışığın dalga boyu, yoğunluğu ve uygulama süresi çok önemlidir (Wang ve ark., 2015). Örneğin, JelMA hidrojelleri, jelatinin ve foto çapraz bağlanabilir metakrilat gruplarının doğal biyoaktivitesi nedeniyle son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Jelatin, FDA tarafından onaylı bir materyal olup kolajenin hidrolizi yoluyla elde edilmektedir ve böylece hücre bağlanmasından sorumlu olan kolajenin karakteristik biyoaktif dizileri korunur ve hücrelerin göçü, çoğalması ve farklılaşması desteklenebilir (Klotz ve ark., 2016). Bununla birlikte JelMA, 37°C'de düşük viskoziteli bir materyaldir. Bu sorunu çözmek için hibrit malzemeler kullanılabilir. Örneğin, Meng ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada hidroksiapatit (HA) ve JelMA ile kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere nanokompozit hidrojel geliştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, geliştirdikleri nanokompozit yapının kemik doku mühendisliğinde herhangi bir osteoindüktif malzeme olmadan kemik rejenerasyonunu teşvik edebileceğini göstermişlerdir.

1.4.1. Nanokompozit Hidrojeller

Nanokompozit hidrojeller, geleneksel olarak üretilen hidrojellere göre çok daha yüksek mekaniksel dayanım ve elastikiyet gösteren nanopartikül içeren, 3B çapraz-bağlı polimerik ağlardır. Nanokompozit hidrojeller yapısında hidroksiapatit, silika gibi

inorganik/seramik, metal/metal oksit ve karbon bazlı nanopartiküller (karbon nanotüpler (CNT'ler), grafen) içermektedir. Nanokompozit hidrojeller, özel fiziksel özelliklere ve ayarlanabilir fonksiyonlara sahip bir hidrojel sınıfıdır (Merino ve ark., 2015).

Nano ölçekte benzersiz kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip çeşitli kompleks jel yapıları geliştirilmektedir. Genel olarak, nanokompozit hidrojeller, nanopartiküller veya nanoyapılar varlığında suyla şişmiş çapraz bağlı polimer ağları olarak tanımlanabilir. Polimer, kimyasal veya fiziksel etkileşimler yoluyla bir ağ oluşturmak için çapraz bağlanır. Kimyasal çapraz bağlanma, kovalent bağlardan dolayı kalıcıdır (Shivashankar ve Mandal, 2012). Nanopartiküller, hidrojeli çapraz-bağlamak veya hidrojel üzerine yeni özellikler eklemek için kullanılabilir. Nanopartiküller, polimer hidrojellerine mekanik, optik, termal, bariyer, manyetik, vb. gibi benzersiz fiziksel özellikler katmaktadır. Doku mühendisliğinde, doğal ve sentetik polimerlerin nanopartiküller ve çeşitli biyomoleküller ile kombinasyonu, insan dokularında ve vücut fonksiyonlarında onarım ve yenilenmeyi destekleyen nanokompozit hidrojeller üretmek için avantajlı kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerin birleştirilmesine izin verir (Schexnailder ve Schmidt, 2009).



Şekil 1.9: Çeşitli nanomaddeler ve polimer zincirleri, doku mühendisliği farklı tipleri için nanokompozit hidrojeller oluşturmak üzere birleştirildiğinin şematik gösterimi (Zhao ve ark., 2020).

Kile benzer şekilde katmanlı bir yapıya sahip olan grafen oksit (GO) yüzeyinde hidroksil, epoksit ve karboksil grupları içerir. Ek olarak, aktif grupları ve katmanlı yapısı nedeniyle GO, üstün özelliklere sahip nanokompozit materyallerin eldesi için kullanılmaktadır. Grafen malzemesinin kullanımı ile birlikte malzemeye esneklik, gözeneklilik, dayanıklılık ve iletkenlik gibi özelliklerinin kazandırılır (Liu R. ve ark., 2012; Chabot ve ark., 2014). Grafen ayrıca, termal iletkenlik ve mekanik stabilite gibi üstün özellikleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Liu H. ve arkadaşları (2012), elektriğe duyarlı GO/poli(vinil alkol) hidrojelleri geliştirmişler ve ilaç salım davranışlarını incelemişlerdir. Liu R. ve arkadaşları (2012), poliakrilamid (PAM) ve GO ile nanokompozit hidrojeller oluşturmuş, metilenbisakrilamid ile kimyasal olarak çapraz-bağlanarak hazırlanan geleneksel PAM hidrojellerine kıyasla, GO ile çapraz-bağlanan

poliakrilamid-GO nanokompozit hidrojelinin yüksek çekme mukavemeti, yüksek tokluk ve özellikle kopmada büyük bir uzama sergilediğini göstermişlerdir.

Manyetik mikro ve nanoparçacıkların kullanımı, 1970'lerin sonundan itibaren özellikle spesifik ilaç hedeflemesi için potansiyel taşıyıcılar olarak araştırılmaya başlanmıştır. Metalik nanoparçacıklar, alternatif manyetik alanlara maruz kaldıklarında ısı üretme kabiliyetini göstermektedir. Metalik nanopartiküller ile geliştirilen nanokompozit hidrojeller, manyetik alan vasıtasıyla uzaktan ısıtılmış ve sıcaklığa duyarlı hidrojellerde ilaç salımını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Bu nedenle, bir hidrojel ağı içinde manyetik nanoparçacıkların dahil edilmesiyle elde edilen nanokompozit hidrojeller, manyetik alan altında arttırılmış kontrolü ilaç salım davranışı göstermektedir (Merino ve ark., 2015).

İlaç teslim sistemlerinde ilaç salım kabiliyetlerini iyileştirmek için yaygın olarak kullanılan hiper-dallanmış polimerler, lipozomlar, miseller, mikroküreler ve siklodekstrinler gibi polimerik nanopartiküller, hidrojellerin mekanik özelliklerini iyileştirmek için hidrojellere dahil edilerek nanokompozit hidrojel eldesinde kullanılmaktadır (Gaharwar ve ark., 2014). Örneğin; bazı kemoterapötik ajanların ana dezavantajlarından biri, yüksek toksik etkileridir. Bu nedenle Ju ve arkadaşları (2013) yılında yüksek yan etkileri önlemek için, Paclitaxel (TAX) etken maddesini, Polaxamer 407 ve kitosan bazlı enjekte edilebilir bir misel hidrojel hibrid sistemine yüklemişlerdir. *In vivo* çalışmalar, tümörün ilerlemesinde bir azalma ve TAX ile karşılaştırıldığında yan etkilerde azalma olduğunu ortaya koymuştur.

1.4.2. İpek Fibroin Bazlı Hidrojeller

Bombyxmori ipek fibroin; esnekliği, mekanik mukavemeti, tokluğu, biyouyumluluk ve kontrol edilebilir bozunması ile biyolojik olarak parçalanabilirliği gibi dikkat çekici özellikleri sebebiyle kemik, kıkırdak ve bağ dokusu mühendisliği için ilgi görmektedir. İpek fibroin bazlı yapı iskelelerinin bozunma oranları, kristallik, moleküler ağırlık, gözeneklilik gibi özellikleri yapıda bazı değişiklikler yapılarak kolaylıkla ayarlanabilir. İpek fibroin, yüksek mekanik özelliklere sahip bir malzemedir. Bu sebeple, özellikle kemik doku mühendisliği uygulamaları için gelişmiş fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip ipek fibroin bazlı kompozit iskelelerinin geliştirilmesi için çalışılmaktadır (Pina ve ark., 2015). Kalsiyum fosfat tozlarının ipek bazlı doku iskelelere ilavesi ile, gelişmiş gözenekli bir yapı, osteojenik farklılaşma ve *in*

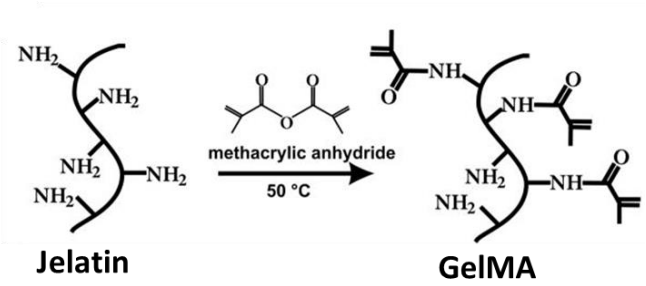
vivo kemik oluşumu gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2010; Yan ve ark., 2013). Aynı zamanda, inorganik bir bileşen olan hidroksiapatitin, ipek temelli köpük yapılarına dahil edilmesi, iskelelerin osteo-iletkenliğini ve mekanik özelliklerini arttırmıştır (Bhumiratana ve ark., 2011). Kemik ve bağ doku mühendisliğinde kullanılması için mezenkimal kök hücreler (MKH) ile de kombinasyon halinde ipek iskeleler geliştirilmiştir (Willerth ve Sakiyama-Elbert, 2019). Örneğin; He ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada hibrit ipek bazlı doku iskelelerinde; kemik iliği mezenkimal kök hücreler (KiMKH), fibroblastlar ve osteoblastlar içeren bir ko-kültür sistemi oluşturarak KiMKH'lerin fibrokartilaj farklılaşmasını incelemişlerdir. Osteoblast hücrelerinin ekildiği bölgeler kemik büyümesini teşvik etmek için hidroksiapatit partikülleri ile kaplanmış ve çalışma sonucunda KiMKH 'lerin fibrokartilaj farklılaşması gözlenmiştir.

Luetchford ve ark., (2020) ipek fibroin ve jelatin mikro taşıyıcıları ile yaptıkları çalışmalarda bu taşıyıcı yapının hücre yapışmasını ve yaşayabilirliğini ve ayrıca sıçan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (rMKH) osteojenik farklılaşmasını desteklediğini göstermişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, ipek fibroin/ jelatin mikro taşıyıcı içeren sistemlerin doku iskelesi olarak kullanımını ve bunların kemik onarımını desteklediğini göstermektedir. Du ve ark., (2019) yaptıkları çalışmada ise gözenekli biyoaktif cam ve ipek fibroin kompozit temelli doku iskelelerini farelere implante etmişler ve bu yapıların, kontrol grubuna (Gözenekli biyoaktif cam / PCL iskeleleri) kıyasla daha iyi yeni kemik oluşumu gösterdiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, yapılan çalışmalar, ipek fibroin bazlı doku iskelelerinin özellikle kemik doku mühendisliği için potansiyel bir malzeme olduğunu göstermektedir.

1.4.3. JelMA Bazlı Hidrojeller

Jelatinin, ışığa duyarlı doymamış metakrilamid yan gruplarıyla modifiye edilmesiyle jelatin metakrilamid (JelMA) elde edilmektedir (Şekil 1.10). Işık altında çağraz-bağlanma özelliğine sahip, sitotoksik olmayan ve biyobozunabilir bir malzemedir. JelMA, foto başlatıcı varlığında UV ışığı altında çapraz bağlanabilir ve böylelikle mükemmel termostabiliteye sahip JelMA hidrojelleri hazırlanabilmektedir. JelMA hidrojelleri, hücrelerin adezyonu için uygun yüzeyi sağlarken, aynı zamanda mekaniksel özelliklerinin ayarlanabilmesi sayesinde doku mühendisliği alanında çeşitli uygulamalarda kulanılmaktadır. Şimdiye kadar JelMA hidrojelleriyle hazırlanan 3B iskelelerin kemik, kıkırdak, cilt, kalp doku, iskelet kası, kornea, vasküler ağlar gibi

birçok farklı dokuda çalışıldığı rapor edilmiştir (Kazemzadeh-Narbat ve ark., 2017; Sun ve ark., 2018).



Şekil 1.10: Jelatinin metakrilanması ile JelMA eldesi.

Kemik doku mühendisliğinde JelMA önemli bir uygulama alanı haline gelmiştir**.** Örneğin; Heo ve arkadaşları (2014) kemik doku mühendisliği uygulamaları için JelMA hidrojelleri ile birlikte altın nanoparçacıklarını (GNP) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda JelMA-GNP hidrojellerinin ALP aktivite seviyelerinin belirgin bir şekilde artmasıyla insan adipoz kaynaklı kök hücrelerinin (ADKH'ler) osteoblast hücrelerine farklılaşmasını desteklediğini göstermişlerdir. Xavier ve arkadaşları (2015) ise, 2D nanosilikatlar içeren JelMA bazlı hibrid hidrojelleri ile çalışmışlardır. Hibrit hidrojellerin enkapsüle edilmiş hücrelerin etkileşimini arttırdığını ve inorganik bileşimler sayesinde *in vitro* kültürde, bu hidrojellerin, ALP aktivitesinde üç kat artış ve mineralize matrisde dört kat artışla desteklendiğini göstermişlerdir. Bu ve bunun gibi sonuçlar kemik doku mühendisliği için umut verici yaklaşımları da beraberinde getirmektedir (Yue ve ark., 2015).

Thakur ve arkadaşları (2016) JelMA ve hidroksiapatit nanopartiküllerini ışık altında çapraz bağlamışlar ve geliştirdikleri nanokompozit hidrojellerin mekanik, reolojik ve bozunma özelliklerini incelemişlerdir. Hidroksiapatit nanopartiküllerinin ilavesinin mekaniksel ve fizyolojik stabilite de önemli bir artışa neden olduğunu, ayrıca hücrelerin nanokompozit yüzeylerde kolayca yapışabilir ve çoğalabilir olduğunu göstermişlerdir. İnsan kemik iliği kök hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda ise ALP aktivitesi ile nanokompozitlerin biyoaktivitesini belirlenmiştir. Geliştirilen elastomerik JelMA/hidroksiapatit nanopartikül içerikli nanokompozit hidrojellerin, kemik rejenerasyonu için minimal invaziv tedavi amacıyla kullanılabilir olduğu sonucuna

varılmıştır. Xaiver ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada nanosilikatlar ve JelMA kullanarak nanokompozit hidrojelleri geliştirmişlerdir. *In vitro* değerlendirmeleri sonucunda bu hidrojellerin herhangi bir osteoindüktif faktör yokluğunda osteogenezi destekleyebildiğini bulmuşlardır. Kardiyak doku mühendisliği için Shin ve arkadaşları (2016) tarafından JelMA ve GO nanokompozit hidrojelleriyle yapılan çalışmada; miyokardiyal doku yapıları tasarlamışlar ve GO'nun JelMA matrisine dahil edilmesi, malzemenin elektriksel iletkenliğini ve mekanik özelliklerini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, geliştirilen JelMA/GO doku iskelelerinde kültürlenen hücreler, sadece JelMA hidrojellerinde kültür edilenlere kıyasla; hücre canlılığı, çoğalma ve olgunlaşma gibi özellikleri bakımından çok daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

1.5. Doku İskelesi Üretim Teknikleri

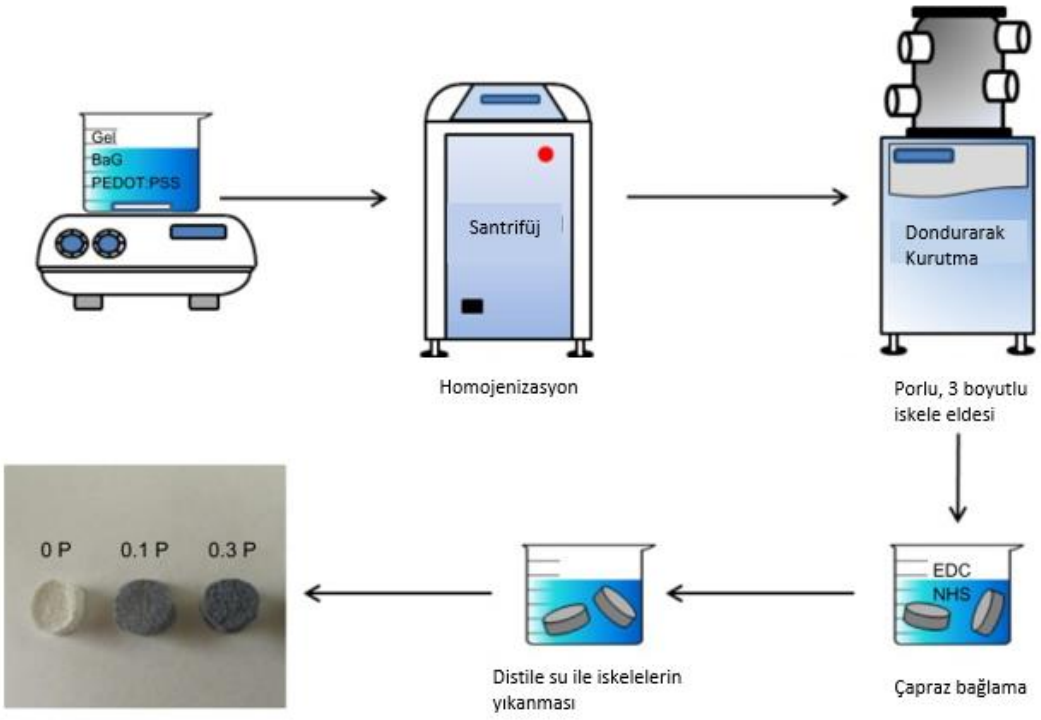
İyi tasarlanmış bir 3B doku iskelesi, doku oluşumunu *in vitro* ve *in vivo* olarak en iyi şekilde yönlendiren temel araçlardan biridir. Bu sebeple bir iskelede aranan özellikler; hücreleri istenilen şekilde yönlendirebilen, biyouyumlu, hücreleri göçüne izin verecek ve farklılaşmasını sağlayacak yüzey kimyasına ve vaskülarizasyonu destekleyebilecek uygun gözenek boyutuna sahip olması şeklinde sıralanabilir (Hutmacher 2001; Subia ve ark., 2010). Doku mühendisliği uygulamalarında sentetik ve doğal içerikli malzemeleri gözenekli yapılara dönüştürmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanlar; çözücü dökümü yöntemi, dondurarak kurutma, elektro-spinleme, 3B-Biyoyazıcı yöntemi ve mikro-kalıplama yöntemidir. Birbirinden farklı bu iskele hazırlama yöntemleri, istenen şekil ve boyutlarda farklı iskeleler oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Yüzey topografisi, gözeneklilik, iskelenin duvar kalınlığı ve yüksekliği gibi birçok özellik seçilen üretim yöntemine göre şekillendirilebilir (Lee ve ark., 2013).

1.5.1. Çözücü Döküm Yöntemi

Çözücü dökümü yöntemi 2B- doku iskeleleri hazırlamak için kullanılmaktadır. Bu yöntemde polimerler organik bir çözücü içinde çözülür. Hazırlanan çözelti uygun bir kalıba dökülerek, çözücüsünün buharlaştırılması sağlanır (Bu ve ark., 2002).

1.5.2. Dondurarak Kurutma (Freeze Drying)

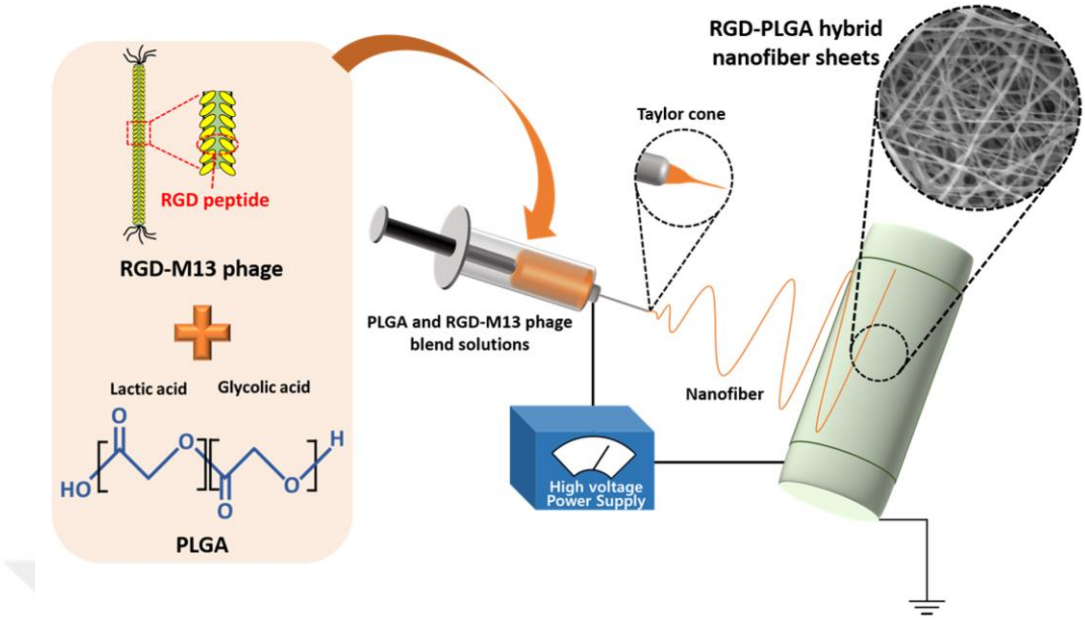
Dondurarak kurutma yöntemi, gözenekli doku iskeleleri elde etmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Hazırlanan polimer çözeltisinin dondurulmasına ve kullanılan çözücünün uygulanan vakum ve ısıtma koşulları sebebiyle süblimasyonuna dayanmaktadır**.** Bu şekilde, donmuş çözücü doğrudan katı fazdan gaz fazına geçer. Bu sayede yüksek gözenekli ve ara bağlantıya sahip doku iskeleleri hazırlanır**.** Donma süresi, dondurularak kurutulan malzemenin gözeneklilik seviyesini kontrol eden kritik bir parametredir. Genel olarak, sünger tipi hidrojeller dondurma tekniği kullanılarak üretilir ve çoğunlukla da yara örtüleri olarak kullanılmaktadır. Dondurarak kurutma tekniği, ilaç ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak benimsenmiştir, çünkü bu teknik, sahaya özgü ilaçlar ve antibiyotik dahil olmak üzere birçok uygulamada artan stabilite veya hızlı çözünürlük sağlamaktadır. Dondurarak kurutma tekniği gözenekli iskeleler ve sünger morfolojisi üretse de, dondurularak kurutulmuş polimerler genellikle amorf haldedir, bu sebeple düşük derecede kristallik gösterir. Düşük derecede kristallik, bazı farmasötiklerin stabilitelerini azaltır (Kang ve ark., 1999; Murphy ve Mikos 2007; Subia ve ark., 2010).



Şekil 1.11: Dondurarak kurutma yöntemi (Shanini ve ark., 2014).

1.5.3. Elektrospinning (Elektro-eğirme) Yöntemi

Elektroeğirme yöntemi, PCL gibi termoplastik polimerlerin nano lifli yapı iskelelerini oluşturma için kullanılır. Bu yöntemde şırınga ve lifleri toplayıcı alan arasında, yüksek voltaj altında polimer şırınga yardımıyla elektrik alan içerisinden pompalanır ve polimer fiberler bir zemin üzerinde veya dönen bir bobinde biriktirilir. Bu yöntem sayesinde fiberler oluşturulabilir (Subia ve ark., 2010; Xu ve ark.,2012; Mohabatpour ve ark., 2016). Elektro-eğirme yönteminde, genellikle elektrik alanın içerisindeki şırıngaya bir polimer çözeltisi eklenir. Polimer filamentler, çözeltiden, zıt kutuplara sahip elektrik yükleri taşıyan iki elektrot arasında oluşturulmuştur. Elektrotlardan biri çözeltiye, diğeri ise kollektöre yerleştirilir. Küçük bir deliği olan metal bir iğne ucundan (nozzle) polimer çıkarıldığında, yüklü çözelti jetleri, toplayıcı üzerinde toplanan elyaf haline gelmek üzere buharlaştırılır. Potansiyel fark, polimer molekül ağırlığı ve viskozite gibi eğirme çözeltisinin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Eğirme düzeneği ile toplama düzeneği arasındaki mesafe kısa olduğunda, eğrilmiş elyaflar eksik çözücü buharlaşması nedeniyle toplama düzeneğine ve birbirine yapışmaya meyillidir. Elektro-eğirme işlemi mikro/nano ölçekli topografya ve doğal hücre dışı matrise (ECM) benzer yüksek gözenekliliğe sahip yapı iskeleleri oluşturma fırsatı verir. Elektrospun iskelelerinin doğal olarak yüksek yüzey / hacim oranı hücre bağlanmasını ve ilaç yükleme özelliklerini geliştirebilir. Sentetik ve doğal malzemeler dahil olmak üzere çeşitli malzemeler elektrospun haline getirilebilir. Elektrospun lifleri rastgele şekilde yönlendirilebilir veya düzenlenebilir, böylece hem mekanik özellikler hem de iskeleye biyolojik tepki üzerinde kontrol sağlanır. Ayrıca antibiyotikler, anti kanser ajanlardan proteinler, DNA ve RNA'ya kadar değişen ilaçlar elektrospun iskelelerine dahil edilebilir (Huang ve ark., 2003).



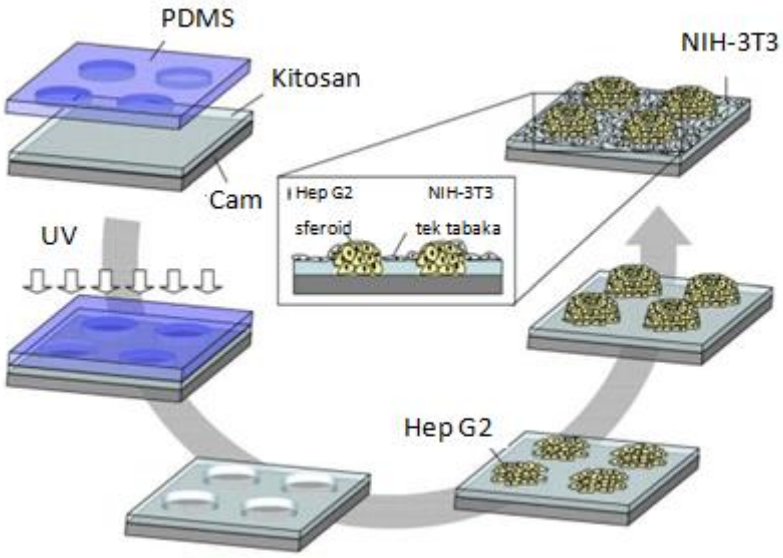
Şekil 1.12: Elektro- eğirme yöntemi kullanılarak elde edilen PLGA bazlı nanofiberlerin üretiminin şematik görünümü (Shin ve ark., 2015).

1.5.4. 3B-Biyoyazıcı

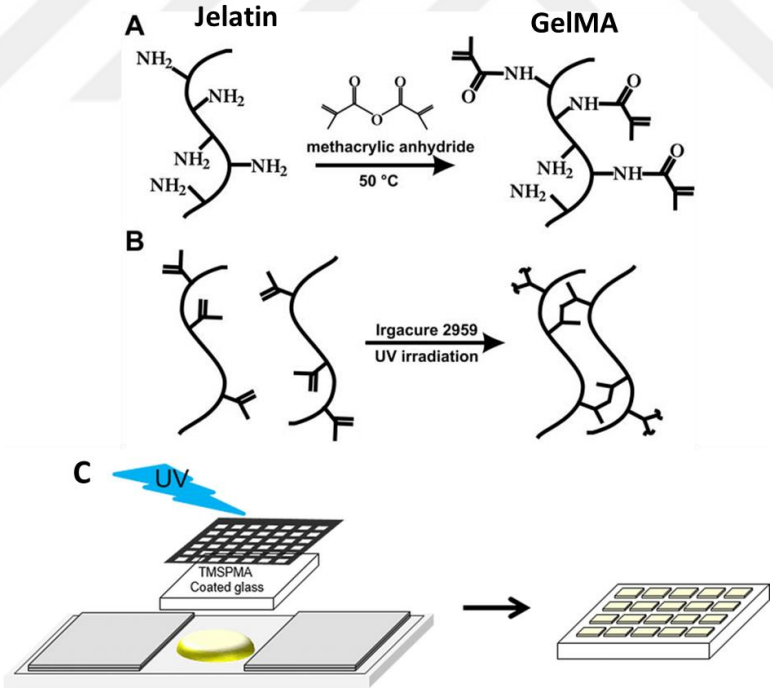
3B-biyobasım işleminde karmaşık 3B doku iskeleleri, klasik doku mühendisliğinin sorunlarının üstesinden gelerek canlı hücreler ile birlikte çeşitli biyomalzemeler kullanılarak basılmasıyla üretilmektedir. (Nakamura ve ark., 2010). Her biri kendi avantajları ve sınırlamaları olan birçok farklı 3B-biyobasım tekniği mevcuttur (Ho ve ark., 2015). Çalışma prensiplerine dayanarak, 3B-biyoyazıcı teknolojilerinin çeşitliliği üç ana gruba ayrılabilir: inkjet biyoyazıcılar, ışık destekli biyoyazıcılar ve ekstrüzyon bazlı biyoyazıcılar (EBB). EBB, doku rejenerasyonu için en yaygın kullanılan biyoyazıcı tekniğidir. Işık destekli biyoyazıcılar ve inkjet biyoyazıcılara göre büyük avantajı, çok yüksek hücre yoğunluklarıyla yüklü viskoz materyalleri basabilme yeteneğidir. Bir polimer çözeltisi içinde süspanse edilmiş hücrelerden oluşan hidrojeller, steril bir şırıngaya aktarılır ve baskı platformunda basılır. EBB'deki dağıtım sistemlerinin çoğu, hidrojel filamanlarını oluşturmak için mekanik (vida veya piston) veya pnömatik kuvvetlerle çalıştırılır (Murphy ve Atala, 2014; Pereira ve Bártolo, 2015; Sears ve ark., 2016).

1.5.5. Mikro-Kalıplama (Mikro-molding) Yöntemi

Polimerin PDMS'den yapılan bir kalıp ile birlikte kalıplanması, mikro yapıları yaratmanın alternatif bir yöntemidir. Soft-litografi biçimi olan mikro-kalıplama yöntemi, elastomerik bir kalıbın, spin kaplı bir polimer filmin yüzeyine hafif bir basınçta kalıbın ve substratın bir süre bozulmadan kalmasına izin verir. Bu şekilde oluşturulan 3B yapı, kalıp kalitesinin herhangi bir bozulma veya kusur olmadan korunması bakımından kullanışlıdır. Mikro-kalıplama yöntemi, hidrojeller ile mikro ve nano yapıları üretmek için potansiyel olarak güçlü bir yöntem sağlar (Yeh ve ark., 2006). Khademhosseini ve ark. (2006), yaptıkları bir çalışmada metakrilanmış hiyaluronik asit jellerinin içerisine, çalışmanın evrenselliğini göstermek amacıyla embriyonik kök hücre veya NIH-3T3 hücrelerini enkapsüle ederek mikro kalıplama-yöntemi ile jelleri kalıplamışlardır. Hiyaluronik asit mikro-yapıları içinde kapsüllenmiş hücrelerin canlılığını analiz etmek için, NIH-3T3 fibroblastları Canlı / Ölü deneyi ile boyanmış ve bir floresan mikroskop altında analiz edilmiştir. Jellerdeki hücrelerin kantitatif sayımı sonucunda %82,65'inin ışık altında çapraz-bağlama ve kalıplama işleminden sağ çıktığını göstermişlerdir. Couthinho ve arkadaşları (2012), poli (bütilen süksinat) kullanarak farklı oluk boyutlarına sahip 20 yüzey geliştirmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize etmişlerdir. Tasarlanmış mikro özelliklerin insan adipoz türevi yetişkin kök hücrelerinin (hAKH'ler) yaşayabilirliği ve bağlanması üzerindeki etkisi değerlendirmişlerdir. Tasarlanmış yüzeyler üzerinde kültürlenen hAKH'lerin test edilen tüm modeller için uygun kaldığı gösterilmiştir. SEM ve immün boyama, tüm desenler için kök hücrelerin yeterli şekilde bağlandığını ve yayıldığını göstermiştir. Tez çalışması kapsamında mikro-kalıplama yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 1.13:Işık altında çapraz-bağlanabilir kitosan bazlı hidrojel ile mikro-kalıplama teknolojisini kullanarak sferoid üretim şeması (Fukuda ve ark., 2006).



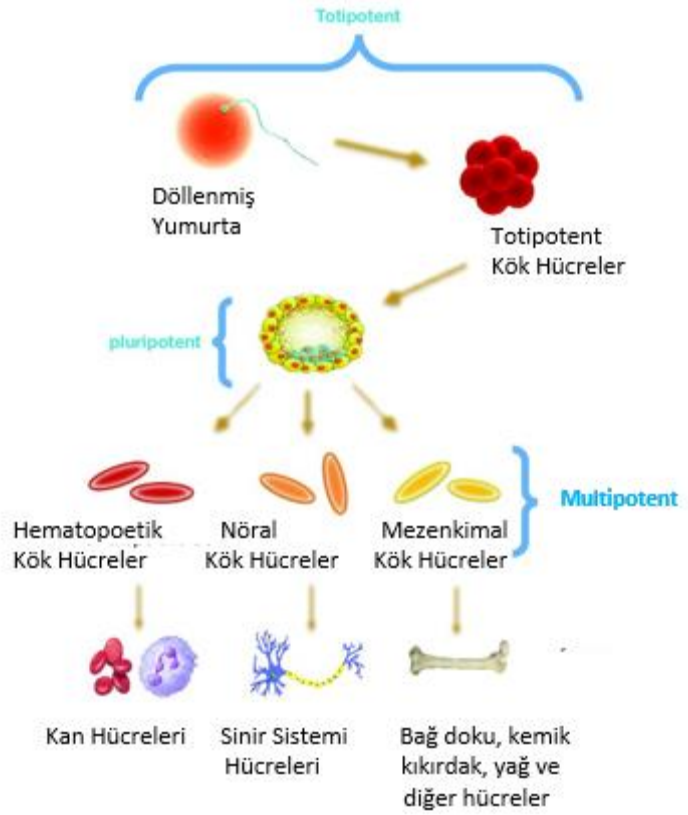
Şekil 1.14: JelMA polimerinden UV ışığı altında mikro-kalıpma yöntemi ile hidrojel doku iskelesi üretimi.

1.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Tipleri

1.6.1. Kök Hücreler

Doku mühendisliğinde genellikle hücreler, donör dokulardan elde edilir fakat bu yöntemin kısıtlamaları bulunmaktadır. Kök hücreler şu anda rejeneratif tıpta önemli bir odak noktasıdır, çünkü yaşam ve büyüme sırasında vücutta birçok farklı hücre tipinde gelişme potansiyeli vardır. Ek olarak, birçok dokuda, bir tür dahili onarım sistemi olarak işlev görür ve canlı hala hayatta olduğu sürece diğer hücreleri yenilemek için sınırsız olarak bölünebilir. Bir kök hücre bölündüğünde, her yeni hücre, bir kök hücre olarak kalma veya bir kas hücresi, bir kırmızı kan hücresi veya bir beyin hücresi gibi daha özel bir işlevi olan başka tür bir hücre olma potansiyeline sahiptir. (Zakrzewski ve ark., 2019). Kök hücreler; sınırsız bölünebilme yeteneği olan, ana kök hücrenin karakterini koruyarak kendini yenileyebilen ve kendisi gibi yeni kök hücreler oluşturabilen, vücudun ihtiyacına göre farklı hücre tiplerine farklılaşabilen ve tüm bunları kendilerine özgü sinyaller ile gerçekleştirebilen eşsiz hücrelerdir (Odorico ve ark., 2001; Stocum 2001).

Bir dokudan elde edilen kök hücrenin, aldığı uyarılarla, uygun koşullar altında yeni bir kimlik kazanma kabiliyetine plastisite adı verilir (Vescovi ve ark., 2002). Kök hücreler plastisitesine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 gruba ayrılır (Alwattar ve ark., 2011). Totipotent kök hücreler, tam bir organizma oluşturma yeteneğine sahipken, pluripotent kök hücreler tam bir organizma oluşturamaz fakat hemen her türlü doku tipini oluşturabilir. Multipotent kök hücreler ise gelişimin ileri evresine ait kök hücrelerdir. Bu sebeple özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler (Chapman ve ark., 1999; Can 2009).



Şekil 1.15: Kök hücre sınıflandırmasına genel bir bakış. Totipotensi: Döllenmeden sonra, embriyonik kök hücreler (EKH'ler) üç germ katmanını ve ekstraembriyonik dokuları veya plasental hücreleri oluşturma yeteneğini koruduğu grup. Pluripotensi: Blastosist aşamasının totipotent hücrelerle karşılaştırıldığında daha özelleşmiş hücreleri, kendi kendini yenileme ve üç germ katmanına farklılaşma yeteneğine sahip olmasıyla birlikte plasental hücreleri veya ekstraembriyonik dokuları oluşturmaz. Multipotensi: Yetişkin veya somatik kök hücrelerden oluşan grup. Doğum sonrası dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Kendi kendilerini yenileme yeteneği pluripotent hücrelere göre daha sınırlıdır (Rajabzadeh ve ark., 2019 değiştirilerek alınmıştır).

Multipotent kök hücreler, kordon bağında ve erişkin vücudunda en çok kemik iliği ve yağ dokusunda bulunmaktadırlar. Vücudumuzun çeşitli organlarında ve bu organların belirli doku bölgelerinde bulunan, gerektiği zaman kendini çoğaltıp, farklılaşabilen bu kök hücrelere 'Yetişkin Kök Hücreler' (YKH) denir. YKH, doku ya da organa özel doku bütünlüğünün devamlılığını sağlayan kök hücrelerdir. Günümüzde üzerinde en çok çalışılan yetişkin kök hücreler arasında; mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoetik kök hücreler (HKH), nöral kök hücreler (NKH) ve endotel kök/öncü hücreleri göstermek mümkündür (Can 2009).

Tablo 1.1: Farklı tipteki kök hücrelerin karakteristik özellikleri (Herberts ve ark., 2011).

Embriyonik Hücreler	Pluripotent Kök Hücreler	Mezenkimal Kök Hücreler
Blastosist iç hücre kitlesinden elde edilir	Somatik hücrelerden elde edilir	Yetiskin dokulardan elde edilir
Allojenik	Otolog veya allojenik	Otolog veya allojenik
Pluripotent karakter	Pluripotent karakter	Multipotent karakter
3 germ tabakasındaki hücre çeşitlerine farklılaşabilir	3 germ tabakasındaki hücre çeşitlerine farklılaşabilir	İzole edildiği dokuya bağlı olarak limitli hücre tiplerine farklılaşabilir
Kendini yenileyebilir	Kendini yenileyebilir	Kendini yenileyebilir
Teratoma oluşturma riski	Teratoma oluşturma riski	Teratoma oluşturma riski yok
Ciddi etik problemler taşır	Etik problem yok	Etik problem yok
Bağışıklık oluşturma riski taşır	Yetişkin hücrelerden alındığında bağışıklık riski düşük	Düşük immünojenikliğe sahiptir ve immünomodülatördür

Rejeneratif tıp son zamanlarda hücre, doku veya organların tedavisinde veya yenilenmesinde ortaya çıkan disiplinler arası bir alan olarak kendini göstermektedir. Kök hücreler ise doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanının değişmez bir dinamiğidir. Rejeneratif tıp bir dizi farklı disiplini (doku mühendisliği, kök hücre tedavisi vb.) kapsamakla birlikte, organogeneze yönelik olduğunda, önemli bileşenler olan uygun hücreler ve uygun bir yapı iskelesini içermelidir. Bu kapsamda kullanılan çeşitli kök hücre tipleri mevcuttur. Örneğin; indüklenmiş pluripotent hücrelerin kullanılması, embriyonik kök hücrelerle ilişkili immünosupresyon kullanımının ve etik problemlerin üstesinden gelebilir. Bununla birlikte, amniyotik sıvı kök hücreleri gibi mezenkimal kök hücreler, tedavi sırasında tümör oluşumu, alıcının reddi, izolasyon zorluğu ve etik konular gibi pluripotent kök hücrelerin sebep olabileceği tehlikeleri azaltabilir (De Coppi 2020).

Dokuların *in* vitro mühendisliği, doğal ECM'ye benzeyen bir matris oluşturmak için bir iskelenin aralıkları üzerinde çoğalan kök hücreler gerektirir (Chandrasekhar ve ark., 2020). Kök hücreler, farklı mezenkimal fenotiplere farklılaşabilme yetenekleri sayesinde dokuya özgü iskele geliştirilmesi ve dokuların reforme edilmesine olanak sağlar. Bununla birlikte salgıladıkları biyomoleküller ve hücreler arası iletişim yetenekleri sayesinde tedavilerde önem arz etmektedir (Brown ve ark., 2013). Dolayısıyla çeşitli avantajları sebebiyle doku mühendisliğinde dikkat çekmektedir.

1.6.2. Mezenkimal Kök Hücreler

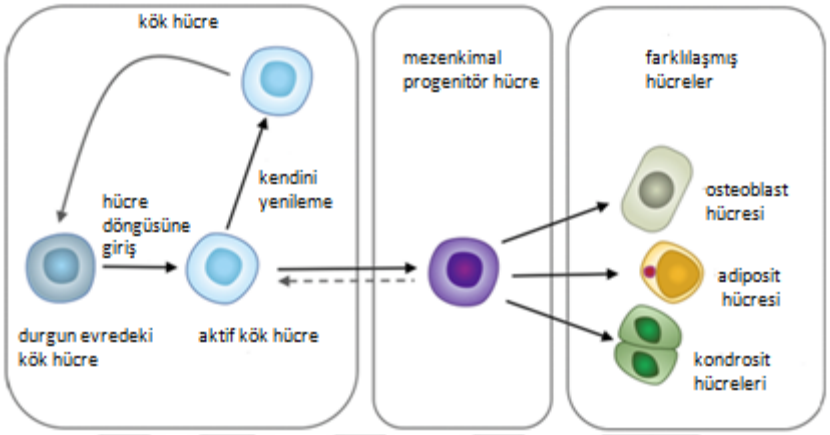
Yetişkin kök hücreler, kanser hastalıklarının tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır. 1950'li 1960'lı yıllarda bilim insanları, kemik iliğinden izole edilen 'hematopoetik kök hücreler' transplantasyonlarının, konakçı bağışıklık sisteminin bulunduğu organizmalarda birçok farklı hücre tipinden oluşan yeni bir bağışıklık sistemi üretebileceğini gösterdi. Bu başarıların ardından, Friedenstein ve ark., (1970) kemik iliği stromasını bir başka dokuya naklettiklerinde, başlangıçta fibroblastlara benzetilen ve kemik, yağ, kıkırdak ve retikulum hücrelerine dönüşebileceğini gösterdikleri başka bir hücre tipini fark ettiler. Daha sonra bir kök hücre olduğu gösterilen bu hücreler kemik iliği kök hücresi ya da daha kapsamlı adıyla mezenkimal kök hücreler (MKH 'ler) olarak adlandırılır. Bu hücreler, bağ dokusundaki hücrelere benzer (fibroblastlar) ve hematopoetik kök hücrelerin aksine, hücre kültürü besiyerinde kolayca büyütülebilir. İçinde büyüdükleri besiyerinin bileşimi değiştirilerek, MKH'ler kemik hücrelerine (osteositler), yağ hücrelerine (adipositler) ve kıkırdak hücrelerine (kondrositler) ayrılabilir. Bu özellik, özellikle kemik ve kıkırdak doku mühendisliği için cazip bir seçim haline getirmiştir. Çünkü hücrelerin izole edildiği kişiyi (otolog) nakil olarak tedavi etmek için kullanılabilir. Literatürde, bu hücrelerin kalp hücreleri ve nöronlar dahil olmak üzere diğer soylara farklılaşabileceğine dair çalışmalar vardır (Evans ve ark., 2006).

Mezenkimal kök hücreler spesifik ve benzersiz belirteçlere sahip değillerdir. Hücrelerin MKH olarak değerlendirilmesi için aşağıdaki çzelliklere sahip olması gerekmektedir:

- Hematopoetik markerler olan CD45, CD34, CD14 veya CD19, HLA-DR

belirteçlerini eksprese etmemesi ya da ekspresyonun çok düşük olması,

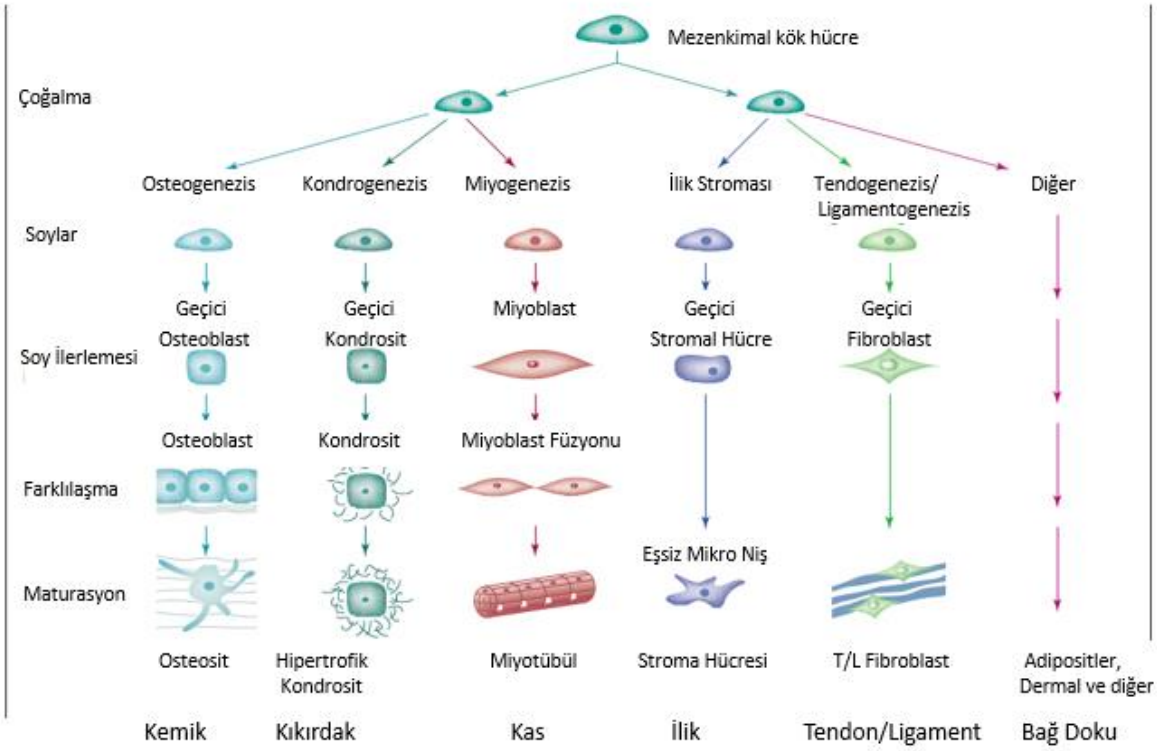
- CD105, CD73, CD44 ve CD90 belirteçlerini eksprese etmesi,
- Kültür kabına yapışabilmeleri,
- Kemik, kıkırdak ve yağ dokuya farklılaşabilme yeteneği göstermesi (Dominici ve ark., 2006; Uccelli ve ark., 2008; Hsu ve Fuchs, 2012).



Şekil 1.16: Kök hücrelerin ve dokuya özgü mezenkimal progenitörlerin organizasyonunun şekil üzerinde gösterimi (Donelly ve ark., 2018).

Mezenkimal kök hücreler; kemik iliği (BM) yağ dokusu, Wharton jeli (WJ), periferik kan, kordon kanı, plasenta, amniyotik sıvı, dental pulp, dental folikül, diş türevli kök hücreler ve periodontal ligamentten elde edilebilmekte ve T hücrelerinin, B hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonlarını baskılayarak bağışıklık sistemini de etkileyebilmektedir (Karaöz ve ark., 2017).

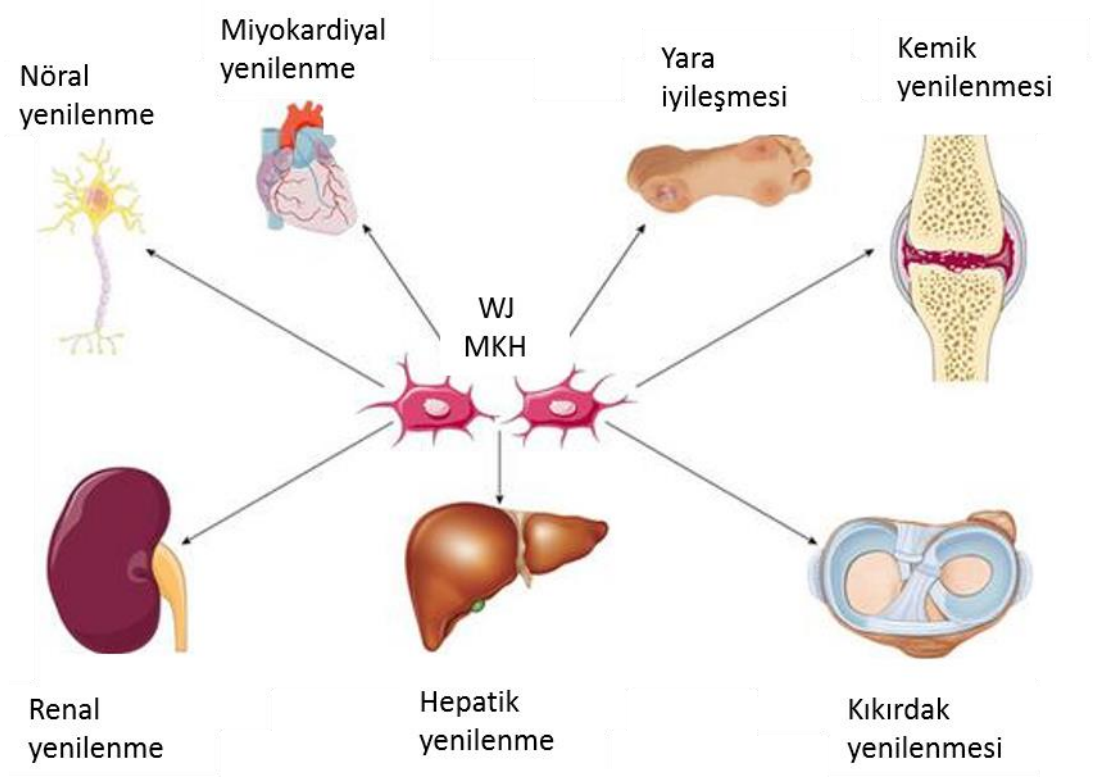
Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü kolaydır. Buna ek olarak, yüksek *ex vivo* potansiyelleri sayesinde hem hücre hem de gen terapisi bağlamında, geniş bir klinik uygulama yelpazesinde rol oynayabilecek çekici bir terapötik araçtırlar (Minguel ve ark., 2001).



Şekil 1.17: Mezenkimal kök hücrelerin çoğalma, soy, farklılaşma ve maturasyonunu gösteren süreç. Varsayılan mezenkimal kök hücreden (MKH) farklılaşmış fenotiplere hücresel geçişler aşamalı şekilde şematik olarak tasvir edilmiştir (Caplan ve Bruder 2001, değiştirilerek alınmıştır).

1.6.2.1. Wharton Jeli Kök Hücreler

MKH'ler farklılaşma potansiyelleri, kendilerini yenileme yetenekleri, uzun vadede *ex vivo* proliferasyon, parakrin etkileri ve immünomodülatör potansiyelleri nedeniyle kendilerini hücresel tedaviler ve rejenerasyon için umut verici bir araç olarak göstermiştir (El Omar ve ark., 2014; Wang ve ark., 2018).



Şekil 1.18: Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerinin (WJMKH) çeşitli dokulardaki rejeneratif etkileri (Abbaszadeh ve ark., 2020).

MKH'lar, kemik iliği, diş pulpası, yağ doku, plasenta, göbek kordonu kanı ve wharton jeli gibi yetişkin ve fetal dokulardan toplanabilir. Yetişkin dokulardan alınan mezenkimal kök hücrelerden farklı olarak wharton jeli mezenkimal kök hücreleri (WJMKH), düşük maliyet, proliferasyon kapasitesi, büyük miktarlarda elde edilebilme, kolay ve invazif olmayan izolasyon prosedürü gibi birçok faydalı özellikleri nedeniyle son zamanlarda allojenik veya otolog uygulama için büyük bir ilgi uyandırmaktadır. Wharton göbek kordonu jeli, mukoid bağ dokusu ve fibroblast benzeri hücreler içerir. Wharton jeli (WJ) olarak bilinen bu doku, bağ dokusu ile çevrili iki arter ve bir venden oluşur (Davies ve ark., 2018). Bu mukoza bağ dokusu, hyaluronik asit ve kondroitin sülfat olan mukopolisakkaritler de içerir (Sobolewski ve ark., 1997). Akış sitometri analizlerine göre göbek kordonu jelinden elde edilen hücrelerin, CD44, CD73, CD90, CD105 belirteçlerini eksprese ederken, CD45,11b, HLA-DR ve CD34 belirteçlerini eksprese etmemesi beklenir (Wang ve ark., 2004; Ranjbaran ve ark., 2018; Kamal ve Kassem, 2020).

Hücreler, doku mühendisliğinin ayrılmaz bir parçasıdır. Kemik doku mühendisliğinde, *in vitro* olarak osteoblast hücre soylarının yanı sıra insan kemik iliğinden elde edilen kemik iliği MKH ve WJKH de başarıyla kullanılmıştır (Canha-Gouveia ve ark., 2015). Kemik iliği kök hücrelerinden farklı olarak WJKH, donör saha morbiditesi olmaması, *in vitro* da üstün büyüme, üstün proliferasyon performansı ve ağrısız izolasyon gibi avantajlara sahiptir (Sarugaser ve ark., 2005). MKH'lar WJ'den izole edilebilir ve adipositler, osteoblastlar, kondrositler, nöronlar, kardiyomiyositler ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelere farklılaşabilmeleri için indüklenebilir (Chen ve ark., 2009; Ishige ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010). Bu hücreler, osteojenik farklılaşma için indüklendiğinde, ALP aktivitesi, kolajen tip I üretimi, kemik sialoproteini, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin ekspresyonu, hücre dışı matriks oluşumu ve kalsiyum fosfat birikimi gibi osteoblastik davranış sergiler (Schneider ve ark., 2010).

Örneğin; Ahmadi ve ark., (2017) yaptıkları bir çalışmada Poli-L-laktik asit (PLLA) elektrospun nanofiber iskele ve wharton jeli kullanarak geliştirdikleri iskelede PLLA, tek başına osteoindüktif bir ortam sağlayamayacağı için nanofiberler wharton jeli ile kaplanarak iskele üzerine mezenkimal kök hücreler ekilmiştir. Osteojenik farklılaşma potansiyeli ve kalsiyum birikimi ölçülen iskelelerin kültür plakası ve yalnızca PLLA iskelesi kullanılan deney gruplarına göre daha yüksek çoğalma ve yüksek kalsiyum minerilizasyonu gösterdiği bulunmuştur. Öteki yandan Gauthaman ve ark., (2011) tarafından yapılan bir çalışmanın ışığında insan göbek kordonu wharton jeli (iWJKH)'nin diğer kök hücre türlerine kıyasla osteojenik soya etkin bir şekilde farklılaşabileceği üzerine çalışmışlardır. Çalışmada bağlanma, proliferasyon, farklılaşma ve mineralizasyon için dört farklı 3B nanofibröz iskeleyi (PCL, PCL/kolajen [PCL/Col], PCL/hidroksiapatit [PCL/HA], ve PCL/Col/HA) insan göbek kordonu wharton jeli kullanarak osteojenik soya farklılaştırmayı denemişlerdir. Kolajen bazlı iskeleler yalnızca PCL/HA bulunduran iskeleye göre %41,80 ve %38,52 oranları arasında daha yüksek hücre bağlanması ve proliferasyonu göstermişlerdir. 21 gün sonunda osteojenik ortamda PCL/Col/HA üzerinde kültürlenen iWJKH'ler, kontrollere kıyasla artmış alkalin fosfataz aktivitesi ve osteokalsin, artmış mineralizasyon ve osteojenik ilişkili genlerin daha fazla ekspresyonunu göstermiştir. Çalışma sonucunda ekip osteojenik farklılaşmalar için etkili bir şekilde insan göbek kordonu wharton jeli kök hücrelerinin kullanılabileceğini önermişlerdir.

Kemik doku mühendisliği üzerine yapılan başka bir çalışmada, Karadaş ve ark., (2012), kalsiyum fosfat kristalleri ile zenginleştirilmiş sünger kolajen iskelesi üzerinde menstural kan kök hücreleri (MKKH) ve WJKH'nin osteojenik farklılaşma kapasitelerini karşılaştırmışlardır. Karşılaştırma sonucunda iskele üzerinde wharton jeli hücrelerinin etkinliğinin daha yüksek olduğu, WJ'lerin ALP aktivitesinin, MKKH 'lerden daha yüksek olduğu gösterilmiş ve bu sonuçlar ışığında, WJ MKH'ler tarafından oluşturulan minerallerin, MKKH 'lere kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kimyasal Malzemeler

- Jelatin, Sigma, Almanya
- Metakrilit anhidrit, Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Irgacure 2959, Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sigma, Almanya
- Lityum bromür (LiBr), Sigma, Almanya
- Bombyxmori ipeği- Bursa Koza Birlik, Türkiye
- 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), Invitrogen
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco, ABD
- L-glutamin, Gibco, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, ABD
- L-DMEM, Sigma, Almanya
- High Glucose DMEM, Gibco, ABD
- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, ABD
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- β- Glycerophosphate Disodium Salt Pentahydrate, Sigma
- L- Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n- Hydrate, Sigma
- Magnezyum nitrat tetrahidrat [$Mg_2(NO_3)_26H_2O$], Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Alüminyum nitrat nonahidrat [$Al(NO_3)9H_2O$], Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Hidrojen klorür (HCI), Merck
- Sodyum hidroksit (NaOH), Sigma, Almanya
- Dexamethasone, Sigma
- Paraformaldehit (PFA)- Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Alizarin Red S, Sigma, Almanya
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma
- Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), R&D Systems
- Alexa Flour 594, Thermo Fisher
- BCA kiti, Serva
- ALP kiti, Enzlyine™

- Laktat Dehidrogenaz (LDH) kiti, Thermo Scientific
- Bovin serum albumin (BSA), Sigma, Almanya
-Tween-20, Sigma
- Triton X-100, Biofroxx
- Hidrojen Peroksit, Tekkim Kimya
- Parafin, Merck
- Ksilen, Merck
- Hematoksilen& Eosin, Moslab
- Masson Trikom, Moslab
- COL1A, Santa Cruz
- Bone Sialoprotein, Millipore
- Osteocalcin, Santa Cruz
- Live&Dead kit, Thermo Fisher
- Prestoblue, Invitrogen
- Etanol, Millipore
- Metanol, Millipore

2.2. Sarf Malzemeler

- 75 cm^2'lik kültür kabı, Corning
- 6, 24 ve 48 kuyulu kültür kapları, Corning
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10-100-1000 µl'lik pipet uçları, İsolab
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Corning
- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Mikroskop lamı, Nest
- Kriyoviyal, Corning
- Diyaliz membran, Sigma&Aldrich, Inc., Almanya

2.3. Hücre Hatları

Tez kapsamında ATCC ‘den satın alınan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre hattı (WJMKH) kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücrelerin pasaj numaraları P3-P4 ‘dır.

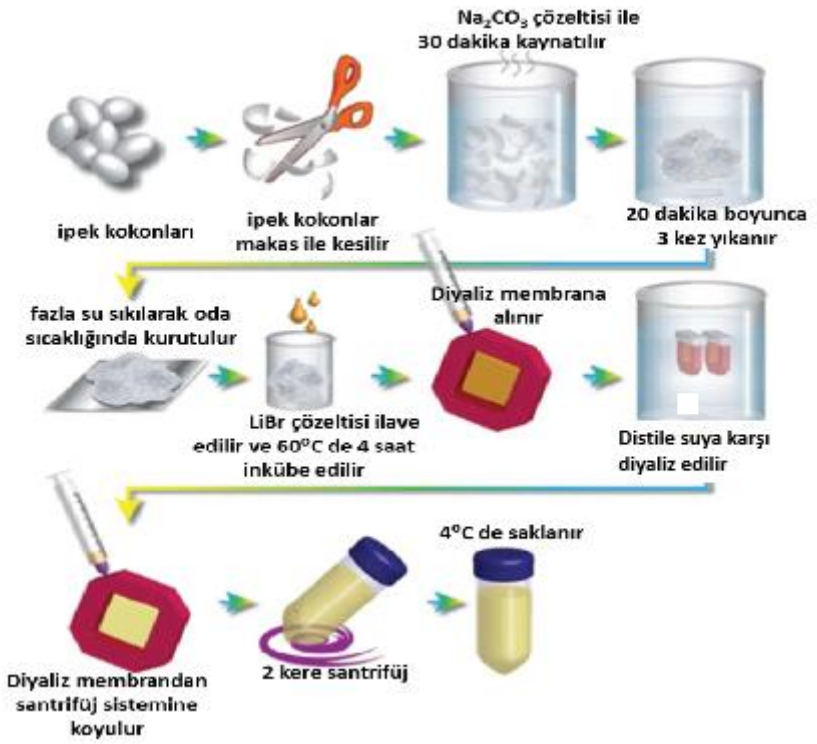
2.4. Kullanılan Cihazlar

- Fourier Transforn Infrared Spektroskopisi (FTIR), Jasco FT/IR-4600
- Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H NMR), Varian UNITY INOVA
- İndüktif Eşleşmiş Plazma ve Kütle Spektrometresi (ICP-MS), Agilent 7800
- X-Işını Difraktometresi (XRD) cihazı, PANanalytical X'Pert Pro MPD
- Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı, NanoZS Malvern Instrument
- Liyofilizatör, Telstar Lyo Quest
- Mekaniksel Test Cihazı, TA.XTPlus
- Hidrotermal Reaktör, Kent Kimya
- Mikroplaka Okuyucu, Spektrostar Nano
- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio
- pH Metre, Ohaus
- Hassas Terazi, SHIMADZU AUW220D
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Etüv, Nüve FN055
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO_2inkübatörü), Panasonic
- Steril Kabin, Telstar
- Otoklav, Nüve, OT120M
- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya
- UV Light, Omnicure S2000, Excelitas Technologies, ABD
- Mikrotom Cihazı, Leica
- Spektroflorometre, Jasco, FP 8300
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Cihazı, Zeiss, Almanya
- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech
- Buzdolabı, Panasonic
- Mikropipet, Rainin

2.5. İpek Kozalarından İpek Fibroin İzolasyonu

Fibroin; Bursa'dan alınan *Bombyxmori* ipeğinden saflaştırılmıştır. İpek kozalarından ipek fibroin izolasyonu, literatürde belirtildiği şekilde standart izolasyon protokolüne göre yapılmıştır (Şekil 2.1). İlk olarak ipek kozaları makasla küçük parçalara kesilerek belirli bir miktar tartılmıştır. 0,02 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca kaynatılmıştır. Kaynatma işlemi sonrasında ipek fiberle çözeltiden alınıp soğutulmuş ultra saf su ile durulanmıştır. Durulama işlemine 20 dakika boyunca 3 kez suyu değiştirilerek devam edilmiştir. Takiben alüminyum folyo üzerinde gece boyu oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

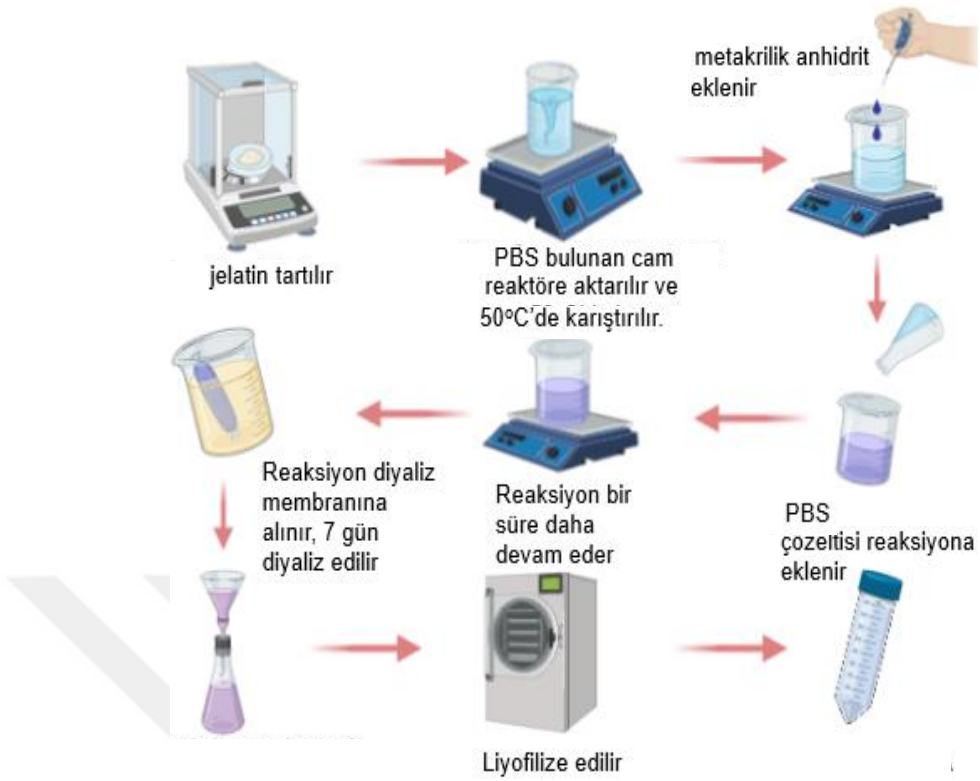
Kurumuş olan ipek fiberlerden 1 g tartılıp bir beher içerisine koyulmuştur. Fiberlerin üzerine lityum bromür (LiBr) çözeltisi eklenip 4 saat boyunca 65^oC'lik etüvde inkübe edilmiştir. Elde edilen çözelti 18G uçlu şırınga yardımıyla diyaliz membranına (MWCO 12.000) alınıp ultra saf su içerisinde 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi boyunca her 24 saatte bir suyu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemi tamamlanan ipek fibroin diyaliz membranından alınıp santrifüj tüpünün içerisinde 9000 rpm, 20 dakika, 4^oC'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenmiş ipek fibroin, temiz bir tüpün içerisine alınıp ağzı kapaklı bir şekilde kullanılana kadar +4^oC de buzdolabında saklanmıştır (Rockwood ve ark., 2011).



Şekil 2.1: İpek fibroin eldesinin şematik gösterimi (Rockwood ve ark., 2011)

2.6. Jelatin Metakrilat (JelMA) Sentezi

Çalışma kapsamında ilk olarak 10 g jelatin tartılmıştır. İçerisinde 100 ml pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) bulunan bir cam reaktörün içerisine koyulmuştur. Karışım, tamamen homojen hale gelene kadar 50°C'de karıştırılmıştır. Üzerine belirli bir miktardaki metakrilik anhidrit damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyon 50°C'de 2 saat boyunca 250 rpm hızda karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. 2 saati tamamlayan reaksiyon karışımının üzerine 50°C'de önceden ısıtılmış PBS çözeltisi eklenip reaksiyona 10 dakika daha devam edilmiştir. Takiben elde edilen reaksiyon karışımı, diyaliz membranına (MWO 12.000-14.000 Da) alınarak 7 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra üzerine aynı hacimde ultra saf su ilave edilip, üzerine reaksiyon karışımı eklenmiştir. Bütün bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımı mavi bantlı süzgeç kağıdı ile süzülmüş ve liyofilize edilmiştir (Şekil 2.2) (Nichol ve ark., 2010)



Şekil 2.2: JelMA sentezinin şematik gösterimi.

2.7. Çift Tabakalı Hidroksit Bileşiklerinin (LDH) Sentezi ve Nanopartiküllerinin Eldesi

Mg-AI LDH sentezi için 1,603 g $Mg_2(NO_3)_26H_2O$ ve 1,723 g $Al(NO_3)9H_2O$ tartılmıştır ve temiz bir beher içerisinde 25 ml ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Ardından başka temiz bir beher içerisinde 1 g NaOH ve 0,3312 g $NaCO_3$ 25 ml ultra saf su içerisinde çözülmüştür. İlk yapılan solüsyon çözeltisi 50 ml'lik biürete aktarılırken ikinci olarak hazırlanan solüsyon çözeltesi ise 250 ml'lik bir balon jojeye aktarılmıştır. Büretteki çözelti, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmakta olan balon joje içerisindeki çözelti üzerine damlacıklar halinde aktarılmıştır. Karıştırma işlemi bittiğinde elde edilen karışım 1 saat boyunca hızlı ayarda karıştırılmaya bırakılır. 1 saat sonunda elde edilen solüsyon, filtre kağıdı yardımıyla süzülmüştür. Son olarak solüsyonun pH'ı 5-6 aralığına gelene kadar çökelti, ultra saf su yardımıyla yıkanmış ve ara ara süzüntünün pH'ı, pH metre yardımıyla kontrol edilmiştir. Tüm bu işlemler bittikten sonra çökelti oda sıcaklığında kurutulmuştur (Özgümüş ve ark., 2013).

Mg-AI LDH nanopartikül eldesi kapsamında hidrotermal yöntem kullanılmıştır (Xu ve Lu, 2005). Oda sıcaklığında kurutululan ve saklanan Mg-AI LDH, kullanılmak üzere tartılmış ve 50 ml'lik ultra saf su içerisine alınmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tortu kalmayana dek homojen hale getirilen çözelti, hidrotermal reaktör içerisine alınmış ve etüvde 100^{o}C'de 16 saat boyunca bırakılmıştır. 16 saat sonunda sıcaklık oda sıcaklığına dönene kadar reaktör açılmamıştır. Takiben içerisindeki solüsyon, temiz falkonlara aktarılarak liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur.

2.8. JelMA Polimerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen JelMA polimeri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Proton nükleer manyetik rezonans spektroskopi (^{1}H NMR) analizleri ile karakterize edilmiştir. JelMA'nın FTIR spektrumu Bölüm 2.4 'de belirtilen cihaz kullanılarak 400-4000 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir (Sadeghi ve Heidari 2011). JelMA polimerinin ^{1}H NMR analizi Varian UNITY INOVA cihazı ile (D_2O, 500 MHz, δ, ppm) alınmıştır.

2.9. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

LDH partikülünün FTIR spektrumu, 400-4000 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir.

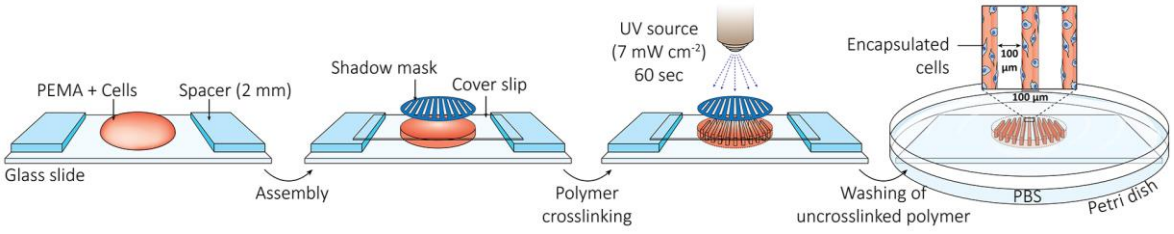
LDH nanopartiküllerinin XRD analizleri 45 mA, 40 kV ve Ni-filtresinde PANanalytical X'Pert Pro MPD Model XRD cihazı ile yapılmıştır. X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), malzemenin kendine özgü atomik dizilimlerine göre kristal fazın X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırarak analiz yapılması esasına dayanır.

Sentezlenen LDH partiküllerinin bileşimi, Agilent 7800 Quadrupole marka ICP-MS (İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma- kütle spektrometresi) kullanılarak belirlenmiştir. Bu analiz için Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Birimi'nden hizmet alımı yapılmıştır. LDH 'ların Mg^{2+}/Al^{3+} oranı, Mg^{2+} konsantrasyonunun ICP-OES ile belirlenen şekilde Al^{3+} konsantrasyonuna bölünmesi ile hesaplanmıştır.

LDH nanopartiküllerinin partikül boyu ve zeta potansiyeli analizleri hidrotermal yöntem ile sentezleri sonrasında gerçekleştirilmiştir. Analizler, Nanosizer cihazında (NanoZS Malvern Instrument, UK) yapılmıştır. LDH partikülleri 25°C'de analiz edilmiştir. Örnekler potansiyel ölçüm cihazının örnek haznesine 1 ml süspansiyon halinde enjekte edilmiş ve ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her formülasyon için ardarda üç ölçüm yapılmıştır.

2.10. Doku İskelelerinin Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında, LDH içermeyen JelMA/İpek fibroin doku iskelelerinin ön- formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, JelMA ve ipek fibroin ile farklı oranlarda çeşitli formülasyonlar üzerinde çalışılmıştır. Bunun için farklı miktarlarda JelMA polimeri (ağırlıkça %5, %10 ve %15) PBS içerisinde tamamen çözündürülmüş, takiben çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Irgacure 2959 (final konsantrasyonu: 2,5mg/ml), JelMA çözeltisine ilave edilmiştir. Işıktan korumak amacıyla alüminyum folyoya sarılmıştır. Ardından çözelti içerisine belirli bir miktarda ipek fibroin çözeltisi eklenerek 37^0C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen karışımdan mikropipet yardımıyla 50 µl alınarak 1 mm ile ayrılmış iki cam slayt arasına pipetlenmiştir (Şekil 2.3). Takiben UV ışığı altında farklı sürelerde (40, 60 ve 90 saniye) çapraz bağlanmış ve stabiliteleri gözlemlenmiştir. Polimerlerin optimum final konsantrasyonları JelMA için 100 mg/ml, ipek fibroin için ağırlıkça %2,5 , UV süresi ise 40 saniye olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.3: Mikro-kalıplama tekniği ile doku iskelelerinin üretimi (Mehrali ve ark., 2019).

2.11. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Sentezi

JelMA/İpek fibroin/LDH doku iskelelerinin sentezinde, bir önceki bölümde (Bölüm 2.10) gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum formülasyon kullanıılmıştır. Bu formulasyona LDH nanopartikülü, farklı miktarlarda ilave edilmiştir. LDH nanopartikülleri, JelMA çözeltisine farklı miktarlarda eklendikten sonra 300 rpm'de manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında homojen hale getirilmiştir. Ardından ipek fibroin eklenerek 37^0C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Mikropipet yardımıyla 50 µl alınarak 1 mm ile ayrılmış iki cam slayt arasına pipetlenmiştir. Takiben UV ışığı altında, yapılan ön çalışmalar sonucunda, minimum sürede UV ışınına maruz bırakmak ve çapraz bağlanmayı sağlamak için 40 saniye seçilmiş ve doku iskeleleri 40 saniye süreyle çapraz bağlanmıştır.

Tablo 2.1: Geliştirilen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin formülasyon adları, bileşim oranları ve UV süreleri.

Formülasyon Adı	JelMA Konsantrasyonu (mg/ml)	İpek Fibroin Konsantrasyon (% ağırlıkça)	LDH Konsantrasyonu (mg/ml)	UV Süresi (sn)
J/IF LDH0	100	2,5	0	40
J/IF LDH1	100	2,5	1	40
J/IF LDH2	100	2,5	2	40
J/IF LDH3	100	2,5	3	40
J/IF LDH5	100	2,5	5	40
J/IF LDH7	100	2,5	7	40
J/IF LDH10	100	2,5	10	40
J/IF LDH15	100	2,5	15	40

2.12. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Bölüm 2.11'de anlatıldığı gibi sentezlenen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin liyofilize edilerek kurutulmuştur. Doku iskelelerinin yapısı FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumu Bölüm 2.4 'de belirtilen cihaz kullanılarak 400-4000 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir Elde edilen doku iskelelerinin morfolojisi (özellikle gözenekli yapısı) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analiziyle belirlenmiştir.

2.13. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitelerinin Belirlemesi

Su tutma kapasitelerinin belirlenmesi için, yapının UV altında çapraz bağlanmasının ardından doku iskeleleri, oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Daha sonra kuru tartımları alınan doku iskeleleri, içerisinde PBS tamponu (pH 7,4) bulunan eppendorf tüplere yerleştirilerek 37^0C'de bekletilmiştir. 48 saatin sonunda doku iskeleleri PBS içerisinden alınarak fazla suyu alınıp tekrar tartılmıştır. Doku iskelelerinin şişme oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı} = \frac{Ws - Wi}{Wi}$$

Burada, Wi doku iskelelerinin kuru haldeki ağırlığı, Ws ise 48 saat şişmesi sonrası ağırlığıdır. Her örnek ile üç tekrarlı çalışılmıştır (Sowjanya ve ark., 2013).

2.14. Doku İskelelerinin Degradasyon Hızlarının Belirlenmesi

Degradasyon hızlarının belirlenmesi için doku iskeleleri, şişme deneyinde olduğu gibi hazırlanmıştır ve liyofilizator edilerek belirli zaman aralıklarında dondurularak kurutulmuştur. Ardından kuru ağırlıkları tartılan iskelelerin degredasyon oranları kalan kütle üzerinden belirlenmiştir. Doku iskelelerinin % degredasyon oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\%\text{Kalan kütle} = \frac{Wi - Wt}{Wi} \times 100$$

Burada Wi, doku iskelelerinin kuru haldeki ilk ağırlığı, Wt ise doku iskelelerinin belirli zaman aralıklarındaki kuru ağırlığıdır. Analiz için her örnek ile üç tekrarlı çalışılmıştır (Sowjanya ve ark., 2013).

2.15. Doku İskelelerinin Mekaniksel Dayanımlarının Belirlenmesi

Hazırlanan doku iskeleleri distile su ortamında şişirildikten sonra silindirik ebatlarda olması için 5 mm çaplı biopsy punch ile delinmiştir. Sonrasında örnekler cihazın (TA.XTPlus Tekstür Analiz Cihazı) iki sıkıştırma plakası arasına yerleştirilerek 1 mm/dak'lık bir yer değiştirme hızında sıkıştırılmıştır. Elastik modülü doğrusal bölgedeki %5-10 gerinime karşılık gelen eğimden hesaplanmıştır. Tüm analizlerde üç tekrarlı çalışılmıştır (Camci-Unal ve ark., 2013; Shin ve ark., 2013).

2.16. WJMKH'nın *In Vitro* Çalışmalar için Hazırlanması

2.16.1. WJMKH'nın Stoktan Çıkartılması

Hücreler stoktan çıkarılarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmüştür. Hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin (10.000 U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin) ve 10 ng/ml FGF2 içeren L-DMEM besiyeri içerisine alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Takiben süpernatant kısım aspire edilmiş ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek mikropipet ile hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Sonrasında 75 cm^2 'lik kültür kaplarının içerisine hücre süspansiyonu ve 14 ml besiyeri eklenerek 37^oC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir.

2.16.2. WJMKH'nın Pasajlanması

WJMKH için; %5 Fetal Bovin Serum, %1 Penisilin-Streptomisin solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), 10 ng/ml FGF2 içeren L-DMEM besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılacak olan hücre soyları, kültür kabı yüzeyini tamamen kapladıktan sonra (konfluent olduklarında) kültür kabı içerisindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücrelerin fetal dana serumundan arındırılması için 75 cm^2 'lik kültür kabı içerisine 5 ml PBS ilave edilmiş ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı yüzeyine

yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 2 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 edilmiş, yüzeyden kalktığına karar verilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için tripsinin en az iki katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Bu uygulamanın yapılış amacı; tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermesini engellemektir. 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 1ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 24 ml besiyeri ilave edilerek 175cm^2'lik kültür kaplarına alınmıştır. 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyon için bırakılmıştır. Pasajlama işlemi hücrelerinin istenilen sayıya ulaşması amacıyla yapılmıştır.

2.16.3. WJMKH'nın 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 miktarının en az iki katı 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 (%5 DMSO + %35 FBS + %60 DMEM) ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisinde -80°C'ye kaldırılmştır.

2.16.4. Hemositometre ile WJMKH'nın Sayımı

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

2.17. LDH Nanopartiküllerin Sitotoksisite Analizi

Tez kapsamında sentezlenen LDH nanopartiküllerinin sitotoksisite analizi MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Mossman (1983) tarafından geliştirilen MTT testi, kolorimetrik bir yöntemdir. Tetrozolyum tuzlarıyla yapılan bu testte, tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenirken, tuzların formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlar ve renk değişikliğini beraberinde getirir (Tokur ve Aksoy, 2017). MTT çözeltisi 5 mg MTT, 1 ml Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen PBS (pH=7,0) içerisinde çözdürülmüş. Çözelti, -20°C'de alüminyum folyoya sarılı şekilde karanlıkta saklanmıştır.

Hücreler, $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 200 µl taze besiyeri ile ekilmiştir. Hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla kültür kapları 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda LDH nanopartikülleri hücre besiyeri ile farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiştir (1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 15 mg/mL). Besiyeri uzaklaştırılan 48 kuyucuklu kültür kaplarında LDH içeren besiyeri 24 ve 48 saat süreyle 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir. Takiben kuyucuklardaki nanopartikül içeren hücre medyumu uzaklaştırılmış, her kuyucuğa MTT solüsyonu ve besiyeri ilave edilmiş, 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki MTT solüsyonu uzaklaştırılmış, 100 µl DMSO ilave edilmiş ve 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Ardından plakalar 570 nm'de mikroplaka okuyucuda okunmuştur.

Test edilen nanopartikül ile kontrol grubunun absorbans değeri karşılaştırılarak % cinsinden ölü hücre sayısı hesaplanmıştır. Nanopartikül uygulanmamış kontrol grubu absorbans değeri, hücre canlılığı cinsinden %100 kabul edilmiştir.

2.18. Doku İskelelerinde Hücre Adezyonu ve DAPI/Actin Analizi

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan başlangıç materyallerinin steril olması gerektiğinden öncelikle siterilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle ipek fibroin ve LDH nanopartiküllerinin sterilizasyonu için otoklav kullanılmıştır. LDH nanopartikülleri belirli oranlarda tartılarak alüminyum folyo içerisine sarılmış şekilde bir beherin içerisinde 121°C'lik otoklavda katı ayarında sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde ipek fibroinin sterilizasyonu steril bir beher içerisinde 121°C'lik otoklavda likit ayarında gerçekleştirilmiştir. JelMA, 0,20 µm çapındaki

filtreler kullanılarak filtre edilmiş ve tüm işlemler steril kabin ortamında gerçekleştirilmiştir.

Hücre-malzeme yapışması, *in vivo* biyouyumluluk için çok önemlidir. Adezyon (hücre yapışması) hücre iletişimi ve düzenlenmesinde çok önemlidir ve dokuların gelişimi ile korunmasında temel öneme sahiptir. Bu sebeple doku mühendisliği uygulamalarında hazırlanan doku iskeleleri üzerinde hücrelerin tutunmasını saptamak, hücrelerin nanokompozit iskeleyle uyumluluğunu araştırmak amacıyla hücre adezyon testi uygulanmıştır. Hücre adezyon testi, 48 kuyucuklu kültür kaplarında steril şartlarda hazırlanan doku iskelelerinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler her bir doku iskelesinin üzerine $4x10^4$ sayıda olacak şekilde ekilmiştir.

Doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Rhodamine-Phalloidin (Alexa-Fluor 594) ve DAPI ile boyanmıştır. Boyama öncesi paraformaldehit kullanılarak doku iskelelerinin fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Paraformaldehit solüsyonunun hazırlanışı:

- Solüsyon, ağırlıkça %4 oranında paraformaldehit içermektedir.
- 2 g paraformaldehit 50 ml ultra saf distile su içerisine ilave edilmiş, manyetik karıştırıcıda 50°C'de tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır.
- Çözünen paraformaldehiti homojen hale getirmek için az miktarda NaOH ilave edilmiş, takiben çözeltinin pH'sı seyreltik HCI çözeltisi ile pH:7'ye ayarlanmıştır.

Adezyon testi için hazırlanan 48 kuyucuklu kaplarda yapılan deney düzeneği, hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonunda gerçekleştirilmiştir. Laminer kabin altında besiyeri aspire edilmiş ve besiyerini tamamen uzaklaştırmak için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası daha önceden hazırlanan %4'lük paraformaldehit, kuyucuk başına yaklaşık 300 µl olacak şekilde eklenmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından fiksasyon solüsyonu olan paraformaldehitin iyice uzaklaştırılması için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyonun ardından permeabilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Permeabilizasyon solüsyonunun hazırlanışı:

- Solüsyon, hacimce %0,1 oranında Triton X-100 içermektedir.
- 100 ml PBS içerisine 100 µl Triton X-100 ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır.

Hazırlanan solüsyon 30 dakika boyunca doku iskeleleri ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Permeabilizasyon solüsyonunu ortamdan uzaklaştırmak için doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanmış ve ardından bloklama adımına geçilmiştir. Bloklama solüsyonunun hazırlanışı:

- Solüsyon, %1 BSA ve %0,1 Tween-20 içermektedir.
- 100 ml PBS içerisinde 1g BSA ve 100 µl Tween-20 manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

Doku iskeleleri 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Bloklama solüsyonunu uzaklaştırmak için doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Takiben boyama adımına geçilmiştir. DAPI ve Alexa Flour 594 solüsyonlarının hazırlanışı:

- Alexa Flour 594 solüsyonu 1:40 oranında PBS ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Boya çözeltisi her boyama öncesi taze hazırlanmıştır.
- DAPI solüsyonu 1:1000 oranında PBS ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Her boyama öncesi taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Doku iskeleleri 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda Alexa Flour 594 boyası ile inkübe edilmiştir. Takiben doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda DAPI solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Son olarak doku iskeleleri 3 kez PBS ile yıkanmış ve floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.

2.19. Doku İskelelerinde Hücre Enkapsülasyonu ve Canlılık Analizi

Doku iskelelerinde enkapsüle edilen hücrelerin canlılığının belirlenmesi için Live/Dead analizi uygulanmıştır. Live/Dead analizi, doku iskelelerinde enkapsüle edilmiş hücrelerdeki canlı ve ölü popülasyonlarını gözlemlemek amacıyla yapılan bir testtir. Bu adımda steril polimer karışımları, $3x10^6$ hücre/ml konsantrasyonda WJMKH ile 37^oC'de karıştırılmıştır. Elde edilen hücre karışımından mikropipet yardımıyla 50 µl alınarak 1 mm ile ayrılmış iki cam slayt arasına steril şartlarda pipetlenmiştir. UV ışığı altında 40 saniye süreyle çapraz bağlanmıştır. Her örnekten 3 tekrarlı hazırlanan doku iskeleleri, hüre medyumu bulunan 48 kuyucuklu plakalarda inkübe edilmiştir. Belirli 0., 3., ve 5., günlerde Live/Dead boyamaları gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi Live/Dead

kitinde belirtildiği şekilde uygulanmıştır (final konsantrasyon: 2µl/ml Calcein AM ve 4µl/ml Ethidium homodimer-1). PBS ile yıkanan doku iskelelerinin üzerine 200 µl boya çözeltisi eklenmiştir. 20 dakika boyunca 37ºC'de inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkanarak boya uzaklaştırılmış ve karanlıkta, floresan mikroskop altında analiz gerçekleştirilmiştir.

2.20. Doku İskelelerinde Enkapsüle Edilen Hücrelerin Çoğalma Hızı Analizi

Doku iskelelerine enkapsüle edilen WJMKH'ların çoğalma hızları Presto Blue testi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. PrestoBlue® reaktifi, hücrelere eklendiğinde, canlı hücrenin indirgeyici ortamı tarafından modifiye edilir ve kırmızı renge dönüşerek oldukça floresan hale gelir. Ölü hücreler, metabolik aktivitelerini kaybettikleri için floresans sinyalinde herhangi değişiklik oluşturamazlar. Oluşan sinyal, Floresans spektrofotometre kullanılarak tespit edilir ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir.

Hücrü-yüklü doku iskeleleri, bir önceki bölümde açıklandığı şekilde hazırlanmıştır (Bölüm 2.19). Kültürün belirli günlerinde kültür ortamı çekildikten sonra her bir kuyucuğa hacimce %10'luk Presto Blue boyası (taze besiyeri ile seyreltme yapıldı) eklenmiş,1 saat karanlık ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası toplanan besiyeri 560ex/ 590em nm okunmuştur. Hücreler üzerinde kalan Presto Blue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmış ve taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir.

2.21. Osteojenik Farklılaştırma Çalışmaları

Hücre yüklü doku iskeleleri (hücre yoğunluğu: $9x10^6$ hücre/ml) Bölüm 2.19'da anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Kontrol olarak yalnızca hücreler kuyucuklara ekilmiştir. *In vitro* kültür boyunca hücre kültürü besiyeri her iki güne bir değiştirilmiştir. 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 DMEM kullanılmıştır.

2.21.1. Alizarin Red Analizi

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 hücre-yüklü doku iskeleleri 1., 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, 3 kez 5'er dakika distile su ile yıkanmış ve ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir.

2.21.2. Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi

Doku iskelelerinde enkapsüle edilen WJMKHW'nin osteojenik farklılaşması ALP ekspresyonu ile tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında hücre dışı ALP sekresyonu ALP kiti kullanılarak ölçülmüştür. 21 gün kültürlenen doku iskelelerinin besiyerleri belirli aralıklarla alınarak saklanmış ve ALP kit protokolüne göre hazırlanan solüsyonlar ile 37ºC 'de 1 saat karanlık ortamda inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, mikroplaka okuyucu kullanılarak 405 nm'de yapılmıştır.

2.21.3. Biçinkoninik Asit (BCA) Analizi

BCA (Biçinkoninik Asit) analizi, total protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır. Her doku iskelesine ait besiyerinin tek tek ölçülmesiyle gerçekleştirilen analizde solüsyon, kitte belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Kitte yer alan Reaksiyon A ve Reaksiyon B solüsyonları farklı oranlarda karıştırılarak, 25 µl besiyeri ve 200 µl solüsyon olacak şekilde 37ºC 'de 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiş, takiben mikroplaka okuyucu kullanılarak 562 nm'de okunmuştur.

2.21.4. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Toksisite Analizi

Doku iskelelerinin kültürü sırasında toksisiteyi araştırmak için LDH (Laktat Dehidrogenaz) toksisite testi uygulanmıştır. Kitteki protokole göre hazırlanan solüsyon, doku iskelelerindeki toksisiteyi ölçmek için her doku iskelesinin kendi besiyerine uygulanmıştır. Her doku iskelesine 50 µl reaksiyon karışımı ve 50 µl besiyeri pipetlenmiş, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş, 560ex/ 590em nm'de okunmuştur.

2.21.5. Histolojik Analiz

Deney gruplarındaki tüm doku iskelelerinde ışık mikroskobisi incelemeleri için sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

- Dokular %4'lük paraformaldehit içerisine alınarak bir gece 4ºC'de fikse edilmiş,
- Her bir deney grubundaki doku iskeleleri yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş,
- Dokular 2 kere 5 dakika ksilende tutularak şeffaflaştırılmış,
- 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklanmış,
- Parafin bloklardan yaklaşık 4 μm kalınlığında kesitler alınmıştır.

Morfolojik değerlendirme ve histopatolojik analiz yapabilmek için Hematoksilen ve Eosin (H&E) ve Masson Trikom boyası ile boyanarak dokular ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.21.5.1. Hematoksilen Eosin Boyaması

Deney gruplarındaki tüm doku iskelelerinin kesiti parafinden arındırmak için 30 dakika ksilende bekletilmiştir. Hidrasyon işlemi için azalan alkol serileri (%100, %96, %90, %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 10 dakika bekletilmiştir. Ardından artan alkol konsantrasyonunda (%70, %90, %96, %100) dehidre edilmiş ve ksilen içinde bekletilmiştir. Dokular uygun kapama maddesi ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.21.5.2. Masson Trikom Boyaması

Doku iskelelerimden parafini arındırmak için kesitler birincisi 30 dakika ve diğer ikisi 20 dakika süreyle üç farklı ksilen içinde tutulmuştur. Daha sonra rehidrasyon işlemi için %96'dan %70'e kadar alkol serisinden geçirilmiştir. Distile suda 5 dakika tutulduktan sonra kit protokolüne göre Masson trikrom boyama seti ile boyanmıştır. Doku iskeleleri distile su ve artan alkol serilerinden geçirilmiş ve en son %100 etanol içinde 1 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak ksilen ile muamele edildikten sonra uygun kapama ortamı ile kesitler kapatılmıştır.

2.21.6. İmmün Floresan Boyama

İmmün floresan yöntem immüngloblinlerin belirli boyalarla işaretlenerek incelenmesi üzerine yapılan bir görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemde antijene bağlanan birincil antikorlar ve floresan ışımayı sağlayan floresan boyalar esastır. Daha önce belirtildiği gibi kesit alınan doku iskeleleri, deparafinizasyon işlemi için sırasıyla; 10 dakika 60 ºC'de ksilende ve 10 dakika oda sıcaklığında ksilende bekletilmiştir. Ardından %96'lık alkolde 2 kere 10'ar dakika bekletilmiş ve en son distile su ile yıkanmıştır. Boyama işlemine geçerken kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletilip distile su ile yıkanmıştır. Dokudaki antijenlerin ortaya çıkması için kesitler, pH'ı 6,0'a ayarlanmış sitrat tamponunda önce 600 watt'ta 1 dakika, sonrasında 200 watt'ta mikrodalgada 20 dakika ısıtılmıştır. Ardından 3'er kez 5'er dakika'lık PBS tamponunda yıkanmışlardır. Boyaların birbirine karışmasını önlemek için Pap Pen ile etrafı çizilen dokular %2'lik sığır albümin serumu ve %0,2'lik Tween-20 solüsyonuna alınıp 30 dakika bekletilmiştir. Bundan sonraki aşamalarda kullanılacak primerler sırasıyla;

- Col1A(Santa Cruz) Mouse monoklonal 1:100
- Rb X Bonesialoprotein (Millipore) 1:100
- Osteocalcin rabbit poliklonal (Santa Cruz) 1:50

oranlarında hazırlanmıştır. Tüm primerler Pap Pen ile çevrelenmiş örneklerin üstünü kapatacak şekilde damlatılmış ve bir gece 4ºC'de inkübe edilmiştir. Boyama işlemi, devamında preparatların 3 kez PBS tamponu ile 5'er dakika yıkanması ardından sekonderlerin damlatılması ile devam etmiştir. Kullanılan sekonderler;

- FITC anti Mouse (Invitrogen) 1:200
- FITC anti Rabbit (Invitrogen) 1:200

olacak şekilde antibody dilüent ile sulandırılarak kullanılmıştır. Sekonderlerin damlatılmasının ardından 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tekrardan 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, DAPI çekirdek boyası ve lamel kullanılarak kapatılmış, ardından floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

2.22. Hücre Yüklü Doku İskelelerinde SEM Analizi

Hücre yüklü doku iskeleleri (14 ve 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırma gerçekleştirilen doku iskeleleri) liyofilizasyon işleminden önce Bölüm 2.18'de

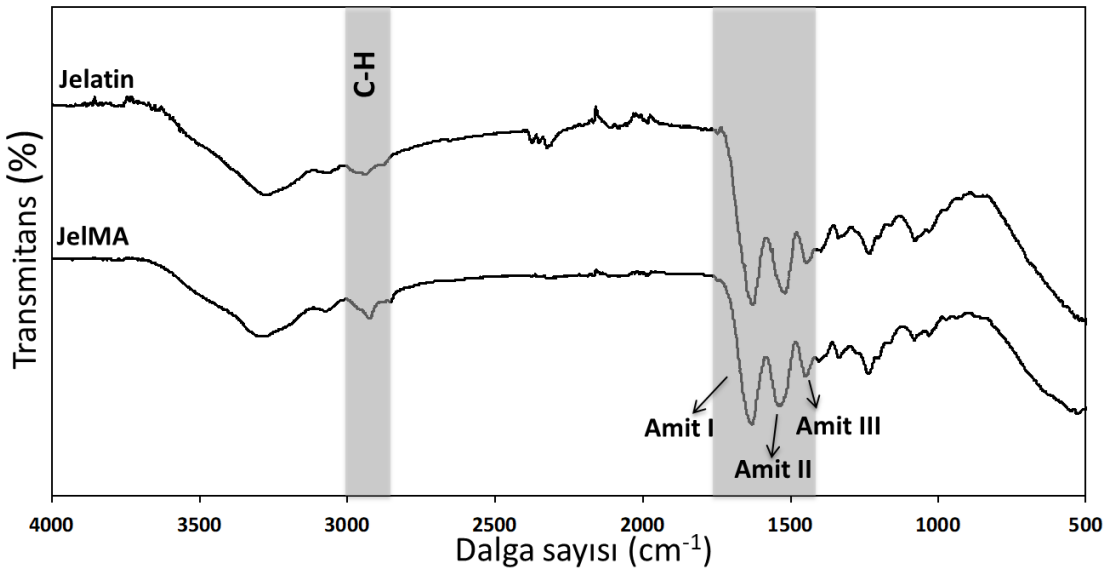
anlatıldığı gibi hazırlanan %4'lük paraformaldehit içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca fikse edilmiştir. Takiben liyofilize edilerek kurutulmuştur.

SEM analizi öncesi numunelerin bir metalle kaplanması, iletken olmayan SEM numunelerini iletken hale getirir. Bu sebeple doku iskeleleri görüntüleme öncesi altın ve paladyum ile kaplanmıştır. Her bir doku iskelesi için farklı bölgelerden ve farklı büyütmelerde elektron mikroskubu ile görüntülenmiştir.

3. BULGULAR

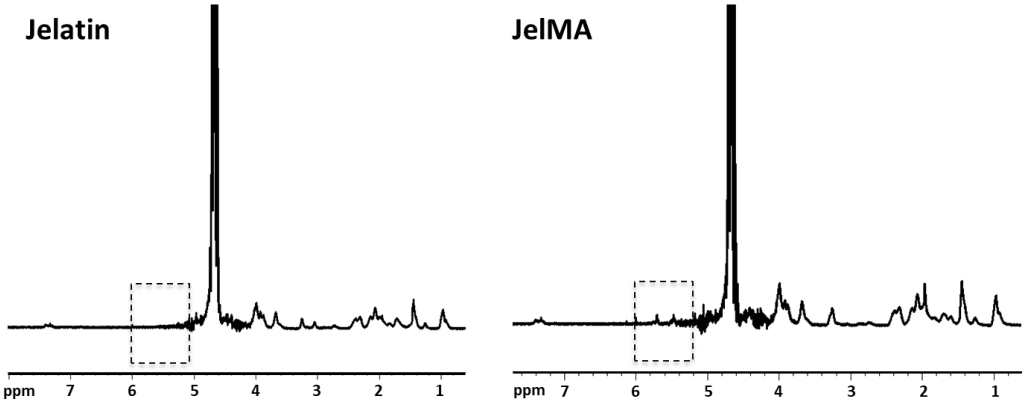
3.1. JelMA Polimerinin Karakterizayonu

Bölüm 2.6'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen JelMA polimerinin FTIR analizi yine Bölüm 2.8'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen JelMA polimerinin FTIR spektrası Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1: Jelatin ve JelMA polimerlerinin FTIR sonuçları.

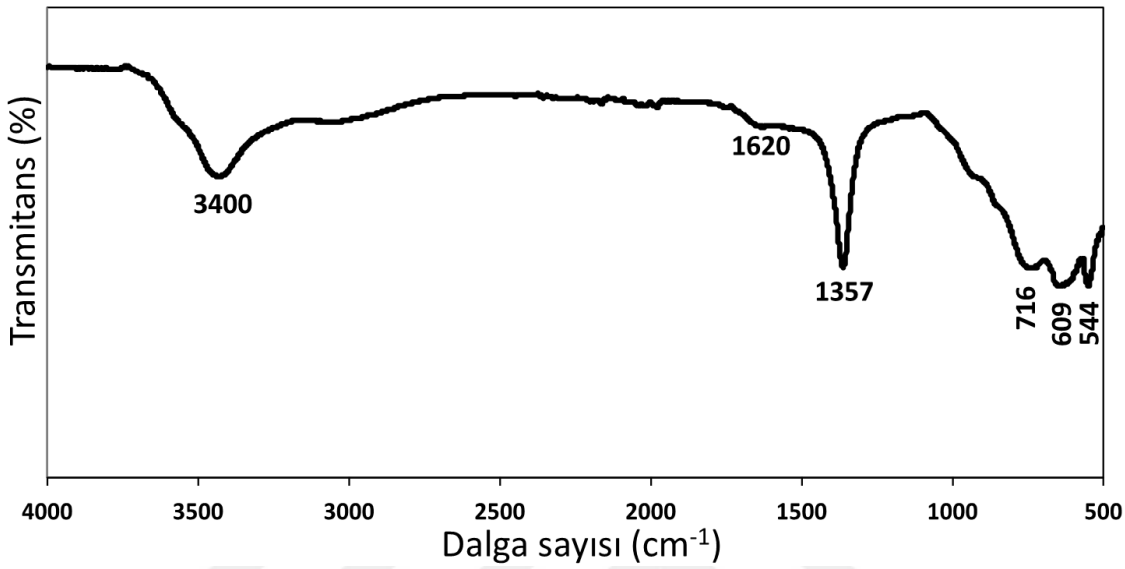
JelMA polimerinin ^{1}H NMR analizi Bölüm 2.8'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen JelMA polimerinin ^{1}H NMR sonuçları Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2: Jelatin ve JelMA polimerlerinin ^{1}H NMR sonuçları.

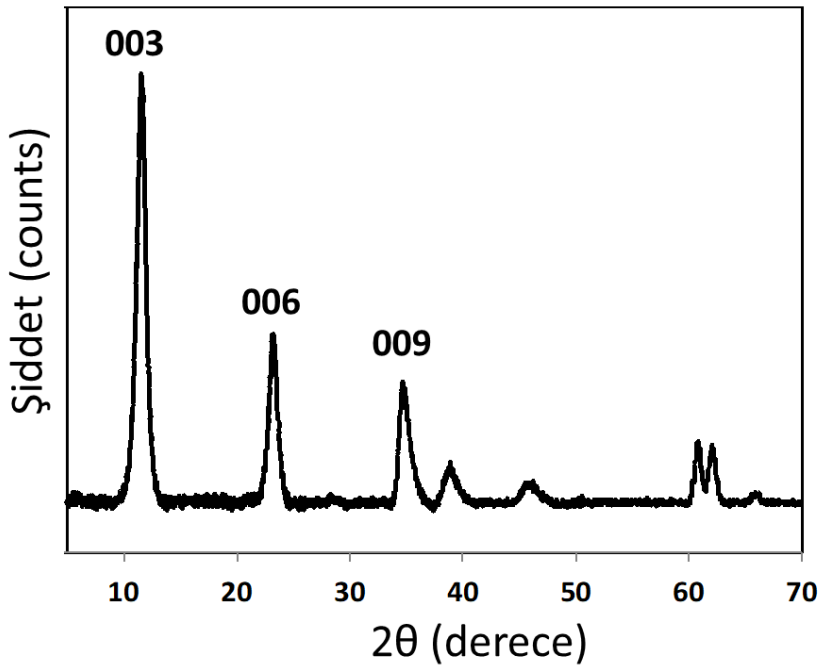
3.2. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Bölüm 2.7'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen LDH nanopartiküllerinin FTIR analizi Bölüm 2.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen LDH nanopartiküllerinin FTIR spektrası Şekil 3.3'de görülmektedir.



Şekil 3.3: LDH nanopartiküllerinin FTIR sonuçları.

LDH partiküllerinin XRD analizi Bölüm 2.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen LDH partiküllerinin XRD analizi sonuçları Şekil 2.9'da görülmektedir.



Şekil 3.4: LDH nanopartiküllerinin XRD analizi sonuçları.

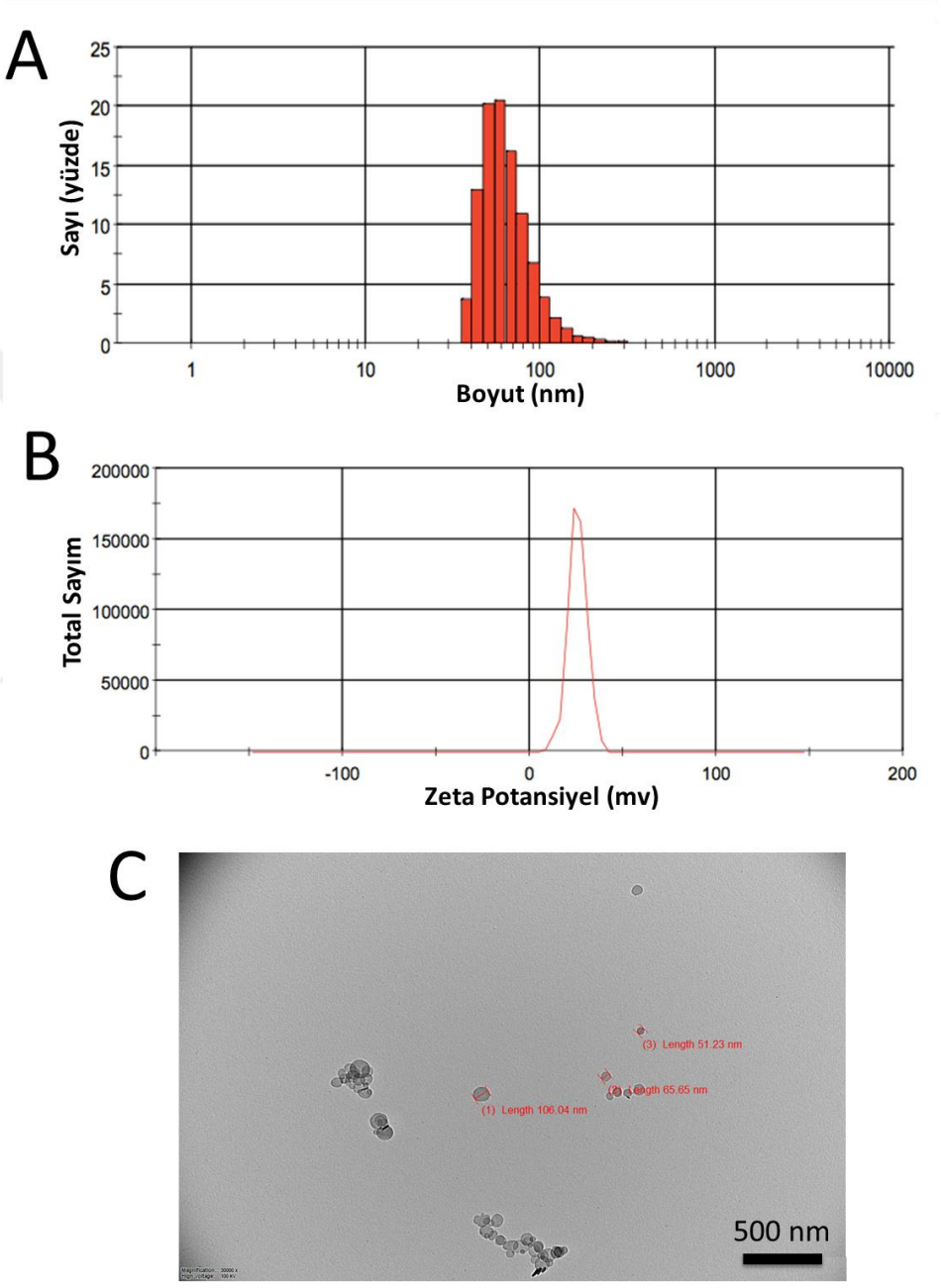
LDH partiküllerinin ICP-MS analizi Bölüm 2.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen LDH partiküllerinin ICP-MS analizi sonuçları Tablo 3.1'de görülmektedir.

Tablo 3.1: Sentezlenen LDH nanopartiküllerinin ICP-MS analiz sonucu.

LDH	Mg^{2+} (%kütlece)	Al^{3+} (%kütlece)	Mg^{2+}/Al^{3+} (mol oranı)*	Mg^{2+}/Al^{3+} (mol oranı)**
Mg/Al 2:1	20,85	10,43	2,22	2

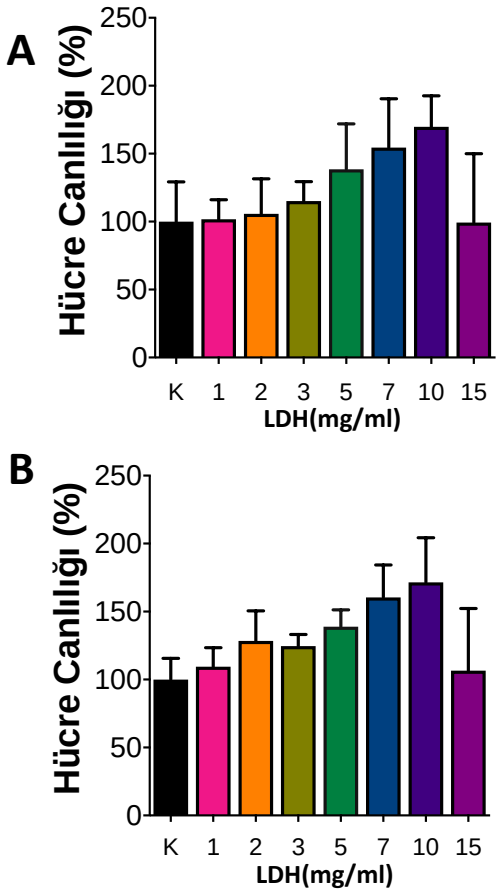
*ICP-MS sonuçlarına göre hesaplandı.
**Teorik oran

LDH partiküllerinin partikül boyu, zeta potansiyeli ve TEM Bölüm 2.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen LDH partiküllerinin partikül boyu, zeta potansiyeli ve TEM analizleri sonuçları Şekil 3.5'de görülmektedir.



Şekil 3.5: LDH nanopartiküllerinin partikül boyu analiz sonuçları (A), zeta potansiyeli sonuçları (B) ve TEM görüntüleri (C).

Bölüm 2.6'da ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen LDH nanopartiküllerinin MTT analizi Bölüm 2.17'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen LDH nanopartiküllerinin MTT analizi sonuçları Şekil 3.6 ve Tablo 3.2'de 'de görülmektedir.



Şekil 3.6: LDH nanopartiküllerinin MTT sonuçları: (A) 24 saat ve (B) 48 saat inkübasyon süresi.

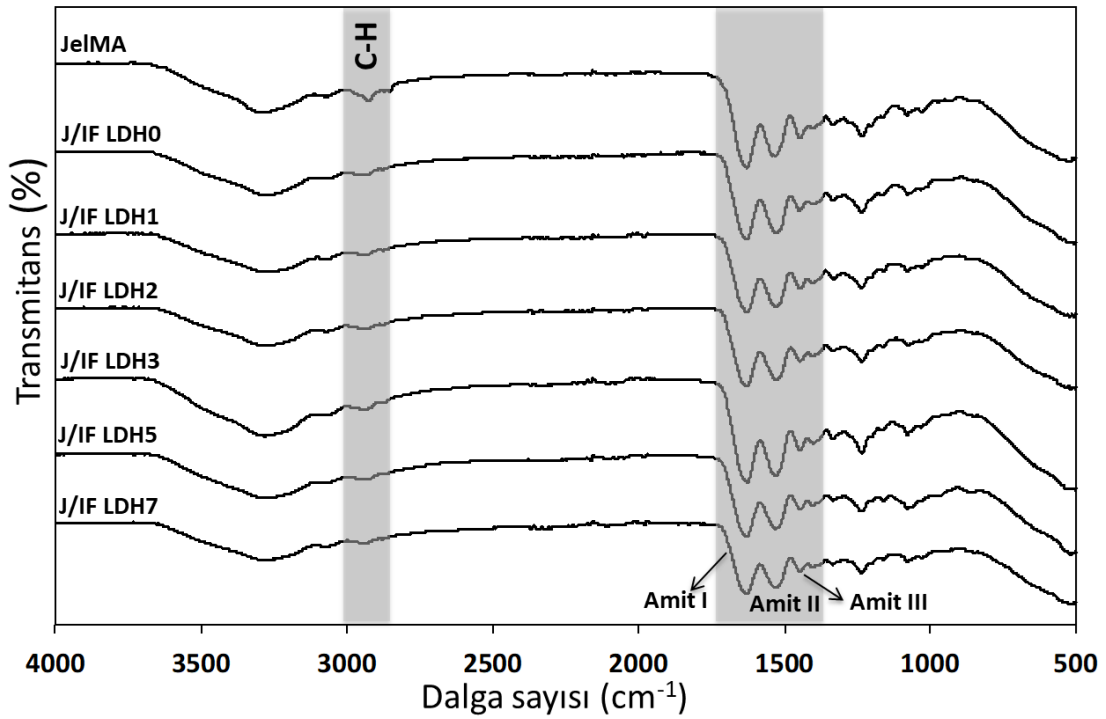
Tablo 3.2: Mg-AI LDH nanopartiküllerinin 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrası %hücre canlılığı sonuçları.

Mg-AI LDH Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı (%)	48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı (%)
Kontrol	100,00 ± 17,94	100,00 ± 15,52
1	101,70 ± 9,44	109,38 ± 14,05
2	105,75 ± 18,66	123,17 ± 20,02
3	115,20 ± 15,74	124,58 ± 8,48
5	138,51 ± 24,37	139,00 ± 12,32
7	154,56 ± 35,86	160,47 ± 23,85
10	169,76 ± 22,78	171,56 ± 32,78
15	99,32 ± 35,83	113,20 ± 55,43

3.3. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

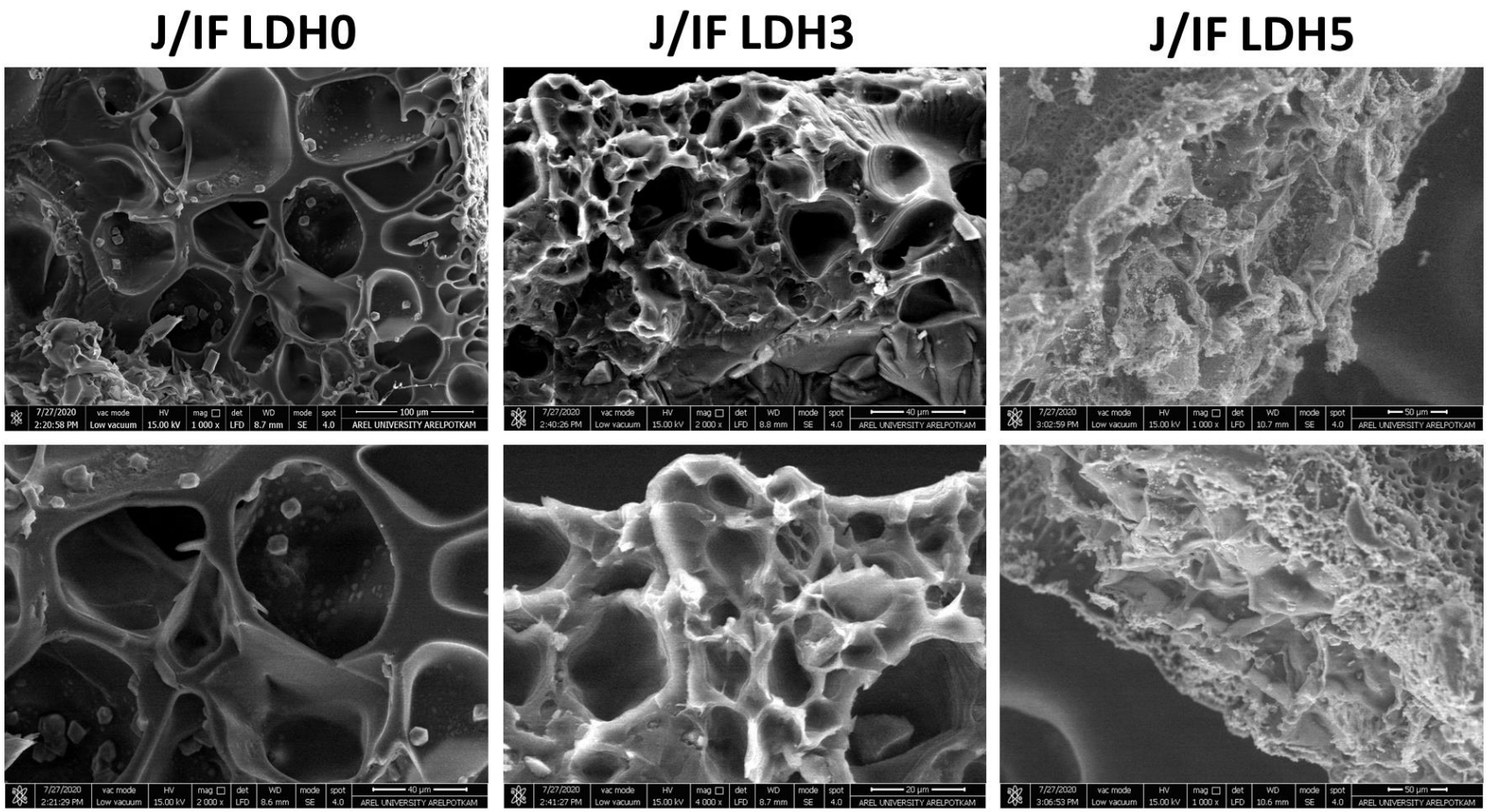
3.3.1. Doku İskelelerinin Yapısal Karakterizasyon Sonuçları

Bölüm 2.11'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin FTIR analizi Bölüm 2.12'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin FTIR spektrası Şekil .3.7'de görülmektedir.



Şekil 3.7: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin FTIR sonuçları.

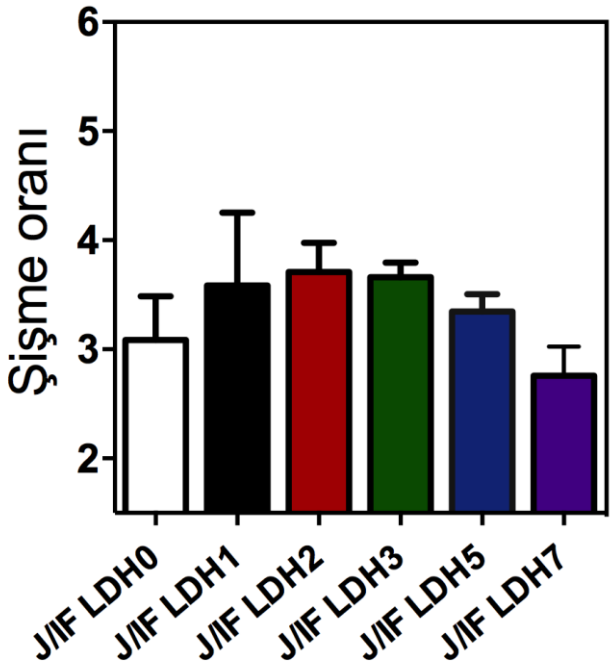
JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM analizi bir önceki bölümde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 3.8'de görülmektedir.



Şekil 3.8: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM sonuçları

3.3.2. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesi Sonuçları

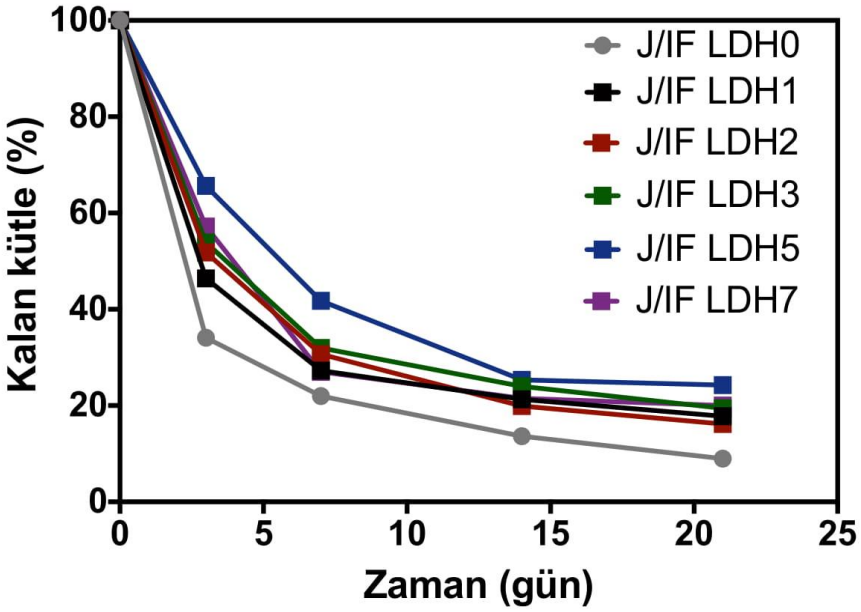
JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin su tutma kapasitesi çalışmaları Bölüm 2.13'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin şişme oranı sonuçları Şekil 3.9'da görülmektedir.



Şekil 3.9: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin şişme oranı sonuçları.

3.3.3. Doku İskelelerinin Degredasyon Hızı Sonuçları

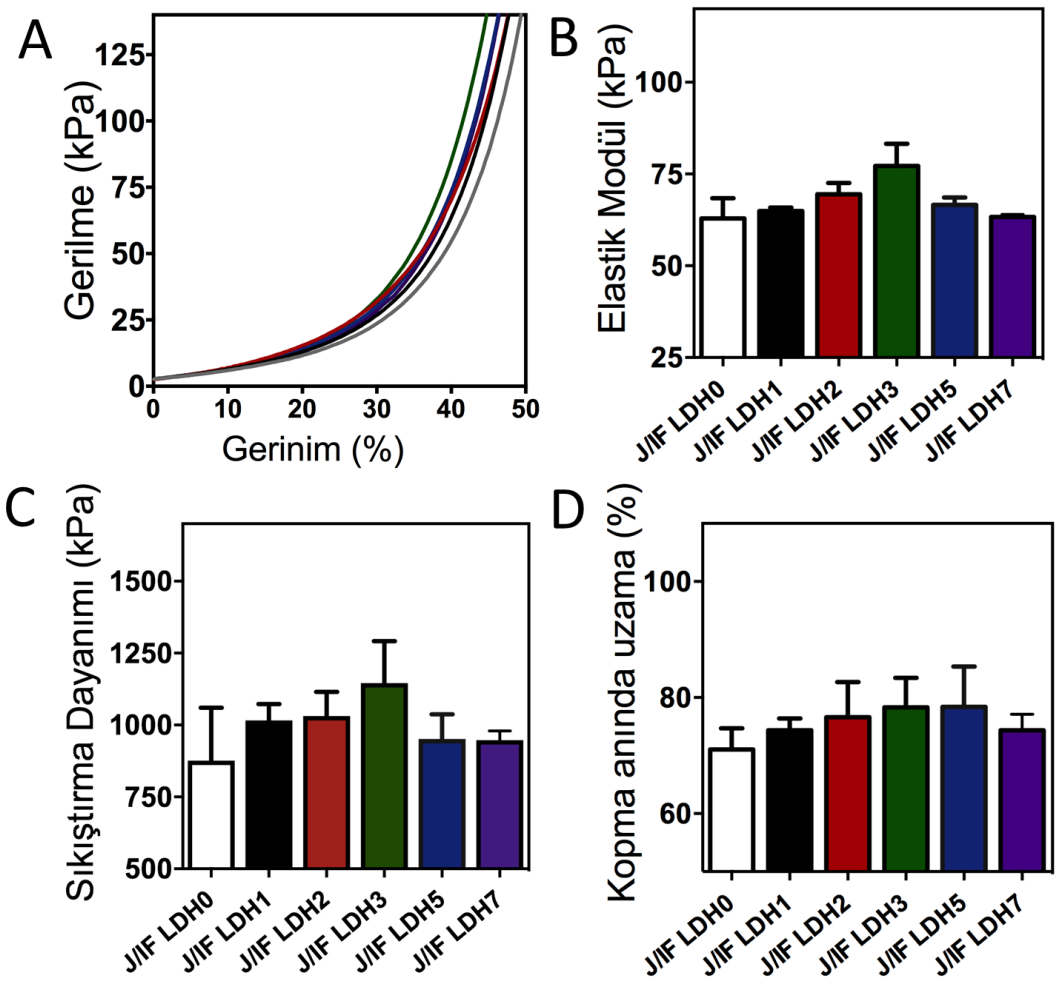
JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin degredasyon çalışmaları Bölüm 2.14'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin degredasyon hızları Şekil 3.10'da görülmektedir.



Şekil 3.10: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin PBS ortamında degredasyon hızı sonuçları.

3.3.4. Doku İskelelerinin Mekaniksel Dayanım Sonuçları

JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin mekaniksel dayanım analizleri Bölüm 2.15'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin mekaniksel dayanım sonuçları Şekil 3.11'de görülmektedir.

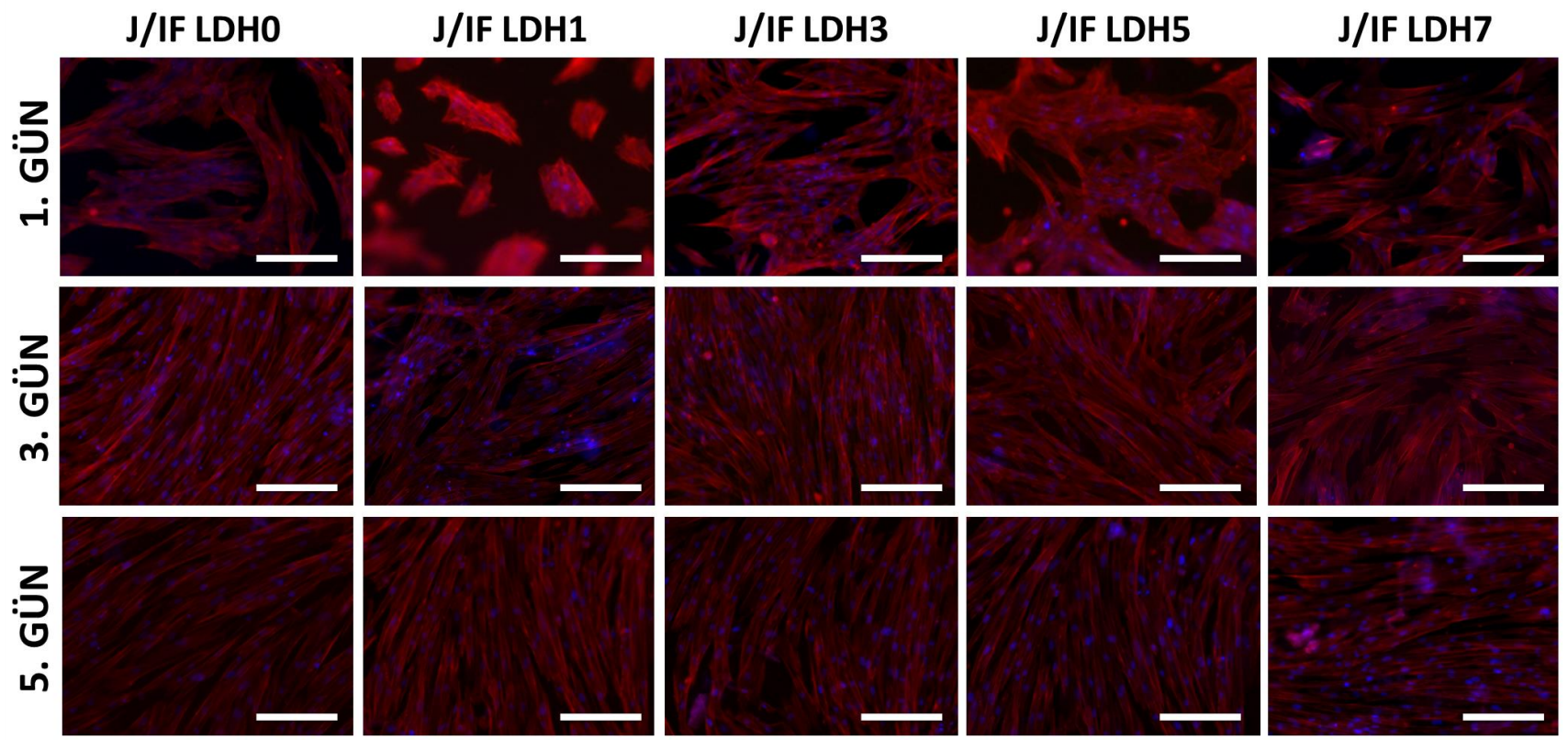


Şekil 3.11: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin mekaniksel dayanım sonuçları: fiziksel ve mekaniksel özellikleri: (A) gerilme-genirim eğrileri, (B) elastik modülleri, (C) sıkıştırma dayanımları ve (D) kopma anında uzama değerleri.

3.3.5. *In vitro* Hücre Kültürü Sonuçları

3.3.5.1. Hücre Adezyonu Sonuçları

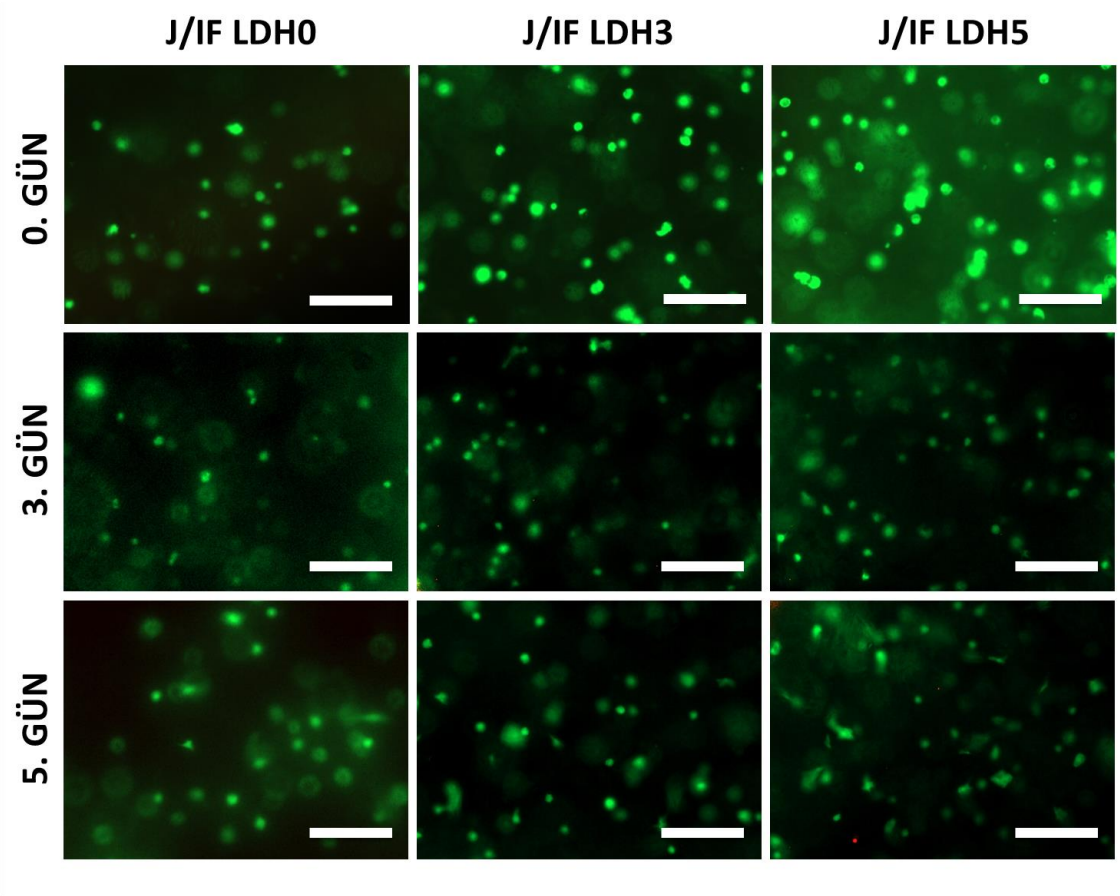
JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin *in vitro* adezyon çalışmaları Bölüm 2.18'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Rhodamine-Phalloidin ve DAPI ile bölüm 2.18'de detaylıca açıklandığı şekilde boyanmış, floresan mikroskobu ile hücreler görüntülenmiştir. Şekil 3.12'de hücrelerin doku iskelelerinin üzerine ekilmesinden sonraki 1., 3. ve 5. gündeki görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.12: JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin hücre adezyonu sonuçları (ölçek çubuğu = 100 µm)

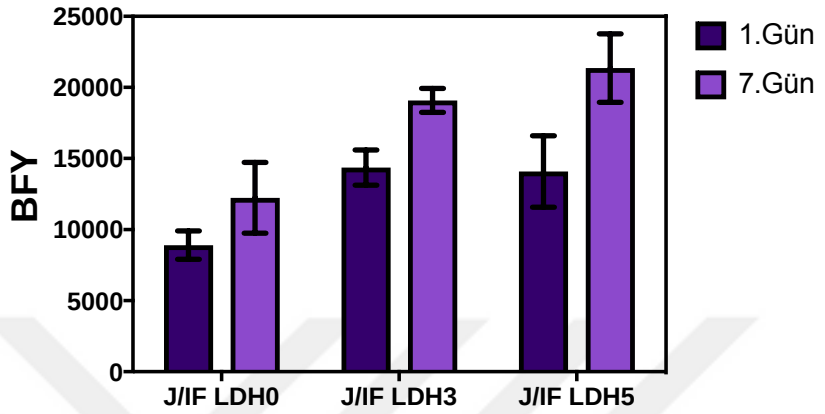
3.3.5.2. Hücre Enkapsülasyonu Sonuçları

Hücre-yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskeleleri bölüm 2.19'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Doku iskelelerine enkapsüle edilen hücrelerin canlılığı Live/Dead analizi ile bölüm 2.19'da detaylıca açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine enkapsüle edilen hücrelerin hücre canlılığı sonuçları Şekil 3.13'de görülmektedir.



Şekil 3.13: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 3 ve 5 gün inkübasyon süreleri sonrası canlılık analizi sonuçları. Yeşil noktalar canlı hücreleri, kırmızı noktalar ölü hücreleri göstermektedir (ölçek çubuğu =100 µm).

JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine enkapsüle edilen hücrelerin proliferasyon hızları PrestoBlue analizi ile bölüm 2.20'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. PrestoBlue sonuçları Şekil 3.14 ve Tablo 3.3'de görülmektedir.

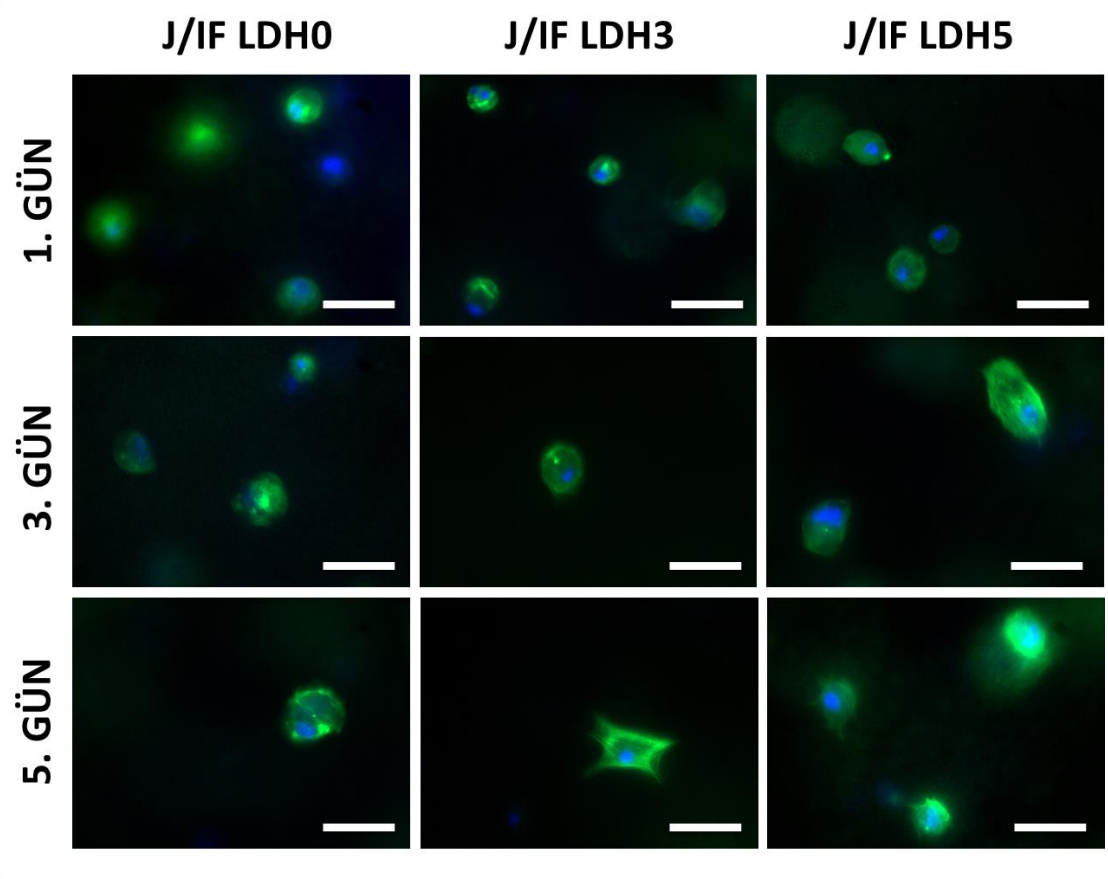


Şekil 3.14: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1 ve 7 gün sonra PrestoBlue testi kullanılarak metabolik aktivite sonuçları (proliferasyon hızı) (BFY: Bağıl floresan yoğunluk).

Tablo 3.3: Doku iskelelerinin PrestoBlue analizi sonuçları (BFY: Bağıl floresan yoğunluk).

J/IF/LDH Doku İskeleleri	1.Gün (BFY)	7.Gün (BFY)
J/IF LDH0	8911,37 ± 996,32	12236,86 ± 2491,61
J/IF LDH3	14361,50 ± 1236,80	19086,17 ± 834,52
J/IF LDH5	14082,78 ± 2512,27	21358,94 ± 2415,02

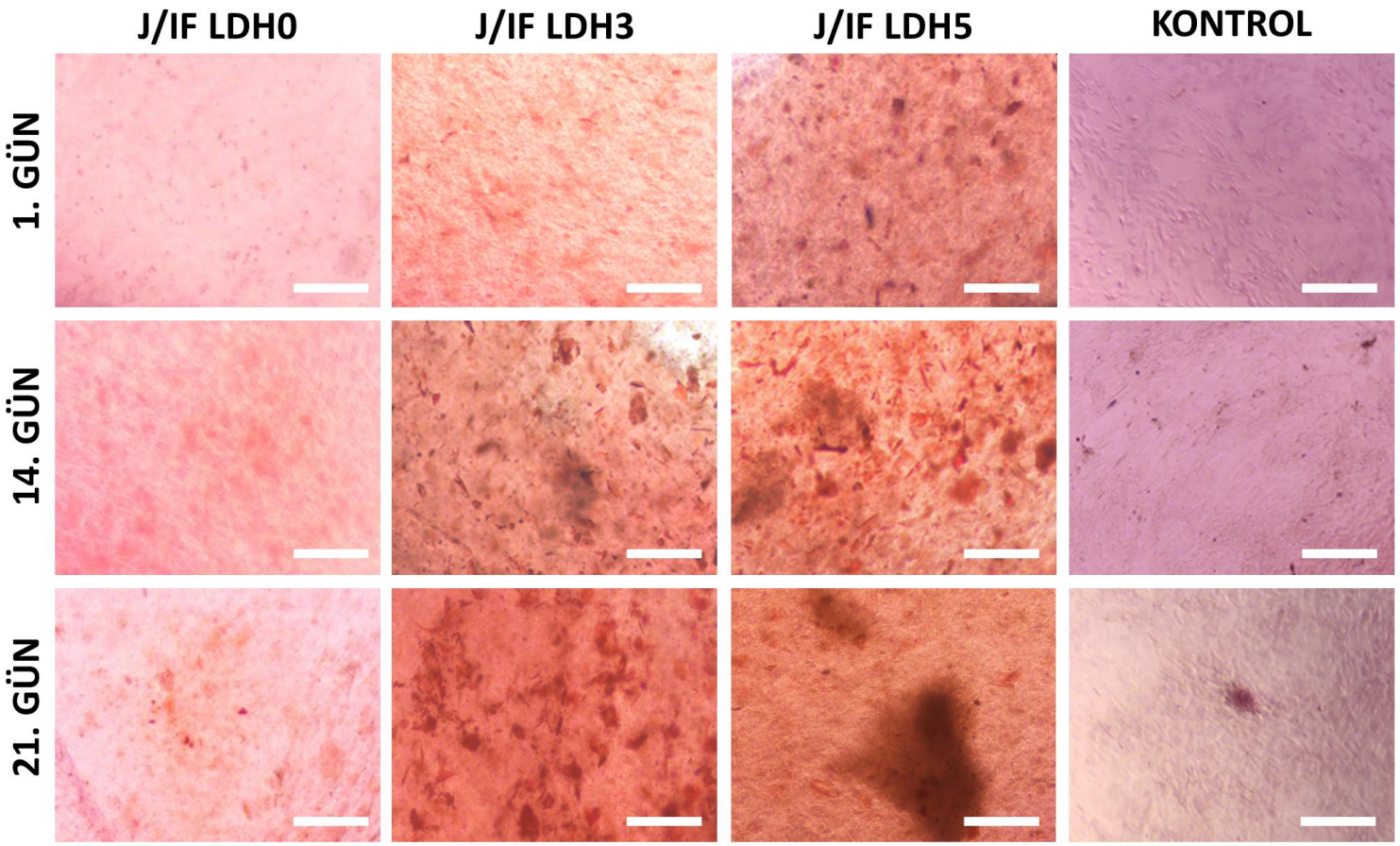
Doku iskelelerinde enkapsüle edilen hücrelerin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Rhodamine-Phalloidin ve DAPI ile bölüm 2.18 'de detaylıca açıklandığı şekilde boyanmış, floresan mikroskobu ile hücreler görüntülenmiştir. Şekil 3.15'de hücre-yüklü doku iskelelerinin 1, 3 ve 5 gün inkübasyon sonrası elde edilen görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.15: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 3 ve 7 gün inkübasyon süreleri sonrası Rhodamine-Phalloidin/DAPI ile boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 25 µm).

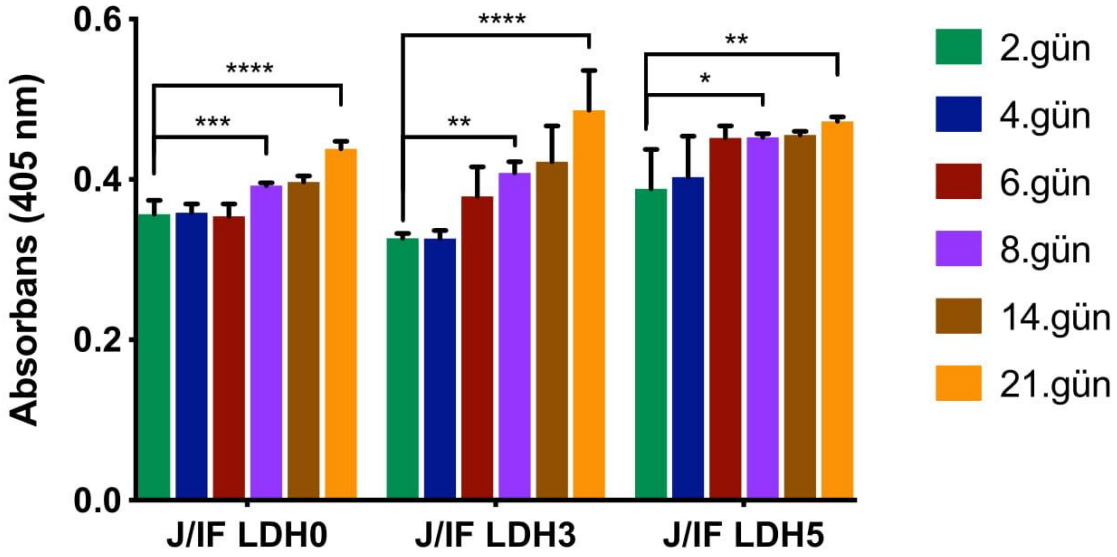
3.3.5.3. Hücre-Yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin osteojenik farklılaşma çalışmaları; osteojenik medyum ortamında 21 gün boyunca bölüm 2.21'de belirtildiği şekilde inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Kültürlenen doku iskeleleri osteojenik farklılaşma belirteçlerinden olan kalsiyum birikimi ve minerilizasyonun için Alizarin Red S ile bölüm 2.21.1'de belirtildiği şekilde boyanarak, ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Alizarin Red S boyama sonuçları Şekil 3.16'da görülmektedir.



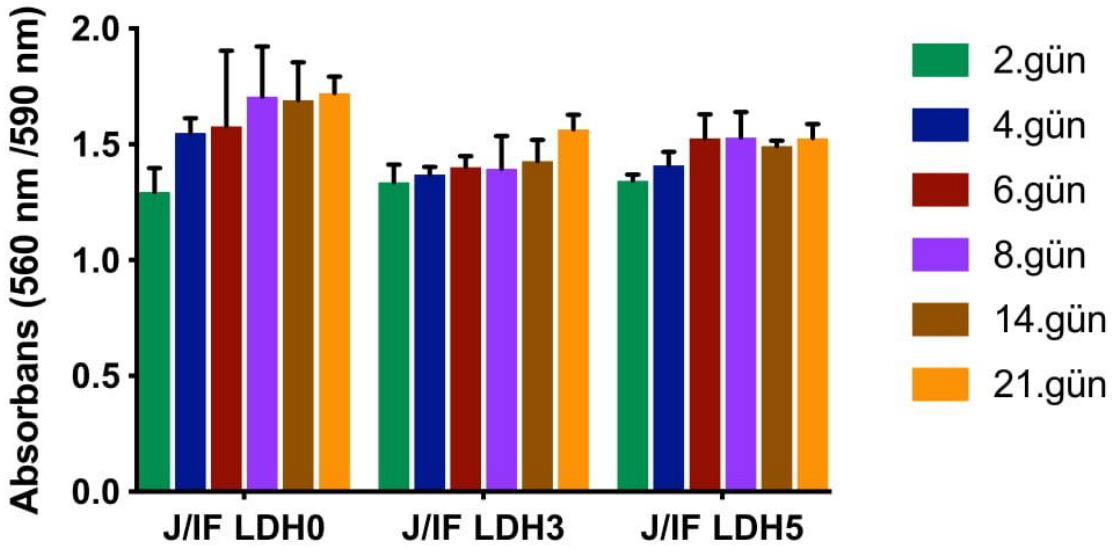
Şekil 3.16: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 1, 14 ve 21 gün inkübasyon süreleri sonrası Alizarin Red S boyama sonuçları ölçek çubuğu = 250 µm).

Alkalen fosfataz (ALP), kemikteki minerilizasyonun önemli bir göstergecidir. Biyominerilizasyonda, dolayısıyla osteojenik farklılaşmada rol oynamaktadır (Tamburacı ve ark., 2019). Bu sebeple kemikteki kalsiyum artışı ALP analizi ile tayin edilmektedir. Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin osteojenik farklılaşma çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen ALP analizi bölüm 2.21.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.17'de görülmektedir.



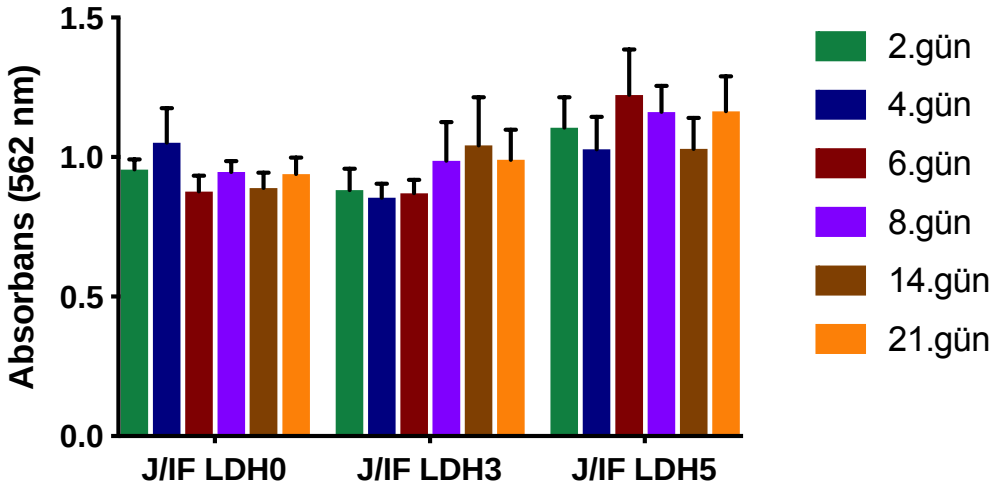
Şekil 3.17: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2-21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* ALP aktivitesi sonuçları (*p< 0,05).

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin LDH analizleri bölüm 2.21.4'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.18 'de görülmektedir.



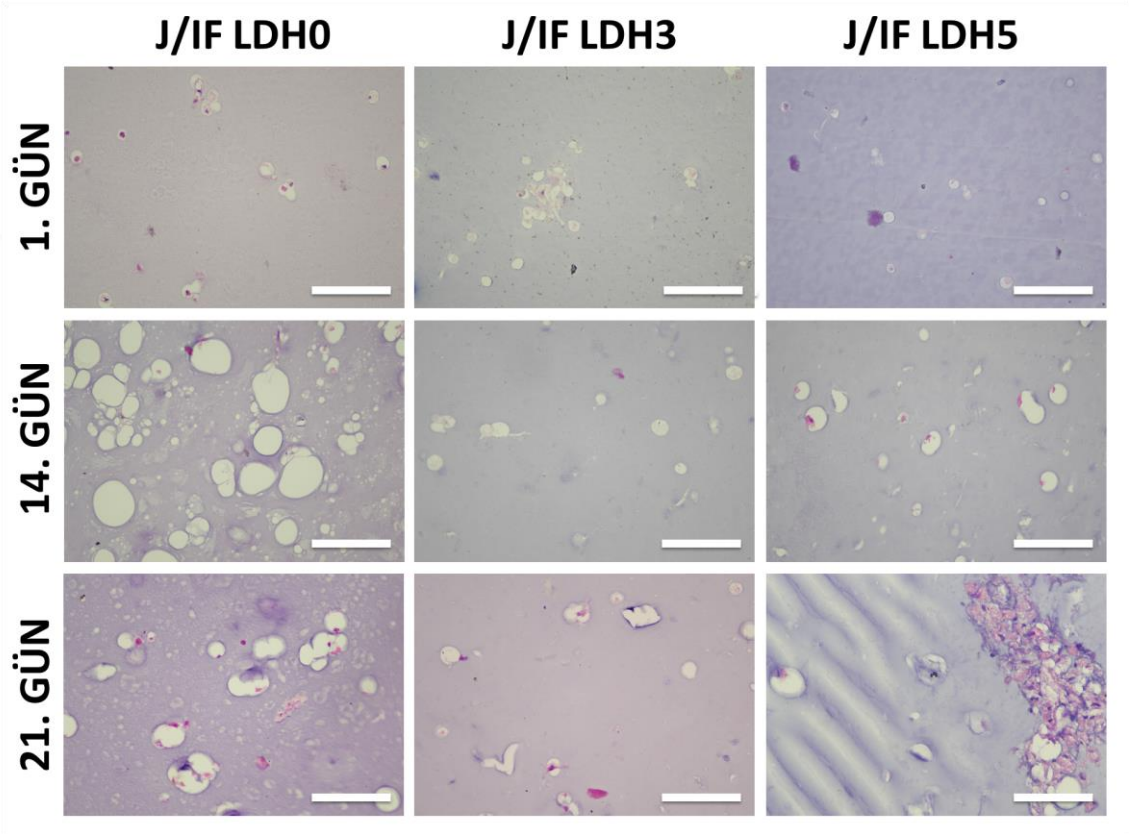
Şekil 3.18: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2- 21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* LDH aktivitesi sonuçları (*p< 0,05).

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin BCA analizleri bölüm 2.21.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.19 'da görülmektedir.



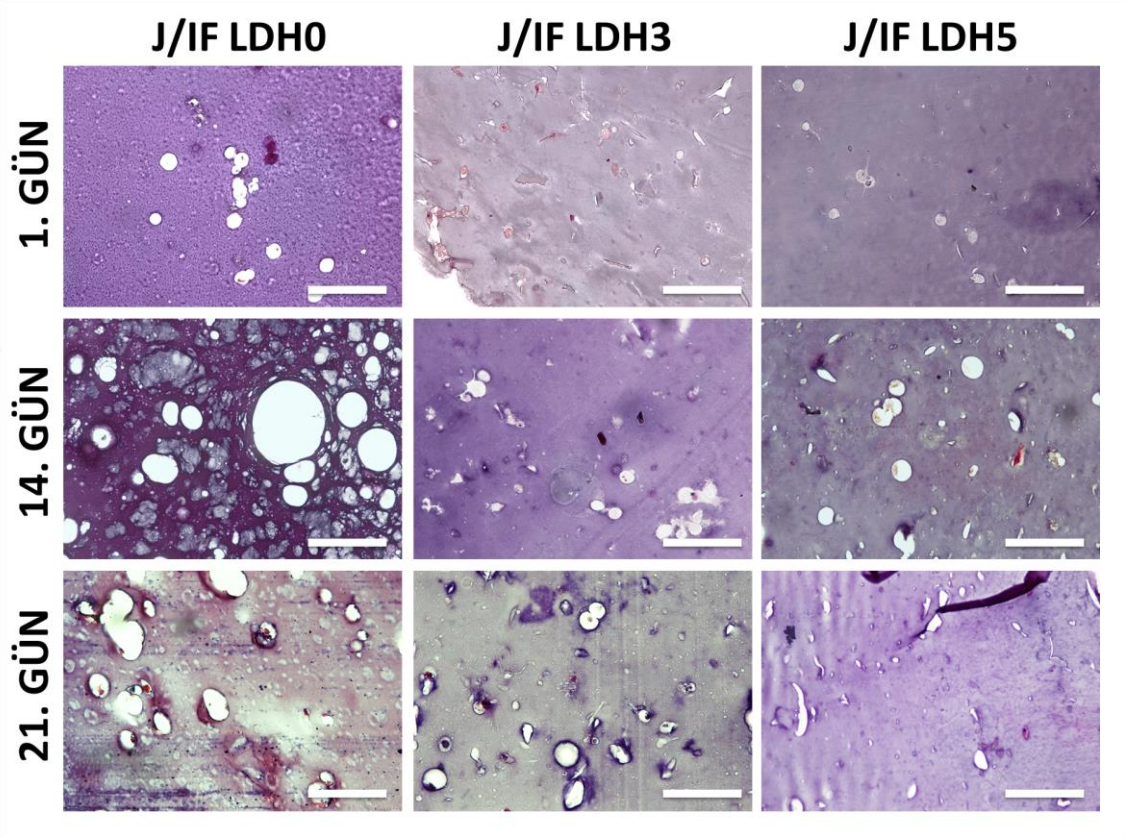
Şekil 3.19: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 2- 21 gün inkübasyon süreleri sonrası *in vitro* BCA aktivitesi sonuçları.

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin Hematoksilen Eosin boyamaları bölüm 2.21.5.1'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.20 'de görülmektedir.



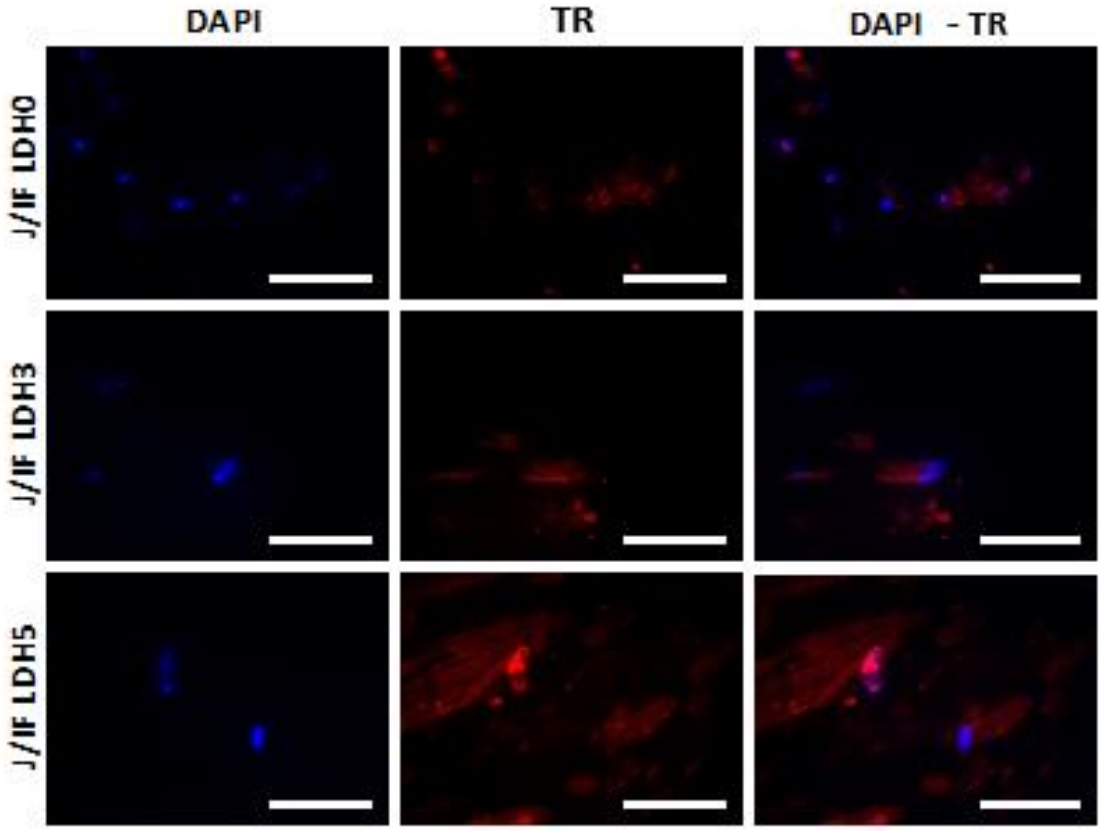
Şekil 3.20: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine ait Hematoksilen-Eozin boyama sonucu elde edilen görüntüler (ölçek çubuğu = 100 µm).

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin Massom-Trikrom boyamaları bölüm 2.21.5.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.21'de görülmektedir.

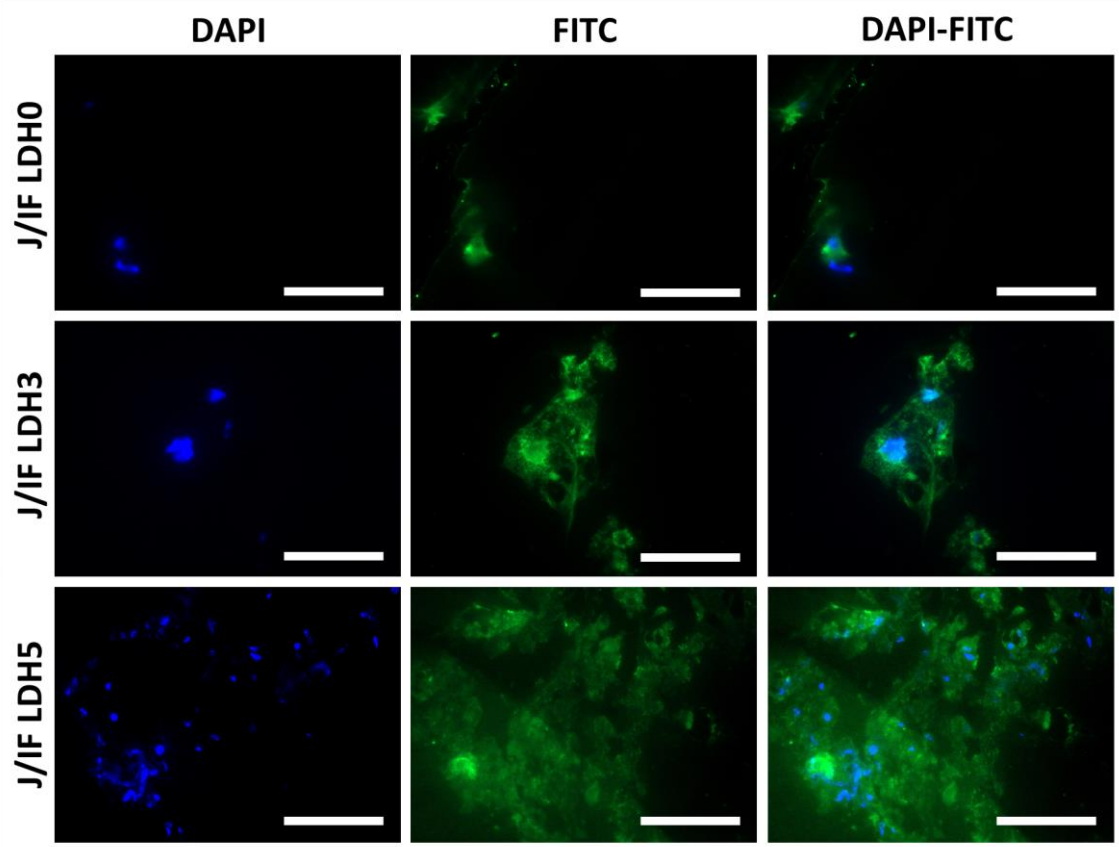


Şekil 3.21: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine ait Massom-Trikrom boyama sonucu elde edilen görüntüler (ölçek çubuğu = 100 µm).

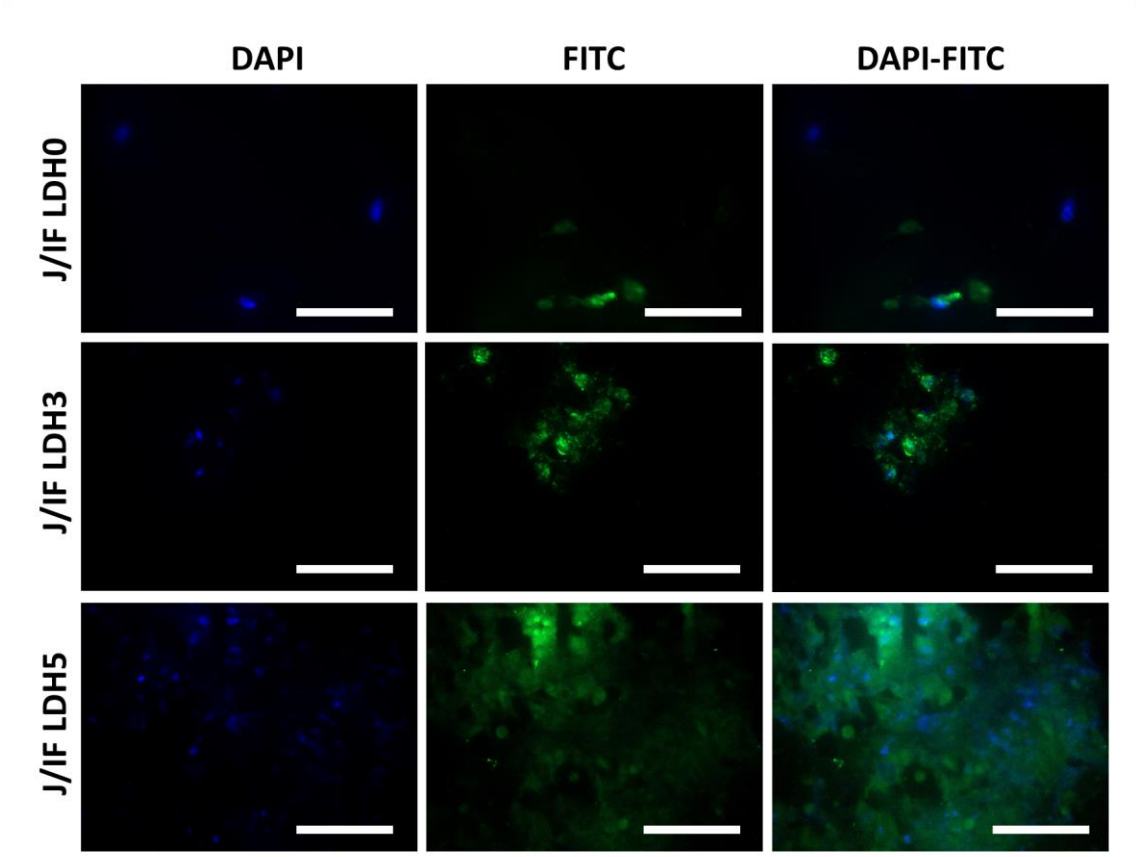
Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin İmmün Floresan boyamaları bölüm 2.21.6'da açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar Şekil 3.22 – 3.24 'de görülmektedir.



Şekil 3.22: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası Col1A immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 µm).



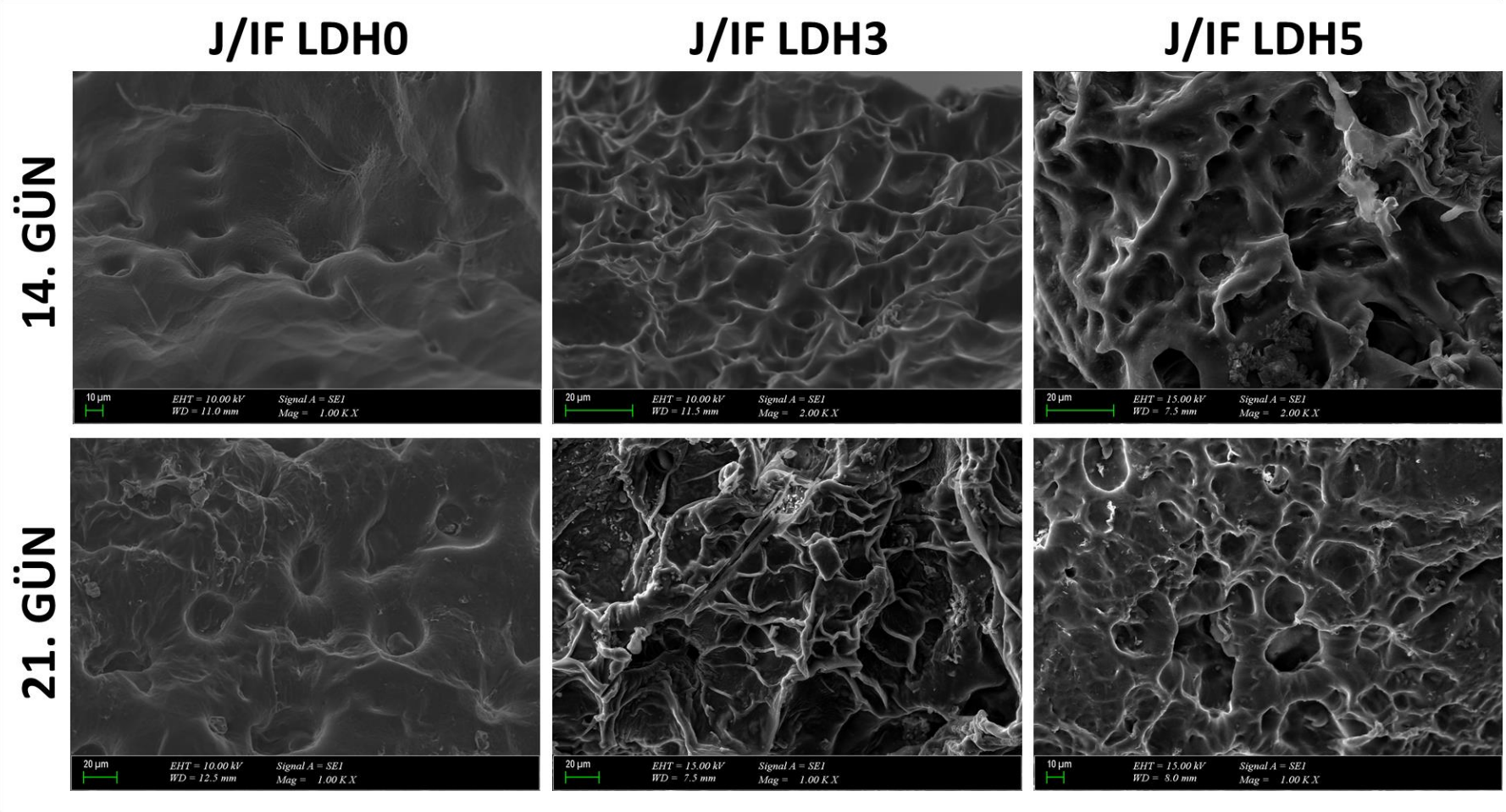
Şekil 3.23: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası Kemik Sialoprotein immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 µm).



Şekil 3.24: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası osteokalsin immün floresan boyama sonuçları (ölçek çubuğu = 50 µm)

3.3.5.4. Hücre-Yüklü Doku İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları

Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM analizi bölüm 2.22'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil .3.25'de görülmektedir.



Şekil 3.25: Hücre yüklü JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin 21 gün inkübasyon süresi sonrası SEM analizi sonuçları

4. TARTIŞMA

Kemik, farklı hiyerarşik seviyelerde kompozit bir yapıdadır. Vücut hareketi, iskeletin yük taşıma kapasitesi, iç organları koruma, endokrin uyaranlara cevap verme gibi çeşitli fiziksel ve metabolik işlevleri yerine getirme potansiyeline sahiptir. Doğal kemik yapısının ECM yapısı spesifik olarak, çoğunlukla mineralize olmayan organik kollajen-tip1 ve mineralize olan inorganik hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Bu kristaller doğal kemik yapısının sertliği ve gerekli basınç dayanımının ayrılmaz bir parçasıdır (Amini ve ark., 2012; Gong ve ark., 2015).

Kemik dokusu, çatlaklar, bazı hafif kırık türleri gibi hasar alanlarının iyileşmesi için yeterli rejeneratif yeteneğe sahip olsa da, kritik boyutları aşan kemik kusurları müdahale olmaksızın iyileşemez (Koons ve ark., 2020). Artan nüfus ile birlikte obezitede ve zayıf fiziksel aktivitedeki artış; kemik kırıkları, skolyoz, kemik kaybı, kemik enfeksiyonu ve tümörleri gibi birçok problemi de beraberinde getirmektedir. Dünya çapında her yıl 20 milyondan fazla insan, kemik dokusu kaybından etkilenmektedir. Bu sebeple oluşan sağlık harcamaları büyük bir ekonomik yükü beraberinde getirmektedir (Gong ve ark., 2015; Habibovic 2017; De Witte ve ark., 2018). Kemik dokusu onarımı için yaygın olarak kullanılan allogreft ve otogreft gibi yöntemler, enfeksiyon riski, donör bölgesinin morbiditesi ve donör reddi, konak dokularla kaynama oranının düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir (Liu ve ark., 2017). Bu sebepler dolayısıyla kemik doku mühendisliği, kusurlu bölgedeki kemik rejenerasyon sürecini bahsettiğimiz risklere maruz kalmadan iyileşmeyi kolaylaştıran, biyomalzemelere yönelik önemli gelişmelere sahiptir (Koons ve ark., 2020).

Kemik dokusu mühendisliğinin amacı, ECM'yi taklit eden ve buna mekanik destek sağlayarak yeni kemik oluşumuna yardımcı olan 3B iskeleler geliştirmektir. Biyomalzemelerle oluşturulan doku iskeleleri, hücrelerin desteklenmesini, hücre bölünme sürecini, hücreler arası iletişimi ve besinlerin verimli bir şekilde iletilmesi gibi faktörleri etkileyebilir. Bu sebeple doku iskelesi için kullanılan malzemeler önem taşımaktadır (De Witte ve ark., 2018; Eivazzadeh-Keihan ve ark., 2020).

Geleneksel doku iskelelerinde metaller, seramikler ve polimer yapıları kullanılmaktadır (De Witte ve ark., 2020). Fakat bu yapılar birtakım avantajlara sahip olsalar da doğal kemik dokusunu taklit etmekte ve hücre organizasyonunu sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Kemik dokusu için biyolojik olarak parçalanabilir, toksik olmayan, biyouyumlu malzemeler kullanılmalıdır. Aynı zamanda bu malzemeler iyileşme gerçekleştikçe zamanla hücrelerin yerleşmesine izin vermeli ve onlara destek sağlamalıdır. Yeni doku oluşumu için hücrelerin biyouyumlu biyomateryallerden uygun şekilde tasarlanmış iskeleler üzerinde ekilmeli ve kemik iskeleleri optimal olarak hem osteokondüktif hem de osteoindüktif özelliklere sahip olmalıdır. Yani, yapı iskelelerinin mezenkimal hücreler, osteoblastlar ve osteoklastlar gibi osteo indüklenebilir hücresel elemanların içe doğru göçünü sağlaması ve hücrelerin farklı soylardan osteojenik hücrelere farklılaşmasının indüklenmesi anlamına gelir. Sonuç olarak kemiğin doğal iyileşme süreci ve doku mühendisliği ilerlemelerine rağmen hala kemik hasarını iyileştirilmesi için geliştirmelere ihtiyaç vardır (De Witte ve ark., 2018; Ghassemi ve ark., 2018).

Tez çalışması kapsamında seçilen *Bombyx mori* kozalarından elde edilen ipek fibroin, insan vücudunda dikiş malzemesi olarak uygulama geçmişine sahip olmakla birlikte, yüksek mekanik özellikleri, ayırt edici biyouyumluluğu ve iyi hipoimmünitesi nedeniyle biyomalzemeler için doğal bir proteindir (Shi ve ark., 2017). Ek olarak, kemik doku mühendisliğinde iyileştirici etkisi, mukavemeti ve gözenek boyutları üzerindeki iyi kontrol etkisi sebebiyle dikkat çekmektedir (Park ve ark., 2010; Meniel ve ark.,2015). Kemik yenilenmesinde etkili olsa da, tek başına yeterli mekaniksel dayanımı sağlayamamaktadır.

Jelatin, kemik dokudaki ECM'nin temel bileşeni olan kollajenin hidrolize edilmiş halidir. Hücre bağlanmasını destekler ve hücrelerin yeniden modellenmesi için uygundur. Kolajen ile karşılaştırıldığında jelatin daha iyi çözünürlüğe ve düşük sıcaklıkta benzersiz jelleşme özelliğine sahiptir. Jelatinin metakrilatlanması, bir foto başlatıcı varlığında jele çapraz bağlanma özelliği kazandırır. Bu da hidrojel oluşturma sürecinde zamansal ve yapısal kontrole izin verirken jelin istenilen ölçülerde ve desenlerde oluşturulmasına da desteklemektedir (Gorgieva ve Kokol, 2011; Pina ve ark., 2015; Yue ve ark., 2015; Shi ve ark., 2017). Tüm bunlar göz önüne alınarak

biyouyumlulukları ve kemik doku oluşumunu indükleyici özelliği sebebiyle iç içe geçen JelMA ve ipek fibroin hidrojeli doku iskelesi olarak seçilmiştir.

LDH nanopartikülü, uzun yıllardır gen ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan inorganik bir yapıdır ve aynı zamanda çok iyi antimikrobiyal özelliğe sahiptir (Fayyazbakhsh ve ark., 2017b). Yapısında -OH bakımından zengin iyonik gruplar ve doğal pozitif yükler, moleküller ve nanomalzemeler ile etkileşimler yoluyla 3B nanohibrit yapıların oluşmasını sağlar (Gu ve Xu 2015). LDH partiküllerinden salgılanan Mg^{+2} iyonları osteojenik hücrelerin integrin ekspresyonunu yukarı regüle eder. Aynı zamanda bu iyonlar kök hücrelerdeki ALP aktivitesini arttırma etkisine sahiptir. Al ise cerrahide kullanılan kemik implantları için dolgu malzemesi olarak mükemmel bir potansiyele sahiptir (Dallari ve ark., 2012; Chen ve ark., 2017; Kang ve ark., 2017).

Tüm bu araştırmalar göz önüne alınarak yapılan literatür taramaları sonucunda, tez çalışması kapsamında doğal kemik yapısını taklit edecek LDH nanopartikülleri ve JelMA ile ipek fibroin kullanılarak bir nanokompozit hidrojel yapı oluşturulmasına karar verilmiştir. Bu tezle sunulan çalışmada ilk defa LDH nanopartikül içeren ipek fibroin/JelMA doku iskelelerinin sentezi, karakterizasyonu, *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile kök hücrelerde osteojenik farklılaşmayı indüklemesi, bununla birlikle ALP aktivitesinde artış ve osteokalsin (OCN), COL1A ve kemik sialoprotein (BSP) gibi proteinlerin gösterilmesi hedeflenmiştir. Hazırlanan doku iskelesi osteojenik ve kondrojenik dokular gibi birçok dokuya farklılaşma yeteneğine sahip göbek kordonundan elde edilen WJMKH hücreleri ile desteklenmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlar ayrıntılı bir şekilde tartışılarak aşağıda sunulmuştur.

4.1. JelMA Polimerinin Karakterizayon Sonuçları

4.1.1. FTIR Analizi Sonuçları

JelMA, jelatinin metakrilik anhidrit ile modifikasyonu sonucu sentezlenen bir biyopolimerdir. Proteinler, amid bağları ile birbirine bağlanan amino asitlerden

meydana gelmektedir. Polipeptitler ve proteinler, amid I, II ve benzeri olarak bilinen tekrar eden birimlere sahiptir. JelMA'nın amid bantları, peptid bağının farklı titreşimsel durumlarını göstermektedir. Jelatinin metakrilik anhidrit ile modifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen JelMA polimerine ait FTIR spektrası Şekil 3.1 ’de verilmiştir. JelMA ‘nın 1625 cm^{-1} (amid I), 1522 cm^{-1} (amid II), ve 1440 cm^{-1} (amid III), 'de görülen pikleri sırasıyla –C=O bağının gerilme titreşimi, N-H bağının eğilme titreşimi ve C-N ve N-H bağlarının düzlem-içi eğilme titreşiminden kaynaklanmaktadır (Mamaghani ve ark., 2018). Görüldüğü üzere metakrilasyon sonrası amit piklerinin şiddetlerinde artış görülmüştür. Bu sonuçlar metakrilasyon reaksiyonun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Ek olarak, 3260 cm^{-1} ve 2915 cm^{-1} bölgelerinde görülen pikler sırasıyla O-H ve C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Usal ve ark., 2019).

4.1.2. ^{1}H NMR Analizi Sonuçları

Jelatinin, metakrilik anhidrit ile modifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen JelMA polimerine ait ^{1}H NMR sonuçları Şekil 3.2 ’de verilmiştir. 5,4 ppm ve 5,7 ppm'de gözlemlenen pikler jelatine konjüge edilmiş metakrilat gruplarının alkenil çift-bağını göstermektedir (Usal ve ark., 2019; Wang ve ark., 2018; Choi ve ark., 2019). Doğal jelatin üzerinde ise çift bağ olmadığını doğrulayan 5,4 ppm ve 5,7 ppm değerlerinde herhangi bir pik yoktur. ^{1}H NMR analizi sonuçları, FTIR analizi sonuçları ile uyumlu olup JelMA polimerinin başarılı bir şekilde sentezlediğini göstermiştir.

4.2. LDH Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Sonuçları

4.2.1. FTIR Analizi Sonuçları

Şekil 3.3 ’de LDH partiküllerinin FTIR spektrumu görülmektedir. M-O ve O-M-O (M= Mg, AI) titreşim bantları 400-800 cm^{-1} arasında görünmektedir (Zhang ve ark., 2013). 1357 cm^{-1}'de görülen keskin absorpsiyon bandı ara katmanda yeterli miktarda nitrat iyonunun varlığını göstermektedir. 3900 cm^{-1} ile 2700 cm^{-1} arasında görülen geniş absorpsiyon bandı (maksimumu 3400 cm^{-1}) tabakalar arasında bulunan su ve hidroksil

gruplarının gerilme titreşimlerine aittir (Olfs vs., 2009; Nogueira ve ark., 2016). 1620 cm^{-1} de bulunan absorpsiyon bandı suyun eğilme deformasyonuna (bending deformation) aittir (Wang ve ark., 2007; Chubar ve ark., 2014).

4.2.2. XRD Analizi Sonuçları

LDH partiküllerinin elde edilen XRD paterni, Şekil 3.4 'de görülmektedir. 11,51°, 23,13°, 34,560° (2θ) 'de üç adet pikin varlığı, LDH partiküllerinin ara-tabaka aralıklarının d003 düzleminde (7,682 Å), d006 düzlemimde (3,842 Å) ve d009 düzleminde (2,593 Å) olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, LDH partiküllerinin tabakalı ve kristalin yapıya sahip olduğunu ve literatür ile uyumlu olarak başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir (Shafiei ve ark., 2016; Fayyazbakhsh ve ark., 2017a; Theiss ve ark., 2107).

4.2.3. ICP-MS Analizi Sonuçları

Mg-AI içerikli LDH'ların Mg^{2+}/Al^{3+} oranı, Mg^{2+} konsantrasyonunun ICP-MS ile belirlenen şekilde Al^{3+} konsantrasyonuna bölünmesi ile hesaplanmıştır (Theiss ve ark., 2016). LDH partiküllerinin analiz sonuçlarından beklenen teorik değerlere yakın olduğu görülmüştür (Tablo 3.1).

4.2.4. Partikül Boyu, Zeta Potansiyeli ve TEM Analizi Sonuçları

Şekil 3.5'de Mg-AI LDH naopartiküllerinin boyu ve zeta potansiyeli sonuçları görülmektedir. Şekil 3.5A'da görüldüğü üzere elde edilen LDH partikülleri nano boyutludur. Boyutlarının 66,85 ± 27,67 nm ve PDI değerinin 0,240 olduğu bulunmuştur. Şekil 3.5B'de LDH nanopartiküllerinin zeta potansiyel sonuçları görülmekte olup partiküllerin pozitif yüklü oldukları görülmektedir. Zeta potansiyeli değeri 25,6 ± 5,19 mV olarak ölçülmüştür. Şekil3.5C'de LDH nanopartiküllerinin TEM görüntüleri görülmektedir. TEM görüntülerinden LDH nanopartiküllerinin küresel morfolojiye sahip olduğu sonucu çıkmıştır. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Fayyazbakhsh ve ark., 2017b; Dasgupta ve ark., 2017).

4.2.5. MTT Analizi Sonuçları

LDH nanopartiküllerinin sitotoksisite analizleri Bölüm 2.17'de belirtildiği şekilde MTT analizi ile mikroplaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında LDH nanopartiküllerinin toksik olmadığı maksimum konsantrasyonu tayin etmek için farklı konsantrasyonlarda LDH nanopartikülleri kullanılmıştır. WJMKH hücreleri ile 24 saat inkübe edilen 1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 15 mg/ml konsantrasyondaki LDH nanopartikül formülasyonlarında sırasıyla %101,70 ± 9,44, %105,75 ± 18,66, %115,20 ± 15,74, %138,51 ± 24,37, %154,56 ± 35,86, %169,76 ± 22,78 ve %99,32 ± 35,83 canlılık görülürken (Şekil 3.6A ve Tablo 3.2; 48 saat inkübasyon süresi sonrası aynı konsantrasyonlardaki LDH nanopartiküllerinde % hücre canlılığı sırasıyla %109,38 ± 14,05, %123,17 ± 20,02 ve %124,58 ± 8,48, %139,00 ± 12,32, %160,47 ± 23,85, %171,56 ± 32,78 ve %113,20 ± 55,43 olarak bulunmuştur (Şekil 3.6B ve Tablo 3.2). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, 24 ve 48 saatin sonunda 1-15 mg/ml arasındaki LDH konsantrasyonlarının WJMKH hücrelerine karşı *in vitro* toksik etki göstermediği saptanmıştır.

Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, Wu ve arkadaşları çalışmalarında Mg/Al (mol oranı 3:1) LDH nanopartiküllerinin (≈100nm) embriyonik kök hücrelerin (mESC) canlılığı üzerindeki etkisini MTT analizi değerlendirmişler ve herhangi bir toksik etki (2-40 μg/ml) gözlemlememişlerdir (Wu ve ark., 2015). Bir başka çalışmada, Mg/Al (mol oranı 3:1) LDH nanopartikülleri (≈100nm) ile preosteoblast hücreleri üzerinde çalışılmış ve 0,02 mg/ml konsantrasyona kadar toksik olmadığı sonucuna varılmıştır (Kang ve ark., 2018). Sonuç olarak, tez kapsamında elde edilen sonuçlar ve literatür sonuçları LDH nanopartiküllerinin doku mühendisliği uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

4.3. JelMA/İpek Fibroin/LDH Doku İskelelerinin Karakterizasyon Sonuçları

4.3.1. FTIR Analizi Sonuçları

Bir dizi farklı oranlarda LDH nanopartikül içeriklerine sahip bir seri JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hidrojel temelli JelMA/İpek Fibroin/LDH

doku iskelelerinin UV ışığı-altında çapraz bağlandığını doğrulamak için FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. JelMA polimeri ve geliştirilen JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerine ait FTIR spektrası Şekil 3.7'de verilmiştir. Tüm ürünlerde, tipik amid I ve II bantları, 1615 cm^{-1} ve 1509 cm^{-1}'de (sırasıyla C=O gerilmesi ve N-H bükülmesinden dolayı) mevcuttur. Çapraz-bağlanmamış JelMA polimerinde C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 2915 cm^{-1}'de görülen pikin şiddeti azalmıştır, bu da foto-polimerizasyonun başarısını ve bunun sonucunda çapraz bağlı hidrojel yapısının oluştuğunu göstermiştir (Usal ve ark., 2019; Almeida ve ark., 2011).

4.3.2. SEM Analizi Sonuçları

SEM analizi, doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarında, malzemenin porozitesi, boyutu, gözenekliliği, hücrelerin malzeme ile etkileşiminin saptanması için kullanılmaktadır (Mamaghani ve ark., 2018). Hazırlanan nanokompozit doku iskelelerinin SEM analizi sonuçları Şekil 3.8 'de gösterilmiştir. Yüksek gözenek bağlantısı, hücre etkileşimi ve aktivitesi için çok önemlidir. Yapılan incelemeler sonucu üç grupta da (J/IF LDH0, J/IF LDH3, J/IF LDH5) yoğun por yapıları gözlemlenmiş olup, LDH nanopartikül katkısı ile gözenek çaplarında azalma olduğu saptanmıştır. Gözenekli yüzey yapısına sahip iskelelerinin, pürüzsüz yüzeye sahip iskelelerine kıyasla doku rejenerasyonu için daha uygun olduğu görülmüştür (Karageorgiou ve Kaplan, 2005).

4.3.3. Su Tutma Kapasitesi Sonuçları

Doku iskelelerinin şişme davranışları, kemik dokusunun yenilenmesi sırasında besin maddelerinin ve atık ürünlerin difüzyonu ile birlikte vücut sıvısının emilimiyle ilgili olduğu için önem taşımaktadır (Zheng ve ark., 2018). Şekil 3.9 'da görüldüğü üzere geliştirilen hidrojel doku iskelelerinin tamamı yüksek oranda birbirine bağlı gözenekli yapıları nedeniyle çok miktarda su emerek şişebilmektedir. Bununla birlikte, LDH içermeyen J/IF LDH0 hidrojel şişme oranının LDH içeren J/IF hidrojellere göre yükselmiş olup istatiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0.05$) görülmemiştir.

4.3.4. Degredasyon Hızı Sonuçları

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilen doku iskeleleri, uygun bozunma performansına sahip olmalı, yeterli alanla yeni doku büyümesine olanak sağlamalı ve bu dokuların yük taşıyıcı bir ortamda yeniden yapılandırılmasını teşvik etmelidir. Yani ideal olarak, iskelelerin degradasyon oranları, yeni doku rejenerasyonu hızıyla eşleşmelidir. Hızlı gerçekleşen bir bozunmada, yeni oluşan doku mekanik yükleri taşıyamayabilirken; yavaş gerçekleşen bir bozunma ise yeni doku gelişmesini önleyebilmektedir (Shafiei ve ark., 2016; Xiao ve ark., 2019). JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin degredasyon hızları Şekil 3.10 'da verilmiştir. J/IF LDH0 doku iskelesi LDH nanopartikül içeren doku iskelelerine kıyasla daha hızlı degrade olmuştur. 21 gün sonunda % ağırlık kaybı yaklaşık %91 olduğu görülmüştür. LDH nanopartikül ilave ile birlikte degredasyon hızlarında yavaşlama gözlenmiş olup en iyi sonuç J/IF LDH5 iskelesinde görülmüştür. 21 gün sonundaki % ağırlık kaybı yaklaşık %23,3 olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte J/IF LDH1, J/IF LDH2 ve J/IF LDH3 iskeleleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer bir şekilde; Suvarnapathaki ve arkadaşlarının çalışması, deneyimizi destekler niteliktedir. Suvarnapathaki ve ekibi JelMA ve LDH gibi inorganik bir malzeme olan hidroksiapatiti (HA) kullanarak geliştirdikleri jelin degradasyon hızını incelemişlerdir. 3, 6, 12, 18 ve 24 saatlik ölçümleri sonrasında hiç HA içermeyen jele göre HA içeren jellerde bozunma hızının daha yavaş olduğunu saptamışlardır (Suvarnapathaki ve ark., 2020).

4.3.5. Mekaniksel Dayanım Sonuçları

Hidrojellerin mekanik özellikleri, polimer ağlarının çapraz bağlanma yoğunluğundan etkilenir. Mekanik özellikler, hem 2B hem de 3B hücrelerin yayılma davranışını önemli ölçüde etkiler. Hidrojellerin sertliği, gözenek boyutlarıyla ters orantılıdır. Bu nedenle, biyomalzemenin gözenek boyutu çok küçükse hücreler 3B yapı içerisinde yayılamazlar (Camci Unal ve ark., 2013). LDH nanopartikül miktarının doku iskelelerinin mekanik özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sıkıştırma testi uygulanmıştır. Malzemenin sertliği polimer konsantrasyonu ve çoğunlukla içerisindeki nanopartikül miktarı arttıkça artar, bu da mekanik özelliklerde bir artışa neden olur. Geliştirilen yapı iskelelerinin gerilim-gerinim eğrileri (Şekil 3.11A),

mekanik özelliklerinin LDH nanopartiküllerinin ilavesiyle belirli ölçüde farklılık gösterebildiğini göstermiştir. Geliştirilen doku iskelelerinin elastik modülleri gerilim-gerinim eğrilerinin %0-10 gerilme aralığında doğrusal bölgenin eğimi alınarak hesaplanmıştır. Elastik modül sonuçları Şekil 3.11B'de görülmektedir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere yapıya LDH nanopartiküllerinin katılması ile elastik modül değerlerinde artış gözlenmiştir. J/IF LDH0 doku iskelelerinin elastik modülü 62,88 ± 5,5 kPA bulunmuştur. J/IF LDH1, J/IF LDH2 ve J/IF LDH3 kodlu doku iskelelerinde bu değer sırasıyla 64,9 ± 0,96 kPa, 69,47 ± 3,13 kPa ve 77,2 ± 6,06 kPA seviyelerine yükselmiş olup J/IF LDH5 ve J/IF LDH7 doku iskelelerinde ise 66,56±2,03 kPa ve 63,30±0,64 kPa seviyelerinde kalmıştır. LDH içeren doku iskelelerinin elastik modüllerinin LDH içermeyen iskelelerine göre artış gösterdiği (maksimum artış J/IF LDH3) sonucuna varılmıştır. Hidrojel doku iskelelerinin sıkıştırma dayanımları Şekil 3.11C 'de görüldüğü üzere, içeriğindeki LDH nanopartiküllerinin miktarına bağlıdır. Örneğin, LDH içermeyen J/IF LDH0 doku iskeleleri J/IF LDH1, J/IF LDH2 ve J/IF LDH3 doku iskeleleri ile karıştırıldığında, sıkıştırma dayanımlarının sırasıyla 877 ± 183 kPa 'dan 1016 ± 57 kPa, 1031 ± 84 kPa ve 1146 ± 145 kPa'a yükselmiştir. J/IF LDH5 ve J/IF LDH7 doku iskelelerinde ise düşüş gözlenmiş olup sırasıyla 952 ± 94 kPa ve 948 ± 32 kPa bulunmuştur. Bu sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında; Xiao ve arkadaşlarının geliştirdikleri JelMA/ipek fibroin hidrojellerinde en yüksek 600 kPa seviyelerine ulaşılmıştır (Xiao ve ark., 2019). Zheng ve arkadaşlarının kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere geliştirdikleri JelMA temelli biyoaktif-cam katkılı doku iskelelerinde en yüksek 240 kPa seviyelerine ulaşılmıştır (Zheng ve ark., 2018). Li ve arkadaşları ise geliştirdikleri hidroksiapatit nanopartikül katkılı JelMA temelli doku iskelelerinde maksimum 625 kPA değerinde sıkıştırma dayanımına erişmişlerdir (Liu ve ark., 2019). Sonuçlar, bu tez çalışmasında geliştirilen J/IF LDH doku iskelelerinin literatürden üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

Kopma anındaki %uzama değerlerinde ise LDH nanopartikül içeren doku iskelelerinde yükseldiği ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.11D). Doku iskelelerinde (artan LDH miktarına göre) kopma anındaki %uzama değerleri sırasıyla %71,05 ± 3,64 , %74,38 ± 2,00 , %76,62 ± 6,04 , %78,3 ± 5,10 , %78,4 ± 6,97 ve %74,36 ± 2,74 olduğu bulunmuştur.

4.3.6. Hücre Adezyonu Sonuçları

Bir biyomateryalin doku mühendisliği alanında doku iskelesi olarak kullanılabilirliğinin ve performansının saptanması için hücre adezyonu davranışlarının bilinmesi gerekmektedir (Xiao ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında, JelMA/İpek Fibroin/LDH doku iskelelerinin hücre adezyonu kabiliyetlerinin belirlemesi kapsamında WJMKH hattı kullanılmış, Rhodamine-Phalloidin/DAPI boyalamaları gerçekleştirilerek, kemik doku mühendisliği alanında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Şekil 3.12'de WJMKH hücrelerinin doku iskelelerinin üzerine ekilmesinden sonraki 1.,3. ve 5. günlerdeki görüntülerini göstermektedir. Görüntüler tüm doku iskelelerinin biyouyumlu olduğunu, tüm doku iskelelerinin üzerine WJMKH hücrelerinin kolaylıkla yapışabileceğini, aynı zamanda hücrelerin çekirdek bütünlüklerini korudukları ve mezenkimal kök hücre morfolojisine ait bir karakteristik olan iğsi fibroblastik morfolojiyi kaybetmedikleri ve kemik doku mühendisliği alanında kullanılabileceğini göstermiştir.

4.3.7. Hücre Enkapsülasyonu Sonuçları

4.3.7.1. Live/Dead Analizi Sonuçları

Live/Dead analizi, doku iskelelerine enkapsüle edilen hücrelerin yaşayabilirliklerininin araştırılması için kullanılmıştır. Live/Dead analiz kiti, plazma membran bütünlüğüne ve esteraz aktivitesine dayalı olarak bir popülasyondaki hücrelerin canlılığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. (Rinoldi ve ark., 2019). Bu ve devamındaki deneylerde LDH nanopartikül ilavesinin en iyi sonuç verdiği (özellikle mekanik dayanım sonuçlarında) J/IF LDH3 ve J/IF LDH5 doku iskeleleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak LDH nanopartikül içermeyen J/IF LDH0 doku iskelesi kullanılmıştır.

Şekil 3.13 'e bakıldığında, J/IF LDH0 ve J/IF LDH3 iskelelerinde % hücre canlılığının ortalama %99, J/IF LDH5 iskelesinde %98 olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında; Peng ve arkadaşları, plazma elektrolitik oksidasyon kaplama (PEO) ve Mg-Al LDH partiküllerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, sıçan kemik iliği kök hücreleri üzerinde Live/Dead analizi yapmışlar ve yalnızca PEO kullanımında 1.günden itibaren hiç canlı hücre tespit edilemezken,

PEO/LDH kaplaması üzerinde çok sayıda canlı hücre tespit etmişler. 14 gün sonra bile hücrelerin canlılıklarını koruduğunu saptamışlardır (Penk ve ark., 2017). Bir başka çalışmada, Xiao ve ekibi ipek fibroin ve JelMA kullanarak oluşturdukları hidrojelde NIH-3T3 fibroblastları kullanarak Live/Dead analizi gerçekleştirmiş ve hücrelerin hidrojel üzerinde canlılığını 1. ve 3. gün takip etmişlerdir. Sonuç olarak yüksek bir canlılık oranıyla düzgün bir dağılım elde etmişlerdir (Xiao ve ark., 2011). Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, LDH nanopartikülleri ve JelMA/İpek Fibroin doku iskelesinin doku mühendisliği uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanılabileceği ve hücre çoğalmasını desteklediği görülmüştür.

4.3.7.2. PrestoBlue Analizi Sonuçları

PrestoBlue analizi ile doku iskeleleri içerisinde enkapsüle edilen WJMKH'ların proliferasyon hızları (üreme davranışları) araştırılmıştır. PrestoBlue analizi, hücre yüklü doku iskelelerinde 1. ve 7. günlerde uygulanmıştır. J/IF LDH0, J/IF LDH3 ve J/IF LDH5 doku iskelelerinde sırasıyla 1. günde 8911,37 ± 996,32, 14361,50 ± 1236,80, 14082,78 ± 2512,27 ve 7. günde 12236,86 ± 2491,61, 19086,17 ± 834,52, 21358,94 ± 2415,02 bağıl floresan yoğunluk ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; %5 oranında LDH içeren doku iskelelerinde (J/IF LDH5) (1 hafta sonunda 1,516 kat artış) LDH içermeyen doku iskelelerine kıyasla (J/IF LDH0) (1 hafta sonunda 1,373 kat artış) enkapsüle edilen hücrelerin çok daha hızlı çoğaldığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, Panjapheree ve arkadaşları (2018) sıçan mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunu ipek fibroin/kitosan doku iskelelerinde incelemiş, 1.,3.,5. ve 7. günlerde etkilerini takip etmişlerdir. İpek fibroin oranı arttıkça doku iskelelerinde hücre sayısının arttığını gözlemlemişlerdir. Patel ve arkadaşları çalışmalarında LDH benzeri inorganik bir madde olan hidroksiapatit (HA) ile güçlendirilmiş bir doku iskelesinde MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonunu PrestoBlue analizi ile ölçmüşlerdir. HA içeren grupların kontrol grubuna göre, 7. günde daha yüksek hücre proliferasyonuna izin verdiği görülmüştür (Patel ve ark., 2019). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, ipek fibroin, JelMA gibi biyouyumlu malzemelerin varlığı hücre yapışmasını ve çoğalmasını olumlu yönde etkilediği, yapıya katılan LDH nanopartiküllerinin hücre proliferasyon hızlarında olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.3.7.3. DAPI/Actin Analizi Sonuçları

Enkapsüle edilen doku iskelelerinde hücrelerin morfolojisini görselleştirmek için DAPI/ Rhodamine-Phalloidin boyası kullanılmıştır. 1, 3 ve 5. gün boyunca doku iskeleleri içide kültürlenen hücrelerin morfolojisi Şekil 3.15'te verilmiştir. J/IF LDH0 doku iskelesinde hücrelerin 1 ve 5. günü arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. J/IF LDH3 iskelesinde 1 ve 3. günlerde hücreler yuvarlak morfolojide iken 5. günden itibaren kök hücre morfolojisine benzer bir şekilde uzanarak morfoloji aldıkları görülmüştür. Yine J/IF LDH5 iskelesinde zamana bağlı olarak hücrelerin 3. günden itibaren, uzanarak morfoloji aldıkları ve jel içerisinde konumlandıkları gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar, geliştirilen doku iskelelerinde kullanılan LDH nanopartiküllerin hücrelerin morfoloji almalarına destek olduğu sonucunu göstermiştir.

4.4. Hücre-yüklü Doku İskelelerinin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

4.4.1. Alizarin Red S Boyaması Sonuçları

Osteojenik farklılaşmanın belirteçlerinden olan kalsiyum birikimi ve minerilizasyonun tayini Alizarin Red S boyaması ile yapılmıştır. Boyama sonrası doku iskelelerindeki kalsiyum- mineral depozitlerinin kırmızımsı-turuncumsu bir renk alması beklenmektedir (Jin ve ark., 2013; Campos ve ark., 2016).

JelMA/İpek Fibroin/LDH kompozisyonlu doku iskelelerinde (J/IF LDH0, J/IF LDH3 ve J/IF LDH5) WJMKH hücreleri enkapsüle edilerek kemik benzeri yapıya farklılaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiş; 0. ,14. ve 21. günlerde Alizarin Red S boyası ile boyanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, LDH oranı arttıkça kalsiyum birikiminde artış olduğu gözlemlenmiştir. %3 ve %5 LDH nanopartikül içeren doku iskelelerindeki (J/IF LDH3 ve J/IF LDH5) mineralize nodüller belirgin şekilde görülmüştür (Şekil 3.16).

Chen ve ekibi JelMA/nHA mikrojellerinde kapsüllenmiş insan periodontal ligament kök hücreleri osteojenik farklılaşma potansiyelini Alizarin Red S boyaması kullanarak araştırmışlardır. Görüntüler göz önüne alındığında %2 oranında nHA içeren mikrojellerde enkapsüle edilen insan periodontal ligament kök hücreleri, diğer mikrojellere kıyasla 10 günlük kültürden sonra önemli mineralizasyon sergilediğini ileri

sürmüşlerdir (Chen ve ark., 2016). Cao ve ekibi, Kitosan/LDH/Ag doku iskelesinde osteoindüktiviteyi araştırmak için kemik iliği kök hücresi üzerinde Alizarin Red boyaması yapmışlardır. LDH'ın mineralizasyon üzerinde önemli bir artışa sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir (Cao ve ark., 2018). Gerçekleştirilen Alizarin Red boyaması ile LDH nanopartiküllerin osteojenik farklılaşmayı indüklediği açıkça görülmüş olup, elde edilen sonuçların literatürü desteklediği sonucuna varılmıştır.

4.4.2. ALP Aktivitesi Sonuçları

Alkalen fosfataz (ALP), kemikteki minerilizasyonun önemli bir göstergecidir. Biyominerilizasyonda, dolayısıyla osteojenik farklılaşmada rol oynamaktadır (Tamburacı ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında yapıdaki kalsiyum artışı ALP analizi ile tayin edilmiştir. Bölüm 2.21.2'de anlatıldığı şekilde uygulanan analizin karşılaştırmalı sonuçları Şekil 3.17'da verilmiştir. LDH içermeyen grupta (J/IF LDH0) ALP seviyelerinde 2.-6. günler arasında farklılık gözlemlenmezken, 6. günden sonra artış görülmüştür. LDH nanopartikül içeren gruplara bakıldığında, J/IF LDH3 grubunda 6. günden sonra ALP aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. J/IF LDH5 grubunda ise 4. günden sonra artış gözlemlenmiştir. ALP seviyelerindeki en yüksek artış J/IF LDH3 grubunda gözlemlenmiştir.

ALP seviyelerindeki artış, osteojenik farklılaşma sürecinde LDH nanopartikülünün ALP aktivitesini indüklemesi sebebiyle ortaya çıkan minerilizasyonun iyi bir örneğidir. LDH nanopartiküllerinin içeriğinde bulunan Mg^{+2} iyonlarının salınması, kök hücrelerin ALP aktivitesini arttırma ve osteogenez yolları üzerinde sinerjik bir etkiye sahiptir (Kang ve ark., 2017). ALP analizleri ile elde edilen sonuçlar, literatür ile birlikte değerlendirildiğinde (Chakraborti ve ark., 2011) doku iskelelerinde bulunan LDH nanopartiküllerinin ALP aktivitesini arttırdığı görülmüştür.

4.4.3. LDH Analizi Sonuçları

Laktat dehidrogenaz (LDH) neredeyse tüm canlı hücrelerde bulunan bir enzim olup piruvat ve laktatın ara dönüşümünü katalize etmektedir (Farhana ve Lappin, 2020). Genel olarak hücreler, doku hasarından sonra LDH'yi kan dolaşımına salmaktadır. Bu

sebeple *in vitro* çalışmalarda kullanılan LDH testi, hasarlı hücrelerin konsantrasyonunu gösteren bir toksisite testidir.

Şekil 3.18'de verilen LDH analizi sonuçları incelendiğinde, doku iskelelerinin toksik etki göstermediği görülmüştür. Sonuçlar birbirleri ile karşılaştırıldığında, LDH nanopartikül içermeyen kontrol grubundaki hücre ölümlerinin LDH içeren gruplara göre yüksek olduğu görülmüştür. Kültür periyodu boyunca tüm doku iskelelerinde LDH seviyelerinde istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, doku iskelelerinde bulunan LDH nanopartikülleri toksik bir etki oluşturmamıştır. Tüm gruplarda hücre toksisitesi kültür periyoduyla birlikte az miktarda artmış olup, bu artış J/IF LDH3 ve J/IF LDH5 gruplarında minimal seviyededir. Sonuç olarak geliştirilen doku iskelelerinin toksik etki sergilemediği sonucuna varılmıştır.

4.4.4. BCA Analizi Sonuçları

Biçinkoninik asit (BCA) analizi, toplam proteini ölçmek için kullanılmıştır. BCA analiz sonuçları Şekil 3.19'da verilmiştir. Protein absorbsiyonundaki artışın ipek fibroinin bir protein olmasından (Gobin ve ark., 2005) dolayı gruplar ve günler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ek olarak, J/IF LDH3 ve J/IF LDH5 doku iskelelerinde gerçekleşen osteojenik farklılaşma sebebiyle protein artışının gün bazında olmasa da genel bakışta J/IF LDH0 grubuyla (LDH içermeyen kontrol grubu) karşılaştırıldığında daha yüksek BCA aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. BCA analizi, hücre yapışması yüzeyde emilen protein miktarı ile doğrudan ilişkili olduğundan (Triphati ve Basu, 2012), sonuçlar hücre yapışması ve canlılık analiz sonuçlarını desteklemektedir.

4.4.5. Histolojik Analiz Sonuçları

Osteojenik farklılaşmada doku analizleri histolojik boyamalar kullanılarak gösterildi. 1, 14 ve 21 gün boyunca kültürlenen hücre yüklü-doku iskeleleri Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson Trikrom boyaları ile muamele edilmiştir. H&E boyası, hücre çekirdeği ve hücre sitoplazmasını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Tüm doku iskelelerinin ilk günleri karşılaştırıldığında hücre boyutlarının aynı olduğu gözlemlenirken gün geçtikçe LDH nanopartikül içeren doku iskeleleri ile içermeyen

arasında bir farklılık olduğu görülmüştür. Şekil 3.20'de gösterilen boyamada J/IF LDH0 doku iskelesinin 14. gününde hücrelerin lakünalarında büyüme olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi, LDH bulunmayan bu iskelede daha yumuşak bir matris yapısı sebebiyle hücrelerin genişlemek için daha fazla alan bulmasına dayandığı düşünülmektedir. Buna karşılık, J/IF LDH3 ve J/IF LDH5 doku iskelelerinde hücrelerin boyutlarını koruduğu, zamanla da uzantılar yaparak yayıldığı gözlemlenmiştir.

Masson Trikrom bağ dokusu matrisinin kollajen içeriği hakkında bilgi veren bir boyadır. Şekil 3.21'de verilen J/IF LDH3 grubunun 14. ve 21.günlerinde hücreler çevrelerindeki matrise doğru uzantılar göndermeye başlamışlardır. Bu görüntüler, kemik hücrelerinin oluşturduğu besinlere ve çevreye erişebilmek için kullanılan kanaliküllere benzemektedir. J/IF LDH5 doku iskelelerinin de uzantıları görülmekle beraber J/IF LDH3 iskelesindeki kadar belirgin değildir. Bunun sebebinin kalsiyum birikiminin fazla olması sebebiyle doku iskelesinin sert bir yapı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İmmünfloresan deneyinde J/IF LDH5 doku iskelesindeki osteokalsin birikimi sonuçları, histolojik sonuçları destekler niteliktedir. Yine J/IF LDH5 grubunun 14.gününde ve J/IF LDH3 grubunun 21. gününde hücrelerin etrafında matris birikimi belirgin bir şekilde (mor renkte) görülmektedir. Bu görüntünün kıkırdaktaki tetrogen matriste olduğu gibi hücrelerin çevresinde matris birikimi vardır.

Literatür taraması sonucunda matris bileşimi ve dokunun yapısal analizleri için histolojik boyamalar yapıldığı ve LDH partikülü ve JelMA/İpek Fibroin yapısının farklılaşmayı desteklediği görülmüştür. (Sahu ve ark., 2015; Fayyazbakhsh ve ark., 2017b; Kang ve ark., 2017; Kang ve ark., 2018).

4.4.6. İmmünFloresan Boyama Sonuçları

Osteojenik farklılaşma bir çok farklı protein ve transkripsiyon faktörlerine sahiptir. Osteokalsin (OCN), Kollajen tip 1 (COL1A), kemik sialoprotein (BSP) ve RUNX2 bunların arasında en çok bilinen ve osteojenik farklılaşma belirteci olarak kullanılanlarıdır (Chen ve ark., 2011; Martin ve ark., 2017). Tez kapsamında uygulanan osteojenik farklılaştırma sonrası protein bağlanmasını ve farklılaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamak için immünfloresans yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde

OCN, COL1A, BSP antikorları kullanılmış ve FITC sekonder boyasıyla ışıma, floresans mikroskop altında gözlemlenmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır.

COL1A immün floresan boyama sonuçlarına bakıldığında (Şekil 3.22), her üç doku iskelesinde de 21 gün sonunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kollajenin hidrolize formu olan jelatinin ve mezenkimal kök hücrelerin de kollajen bulundurduğu düşünülürse LDH içermeyen J/IF LDH0 doku iskelesinde de COL1A boyanmalarının yüksek olması normaldir. Bu üç doku iskelesi aynı zamanda farklılaşma potansiyeli de gösterdiği için COL1A antikorunun pozitif boyanması beklenildiği gibidir. Bir diğer protein olan OCN proteini, kemikte ve dentin yapısında bulunan kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. OCN immün floresan boyama sonuçlarına bakıldığında (Şekil 3.23), J/IF LDH0 ve J/IF LDH3 iskelelerinde pozitif boyanmalar görülmekte olup, J/IF LDH5 iskelesindeki pozitif boyanma J/IF LDH0 ve J/IF LDH3 iskelesiyle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Aynı şekilde kemik hücre dışı matrisinin ve mineralize dokuların önemli bir bileşeni olan BSP proteini de OCN ile uyumlu bir şekilde en fazla pozitifliği J/IF LDH5 iskelesinde göstermiştir (Şekil 3.24). Bu sonuçlar alizarin red S boyaması ve histolojik boyamalar ile de benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

Chen ve arkadaşları, kitosan, LDH nanopartikülü ve PFTα partikülü kullanarak doku iskeleleri geliştirmişler ve bu iskelelere sırasıyla 10 μM, 20 μM ve 40 μM PFTα partikülü yüklemişler, ardından kemik iliği kök hücreleri ile kültürlemişlerdir. 72 saat sonra OCN ile boyamaları sonucunda tüm iskelelerde PFTα konsantrasyonuna bağlı olarak osteojenik belirteç olan OCN gösterilmiştir (Chen ve ark., 2017). Yine benzer bir çalışmada Kang ve arkadaşları adenozini dağıtmak için oluşturdukları nanohibrit MgFe-Ado-LDH yapısında, OCN, RUNX2, Osteopontin (OPN) genlerinin ekspresyon seviyelerine bakmışlar ve MgFe-LDH katkılı nanohibrit yapının, hiç içermeyen yapıya göre 14. ve 21. günlerde ekspresyonlarında anlamlı bir artış göstermişlerdir. Tüm sonuçlar ilgili literatürler dikkate alınarak birlikte değerlendirildiğinde JelMA/İpek Fibroin LDH doku iskelesinin osteojenik farklılaşmaya yol açtığı doğrulanmıştır.

4.5. Hücre-yüklü Doku İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları

Hücrelerin doku iskelelerine tutunması, çoğalması ve yayılması, doku mühendisliğinde aranılan bir özelliktir. Bu sebeple LDH katkılı JelMA/İpek Fibroin

doku iskeleleri ile hücreler arasındaki etkileşim ve hücrelerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Hücre yüklü doku iskelelerinde gerçekleştirilen SEM analizi sonuçları Şekil 3.25'de verilmiştir. 14. ve 21. günlerde hücreler doku iskelesindeki porların etrafını tamamen kaplayıp iç bölgelere doğru yayılmışlardır. Benzer bir yapı Li ve arkadaşlarının insan amniyotik mezenkimal kök hücrelerini kullanarak ipek fibroin yapısının osteojenik ve anjiojenik farklılaşmasına ait SEM fotoğraflarında da gösterilmiştir (Li ve ark., 2020).

5. SONUÇ

Elde edilen veriler sonucunda, Mg-Al LDH nanopartikül katkılı JelMA/İpek Fibroin nanohibrit doku iskeleleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. JelMA/İpek Fibroin- temelli doku iskelelerine LDH nanopartikül katkısı ile doku iskelelerininin mekaniksel özellikleri ve degredasyon hızları iyileştirilmiştir. LDH nanopartikülleri doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin adezyon davranışlarında herhangi bir olumsuz etki yapmamıştır, hücre yüklü doku iskelelerinde hücre canlılığını ve proliferasyon hızlarını olumsuz yönde etkilememiştir. Aksine hücrelerin daha iyi morfoloji almalarını sağlamıştır. Osteojenik farklılaşma sonuçları, yapıda bulunan LDH nanopartiküllerinin ostejenik farklılaşmayı önemli ölçüde tetiklediğini göstermiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, literatürde ilk defa sentezlenen LDH nanopartikül katkılı JelMA/İpek Fibroin nanohibrit doku iskeleleri kemik doku mühendisliği alanında yapay kemik üretiminde kullanılabileceği saptanmıştır. Doku iskelelerinin *in vivo* etkilerinin değerlendirilmesinin ardından klinikte kullanılabilecek potansiyeli olduğu öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

Abbaszadeh, H., Ghorbani, F., Derakhshani, M., Movassaghpour, A. A., Yousefi, M., Talebi, M.,ve ark. (2020). Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. Journal of Cellular Physiology, 235(12), 9230-9240

Abdalla, M. O., Karna, P., Sajja, H. K., Mao, H., Yates, C., Turner, T., ve ark. (2011). Enhanced noscapine delivery using uPAR-targeted optical-MR imaging trackable nanoparticles for prostate cancer therapy. Journal of controlled release, 149(3), 314-322.

Abeysekera, R. (2007). The impact of human resource management practices on marketing executive turnover of leasing companies in Sri Lanka. Contemporary Management Research, 3(3). doi:10.7903/cmr.94

Ahmadi, M., Seyedjafari, E., Zargar, S. J., Birhanu, G., Zandi-Karimi, A., Beiki, B., ve ark. (2017). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on PLLA scaffold coated with Wharton's Jelly. EXCLI journal, 16, 785.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of advanced research, 6(2), 105-121.

Almeida, J. F., Ferreira, P., Lopes, A., & Gil, M. H. (2011). Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems. International journal of biological macromolecules, 49(5), 948-954.

Alwattar, B. J., Schwarzkopf, R., & Kirsch, T. (2011). Stem cells in orthopaedics and fracture healing. Bulletin of the NYU hospital for joint diseases, 69(1), 6.

Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Critical reviews in biomedical engineering, 40(5), 363–408.

Anirudhan, T. S., Dilu, D., & Sandeep, S. (2013). Synthesis and characterisation of chitosan crosslinked-β-cyclodextrin grafted silylated magnetic nanoparticles for controlled release of Indomethacin. Journal of magnetism and magnetic materials, 343, 149-156.

Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2015). A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. The AAPS journal, 17(5), 1041-1054.

Bachtiar, E. W., Amir, L. R., Suhardi, P., & Abas, B. (2016). Scaffold degradation during bone tissue reconstruction in Macaca nemestrina mandible. Interventional Medicine and Applied Science, 8(2), 77-81.

Bhumiratana, S., Grayson, W. L., Castaneda, A., Rockwood, D. N., Gil, E. S., Kaplan, D. L., ve ark. (2011). Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. Biomaterials, 32(11), 2812-2820.

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Trends in biotechnology, 30(10), 546-554.

Britannica (2012). Bone-Morphology 2012. Erişim: 15.12.2020, https://www.britannica.com/science/bone-anatomy/Bone-morphology

Bu, W., Wu, L., Hou, X., Fan, H., Hu, C., & Zhang, X. (2002). Investigation on solvent casting films of surfactant-encapsulated clusters. Journal of colloid and interface science, 251(1), 120-124.

Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials, 21(23), 2347-2359.

Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D., & Khademhosseini, A. (2013). Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. Biomacromolecules, 14(4), 1085-1092.

Can, A., (2009). Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1. Baskı. Ankara: TÜBA. 113.

Canha-Gouveia, A., Costa-Pinto, A. R., Martins, A. M., Silva, N. A., Faria, S., Sousa, R. A., ve ark. (2015). Hierarchical scaffolds enhance osteogenic differentiation of human Wharton's jelly derived stem cells. Biofabrication, 7(3), 035009.

Cao, D., Xu, Z., Chen, Y., Ke, Q., Zhang, C., & Guo, Y. (2018). Ag-loaded MgSrFe-layered double hydroxide/chitosan composite scaffold with enhanced osteogenic and antibacterial property for bone engineering tissue. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 106(2), 863-873.

Cao, Y., & Wang, B. (2009). Biodegradation of silk biomaterials. International journal of molecular sciences, 10(4), 1514-1524.

Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends in molecular medicine, 7(6), 259–264.

Carrow, J. K., Kerativitayanan, P., Jaiswal, M. K., Lokhande, G., & Gaharwar, A. K. (2015). Polymers for bioprinting. İçinde A. Atala ve J.J. Yoo (Ed.), In Essentials of 3D biofabrication and translation. Cambridge, Massachusetts:Academic Press, ss. 229-248.

Chabot, V., Higgins, D., Yu, A., Xiao, X., Chen, Z., & Zhang, J. (2014). A review of graphene and graphene oxide sponge: material synthesis and applications to energy and the environment. Energy & Environmental Science, 7(5), 1564-1596.

Chakraborti, M., Jackson, J. K., Plackett, D., Brunette, D. M., & Burt, H. M. (2011). Drug intercalation in layered double hydroxide clay: Application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration. International journal of pharmaceutics, 416(1), 305-313.

Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. European spine journal, 17(4), 467-479.

Chandrasekhar, S. K., Thankam, F. G., Agrawal, D. K., & Ouseph, J. C. (2020). Interface biology of stem cell–driven tissue engineering: concepts, concerns, and approaches. In Biointegration of Medical Implant Materials (pp. 19-44). Woodhead Publishing.

Chapman, A., Frankel, M., Garfinkel, M., & American Association for the Advancement of Science. (1999). Stem cell research and applications: monitoring the frontiers of biomedical research.

Chatzinikolaidou, M., Pontikoglou, C., Terzaki, K., Kaliva, M., Kalyva, A., Papadaki, E., ve ark. (2017). Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) immobilized on laser-fabricated 3D scaffolds enhance osteogenesis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 149, 233-242.

Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, T. (2002). Scaffold design for tissue engineering. Macromolecular Bioscience, 2(2), 67-77.

Chen, M. Y., Lie, P. C., Li, Z. L., & Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow–derived mesenchymal stem cells. Experimental hematology, 37(5), 629-640.

Chen, M., Le, D. Q., Baatrup, A., Nygaard, J. V., Hein, S., Bjerre, L., ve ark. (2011). Self-assembled composite matrix in a hierarchical 3-D scaffold for bone tissue engineering. Acta Biomaterialia, 7(5), 2244-2255.

Chen, X., Bai, S., Li, B., Liu, H., Wu, G., Liu, S., & Zhao, Y. (2016). Fabrication of gelatin methacrylate/nanohydroxyapatite microgel arrays for periodontal tissue regeneration. International journal of nanomedicine, 11, 4707.

Chen, Y. X., Zhu, R., Ke, Q. F., Gao, Y. S., Zhang, C. Q., & Guo, Y. P. (2017). MgAl layered double hydroxide/chitosan porous scaffolds loaded with PFTα to promote bone regeneration. Nanoscale, 9(20), 6765-6776.

Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., ve ark. (2019). Advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. Tissue Engineering Part B: Reviews, 25(1), 14-29.

Choi, B. Y., Chalisserry, E. P., Kim, M. H., Kang, H. W., Choi, I. W., & Nam, S. Y. (2019). The Influence of Astaxanthin on the Proliferation of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells in Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels. *Materials*, *12*(15), 2416.

Chubar, N. (2014). EXAFS and FTIR studies of selenite and selenate sorption by alkoxide-free sol–gel generated Mg–Al–CO 3 layered double hydroxide with very labile interlayer anions. *Journal of Materials Chemistry A*, *2*(38), 15995-16007.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology, 3(Supplement 3), S131-S139.

Cole, A. J., Yang, V. C., & David, A. E. (2011). Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. Trends in biotechnology, 29(7), 323-332.

Coutinho, D. F., Gomes, M. E., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2012). Development of micropatterned surfaces of poly (butylene succinate) by micromolding for guided tissue engineering. Acta biomaterialia, 8(4), 1490-1497.

Dallari, D., Savarino, L., Albisinni, U., Fornasari, P., Ferruzzi, A., Baldini, N., ve ark. (2012). A prospective, randomised, controlled trial using a Mg-hydroxyapatite-demineralized bone matrix nanocomposite in tibial osteotomy. Biomaterials, 33(1), 72-79.

Dang, J. M., & Leong, K. W. (2006). Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. Advanced drug delivery reviews, 58(4), 487-499.

Dasgupta, S. (2017, August). Controlled release of ibuprofen using Mg Al LDH nano carrier. In IOP Conf Ser Mater Sci Eng (Vol. 225, p. 012005).

Daud, M., Kamal, M. S., Shehzad, F., & Al-Harthi, M. A. (2016). Graphene/layered double hydroxides nanocomposites: a review of recent progress in synthesis and applications. Carbon, 104, 241-252.

Davies, J. E., Walker, J. T., & Keating, A. (2017). Concise review: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. Stem Cells Translational Medicine, 6(7), 1620-1630.

De Coppi, P. (2020). Tissue Engineering and Stem Cell Research. Pediatric Surgery: General Principles and Newborn Surgery, 577-592.

De Witte, T. M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., & Peppas, N. A. (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. Regenerative biomaterials, 5(4), 197-211.

De Witte, T. M., Wagner, A. M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., & Peppas, N. A. (2020). Immobilization of nanocarriers within a porous chitosan scaffold for the sustained delivery of growth factors in bone tissue engineering applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 108(5), 1122-1135.

Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ve ark. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8(4), 315-317.

Donnelly, H., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2018). Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. Journal of The Royal Society Interface, 15(145), 20180388.

Du, X., Wei, D., Huang, L., Zhu, M., Zhang, Y., & Zhu, Y. (2019). 3D printing of mesoporous bioactive glass/silk fibroin composite scaffolds for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C, 103, 109731.

Duarte Campos, D. F., Blaeser, A., Buellesbach, K., Sen, K. S., Xun, W., Tillmann, W., ve ark. (2016). Bioprinting organotypic hydrogels with improved mesenchymal stem cell remodeling and mineralization properties for bone tissue engineering. Advanced healthcare materials, 5(11), 1336-1345.

Eivazzadeh-Keihan, R., Chenab, K. K., Taheri-Ledari, R., Mosafer, J., Hashemi, S. M., Mokhtarzadeh, A., ve ark. (2020). Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C, 107, 110267.

El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J. F., Menu, P., Velot, E., & Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?. Tissue Engineering Part B: Reviews, 20(5), 523-544.

Evans, N. D., Gentleman, E., & Polak, J. M. (2006). Scaffolds for stem cells. Materials Today, 9(12), 26-33.

Farhana, A., & Lappin, S. L. (2020). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH). In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Fayyazbakhsh F., Solati-Hashjin M., Keshtkar A., Shokrgozar M.A., Dehghan M.M., & Larijani B. (2017). "Release behavior and signaling effect of vitamin D3 in layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffold: An in vitro evaluation". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 158, 697-708.

Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Keshtkar, A., Shokrgozar, M. A., Dehghan, M. M., & 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.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Proliferation, 3(4), 393-403.

Fukuda, J., Khademhosseini, A., Yeo, Y., Yang, X., Yeh, J., Eng, G., ve ark. (2006). Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. Biomaterials, 27(30), 5259-5267.

Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., & Khademhosseini, A. (2014). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. Biotechnology and bioengineering, 111(3), 441-453.

Gauthaman, K., Venugopal, J. R., Yee, F. C., Biswas, A., Ramakrishna, S., & Bongso, A. (2011). Osteogenic differentiation of human Wharton's jelly stem cells on nanofibrous substrates in vitro. Tissue Engineering Part A, 17(1-2), 71-81.

Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. The archives of bone and joint surgery, 6(2), 90–99.

Gobin, A. S., Froude, V. E., & Mathur, A. B. (2005). Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 74(3), 465-473.

Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., & Lin, Y. (2015). Nanomaterials and bone regeneration. Bone research, 3, 15029.

Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. Biomaterials applications for nanomedicine, 2, 17-52.

Gu, Z., Atherton, J. J., & Xu, Z. P. (2015). Hierarchical layered double hydroxide nanocomposites: structure, synthesis and applications. Chemical Communications, 51(15), 3024-3036.

Guo, B., & Ma, P. X. (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. Science China Chemistry, 57(4), 490-500.

Habibovic, P. (2017). Strategic directions in osteoinduction and biomimetics. Tissue Engineering Part A, 23(23-24), 1295-1296.

Hardy, J. G., Römer, L. M., & Scheibel, T. R. (2008). Polymeric materials based on silk proteins. Polymer, 49(20), 4309-4327.

He, P., Ng, K. S., Toh, S. L., & Goh, J. C. H. (2012). In vitro ligament–bone interface regeneration using a trilineage coculture system on a hybrid silk scaffold. Biomacromolecules, 13(9), 2692-2703.

Hecht, K. J., Velagala, S., Easo, D. A., Saleem, M. A., & Krause, U. (2019). Influence of Wettability on Bubble Formation from Submerged Orifices. Industrial & Engineering Chemistry Research.

Heo, D. N., Ko, W. K., Bae, M. S., Lee, J. B., Lee, D. W., Byun, W., ve ark. (2014). Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle–hydrogel complex. Journal of Materials Chemistry B, 2(11), 1584-1593.

Herberts, C. A., Kwa, M. S., & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. Journal of translational medicine, 9(1), 29.

Ho, C. M. B., Ng, S. H., & Yoon, Y. J. (2015). A review on 3D printed bioimplants. International Journal of Precision Engineering and Manufacturing, 16(5), 1035-1046.

Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., & Ovsianikov, A. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. Biofabrication, 8(3), 032002.

Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M., & Roberts, S. J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. Journal of anatomy, 213(1), 66-72.

Hsu, Y. C., & Fuchs, E. (2012). A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. Nature reviews Molecular cell biology, 13(2), 103-114.

Huang, H. C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K., & Rege, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. Journal of controlled Release, 155(3), 344-357.

Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., & Madihally, S. V. (2005). In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 26(36), 7616-7627.

Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites science and technology, 63(15), 2223-2253.

Hubbell, J. A. (1995). Biomaterials in tissue engineering. Bio/technology, 13(6), 565-576.

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 21(24), 2529-2543.

Hutmacher, D. W. (2001). Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 12(1), 107-124.

İnsal, B., & Pişkin, İ. (2017). Kemik Dokusunun Fizyolojisi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 28(1), 28-32.

Ishige, I., Nagamura-Inoue, T., Honda, M. J., Harnprasopwat, R., Kido, M., Sugimoto, M., ve ark. (2009). Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. International journal of hematology, 90(2), 261-269.

Jessop, Z. M., Javed, M., Otto, I. A., Combellack, E. J., Morgan, S., Breugem, C. C., ve ark. (2016). Combining regenerative medicine strategies to provide durable reconstructive options: auricular cartilage tissue engineering. Stem cell research & therapy, 7(1), 19.

Jin, G. Z., Kim, T. H., Kim, J. H., Won, J. E., Yoo, S. Y., Choi, S. J., ve ark. (2013). Bone tissue engineering of induced pluripotent stem cells cultured with macrochanneled polymer scaffold. Journal of biomedical materials research Part A, 101(5), 1283-1291.

Ju, C., Sun, J., Zi, P., Jin, X., & Zhang, C. (2013). Thermosensitive micelles–hydrogel hybrid system based on poloxamer 407 for localized delivery of paclitaxel. Journal of pharmaceutical sciences, 102(8), 2707-2717.

Kamal, M. M., & Kassem, D. H. (2020). Therapeutic potential of wharton's jelly mesenchymal stem cells for diabetes: achievements and challenges. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8.

Kamil, S. H., Vacanti, M. P., Aminuddin, B. S., Jackson, M. J., Vacanti, C. A., & Eavey, R. D. (2004). Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. The Laryngoscope, 114(5), 867-870.

Kang, H. R., da Costa Fernandes, C. J., da Silva, R. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J., & Zambuzzi, W. F. (2018). 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), 1700693.

Kang, H. W., Tabata, Y., & Ikada, Y. (1999). Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 20(14), 1339-1344.

Kang, H., Kim, M., Feng, Q., Lin, S., Wei, K., Li, R., ve ark. (2017). Nanolayered hybrid mediates synergistic co-delivery of ligand and ligation activator for inducing stem cell differentiation and tissue healing. Biomaterials, 149, 12-28.

Karadas, O., Yucel, D., Kenar, H., Torun Kose, G., & Hasirci, V. (2014). Collagen scaffolds with in situ-grown calcium phosphate for osteogenic differentiation of Wharton's jelly and menstrual blood stem cells. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 8(7), 534-545.

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

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017). Comparative analyses of immunosuppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly, and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells. Turkish Journal of Hematology, 34(3), 213.

Kasoju, N., & Bora, U. (2012). Silk fibroin in tissue engineering. Advanced healthcare materials, 1(4), 393-412.

Kazemzadeh-Narbat, M., Rouwkema, J., Annabi, N., Cheng, H., Ghaderi, M., Cha, B. H., ve ark. (2017). Engineering photocrosslinkable bicomponent hydrogel

constructs for creating 3D vascularized bone. Advanced healthcare materials, 6(10), 1601122.

Khademhosseini, A., Eng, G., Yeh, J., Fukuda, J., Blumling III, J., Langer, R ve ark. (2006). Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 79(3), 522-532.

Kim, Y. S., Suh, K. Y., & Lee, H. H. (2001). Fabrication of three-dimensional microstructures by soft molding. Applied Physics Letters, 79(14), 2285-2287.

Kini, U., & Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In Radionuclide and hybrid bone imaging (pp. 29-57). Springer, Berlin, Heidelberg.

Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J., Malda, J., & Melchels, F. P. (2016). Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair. Trends in biotechnology, 34(5), 394-407.

Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. Nature Reviews Materials, 1-20.

Kuthati, Y., Kankala, R. K., & Lee, C. H. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects. Applied Clay Science, 112, 100-116.

Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. International journal of pharmaceutics, 221(1-2), 1-22.

Lee, J., Park, S., & Kim, W. D. (2013). 3D Printing Technology and Its Application on Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Transactions of the KSME C: Technology and Innovation, 1(1), 21-26.

Li, Y., Liu, Z., Tang, Y., Fan, Q., Feng, W., Luo, C., ve ark. (2020). Three-dimensional silk fibroin scaffolds enhance the bone formation and angiogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells: a biocompatibility analysis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica.

Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2012). Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. Chemical Society Reviews, 41(7), 2590-2605.

Liang, R., Wei, M., Evans, D. G., & Duan, X. (2014). Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. Chemical Communications, 50(91), 14071-14081.

Liu J, Li L, Suo H, Yan M, Yin J & Fu J. (2019). 3D printing of biomimetic multi-layered GelMA/nHA scaffold for osteochondral defect repair. Materials & Design, 171, 107708.

Liu, H. W., Hu, S. H., Chen, Y. W., & Chen, S. Y. (2012). Characterization and drug release behavior of highly responsive chip-like electrically modulated reduced graphene oxide–poly (vinyl alcohol) membranes. Journal of Materials Chemistry, 22(33), 17311-17320.

Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., ve ark. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Bone research, 5(1), 1-20.

Liu, R., Liang, S., Tang, X. Z., Yan, D., Li, X., & Yu, Z. Z. (2012). Tough and highly stretchable graphene oxide/polyacrylamide nanocomposite hydrogels. Journal of Materials Chemistry, 22(28), 14160-14167.

Liu, X., Holzwarth, J. M., & Ma, P. X. (2012). Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Macromolecular bioscience, 12(7), 911-919.

Luetchford, K. A., Chaudhuri, J. B., & Paul, A. (2020). Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C, 106, 110116.

Ma, P. X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. Advanced drug delivery reviews, 60(2), 184-198.

Maitra, J., & Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review. Am. J. Polym. Sci, 4(2), 25-31.

Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J., ve ark. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. Advanced materials, 25(36), 5011-5028.

Mamaghani, K. R., Naghib, S. M., Zahedi, A., & Mozafari, M. (2018). Synthesis and microstructural characterization of GelMa/PEGDA hybrid hydrogel containing graphene oxide for biomedical purposes. Materials Today: Proceedings, 5(7), 15635-15644.

Martin, P. M., Creber, K., & Hamilton, D. W. (2017). Measuring gene expression changes on biomaterial surfaces. In Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance In Vivo (pp. 111-131). Woodhead Publishing.

MB Murphy & AG Mikos. (2007). Polymer Scaffold Fabrication, Principles of Tissue Engineering, 3rd Ed., RP Lanza, R. Langer ve JP Vacanti (Ed.), Elsevier Academic Press, San Diego: s. 309-321.

Mehrali, M., Thakur, A., Kadumudi, F. B., Pierchala, M. K., Cordova, J. A. V., Shahbazi, M. A., ve ark. (2019). Pectin methacrylate (PEMA) and gelatin-based hydrogels for cell delivery: converting waste materials into biomaterials. ACS applied materials & interfaces, 11(13), 12283-12297.

Mehrban, N., Teoh, G. Z., & Birchall, M. A. (2016). 3D bioprinting for tissue engineering: Stem cells in hydrogels. International journal of bioprinting, 2(1).

Meinel, L., Fajardo, R., Hofmann, S., Langer, R., Chen, J., Snyder, B., ve ark. (2005). Silk implants for the healing of critical size bone defects. Bone, 37(5), 688-698.

Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., & Hofmann, S. (2016). Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. Acta biomaterialia, 31, 1-16.

Meng, Z., Chitrakar, C., Gaharwar, A. K., & Yakovlev, V. V. (2015, April). Reinforcement of osteogenesis with nanofabricated hydroxyapatite and GelMA nanocompositeInternational Society for Optics and Photonics. . In Photonic Therapeutics and Diagnostics XI (Vol. 9303, p. 930340).

Merino, S., Martin, C., Kostarelos, K., Prato, M., & Vázquez, E. (2015). Nanocomposite hydrogels: 3D polymer–nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. ACS nano, 9(5), 4686-4697.

Minguell, J. J., Erices, A., & Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 226(6), 507–520.

Mohabatpour, F., Karkhaneh, A., & Sharifi, A. M. (2016). A hydrogel/fiber composite scaffold for chondrocyte encapsulation in cartilage tissue regeneration. RSC advances, 6(86), 83135-83145.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, 65(1-2), 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Müller, R. (2009). Hierarchical microimaging of bone structure and function. Nature Reviews Rheumatology, 5(7), 373-381.

Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. Nature biotechnology, 32(8), 773-785.

Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K., & Nishiyama, Y. (2010). Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. Biofabrication, 2(1), 014110.

Narayanan, G., Vernekar, V. N., Kuyinu, E. L., & Laurencin, C. T. (2016). Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. Advanced drug delivery reviews, 107, 247-276.

Nguyen, K. T., & West, J. L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. Biomaterials, 23(22), 4307-4314.

Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. M., Yamanlar, S., & Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. Biomaterials, 31(21), 5536-5544.

Nogueira, K. A., Cecilia, J. A., Santos, S. O., Aguiar, J. E., Vilarrasa-García, E., Rodríguez-Castellón, E., ve ark. (2016). Adsorption behavior of bovine serum albumin on Zn–Al and Mg–Al layered double hydroxides. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 80(3), 748-758.

Nommeots-Nomm, A., Labbaf, S., Devlin, A., Todd, N., Geng, H., Solanki, A. K., ve ark. (2017). Highly degradable porous melt-derived bioactive glass foam scaffolds for bone regeneration. Acta biomaterialia, 57, 449-461.

O', R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. Science 260: 920-926. Tissue Engineering: The Union of Biology and Engineering, 98.

O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials today, 14(3), 88-95.

Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem cells, 19(3), 193-204.

Olfs, H. W., Torres-Dorante, L. O., Eckelt, R., & Kosslick, H. (2009). Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. Applied clay science, 43(3-4), 459-464.

Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., ve ark. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. Materials Science and Engineering: R: Reports, 58(3-5), 77-116.

Özgümüş, S., Gök, M. K., Bal, A., & Güçlü, G. (2013). Study on novel exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg–Al–Cl layered double hydroxide: synthesis and characterization. Chemical engineering journal, 223, 277-286.

Panjapheree, K., Kamonmattayakul, S., & Meesane, J. (2018). Biphasic scaffolds of silk fibroin film affixed to silk fibroin/chitosan sponge based on surgical design for cartilage defect in osteoarthritis. Materials & Design, 141, 323-332.

Park, J. Y., Choi, Y. J., Shim, J. H., Park, J. H., & Cho, D. W. (2017). Development of a 3D cell printed structure as an alternative to autologs cartilage for auricular reconstruction. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 105(5), 1016-1028.

Park, S. H., Gil, E. S., Shi, H., Kim, H. J., Lee, K., & Kaplan, D. L. (2010). Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis. Biomaterials, 31(24), 6162-6172.

Patel, P. P., Buckley, C., Taylor, B. L., Sahyoun, C. C., Patel, S. D., Mont, A. J., ve ark. (2019). Mechanical and biological evaluation of a hydroxyapatite-reinforced scaffold for bone regeneration. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 107(4), 732-741.

Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2015). 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. Journal of Applied Polymer Science, 132(48).

Perez, R. A., Seo, S. J., Won, J. E., Lee, E. J., Jang, J. H., Knowles, J. C., ve ark. (2015). Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration. Materials Today, 18(10), 573-589.

Piao, H., Kim, M. H., Cui, M., Choi, G., & Choy, J. H. (2019). Alendronate-anionic clay nanohybrid for enhanced osteogenic proliferation and differentiation. Journal of Korean medical science, 34(5).

Pina, S., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2015). Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. Advanced Materials, 27(7), 1143-1169.

Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnology progress, 25(6), 1539-1560.

Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., & Tan, W. (2001). Biochemically functionalized silica nanoparticles. Analyst, 126(8), 1274-1278.

Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. Stem Cell Investigation, 6.

Ramanathan, G., Fardim, P., & Sivagnanam, U. T. (2018). Fabrication of 3D dual-layered nanofibrous graft loaded with layered double hydroxides and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. Process biochemistry, 64, 255-259.

Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., Rahmani, Z., ve ark. (2018). Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: Isolation and characterization. Acta Medica Iranica, 28-33.

Rinoldi, C., Costantini, M., Kijeńska-Gawrońska, E., Testa, S., Fornetti, E., Heljak, M., ve ark. (2019). Tendon tissue engineering: effects of mechanical and biochemical stimulation on stem cell alignment on cell-laden hydrogel yarns. Advanced healthcare materials, 8(7), 1801218.

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nature protocols, 6(10), 1612.

Rodrigues, C. V. M., Serricella, P., Linhares, A. B. R., Guerdes, R. M., Borojevic, R., Rossi, M. A., ve ark. (2003). Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials, 24(27), 4987-4997.

Romeo, V., Gorrasi, G., Vittoria, V., & Chronakis, I. S. (2007). Encapsulation and exfoliation of inorganic lamellar fillers into polycaprolactone by electrospinning. Biomacromolecules, 8(10), 3147-3152.

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., ve ark. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering: C, 78, 1246-1262.

Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. Journal of materials science, 44(21), 5713-5724.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., & Jamshidi, A. (2015). 3-Dimensional cell-laden nano-hydroxyapatite/protein hydrogels for bone regeneration applications. Materials Science and Engineering: C, 49, 835-843.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta biomaterialia, 9(8), 7591-7621.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Jamshidi, A., & Irani, S. (2013). Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. Materials Science and Engineering: C, 33(5), 2776-2787.

Sadeghi, M., & Heidari, B. (2011). Crosslinked graft copolymer of methacrylic acid and gelatin as a novel hydrogel with pH-responsiveness properties. Materials, 4(3), 543-552.

Sahu, N., Baligar, P., Midha, S., Kundu, B., Bhattacharjee, M., Mukherjee, S., ve ark. (2015). Nonmulberry silk fibroin scaffold shows superior osteoconductivity than mulberry silk fibroin in calvarial bone regeneration. Advanced healthcare materials, 4(11), 1709-1721.

Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., & Davies, J. E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem cells, 23(2), 220-229.

Schexnailder, P., & Schmidt, G. (2009). Nanocomposite polymer hydrogels. Colloid and Polymer Science, 287(1), 1-11.

Schneider, R. K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., ve ark. (2010). The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. Biomaterials, 31(3), 467-480.

Sears, N. A., Seshadri, D. R., Dhavalikar, P. S., & Cosgriff-Hernandez, E. (2016). A review of three-dimensional printing in tissue engineering. Tissue Engineering Part B: Reviews, 22(4), 298-310.

Shafiei, SS., Shavandi, M., Ahangari, G., & 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, 52-63.

Shahini, A., Yazdimamaghani, M., Walker, K. J., Eastman, M. A., Hatami-Marbini, H., Smith, B. J., ve ark. (2014). 3D conductive nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. International journal of nanomedicine, 9, 167.

Shi, W., Sun, M., Hu, X., Ren, B., Cheng, J., Li, C., ve ark. (2017). Structurally and functionally optimized silk-fibroin–gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury in vitro and in vivo. Advanced materials, 29(29), 1701089.

Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. Biomaterials, 24(24), 4353-4364.

Shin, S. R., Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Dang, T. T., Topkaya, S. N., Gao, X., Yang, S. Y., ve ark. (2013). Cell-laden microengineered and mechanically tunable hybrid hydrogels of gelatin and graphene oxide. Advanced materials, 25(44), 6385-6391.

Shin, S. R., Zihlmann, C., Akbari, M., Assawes, P., Cheung, L., Zhang, K., ve ark. (2016). Reduced graphene oxide-gelMA hybrid hydrogels as scaffolds for cardiac tissue engineering. Small, 12(27), 3677-3689.

Shin, Y. C., Lee, J. H., Kim, M. J., Park, J. H., Kim, S. E., Kim, J. S., ve ark. (2015). Biomimetic hybrid nanofiber sheets composed of RGD peptide-decorated PLGA as cell-adhesive substrates. Journal of functional biomaterials, 6(2), 367-378.

Shivashankar, M., & Mandal, B. K. (2012). A review on interpenetrating polymer network. Int. J. Phram. Phram. Sci, 4(5), 1-7.

Shrivats, A. R., Alvarez, P., Schutte, L., & Hollinger, J. O. (2014). Bone regeneration. İçinde R. Lanza, R. Langer and J. Vacanti (Ed.), In Principles of Tissue Engineering. Boston. Academic Press. pp. 1201-1221.

Sobolewski, K., Bańkowski, E., Chyczewski, L., & Jaworski, S. (1997). Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. Neonatology, 71(1), 11-21.

Sowjanya, J. A., Singh, J., Mohita, T., Sarvanan, S., Moorthi, A., Srinivasan, N., ve ark. (2013). Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 109, 294-300.

Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. Materials today, 11(5), 18-25.

Stocum, D. L. (2001). Stem cells in regenerative biology and medicine. Wound repair and regeneration, 9(6), 429-442.

Subia, B., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. Tissue engineering, 141.

Sun, M., Sun, X., Wang, Z., Guo, S., Yu, G., & Yang, H. (2018). Synthesis and properties of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels and their recent applications in load-bearing tissue. Polymers, 10(11), 1290.

T Brown, P., M Handorf, A., Bae Jeon, W., & Li, W. J. (2013). Stem cell-based tissue engineering approaches for musculoskeletal regeneration. Current pharmaceutical design, 19(19), 3429-3445.

Tamburaci, S., Cecen, B., Ustun, O., Ergur, B. U., Havitcioglu, H., & Tihminlioglu, F. (2019). Production and Characterization of a Novel Bilayer Nanocomposite Scaffold Composed of Chitosan/Si-nHap and Zein/POSS Structures for Osteochondral Tissue Regeneration. ACS Applied Bio Materials, 2(4), 1440-1455.

Tan, H., & Marra, K. G. (2010). Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. Materials, 3(3), 1746-1767.

Tan, H., Huang, D., Lao, L., & Gao, C. (2009). RGD modified PLGA/gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 91(1), 228-238.

Tan, H., Wan, L., Wu, J., & Gao, C. (2008). Microscale control over collagen gradient on poly (L-lactide) membrane surface for manipulating chondrocyte distribution. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 67(2), 210-215.

Thakur, T., Xavier, J. R., Cross, L., Jaiswal, M. K., Mondragon, E., Kaunas, R., ve ark. (2016). Photocrosslinkable and elastomeric hydrogels for bone regeneration. Journal of biomedical materials research Part A, 104(4), 879-888.

Theiss, F. L., Ayoko, G. A., & Frost, R. L. (2017). Removal of iodate (IO_3^-) from aqueous solution using LDH technology. Materials Chemistry and Physics, 202, 65-75.

Tissue Engineering (2020). Tissue Engineering Project 2020. Erişim: 15.12.20, https://tissueengineeringproject.weebly.com/

Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 6(1), 112-118.

Tripathi, G., & Basu, B. (2012). A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. Ceramics International, 38(1), 341-349.

Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews immunology, 8(9), 726-736.

Usal, T. D., Yucel, D., & Hasirci, V. (2019). A novel GelMA-pHEMA hydrogel nerve guide for the treatment of peripheral nerve damages. International journal of biological macromolecules, 121, 699-706.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., & Gough, J. E. (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. Clinical Otolaryngology & Allied Sciences, 28(3), 165-172.

Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a biomaterial. Progress in polymer science, 32(8-9), 991-1007.

Vescovi, A., Gritti, A., Cossu, G., & Galli, R. (2002). Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. Cells Tissues Organs, 171(1), 64-76.

Walsh, J. S. (2015). Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. Surgery (Oxford), 33(1), 1-6.

Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., ve ark. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem cells, 22(7), 1330-1337.

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. Stem cells international, 2018.

Wang, S. L., & Wang, P. C. (2007). In situ XRD and ATR-FTIR study on the molecular orientation of interlayer nitrate in Mg/Al-layered double hydroxides in water. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 292(2-3), 131-138.

Wang, S., Lee, J. M., & Yeong, W. Y. (2015). Smart hydrogels for 3D bioprinting. International Journal of Bioprinting, 1(1).

Wang, W., & Yeung, K. W. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Bioactive Materials, 2(4), 224-247.

Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. Annual review of materials science, 28(1), 271-298.

Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2019). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. StemJournal, 1(1), 1-25.

Wu, L., & Ding, J. (2005). Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly (D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and

The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 75(4), 767-777.

Wu, Y., Zhu, R., Zhou, Y., Zhang, J., Wang, W., Sun, X., ve ark. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles promote self-renewal of mouse embryonic stem cells through the PI3K signaling pathway. Nanoscale, 7(25), 11102-11114.

Xavier, J. R., Thakur, T., Desai, P., Jaiswal, M. K., Sears, N., Cosgriff-Hernandez, E., ve ark. (2015). Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. ACS nano, 9(3), 3109-3118.

Xiao, W., He, J., Nichol, J. W., Wang, L., Hutson, C. B., Wang, B., ve ark. (2011). Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. Acta biomaterialia, 7(6), 2384-2393.

Xiao, W., Li, J., Qu, X., Wang, L., Tan, Y., Li, K., ve ark. (2019). Cell-laden interpenetrating network hydrogels formed from methacrylated gelatin and silk fibroin via a combination of sonication and photocrosslinking approaches. Materials Science and Engineering: C, 99, 57-67.

Xu, T., Binder, K. W., Albanna, M. Z., Dice, D., Zhao, W., Yoo, J. J., ve ark. (2012). Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. Biofabrication, 5(1), 015001.

Xu, Z. P., & Lu, G. Q. (2005). Hydrothermal synthesis of layered double hydroxides (LDHs) from mixed MgO and Al2O3: LDH formation mechanism. Chemistry of materials, 17(5), 1055-1062.

Yan, L. P., Salgado, A. J., Oliveira, J. M., Oliveira, A. L., & Reis, R. L. (2013). De novo bone formation on macro/microporous silk and silk/nano-sized calcium phosphate scaffolds. Journal of bioactive and compatible polymers, 28(5), 439-452.

Yeh, J., Ling, Y., Karp, J. M., Gantz, J., Chandawarkar, A., Eng, G., ve ark. (2006). Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. Biomaterials, 27(31), 5391-5398.

Ying, G., Jiang, N., Yu, C., & Zhang, Y. S. (2018). Three-dimensional bioprinting of gelatin methacryloyl (GelMA). Bio-Design and Manufacturing, 1(4), 215-224.

Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. Biomaterials, 73, 254-271.

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. Stem cell research & therapy, 10(1), 68.

Zare, S., Kurd, S., Rostamzadeh, A., & Nilforoushzadeh, M. A. (2014). Types of stem cells in regenerative medicine: a review. J Skin Stem Cell, 1(3).

Zhang, M., Gao, B., Yao, Y., & Inyang, M. (2013). Phosphate removal ability of biochar/MgAl-LDH ultra-fine composites prepared by liquid-phase deposition. Chemosphere, 92(8), 1042-1047.

Zhang, Q., Yan, S., & Li, M. (2009). Silk fibroin based porous materials. Materials, 2(4), 2276-2295.

Zhang, Y., Wu, C., Friis, T., & Xiao, Y. (2010). The osteogenic properties of CaP/silk composite scaffolds. Biomaterials, 31(10), 2848-2856.

Zhao, H., Liu, M., Zhang, Y., Yin, J., & Pei, R. (2020). Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. Nanoscale, 12(28), 14976-14995.

Zhao, L., Weir, M. D., & Xu, H. H. (2010). Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering. Biomaterials, 31(14), 3848-3857.

Zheng, J., Zhao, F., Zhang, W., Mo, Y., Zeng, L., Li, X., ve ark. (2018). Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration. Materials Science and Engineering: C, 89, 119-127.