TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK YENİLENMESİNE YÖNELİK OTOLOG BİLEŞENLİ KOMPOZİT YAPI İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Dilara ARAL

DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Kemik Yenilenmesine Yönelik Otolog Bileşenli Kompozit Yapı İskelelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: **Dilara ARAL**

Tarih: 28.06.2022

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalında Dilara ARAL tarafından hazırlanan "Kemik Yenilenmesine Yönelik Otolog Bileşenli Kompozit Yapı İskelelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.06.2022

Dr. Öğr. Üyesi Cem BAYRAM
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
İçindekiler iv
Önsöz vi
Simgeler ve Kısaltmalar viii
Şekiller xi
Çizelgeler xiv

1. GİRİŞ 1
1.1. Kemik 2
1.1.1. Kemik Doku: Etimolojisi, Histolojisi ve Anatomisi 2
1.1.2. Kemik Hücreleri 3
1.1.3. Kemik Matrisi 4
1.2. Doku Mühendisliği 4
1.2.1. Kemik Doku Mühendisliği 6
1.2.1.1. Biyomalzemeler 7
1.2.1.2. Hücreler 9
1.2.1.2.a. Kök Hücre 9
1.2.1.2.b. Mezenkimal Kök Hücre 11

2. GEREÇ ve YÖNTEM 12
2.1. Kompozit Biyomalzemenin Hazırlanması 12
2.1.1. Okside Dekstran (OD) Sentezi 12
2.1.2. Trombosit Lizatı (TL) Hazırlanması 13
2.1.3. Kompozit Biyomalzeme Sentezi 14
2.2. Kompozit Biyomalzemenin Biyomineralizasyonu 15
2.2.1. Yapay Vücut Sıvısı (*Simulated Body Fluid*, SBF) Hazırlanması 15
2.2.2. Kompozit Biyomalzemenin SBF İçinde İnkübasyonu 16
2.3. Biyomineralize Kompozit Biyomalzemenin Karakterizasyonu 16
2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi 17
2.3.2. Enerji Dağılımı X-Işını Spektrometresi (EDS) Analizi 17
2.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi 18
2.3.4. Termogravimetrik Analiz (TGA) 18
2.3.5. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analizi 19
2.3.6. Cıva Porozimetresi Analizi 19
2.3.7. Yoğunluk ve Gözeneklilik Ölçümü 19
2.3.8. Su Tutma (Şişme) Analizi 20
2.3.9. Enzimatik Biyobozunma Testi 20
2.3.10. Biyouyumluluk Testleri 20
2.3.10.1. *İn vitro* Sitotoksisite Testi 21
2.3.10.1.a. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) Hücre Kültürü 21
2.3.10.1.b. Ekstraksiyon 21
2.3.10.1.c. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ile Canlılık Analizi 22
2.3.10.2. Hemoliz Testi 23

2.4. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) Hücrelerinin Kültürü ve Hücrelerin Yapı İskeleleri Üzerine Tohumlanması 24
2.4.1. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) Hücrelerinin Kültürü 25
2.4.2. Biyomineralize Edilmiş ve Edilmemiş Yapı İskelelerinin Üzerine Hücre Tohumlanması 25
2.5. Hücreli Yapı İskelelerinin SEM ve EDS Analizi 26
2.6. Kalsiyum (Ca^{+2}) Miktar Tayini 27
2.7. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivite Analizi 28
2.8. Alamar Mavisi ile Canlılık Takibi 29

3. BULGULAR 31
3.1. Kompozit Biyomalzemenin Karakterizasyon Sonuçları 31
3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi Sonuçları 31
3.1.2. Enerji Dağılımı X-Işını Spektrometresi (EDS) Analizi Sonuçları 36
3.1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi Sonuçları 40
3.1.4. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları 44
3.1.5. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analizi Sonuçları 47
3.1.6. Cıva Porozimetresi Analizi Sonuçları 49
3.1.7. Yoğunluk ve Gözeneklilik Ölçümü Sonuçları 49
3.1.8. Su Tutma (Şişme) Analizi Sonuçları 50
3.1.9. Enzimatik Biyobozunma Testi Sonuçları 52
3.1.10. Biyouyumluluk Testleri Sonuçları 54
3.1.10.1. *İn vitro* Sitotoksisite Testi Sonuçları 54
3.1.10.2. Hemoliz Testi Sonuçları 55
3.2. Hücreli Yapı İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları 55
3.3. Hücreli Yapı İskelelerinin EDS Analizi Sonuçları 62
3.4. Kalsiyum (Ca^{+2}) Miktar Tayini Sonuçları 68
3.5. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivite Analizi Sonuçları 69
3.6. Alamar Mavisi ile Canlılık Analizi Sonuçları 70

4. TARTIŞMA 71
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 75
ÖZET 77
SUMMARY 78
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 85

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, günümüzde ihtiyaç duyulan, daha yüksek rejeneratif kapasiteye ve daha iyi rejeneratif kemik oluşturma potansiyeline sahip otolog bileşenli kompozit yapı iskelesi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla otolog bileşen olarak kullanılan trombosit lizatının çapraz bağlanmasıyla oluşturulan makro gözenekli kompozit yapı iskeleleri, yapay vücut sıvısı içerisinde biyomineralize edilmiş ve geliştirilen iskelelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı yöntemlerle karakterize edilen yapı iskelelerinin hücre kültürü için uygun gözenekliliğe ve kemik doku oluşumu için uygun mukavemete sahip oldukları belirlenmiştir. Bunun yanında biyobozunur olmaları, hemolitik ve sitotoksik etkiye sahip olmamaları biyouyumlu olduklarını göstermiştir. Geliştirilen yapı iskeleleri üzerine insan fetal osteoblast hücreleri tohumlanmış ve iskeleler farklı zaman aralıklarında (7-14-21-28 gün) standart ve osteojenik indüksiyon besiyerlerinde kültüre edilerek osteojenik farklılaşma bakımından kalsiyum miktar tayini ve ALP aktivite analizleri ile karakterize edilmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, geliştirilen yapı iskelelerinin biyomineralize edilmeleri halinde osteojenik farklılaşmayı daha çok desteklediği bulunmuştur.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasını sağlayan, başta bana güvenerek çalışmam için bu konuyu uygun gören, laboratuvarında yer açan ve her türlü imkânı sağlayan, derslerinde verdiği bilgilerle yolumu aydınlatan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN'e,

Çalışmayı yürütürken tecrübelerini benimle paylaşan, öğretici bilgileriyle beni yönlendiren, çalışmada ve çalışma sürecinde çok büyük emeği olan sayın hocam Doç. Dr. Şükran ŞEKER'e,

Onsuz asla başaramayacağım, her adımımda beni destekleyen, gerek derste gerekse ders dışında her zaman ulaşabildiğim ve her an yardım alabildiğim, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca kendisinden aldığım derslerde edindiğim tüm bilgiler için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Klara DALVA'ya,

Laboratuvar çalışmalarımda bana her zaman destek olan tüm ElçinLab ailesine ve canım arkadaşlarıma,

Tez yazım aşamasında en çok destek aldığım, iyi ki var dediğim biricik kardeşim Başak ARAL'a,

Eğitim hayatıma başladığım günden beri maddi-manevi desteğim, her kararımda bana güvenen ve beni destekleyen, yaşam sponsorum canım annem Makbule ARAL'a,

Devamlı benim için koşturan, günün erken saatleri ya da gecenin geç saatleri fark etmeksizin beni bekleyen, götürüp getiren destekçim, ulaşım sponsorum canım babam Murat ARAL'a,

En içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

$(CH_2OH)_3CNH_2$	Tris(hidroksimetil)aminometan
°	Derece
˚C	Derece Celcius
A	Absorbans
ADKH	Adipoz doku kök hücreleri
ALP	Alkalen fosfataz
ASEPH	Amniyon sıvısı epitelyal progenitör hücreler
ASMKH	Amniyon sıvısı mezenkimal kök hücreleri
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
cm^{-1}	Wavenumber (dalga sayısı)
CO_2	Karbondioksit
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
dk	Dakika
dl	Desilitre
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
EDS	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (Enerji Dağılım X-Işını Spektroskopisi)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKH	Embriyonik kök hücre
EPH	Epitelyal progenitör hücreler
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FKH	Fetal kök hücre
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
g	Gram
G	Yerçekimi Kuvveti
GKEPH	Göbek kordonu epitelyal progenitör hücreler
GKMKH	Göbek kordonu mezenkimal kök hücreler

H_2O	Distile su
HAp	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik asit
HDM	Hücre dışı matris
hFOB	Human fetal osteoblast
HKH	Hematopoietik kök hücre
IU	International unit
K_2HPO_4	Potasyum fosfat dibazik
KCl	Potasyum klorür
KİKH	Kemik iliği kök hücreleri
KKKH	Kordon kanı kök hücresi
KVEPH	Koryonik villus epitelyal progenitör hücreleri
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
MIP	Mercury Intrusion Porosimeter (Cıva Porozimetresi)
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mol	Birim hacimdeki madde miktarı
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NK	Negatif kontrol
NKH	Nöral kök hücre
nm	Nanometre
OD	Okside dekstran
OD_{612nm}	612 nm dalgaboyunda elde edilen optik yoğunluk
OI	Osteojenik indüksiyon
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfatlı Tampon Çözeltisi)
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poliglikolik asit
pH	Asitlik derecesi

PK	Pozitif kontrol
PKH	Pluripotent kök hücre
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
pNPP	p-nitrofenil fosfat
psi	İnçkare başına libre
RCF	Relative Centrifugal Force
rpm	Revolutions per minute (Dakika başına dönüş sayısı)
SBF	Simulated Body Fluid (Yapay Vücut Sıvısı)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)
ß	Beta
SV	Standart vasat (besiyeri)
t	Zaman
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGA	Termogravimetrik Analiz
TL	Trombosit lizatı
TZP	Trombositten zengin plazma
uPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre
v	Hacim
V_p	Gözenek hacmi
V_s	İskele hacmi
w	Ağırlık
W_f	Son ağırlık
W_i	İlk ağırlık
XRD	X-ray Diffractometry (X-Işını Difraktometresi)
YKH	Yetişkin kök hücre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
ρ_{EtOH}	Etil alkolün özkütlesi

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Okside dekstran sentez aşamaları 13
Şekil 2.2. Trombositten zengin plazmadan (TZP) trombosit lizatı (TL) elde edilmesi 14
Şekil 2.3. Kompozit biyomalzeme sentez aşamaları 15
Şekil 2.4. Kompozit biyomalzemenin biyomineralizasyonu 16
Şekil 2.5. Biyomineralize iskelelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi 17
Şekil 2.6. EDS detektörü 18
Şekil 2.7. Yoğunluk ve gözeneklilik oranı hesaplama formülü 19
Şekil 2.8. Su tutma kapasitesi hesaplama formülü 20
Şekil 2.9. Biyobozunma miktarı hesaplama formülü 20
Şekil 2.10. *İn vitro* sitotoksisite testi ölçüm öncesi görünümü 23
Şekil 2.11. Hemoliz oranı hesaplama formülü 23
Şekil 2.12. Hemoliz testi sonrası örneklerin görünümü 24
Şekil 2.13. İnsan fetal osteoblast hücrelerinin çoğaltılması ve iskeleler üzerine tohumlanması 25
Şekil 2.14. Kalsiyum miktar tayini hesaplama formülü 28
Şekil 2.15. Ca^{2+} miktarı ölçümünün yapıldığı 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü 28
Şekil 2.16. ALP aktivite tepkimesi 28
Şekil 2.17. ALP aktivitesi hesaplama formülü 29
Şekil 2.18. ALP aktivitesi tayini yapılan 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü 29
Şekil 2.19. Alamar Mavisi analizi sonrası kuyucukların görüntüsü 30
Şekil 3.1. İskelenin SBF içerisinde bir günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 32
Şekil 3.2. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 32
Şekil 3.3. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 33
Şekil 3.4. İskelenin SBF içerisinde 10 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 33
Şekil 3.5. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 34
Şekil 3.6. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 34
Şekil 3.7. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X) 35
Şekil 3.8. İskelenin SBF içerisinde inkübasyon öncesi SEM görüntüsü (500X büyütme) 35
Şekil 3.9. İskelenin SBF içerisinde bir günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 36
Şekil 3.10. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 37
Şekil 3.11. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 37
Şekil 3.12. İskelenin SBF içerisinde 10 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 38
Şekil 3.13. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 38
Şekil 3.14. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu 39

Şekil 3.15. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası EDS spektrumu 39
Şekil 3.16. İskelenin SBF içerisinde inkübasyon öncesi EDS spektrumu 40
Şekil 3.17. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası FTIR spektrumu 41
Şekil 3.18. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu 41
Şekil 3.19. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu 42
Şekil 3.20. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu 42
Şekil 3.21. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu 43
Şekil 3.22. Liyofilize trombosit lizatının FTIR spektrumu 43
Şekil 3.23. Liyofilize okside dekstranın FTIR spektrumu 44
Şekil 3.24. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası TGA grafiği 45
Şekil 3.25. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği 45
Şekil 3.26. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği 46
Şekil 3.27. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği 46
Şekil 3.28. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği 47
Şekil 3.29. Yapı iskelelerinin XRD grafiği 48
Şekil 3.30. Yapı iskelelerinin cıva porozimetresi grafiği 49
Şekil 3.31. İskelelerin SBF biyomineralizasyonuna bağlı gözeneklilik oranı değişimi 50
Şekil 3.32. İskelelerin su tutma kapasiteleri 52
Şekil 3.33. İskelelerin biyobozunma miktarları 53
Şekil 3.34. Deney gruplarının canlılık yüzdeleri 54
Şekil 3.35. Deney gruplarının hemoliz yüzdeleri 55
Şekil 3.36. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme) 56
Şekil 3.37. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme) 56
Şekil 3.38. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme) 57
Şekil 3.39. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme) 57
Şekil 3.40. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme) 58
Şekil 3.41. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme) 58
Şekil 3.42. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme) 59
Şekil 3.43. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme) 59

Şekil 3.44. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme) 60
Şekil 3.45. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme) 60
Şekil 3.46. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme) 61
Şekil 3.47. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme) 61
Şekil 3.48. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu 62
Şekil 3.49. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu 62
Şekil 3.50. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu 63
Şekil 3.51. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu 63
Şekil 3.52. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu 64
Şekil 3.53. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu 64
Şekil 3.54. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu 65
Şekil 3.55. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu 65
Şekil 3.56. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu 66
Şekil 3.57. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu 66
Şekil 3.58. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu 67
Şekil 3.59. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu 67
Şekil 3.60. Kalsiyum miktarının deney grupları ve zamana bağlı değişimi 68
Şekil 3.61. ALP aktivitesinin deney grupları ve zamana bağlı değişimi 69
Şekil 3.62. Alamar mavisi ile canlılık testi 70

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. SBF hazırlanırken kullanılan kimyasallar (1,5X konsantrasyon, 1L, pH 7,40) 15
Çizelge 2.2. Kalsiyum standart miktarları 27
Çizelge 3.1. İskelelerin kuru ağırlıkları 50
Çizelge 3.2. İskelelerin ıslak ağırlıkları 51
Çizelge 3.3. İskelelerin su tutma kapasiteleri 51
Çizelge 3.4. İskelelerin üç günlük enzimatik biyobozunma miktarı 52
Çizelge 3.5. İskelelerin yedi günlük enzimatik biyobozunma miktarı 53

1. GİRİŞ

İyi bir doku mühendisliği yapısı doğala benzer yapı iskeleleriyle geliştirilmelidir. Bugüne kadar gerçekleştirilen çok sayıdaki çalışmalara rağmen hala yeni malzeme çeşitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca ilaç çalışmalarına harcanan yüksek meblağlara rağmen başarı oranı düşüktür ve hayvan modelleri insanı tam ve doğru olarak simüle edememektedir. Bu nedenle son yıllardaki doku mühendisliği yaklaşımları ve organoid teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte *in vitro* doku modellerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar ön plana çıkmıştır. Doku mühendisliği her ne kadar nakil için uygun organ ve doku geliştirme hedefiyle ortaya çıkmış olsa da doku oluşturma teknolojileri ve bu konudaki bilgi birikiminin artmasını sağlamıştır, dolayısıyla, *in vitro* doku modeli çalışmaları de bundan faydalanmaktadır.

Çeşitli yaklaşımlar bulunmasına rağmen büyük kemik defektlerinin yenilenmesi ile ilgili sınırlamalar tam olarak çözülememiştir. Mevcut ortopedik biyomalzemeler tam bir yeniden kemik doku oluşumunu sağlamamaktadır (Winkler ve ark., 2018). Bu konuda bazı önemli ilerlemeler de sağlanmıştır (Quinlan ve ark., 2015) fakat kemik düzeninin oluşması için vasküler kemik oluşumu önemli bir kriterdir (Khosla ve ark., 2010). Her ne kadar çeşitli yaklaşımlar olsa da mevcut çalışmalar tam olarak tatmin edici sonuçlara ulaşmamaktadır (Yin ve ark., 2019) ve bu konuda bir arayış sürmektedir. Geliştirilecek doku iskelesinin kemik gelişimine katkı sağlaması beklenmektedir, dolayısıyla kemik oluşumuna katkı sağlayabilecek hücre dışı matris yapı iskelesinin yanı sıra bunun içerisinde mineralize bir yapılanmaya da ihtiyaç vardır (Polo-Corrales ve ark., 2014). Bu kapsamda polimer tabanlı yapı iskeleleri; hidroksiapatit (HAp), beta trikalsiyum fosfat (ß-TCP), diğer kalsiyum fosfat biyoseramikleri tek başlarına veya kompozit olarak kullanılmaktadır (Bao ve ark., 2019; Lin ve ark., 2019; Titorencu ve ark., 2017). Hücre dışı matris (HDM) büyük ölçüde protein yapıda olduğundan, iyi bir kemik doku iskelesi oluşturabilmek için mineralize edilmesi gereklidir (Cancedda, 2009).

Kemik doku mühendisliğinde de kemik onarımına katkı sağlayabilecek, aynı zamanda otolog kaynakların da kullanımına dayanan bir matris yapısı ve yapı iskelesi oluşturulmasına yönelik geliştirilecek yeni bir yaklaşım da önemli bir potansiyel taşımaktadır (Shanbhag ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı, yukarıda verilen bilgiler ışığında, daha yüksek rejeneratif kapasiteye ve daha iyi rejeneratif kemik oluşturma potansiyeline sahip kompozit yapı iskelesi geliştirilmesidir. Kemik doku mühendisliğinde kemik onarımına katkı sağlayabilecek, aynı zamanda otolog kaynakların da kullanımına dayanan bir matris yapısı ve yapı iskelesi oluşturulmasına yönelik geliştirilecek yeni bir yaklaşım getirmek çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır. Kemik doku yapı iskelesi geliştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bu kapsamda kan kaynaklı otolog bileşenlerin kullanımına dayalı yapı iskelesi geliştirilmesine yönelik çalışma sayısının sınırlılığı ve çalışmanın başarılı sonuçlanması kemik doku mühendisliğinde yenileyici tıp açısından yeni bir yaklaşım ortaya konmasını sağlaması çalışmayı özgün kılmaktadır.

1.1. KEMİK

1.1.1. Kemik Doku; Etimolojisi, Histolojisi ve Anatomisi

Kemik doku, omurgalı canlıların iskeletinin temel birimi olarak canlının iç organlarını korumakla ve sağlam yapısıyla canlının duruşunu desteklemekle görevli yapıdır. Bununla birlikte organizmalarda kalsiyum iyonunun (Ca^{2+}) depolandığı yerdir.

Kemik, özelleşmiş bir bağ doku olmasının yanı sıra, mineralize hücre dışı bileşenlerden oluşan kemik matrisine ve üç ana hücre tipine sahip bir yapı olarak şekillenmektedir.

1.1.2. Kemik Hücreleri

Kemik hücrelerinin sahip olduğu üç ana hücre tipi: *osteoblast, osteosit* ve *osteoklast*'tır.

Osteoblast, yunanca *osteon* (kemik) ve *blastos* (tohum) kelimelerinin birleşiminden oluşan bir kavram olarak literatürde kendine yer bulmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerden köken alan osteoprogenitör hücrelerin farklılaşması ile oluşan ve kemik matrisinin organik bileşenlerini (tip 1 kolajen iplikleri, proteoglikanlar, osteonektin ve osteokalsin gibi matrisin minerilizasyonunu sağlayan ve osteoid denilen mineralize olmamış başlangıç matrislerini) sentezlemek gibi özelliklere sahip hücrelerdir. Bir kısmı, matris ile çevrelenmiş lakuna içinde osteositlere farklılaşırken; bir kısmı da düzleşip matris yüzeyini kaplayan kemik döşeyen hücrelere dönüşmektedir.

Osteosit, *osteo* (kemik) ve *sitos* (hücre) kelimelerinin birleşiminden oluşan kavram, lamel ve lakünler arasında bulunan ve küçük kanaküllerdeki sitoplazmik süreçlerin matrislere dönüştüğü hücreleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Kemik üzerine uygulanan mekanik gerilmenin tespit edilmesinde ve matris yapısının korunmasında görev almaktadır.

Osteoklast, *osteo* (kemik) ve *klastos* (kırılmış) kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Kemik yıkımından ve kemik matrisinin yeniden emilmesinden (*resorpsiyon)* sorumlu hücrelerdir. Bağışıklık sistemi hücrelerinden monositler kemiğin yeniden emilmesinde görev alan hücrelerdir.

1.1.3. Kemik Matrisi

Kemik matrisinin yarısı osteoblastlar tarafından sentezlenen organik yapılardan oluşurken; diğer yarısını inorganik maddeler oluşturmaktadır. Kalsiyum hidroksiapatit, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları bu inorganik bileşenlerden bazılarıdır. Osteonektin, osteokalsin ve osteopontin kemik matrisini oluşturan başlıca glikoproteinlerdir.

1.2. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği hasarlı ve/veya kayıp doku ve organların yerini alması amacıyla yeni doku ve organların doğala eşdeğer şekilde geliştirilmesini hedefleyen bir yenileyici tıp alanıdır. Bu amaçla otolog, allojenik veya zenojenik doku kaynakları kullanılmaktadır. Otolog kaynaklar bireyin kendine ait dokularından elde edilirler ve bu sayede bağışıklık yanıtı oluşturmazlar; ancak kullanımları kısıtlıdır. Allojenik kaynaklar aynı tür içindeki başka bir bireyden elde edilirler bu nedenle oluşacak bağışıklık yanıtını engellemek için bağışıklık baskılayıcı ajanlar kullanılır. Bu hücrelerin kullanımları yaygındır. Zenojenik kaynaklar ise farklı türlerin bireylerinden elde edilirler, çok yaygın kullanımda değillerdir, ileri derecede bağışıklık yanıtı oluştururlar ve implantasyon öncesinde işlem gerektirirler (Elçin, 2008).

Doku mühendisliği alanındaki güncel ve önemli gelişmeler arasında biyobasım, mekanobiyolojik uyarım, uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH), hücresizleştirilmiş organlar, immünomodülasyon, biyoortogonal kimyasal yapılar ve Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) teknolojileri sayılabilir. Bununla birlikte, son on yılda uPKH ve yetişkin kök hücreler (YKH)'in kullanımı ve CRISPR-Cas9 gibi genetik araçlar hücre mühendisliği; yeni kimyasal yapıların ve büyüme faktörlerinin hücrelere verilme mekanizmalarının geliştirilmesi ile biyomekanik alanı malzeme mühendisliği; kendiliğinden bir araya gelme, üç boyutlu basım ve hücresizleştirilmiş organlar doku mimarisi mühendisliği konularının gelişmesini sağlamıştır (Khademhosseini ve Langer, 2016).

Doku mühendisliğinin temel bileşenleri hücreler, iskeleler, büyüme faktörleri olarak sayılabilir. Hücre kaynakları embriyonik kök hücreler (EKH); göbek kordonu mezenkimal kök hücreler (GKMKH), göbek kordonu epitelyal progenitör hücreler (GKEPH), koryonik villus epitelyal progenitör hücreleri (KVEPH), amniyon sıvısı mezenkimal kök hücreleri (ASMKH) ve amniyon sıvısı epitelyal progenitör hücreler (ASEPH) gibi fetal doku türevli kök hücreler (FKH); epitelyal progenitör hücreler (EPH), kemik iliği kök hücreleri (KİKH) ve adipoz doku kök hücreleri (ADKH) gibi yetişkin kök hücreler (YKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) olabilir. EKH'ler farklılaşma kapasitelerinin yüksekliği, fenotipik potansiyellerinin sınırsız olması ve kolay çoğaltılabilme avantajlarına sahipken etik kaygılar, tümör oluşturma riski ve izolasyon zorluğu gibi dezavantajlar da getirirler. FKH'lerin çoğaltılmaları kolaydır, engraftman sonrasında teratom oluşturmazlar; ancak fenotipleri sınırlıdır, kullanımları açısından etik kaygılar bulunmaktadır ve izole edilmeleri daha zordur. YKH'ler kolay izole edilirler, vücutta bol miktarda bulunurlar, otolog kullanımda bağışıklık yanıtını baskılarlar ve etik kaygılar kullanımlarını engellemez. Buna karşın YKH'ler de sınırlı fenotipe sahiptir, spesifik belirteçleri yoktur ve elde edilmeleri kolay değildir. uPKH'ler vücutta sınırsız sayıda olup kişiye özel oldukları için bağışıklık yanıtı riski taşımasalar da hangi aşamaya kadar farklılaştırılıp uygulanmaları gerektiğinin bilinmemesi ve tümör oluşturma potansiyelleri nedeniyle

dezavantajlıdırlar (Al-Himdani ve ark., 2017). İskeleler doğal, yapay ve hibrit olarak üç gruba ayrılabilir. Doğal iskele malzemeleri arasında kolajen, jelatin, elastin, keratin, ipek, fibrinojen, proteoglikanlar gibi proteinler; arabinoksilan, ksiloglukan, ß-glukan, selüloz, nişasta, aljinat, glikozaminoglikan, kitin/kitosan ve hyaluronik asit gibi polisakkaritler sayılabilirken; sentetik iskele malzemeleri arasında polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve onların kopolimerleri (polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)), polikaprolakton (PCL) sayılabilir. Bunların dışında doğal ve sentetik biyomalzemelerin bir arada kullanımıyla oluşturulan hibrit iskeleler de bulunmaktadır (Aslam Khan ve ark., 2021; Chesterman ve ark., 2020).

Doku mühendisliği uygulamalarında dikkat edilmesi gereken beş temel ilke şu şekilde sıralanabilir: kullanılacak iskeleler: doğal, sentetik veya hibrit; seçilecek hücre kaynakları: kök hücreler, progenitör hücre veya farklılaşmış hücreler; birleştirilme: hücre tohumlama, biyobasım veya mikroküreler; büyüme ve olgunlaşma: büyüme faktörleri, anjiyogenez veya biyoreaktör/*in vivo*; uygulama güvenliği: bağışıklık yanıtı, sterilite ve kanser oluşumu (Al-Himdani ve ark., 2017).

Doku mühendisliği uygulamalarının başlıca kısıtlamaları ise depolama/dağıtım, kontaminasyon riski, ölçek büyütme/dağıtma, maliyet, uzun dönem etkilerin belirsizliği, yasal onaylar ve standardizasyondur (Al-Himdani ve ark., 2017).

1.2.1. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik, insan vücudunda yaralanma sonrası rejenerasyon yeteneğine sahip form ve fonksiyonunu yeniden oluşturabilen bir dokudur. Kemik rejenerasyonu, normal kırık iyileşmesi sırasında görülebilen ve yetişkin yaşamı boyunca sürekli yeniden şekillenmeye dahil olan karmaşık ve iyi yönetilen fizyolojik bir kemik oluşum

sürecidir (Dimitriou ve ark., 2011). Ancak kemik yenilenmesiyle ilgili kısıtlamalar mevcuttur; iyi bir kemik yenilenmesi ve kemiğin yeniden inşası ile ilgili yeni gelişmelere ihtiyaç vardır.

Kemik doku mühendisliğinde kemik yenilenmesini teşvik edecek biyomalzemelerin sahip olması gereken biyolojik özellikler; biyouyumluluk, biyobozunurluk, biyoaktiflik, biyoemilebilirlik, immunojenik olmama şeklinde sıralanabilir. Yapısal özellikler ise özelleştirilebilirlik, açık ve bağlantılı porlara sahip olma, uygun yüzey topografisi, dokuya göre farklılık gösteren mekanik özelliklere sahip olma olarak sıralanabilir. Bu biyomalzemeler metallerin, polimerlerin, biyoseramiklerin veya bunların kompozitlerinin bileşiminden meydana gelebilir. Biyomalzemelerin üretiminde gaz köpüklendirme, çözücü döküm, dondurarak kurutma, hassas işleme ve eklemeli üretim tekniklerinden yararlanılabilir. Kemik yenilenmesini teşvik eden biyomalzemelerin üretim sırasında ve sonrasında test edilmesi üç evrede gerçekleşir. Erken evrede *in vitro* koşullarda hücrelerin iskeleye adezyonu, hücre canlılığının ve çoğalmasının (proliferasyon) devam etmesi kontrol edilirken; orta evrede *in vitro* ve *in vivo* koşullarda iskelenin hücrelerin osteojenik farklılaşmasını, damar-kılcal yayılımını (*vascular ingrowth*) ve anjiyogenezi desteklemesine bakılır. Geç evrede ise *in vivo* koşullarda iskelenin konak entegrasyonu, yük taşıma kapasitesi ve yeniden modellemeyi sağlayıp sağlamadığı analiz edilir (Kanzcler ve ark., 2020).

1.2.1.1. Biyomalzemeler

D. F. Williams'ın 1999 yılında yayımladığı *The Williams Dictionary of Biomaterials* kitabındaki ikinci tanıma göre biyomalzeme, "vücuttaki herhangi bir dokuyu, organı veya işlevi değerlendirmek, tedavi etmek, artırmak veya değiştirmek için biyolojik sistemlerle arayüz oluşturma niyetinde olan malzeme"dir. (Williams,

1999, s:42). Yine aynı kitapta biyouyumluluk, “bir malzemenin belirli bir uygulamada uygun konak yanıtı ile performans göstermesi” olarak tanımlanmaktadır (Williams, 1999, s:40).

Doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılan biyomalzemelerin sahip olması gereken özellikler: biyomimetik olma; biyobozunurluk; uygun mekanik dayanıma sahip olma; gaz, besin, atık alışverişine ve hücre göçüne elverişli uygun por yapısına sahip olma; biyouyumluluk; immunojenik olmama; kullanılacak üretim yöntemine uygun yapıda ve özellikte olma ve işlev kazandırılabilir olma olarak sıralanabilir. Kullanılan doğal ve sentetik iskelelerin birbirlerine göre avantajlı ve dezavantajlı oldukları durumlar vardır. Doğal iskeleler daha öngörülebilir ve tekrarlanabilir mekanik ve fiziksel özelliklere sahipken -özellikle gerilim kuvveti, bozunma hızı ve elastik modülü bakımından- biyolojik iskeleler üretimden üretime farklılık gösterirler, mekanik özellikleri sınırlıdır ve tekrarlanabilirlikleri düşüktür. Biyouyumluluk, hücre dostu olma ve toksisite bakımından biyolojik iskeleler daha avantajlı iken sentetik iskeleler biyolojik işaretçilerden yoksundurlar ve bağışıklık yanıtına neden olma, toksik etki gösterme, enfeksiyona yol açma gibi risklere sahiptirler. Maliyet açısından bakıldığında biyolojik iskeleler belirli işleme ve üretim koşullarına ihtiyaç duymaları sebebiyle, kolaylıkla temin edilebilen sentetik iskelelere göre dezavantajlı durumdadırlar (Al-Himdani ve ark., 2017).

Otolog doku kaynaklarının kısıtlı olması da göz önüne alındığında kan kaynaklı ürünler önemli bir ilgi odağı haline gelmektedir (Lu ve ark., 2011). Kan kaynaklı otolog ürünlerden trombosit lizatı (TL) ve trombositten zengin plazma (TZP) son zamanlarda doku mühendisliği alanında sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Lalegül-Ülker ve ark., 2019). Anjiyogenezin düzenlenmesinden ve yara iyileşmesinden sorumlu sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yüksek miktarda bulunduğu TL, TZP’den elde edilir (Naskou ve ark., 2018). Otolog trombosit kaynaklı ürünler yıllardır yumuşak ve sert doku hasarlarında kullanılmaktadır (Liao ve ark., 2014; Gentile ve ark., 2010), TZP kökenli biyomalzemelerin kemik doku iyileşmesini ve

yenilenmesini desteklediği klinik-öncesi ve klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (Smith ve ark., 2013; Cervelli ve ark., 2011). TL ayrıca kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını da desteklemektedir (Babo ve ark., 2014). Otolog kaynaklar ayrıca doku reddini ve hastalık geçiş riskini ortadan kaldırma potansiyeline de sahiptir.

1.2.1.2. Hücreler

1.2.1.2.a. Kök Hücre

Kök hücre kendini yenileme, farklılaşmadan kalma, yeni kök hücreler üretme (klon oluşturabilme) ve diğer özelleşmiş hücrelere farklılaşma (potensi) özelliklerine sahip bir hücre türüdür (Weissman ve ark., 2001; Smith, 2001). Kök hücreler; farklılaşma potansiyellerine ve elde edildikleri kaynaklara göre iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar.

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olmak üzere beş gruba ayrılırlar. Totipotent kök hücreler hem embriyonun tüm dokularına hem de embriyo dışı dokulara farklılaşarak organizmanın tamamını oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Sperm ve yumurtanın bir araya gelmesiyle oluşan zigot ve döllenmeden sonraki ilk dört gün içinde oluşan hücreler totipotent özelliktedirler. Pluripotent kök hücreler (PKH) organizmanın bütün hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler, embriyo dışı dokuları oluşturamazlar. Bu hücrelere embriyonik kök hücreler (EKH) örnek verilebilir. Embriyonik kök hücre özelliği kazandırılmış yetişkin kök hücreler (uyarılmış pluripotent kök hücreler, uPKH) yetişkin dokulardan izole edilen hücrelerin genetik yeniden programlama ile embriyonik kök hücre gibi davranan hücreler haline

gelmesiyle oluşan hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler yerine yeniden programlanmış hücrelerin kullanılmasıyla kök hücrelerin oluşturduğu bağışıklık yanıtı engellenebilir olsa da değiştirilmiş yetişkin hücrelerinin yan etkileri henüz bilinmemektedir. Multipotent kök hücreler embriyonik gelişimin ileri evrelerinde görülen ve bulundukları organ ve dokulardaki hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Kemik iliği, periferik kan, göbek kordon kanından elde edilen ve tüm kan hücrelerini oluşturabilme yeteneğine sahip hematopoietik kök hücreler (HKH), kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonundan elde edilen ve üç eşey tabakasından dokulara farklılaşabilen mezenkimal kök hücreler (MKH) ile beyin ve omurilikten elde edilen ve sinir hücrelerine farklılaşabilen nöral kök hücreler (NKH) bunlara örnek verilebilir. Oligopotent kök hücreler organizmadaki birkaç hücre tipine farklılaşabilirler, myeloid kök hücreler ve lenfoid kök hücreler bunlara örnek verilebilir. Unipotent kök hücreler tek bir hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir, kas kök hücresi gibi. Progenitör hücreler ise eğer bölünme sırasında kendilerinden bir tane daha oluşturabiliyorsa kök hücre özelliği taşırlar.

Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler embriyodan ve embriyo dışı dokulardan olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Embriyodan elde edilen kök hücreler (embriyonik kök hücre, EKH) 1998 yılında Nobel ödüllü bilim insanı James A. Thompson tarafından keşfedilmişlerdir, döllenmeden sonraki beşinci günde embriyonun yaklaşık 150 hücreye sahip blastokist aşamasından elde edilirler. Embriyonik kök hücreler, pluripotent özellikte olup vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler; ancak EKH'lerin elde edilme şekillerinden kaynaklı olarak birçok etik kaygı bulunmaktadır. Embriyo dışı dokulardan elde edilen kök hücreler de fetal kök hücreler (FKH), kordon kanı kök hücreleri (KKKH) ve yetişkin kök hücreleri olarak üç sınıfta incelenirler. Fetal kök hücreler (FKH) embriyonun döllenmeden sonraki 7-8 haftalık döneminde fetüsten elde edilirler, pluripotent özelliktedirler ve gamet hücrelerini oluşturabilirler. Doğumdan sonra göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) ve kordon kanından elde edilen hematopoietik kök hücreler (HKH) multipotent özelliktedirler. Yetişkin kök hücreler (YKH) kemik iliği ve yağ gibi dokularda bulunan, embriyonik kök hücreler ile kıyaslandığında daha

sınırlı farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Yetişkin kök hücrelerin embriyonik kök hücreler kadar dayanıklı olmaması ve her hücre tipine farklılaşamaması hastalıkların tedavisinde kullanımlarını kısıtlamaktadır. Ayrıca yetişkin kök hücreler çevresel zararlardan veya çoğalma sırasında meydana gelen mutasyonlardan dolayı anomalilere sahip olabilmektedirler.

1.2.1.2.b. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)

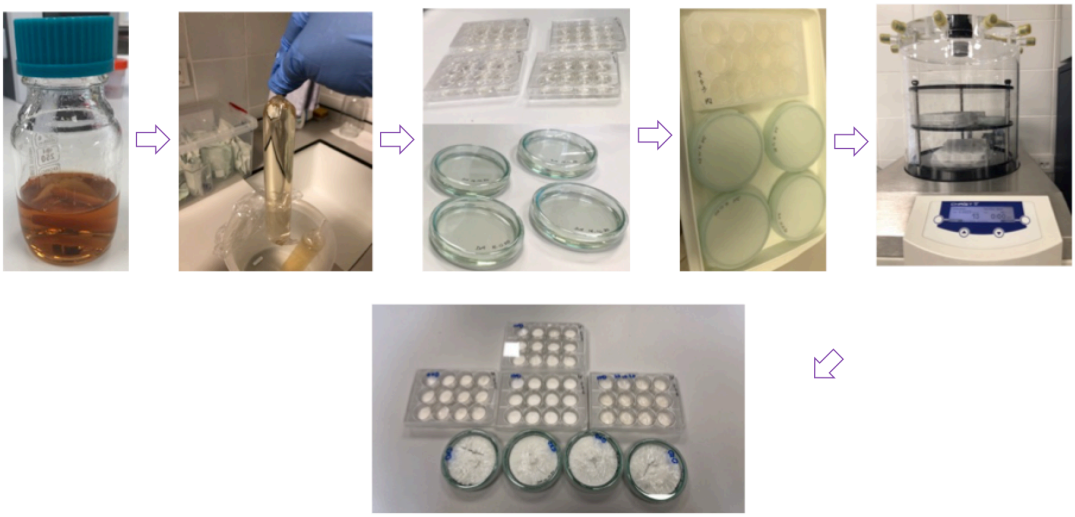
Mezenkimal kök hücreler ilk defa 1976 yılında Friedenstein A. J. ve ark. tarafından izole edilen, mezenkimal stromal kök hücreler veya multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da isimlendirilirler. Bütün kök hücrelerin ortak özelliği olan kendini yenileyerek kök hücre havuzunu koruma, farklılaşarak eksik veya hasarlı hücrelerin yerini alma özelliklerinin yanı sıra, salgıladığı moleküllerle bağışıklık sistemini düzenleme, kültür kabına yapışabilme, uygun koşullarda üç eşey tabakasından köken alan (*tri-lineage*) osteojenik, adipojenik, kondrojenik, nörojenik, miyojenik farklılaşma özelliklerine sahip bulunan mezenkimal kök hücreler; özellikle son yıllarda doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanında artan kullanımlarıyla dikkat çekmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının biyoiskele kullanımıyla desteklenebileceği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Westhauser ve ark., 2019; Smith ve ark., 2013; Persson ve ark., 2018).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kompozit Biyomalzemenin Hazırlanması

2.1.1. Okside Dekstran (OD) Sentezi

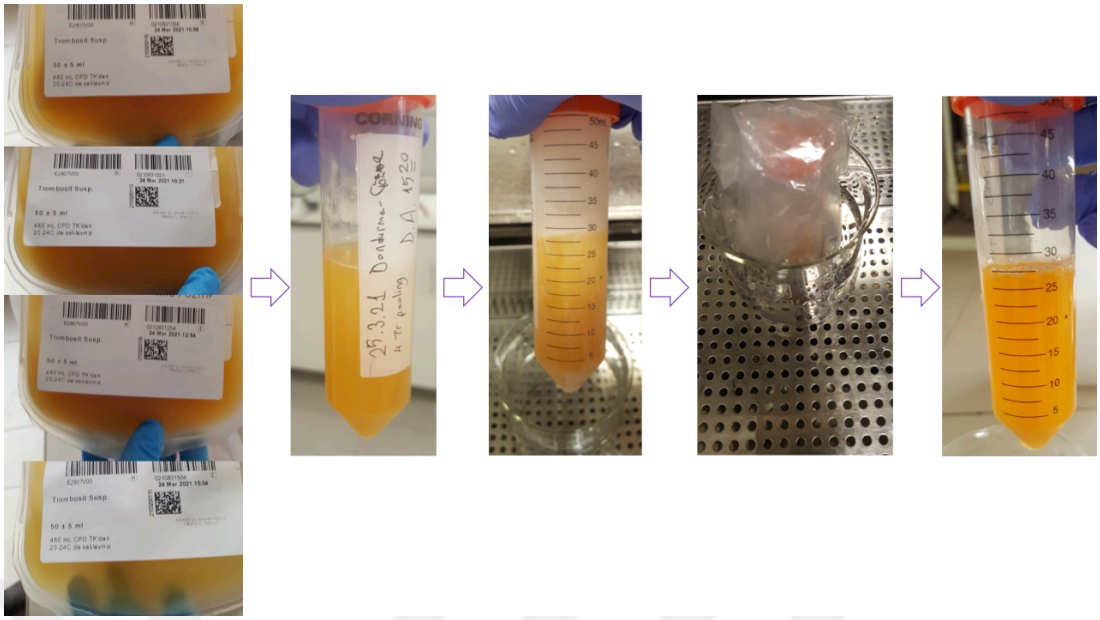
İlk olarak 10 g dekstran (0,0618 mol) 50 ml distile su içinde çözüldü. 50 ml %26,4 (w/v) taze hazırlanmış sodyum periyodat (0,0618 mol) çözeltisi yavaşça dekstran çözeltisine eklendi. Karışım bir saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında karıştırıldı. Oksidasyon reaksiyonunu durdurmak için karışıma sodyum periyodat ile aynı molar orana sahip propilen glikol (4,53 ml) eklendi. Çözelti diyaliz torbasına aktarıldı ve distile su içerisinde bir hafta boyunca 4°C'de günde iki kere suyu değiştirilerek diyaliz edildi. Diyaliz edilen çözelti kültür kaplarına konarak bir gün -80°C sıcaklıkta buzdolabında bekletildi. Çözeltideki suyu uzaklaştırmak için çözelti liyofilize edildi. Liyofilize ürünler parafilmlenip kullanılana kadar 4°C sıcaklıkta buzdolabında saklandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Okside dekstran sentez aşamaları

2.1.2. Trombosit Lizatı (TL) Hazırlanması

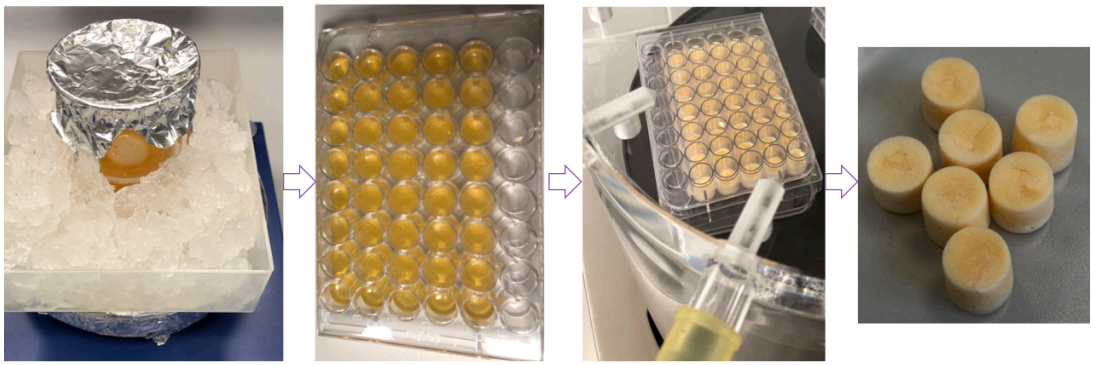
Biriktirilmiş Trombositten Zengin Plazma (TZP) üç kez dondurma-çözme işleminden geçirilerek Trombosit Lizatı (TL) elde edildi. TZP örnekleri 24 saat -80°C sıcaklıkta buzdolabında tutuldu, sonra bir saat 37°C'ye ayarlı su banyosunda bekletildi. Örnekler hücresel atıklardan arındırılmak için 2000 RCF hızında 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatan 0,22 µm steril filtreden geçirildi ve kullanılıncaya kadar -80°C sıcaklıkta buzdolabında saklandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Trombositten zengin plazmadan (TZP) trombosit lizatı (TL) elde edilmesi

2.1.3. Kompozit Biyomalzeme Sentezi

TL/OD kriyojeller TL içindeki plazma proteinlerinin kriyojelleşme reaksiyonu ile elde edildi. %2 OD konsantrasyonuna sahip TL-OD çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler homojen hale gelene kadar buz üstünde manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli olarak karıştırıldı. Kriyojelleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi için çözelti 48 kuyucuklu kültür kaplarına konularak 16 saat boyunca -12°C'de buzdolabında bekletildi. Donmuş örnekler 24 saat boyunca liyofilize edildi. Elde edilen kriyojeller sonraki deneyler için +4°C'deki buzdolabında saklandı.



Şekil 2.3. Kompozit biyomalzeme sentez aşamaları

2.2. Kompozit Biyomalzemenin Biyomineralizasyonu

2.2.1. Yapay Vücut Sıvısı (*Simulated Body Fluid*, SBF) Hazırlanması

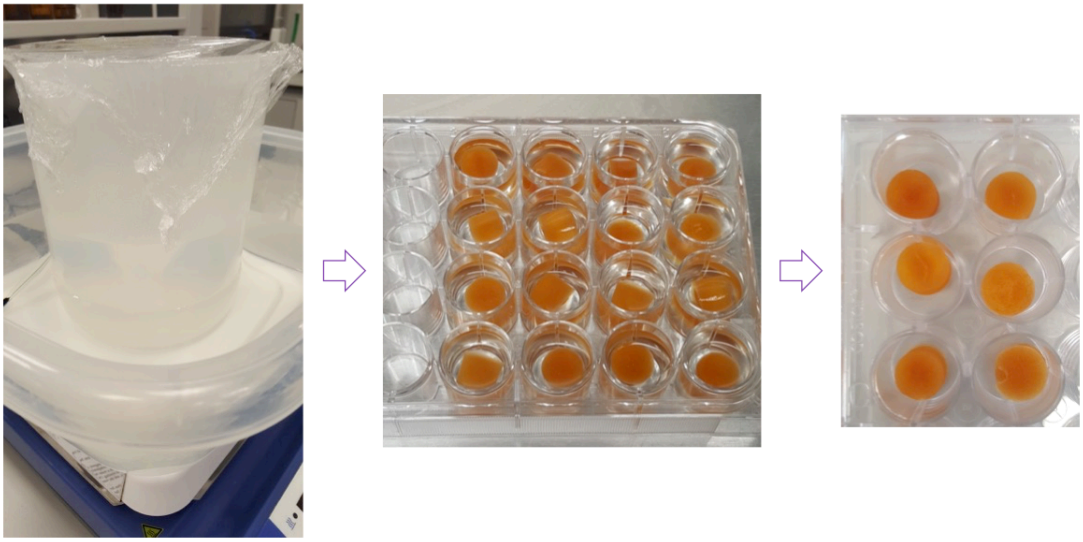
Kompozit biyomalzemenin biyomineralizasyonu için Kokubo ve ark., (1990) tarafından geliştirilen protokolün modifiye edilmesi ile hazırlanan Yapay Vücut Sıvısı (*Simulated Body Fluid,* SBF) kullanıldı (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. SBF hazırlanırken kullanılan kimyasallar (1,5X konsantrasyon, 1L, pH 7,40)

Eklenme Sırası	Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
1	NaCl	11,994 g
2	$NaHCO_3$	0,525 g
3	KCl	0,336 g
4	K_2HPO_4	0,261 g
5	$MgCl_2$	0,214 g
6	1M HCl	60 ml
7	$CaCl_2$	0,417 g
8	Na_2SO_4	0,107 g
9	$(CH_2OH)_3CNH_2$	9,086 g

2.2.2. Kompozit Biyomalzemenin SBF içinde İnkübasyonu

Liyofilize haldeki biyomalzemeler %70'lik etil alkol içerisinde bir gece bekletilerek sterilize edildi, sonra distile su ile ıslatılıp tartıldı. Sterilize edilen biyomalzemeler 12 kuyucuklu kültür kaplarına konularak 1,5X konsantrasyonda Yapay Vücut Sıvısı (*Simulated Body Fluid,* SBF) içerisinde farklı zaman aralıklarında (1, 3, 7, 10, 14 ve 21 gün) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında -80°C'deki buzdolabında dondurulan biyomalzemeler 24 saat boyunca liyofilizasyonla kurutuldu.



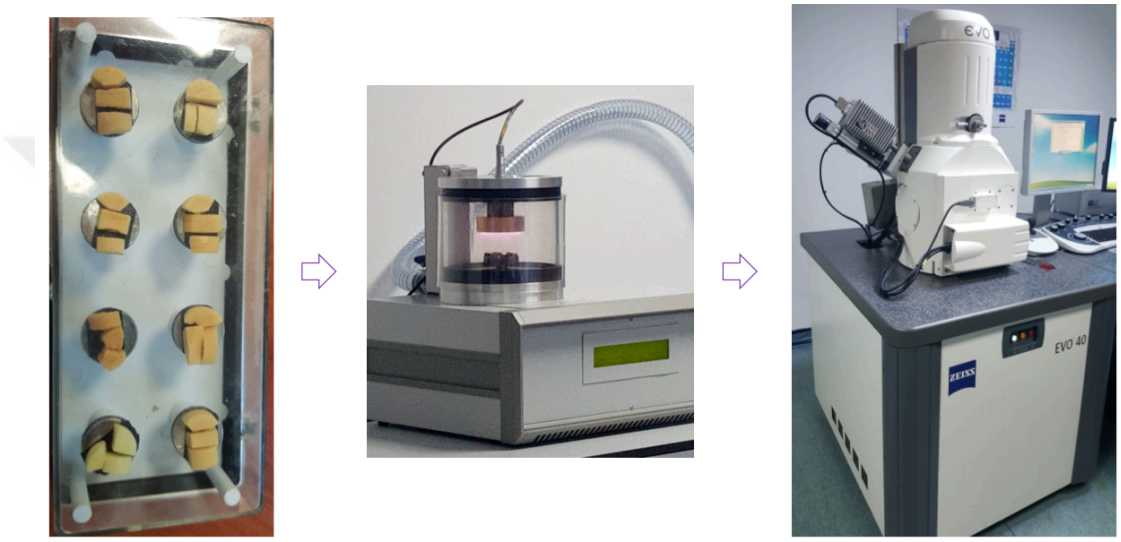
Şekil 2.4. Kompozit biyomalzemenin biyomineralizasyonu

2.3. Biyomineralize Kompozit Biyomalzemenin Karakterizasyonu

Biyomineralize edilen kompozit biyomalzeme fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri açısından analiz edildi.

2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Liyofilize biyomalzemelerin üst yüzey, iç kısım ve yan yüzey olmak üzere kesitleri alınıp bant ile stab üzerine yapıştırıldı. Yüzeyler sıvı grafit ile kaplandıktan sonra altın kaplama işlemi ile iletken hale getirilen numuneler farklı büyütme oranları ile Zeiss Evo 40 taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülendi.



Şekil 2.5. Biyomineralize iskelelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

2.3.2. Enerji Dağılımı X-Işını Spektrometresi (EDS) Analizi

SEM ile görüntülenen numunelerin, Enerji Dağılım X-Işını Spektrometresi (EDS) detektörü kullanılarak element dağılım analizi yapıldı.



Şekil 2.6. EDS detektörü

2.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) Analizi

Liyofilize biyomalzeme toz haline getirildikten sonra Perkin Elmer 400 FTIR cihazı kullanılarak 4cm^{-1} çözünürlükte ve 400-4000cm^{-1} spektrum aralığında analiz edildi.

2.3.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Liyofilize biyomalzeme toz haline getirildikten sonra Perkin Elmer Pyris 1 TGA cihazı ile azot ortamında 25°C-600°C sıcaklık aralığında 10°C/dakika ısıtma hızında toz numunelerdeki kütle kayıpları belirlendi.

2.3.5. X-Işını Difraktometresi (*X-Ray Diffractometry*, XRD) Analizi

Toz halindeki numunelerin 10°-70° aralığında 2°/dakika tarama hızında Rigaku Miniflex XRD cihazı kullanılarak toz kırınım deseni çekildi.

2.3.6. Cıva Porozimetresi (*Mercury Intrusion Porosimetry*, MIP) Analizi

Quantachrome Corporation, Poremaster 60 model cıvalı porozimetre cihazı ile düşük basınçta (50psi'a kadar) liyofilize haldeki numunelerin gözenek boyut dağılım analizi yapıldı.

2.3.7. Yoğunluk ve Gözeneklilik Ölçümü

Yapı iskelelerinin gözeneklilik ve yoğunluklarının ölçümünde sıvı yer değiştirme metodu (Arşimet prensibi) kullanıldı. Liyofilize haldeki yapı iskelelerinin ağırlıkları (W_i) hassas terazi ile ölçüldükten sonra, yapı iskeleleri 5 ml'lik saf etil alkol (EtOH) içerisinde bekletilerek etil alkolün gözenekleri doldurması sağlandı. Etil alkolün içerisinden alındıktan sonra ağırlıkları (W_f) hassas terazi ile yeniden ölçülen yapı iskelelerinin yoğunluk ve gözeneklilik yüzdesi; V_p toplam gözenek hacmi ve V_s iskelenin hacmi olmak üzere aşağıdaki formüller ile hesaplandı (Şekil 2.7).

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = \left(V_p / V_s\right) \times 100$$

$$V_p = (W_f - W_i) / \rho_{EtOH}$$

Şekil 2.7. Yoğunluk ve gözeneklilik oranı hesaplama formülü

2.3.8. Şişme (Su Tutma) Testi

Kompozit yapı iskelelerinin kuru ağırlıkları (W_i) tartılıp not edildi. İskeleler 24 saat PBS içerisinde inkübe edilmelerinin ardından kurutma kâğıdı yardımıyla fazla ıslaklıkları alındıktan sonra ıslak ağırlıkları (W_f) tartılıp not edildi. İskelelerin su tutma kapasiteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.8).

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = [(W_f - W_i) / W_i] \times 100$$

Şekil 2.8. Su tutma kapasitesi hesaplama formülü

2.3.9. Enzimatik Biyobozunma Testi

Enzimatik biyobozunma deneyi için seçilen liyofilize iskeleler kuru halde tartılıp (W_i) not edilmelerinin ardından hücre kültürü deneylerinde kullanılan konsantrasyonda hazırlanan Tripsin/EDTA içerisinde 37˚C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Tripsin/EDTA içerisinde inkübe edilen kompozit yapı iskelelerinden farklı zaman noktalarında alınan örnekler liyofilize edildi ve tartımlar yapıldı (W_f). İskelelerin biyobozunma miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Şekil 2.9).

$$\text{Biyobozunma miktarı (\%)} = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100$$

Şekil 2.9. Biyobozunma miktarı hesaplama formülü

2.3.10. Biyouyumluluk Testleri

Geliştirilen kompozit yapı iskelelerinin biyouyumlulukları *in vitro* sitotoksisite ve hemoliz testleri ile analiz edildi.

2.3.10.1. *İn vitro* Sitotoksisite Testi

Geliştirilen kompozit yapı iskelelerinin insan fetal osteoblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi analiz yöntemiyle analiz edildi.

2.3.9.1.a. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19) Hücre Kültürü

Dondurulmuş insan fetal osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) hücre hattı -80°C sıcaklıkta dondurucudan çıkarıldıktan sonra, DMEM/F12 besiyeri içine alınıp 1500 rpm hızında beş dakika santrifüjlendi. Süpernatan atılarak 3 ml DMEM/F12 besiyeri ile pellet çözüldü. Hücre çözeltisi, içerisinde 12 ml DMEM/F12 besiyeri bulunan T75 hücre kültür kabına ekildi. 24 saatin sonunda, hücreler invert mikroskopta incelendi. Kültür kabı içerisindeki besiyeri uzaklaştırılıp 12 ml taze DMEM/F12 besiyeri eklendi. 24 saat sonra Tripsin/EDTA çözeltisi kullanılarak hücreler toplandı ve sayıldı. Her bir kuyucuğa 50 bin hücre olacak şekilde *in vitro* sitotoksisite testinin pozitif kontrolü için kullanılacak bir adet 24 kuyucuklu kültür kabının 6 kuyucuğuna; negatif kontrol ve deney grubu için kullanılacak 1 adet 24 kuyucuklu kültür kabının tüm kuyucuklarına hücre ekimi gerçekleştirildi.

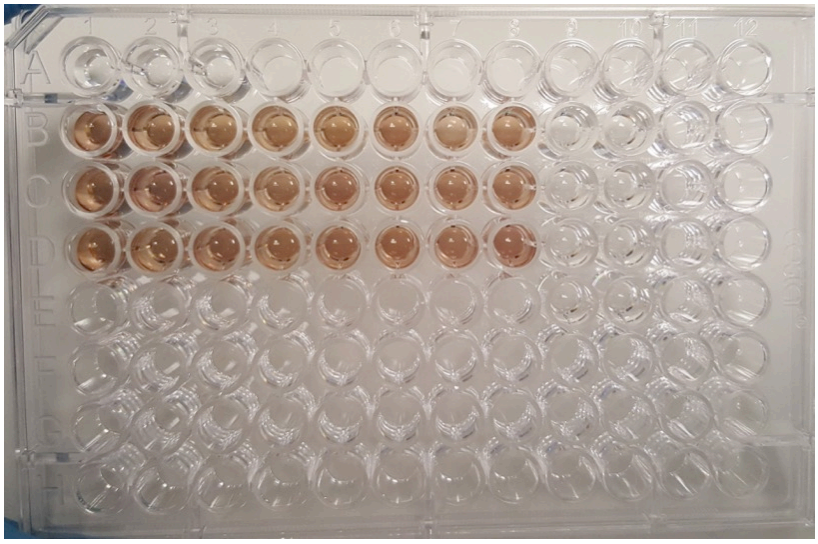
2.3.9.1.b. Ekstraksiyon

Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi için ISO 10993-5 standardına göre ekstraksiyon testi yapıldı. *İn vitro* sitotoksisite testinde kullanılacak liyofilize edilmiş malzemeler, 50 ml falcon tüp içinde 45 ml steril %70'lik etil alkol içine konulup,

aksiyel karıştırıcı üzerinde 16 saat sterilize edildi. 16 saatin sonunda, falcon tüplerdeki etil alkol uzaklaştırılıp, 35 ml steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) konuldu ve 30 dakika aksiyel karıştırıcı üzerine bırakıldı. 30 dakikalık PBS ile yıkama işlemi etil alkolün tamamen uzaklaştırılması için dört kez tekrarlandı. Steril malzemeler, 24 kuyucuklu kültür kaplarına konulup ekstraksiyon için üzerlerine DMEM/F12 besiyeri eklenerek 24 saat 37°C, %5 CO_2 inkübatör içerisinde inkübasyonun ardından ekstraksiyon besiyeri elde edildi.

2.3.9.1.c. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ile Canlılık Analizi

Deney grubu olarak hazırlanan 24 kuyucuklu kültür kabının 12 kuyucuğundaki besiyeri uzaklaştırılıp ekstraksiyon besiyeri hücreler üzerine eklenerek 24 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak hazırlanan 24 kuyucuklu kültür kabındaki hücrelerin besiyeri atıldıktan sonra üzerlerine %0,5 (w/v) ve %1 (w/v) fenol çözeltisi; negatif kontrol olacak kuyucukların besiyeri atıldıktan sonra üzerlerine DMEM/F12 besiyeri eklenerek 24 saatlik inkübasyonun sonunda, tüm kuyucuklardaki fenol/besiyeri uzaklaştırılıp yerlerine serumsuz besiyeri konularak yıkama yapılmasının ardından, 450 µl besiyeri ve 50 µl 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) reaktifi eklendi. 4 saat 37°C inkübatör içerisinde inkübasyonun ardından, kuyucuklardaki karışım uzaklaştırılarak, oluşan formazan kristallerini çözmek için, 500 µl MTT çözücüsü (0,1N HCl/izopropanol) eklendi. Her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol üç tekrarlı olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarından 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı ve 570 nm dalga boyunda SpectraMax M5 mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) cihazında ölçüm alındı (Şekil 2.10).



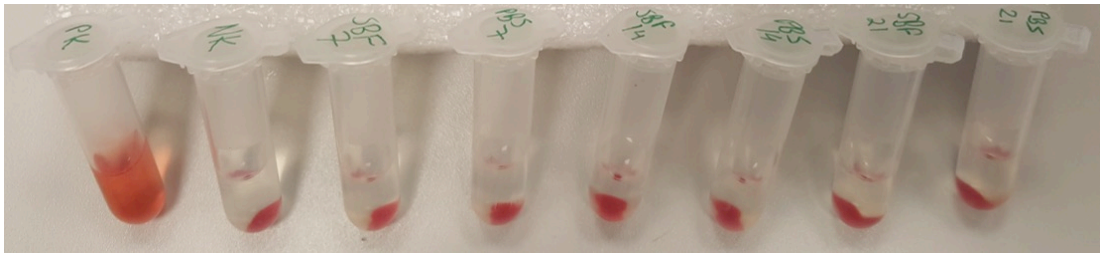
Şekil 2.10. *İn vitro* sitotoksisite testi ölçüm öncesi görünümü

2.3.10.2. Hemoliz Testi

Geliştirilen kompozit yapı iskelelerinin kan uyumlulukları ISO 10993-4 standardına göre analiz edildi. Geliştirilen kompozit yapı iskeleleri PBS ile yıkandıktan sonra eppendorf tüp içerisinde 1 ml PBS ile 30 dakika hafifçe çalkalanarak 37°C sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. 2 ml taze tam kan 2,5 ml PBS ile seyreltildi. Bir adet eppendorf tüp içerisine 1 ml distile su pozitif kontrol (PK) olarak; bir adet eppendorf tüp içerisine 1 ml PBS negatif kontrol (NK) olarak hazırlandı. 30 dakikalık inkübasyonun ardından, PBS içindeki örneklere ve kontrol tüplerine 20 µl seyreltilmiş kan eklendi. Bir saat 37°C etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, yapı iskeleleri çıkarılan tüpler ve kontrol tüpleri 520 G hızında 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatan kısımları 545 nm dalga boyunda SpectraMax M5 mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) cihazında ölçüm alındı. Hemoliz oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı (Şekil 2.11.).

$$\text{Hemoliz (\%)} = \frac{A_{\text{örnek}} - A_{PK}}{A_{NK}} \times 100$$

Şekil 2.11. Hemoliz oranı hesaplama formülü

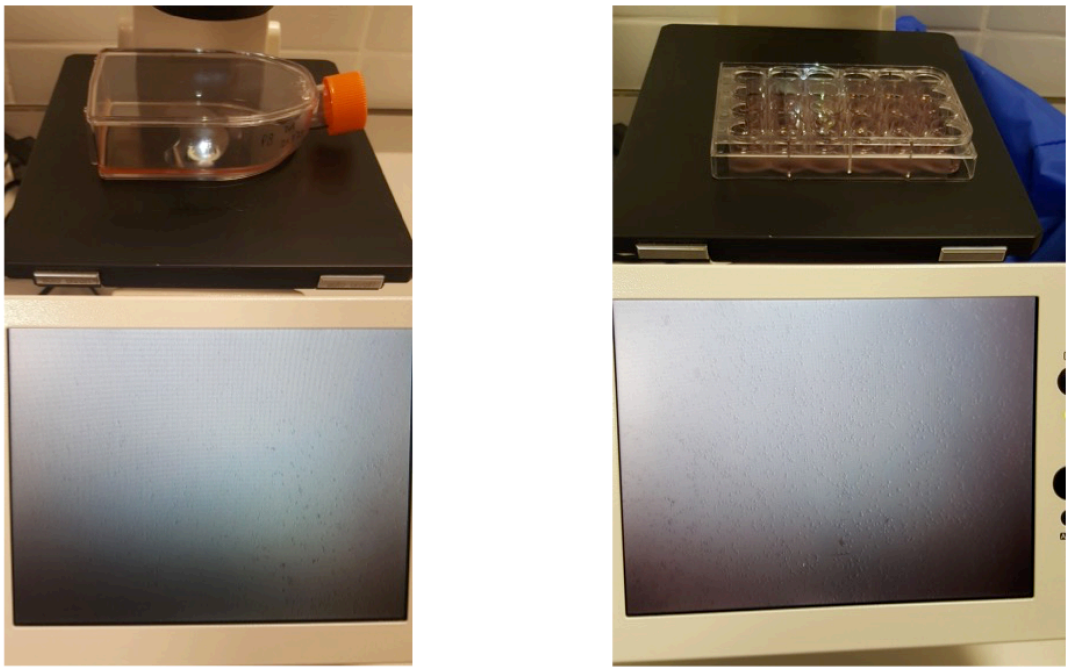


Şekil 2.12. Hemoliz testi sonrası örneklerin görünümü

2.4. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) Hücrelerinin Kültürü ve Hücrelerin Yapı İskeleleri Üzerine Tohumlanması

2.4.1. İnsan Fetal Osteoblast (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372) Hücrelerinin Kültürü

Ticari insan fetal osteoblast hücre hattı (hFOB 1.19 ATCC CRL-11372), hacimce %10 fetal sığır serumu (FBS) ve hacimce %1 penisilin-streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 besiyeri içerisinde istenilen hücre sayısına ulaşılıncaya kadar 37°C sıcaklık ve %95 nem oranına ayarlı karbondioksit (CO_2) inkübatörü içerisinde kültüre çoğaltıldı. Çoğaltılma sürecinde her iki günde bir besiyeri değiştirildi (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. İnsan fetal osteoblast hücrelerinin çoğaltılması ve iskeleler üzerine tohumlanması

2.6.2. Biyomineralize edilmiş ve edilmemiş yapı iskelelerinin üzerine hücre tohumlanması

SBF içinde 14 gün biyomineralize olan kompozit yapı iskelelerinin üzerindeki SBF solüsyonu serolojik pipet yardımıyla atıldıktan sonra, kompozit yapı iskeleleri steril spatül yardımıyla yeni bir steril 50 ml falcon içerisine alınıp üzerlerine 40 ml %70'lik steril etil alkol eklendi. Bir saat sonra etil alkol uzaklaştırılıp 40 ml – hacimce %1 penisilin-streptomisin içeren– steril PBS eklendi. Bir saatlik yıkamanın ardından üç tekrarlı olarak PBS çekilip atılıp, yeni PBS çözeltisi eklenerek kompozit yapı iskeleleri etil alkolden arındırıldı. Steril cam petri içerisine konulan steril gazlı bez üzerine alınan yapı iskelelerinin içerdiği fazla sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, yapı iskeleleri falcona geri alınıp üzerine 40 ml steril PBS eklendi. Bir saatin sonunda yapı iskeleleri besiyerinin içerisine aktarılarak, iskelelerin besiyerine doyması için 90 dakika kadar bekletildi. Doyan yapı iskeleleri steril cam petri içerisine konulan steril gazlı bez üzerine dökülüp 30 dakika fazla sıvıdan kurtulmaları için beklendi.

Biyomineralize edilmemiş liyofilize kompozit yapı iskeleleri, %70'lik etil alkol içerisinde bir gece bekletildikten sonra, üç kez birer saat steril penisilin-streptomisinli PBS içerisinde yıkandı.

Hem biyomineralize edilmiş hem de biyomineralize edilmemiş yapı iskelelerinin, 48 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğa bir adet yapı iskelesi gelecek şekilde yerleştirilmelerinin ardından, üzerlerine 30 µl hücre solüsyonu eklenip 40 dakika 37°C, %5 CO_2 inkübatör içerisinde hücrelerin yapı iskelelerine tutunmaları için beklendi. Ardından, her kuyucuğa 1ml DMEM/F12 besiyeri eklendi. 24 saat sonra, 48 kuyucuklu kültür kaplarından 24 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılan hücreli yapı iskeleleri üzerine 1,5 ml DMEM/F12 besiyeri eklendi.

Besiyerleri kültür kaplarından 36 saatin sonunda atılıp 0.gün örneği alındıktan sonra; kuyucukların yarısına standart besiyeri, yarısına da osteojenik indüksiyon besiyeri eklendi. İki günde bir besiyeri değiştirilerek kültür 28 gün boyunca devam ettirildi. Kültürün 7., 14., 21. ve 28.günlerinde karakterizasyon analizleri için örnekler alındı. SEM ile görüntülenecek hücreli yapı iskeleleri %2,5'luk glutaraldehit içine alınarak analiz gününe kadar +4°C'de saklandı. Kalsiyum (Ca^{+2}) miktar tayin ve Alkalen fosfataz (ALP) aktivite analizleri için aynı zaman noktalarında besiyeri örnekleri toplanarak, -18°C'deki dondurucuda saklandı. Ayrıca, hücrelerin canlılık takibi, aynı zaman noktalarında Alamar mavisi analizi ile gerçekleştirildi. Kültürün 12.günü itibariyle besiyeri 2 ml olarak eklenmeye başlandı.

2.5. Hücreli Yapı İskelelerinin SEM ve EDS Analizi

Glutaraldehit içinde tespit edilmiş örnekler glutaraldehitin uzaklaştırılmasının ardından 30 dakika PBS içerisinde bekletildi. Hacimce %50, %70, %80, %90

ve %95'lik etil alkol çözeltileri hazırlandı. Örnekler hazırlanan etil alkol çözeltileri içerisinde 20'şer dakika bekletilerek etil alkol serisinden geçirilip kurumaya bırakıldı. Çift taraflı karbon iletken bant ile stab üzerine yapıştırılan örneklerin yan yüzeyleri sıvı grafit ile kaplandıktan sonra altın kaplama işlemi ile iletken hale getirilen numuneler farklı büyütme oranlarında Zeiss Evo 40 taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülendi. Numunelerin görüntülenen yüzeylerinde, cihazın EDS detektörü kullanılarak element dağılım analizi de yapıldı.

2.6. Kalsiyum (Ca^{+2}) Miktar Tayini

Kalsiyum (Ca^{+2}) miktar tayini için, kit (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA-500), BioAssay Systems, CA, USA) içerisinden çıkan kalsiyum standartları aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2.2) belirtildiği şekliyle seyreltilerek hazırlandı.

Çizelge 2.2. Kalsiyum standart miktarları

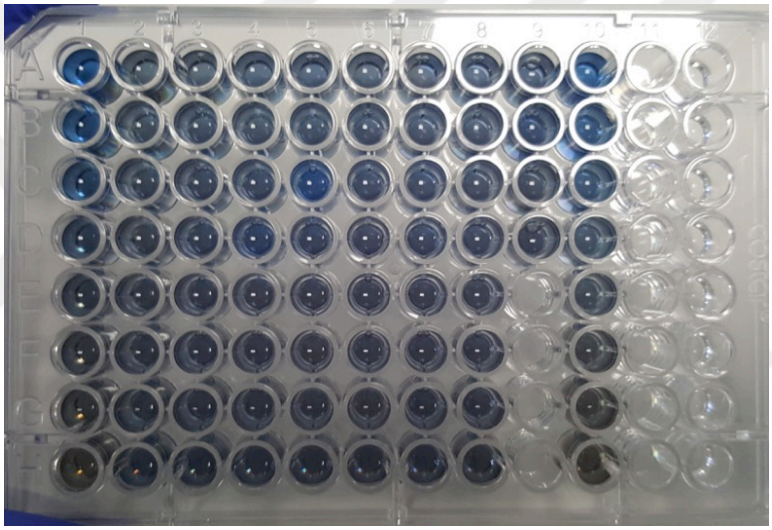
No	**Standart + dH_2O**	**Hacim (µL)**	**Ca^{2+} (mg/dl)**
1	10 µL + 0 µL	10	20
2	8 µL + 2 µL	10	16
3	6 µL + 4 µL	10	12
4	4 µL + 6 µL	10	8
5	3 µL + 7 µL	10	6
6	2 µL + 8 µL	10	4
7	1 µL + 9 µL	10	2
8	0 µL + 10 µL	10	0

96 kuyucuklu kültür kabının bir sütununa 5 µL/kuyucuk kalsiyum standardı, diğer kuyucuklara 5 µL örnek konuldu. Her kuyucuğa 200 µL çalışma solüsyonu (eşit

miktarda reaktif A ve reaktif B'nin karıştırılmasıyla hazırlanan) eklendi (Şekil 2.15). Üç dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 612 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Sadece dH_2O'dan oluşan standart #8'e ait OD_{612nm} değeri kör (blank) alınıp tüm değerlerden bu değerin çıkarılmasından sonra kalsiyum standartlarının OD_{612nm} değerlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formül ile kalsiyum konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 2.14).

$$Ca^{2+} \text{ miktarı (mg/dL)} = \frac{OD_{örnek} - OD_{blank}}{\text{eğim}}$$

Şekil 2.14. Kalsiyum miktar tayini hesaplama formülü



Şekil 2.15. Ca^{2+} miktarı ölçümünün yapıldığı 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü

2.7. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivite Analizi

Alkalen fosfataz (ALP) aktivite analiz kiti (QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250), BioAssay Systems, CA, USA), aşağıda belirtilen tepkimeye dayanır (Şekil 2.16):

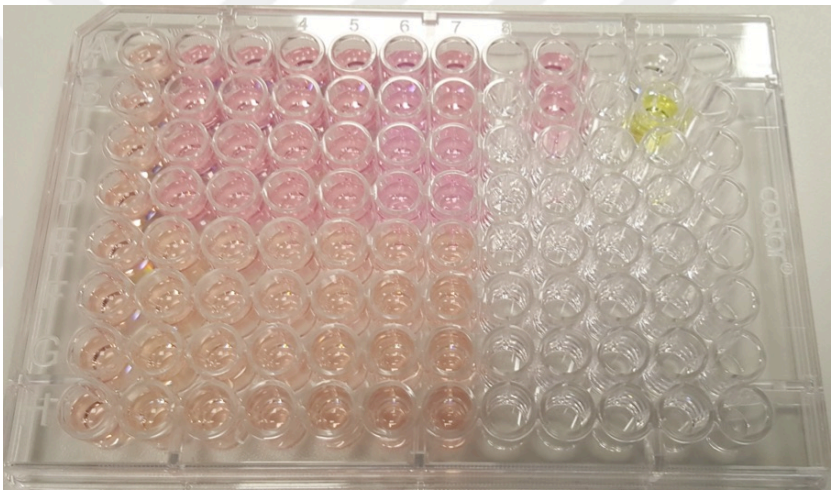
p-nitrofenil fosfat → *p-nitrofenol* + *fosfat*

Şekil 2.16. ALP aktivite tepkimesi

Öncelikle 96 kuyucuklu kültür kabının bir kuyucuğuna 200 µl distile su, bir kuyucuğuna 200 µl Tartrazin (calibrator) solüsyonu eklendi. Örnekler 50 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendikten sonra her kuyucuğa, 200 µl test tamponu + 5 µl magnezyum asetat +2 µl pNPP'nin karıştırılmasıyla elde edilen çalışma solüsyonundan 150 µl eklendi (Şekil 2.18). Eklemeden hemen sonra (t=0) ve eklemeden 4 saniye sonra (t=4) 405 nm dalga boyunda ölçüm alındı. ALP aktivitesi (IU/L = µmol / (L × dakika)) aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (Şekil 2.17).

$$\text{ALP aktivitesi} = \frac{(OD_{\text{örnek t}} - OD_{\text{örnek 0}}) \times \text{Tepkime hacmi}}{(OD_{\text{Tartrazin}} - OD_{H_2O}) \times \text{Örnek hacmi} \times t} \times 35{,}3$$

Şekil 2.17. ALP aktivitesi hesaplama formülü

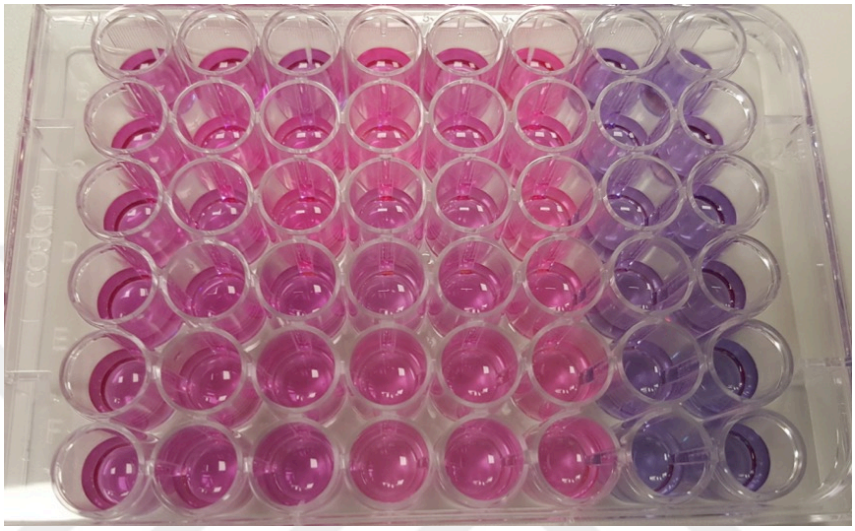


Şekil 2.18. ALP aktivitesi tayini yapılan 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü

2.8. Alamar Mavisi ile Canlılık Takibi

Kompozit yapı iskeleleri üzerinde osteoblast kültürü devam ederken belirlenen zaman noktalarından (7-14-21-28 gün) alınan örnekler besiyerinden arındırılmak için PBS ile üçer kez yıkandı. 48 kuyucuklu kültür kabına alınan örneklerin üzerine 500 µL besiyeri 50 µL resazurinden oluşan Alamar mavisi çözeltisi (*Alamar blue assay,*

alamarBlue cell viability reagent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eklenerek 37°C'de 150 dakika inkübe edildi (Şekil 2.19). İnkübasyon işleminden sonra süzüntünün floresan yoğunluğu 560 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalga boylarında mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Kontrol grubuna göre canlılığın yüzdece değişimi hesaplandı.



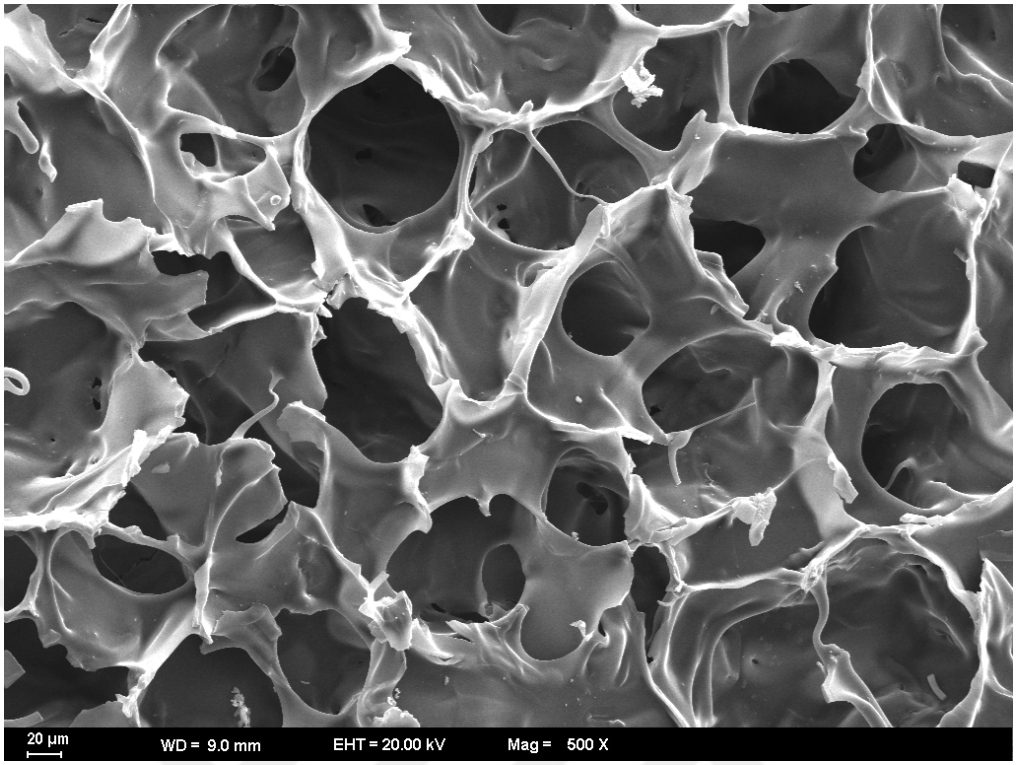
Şekil 2.19. Alamar Mavisi analizi sonrası kuyucukların görüntüsü

3. BULGULAR

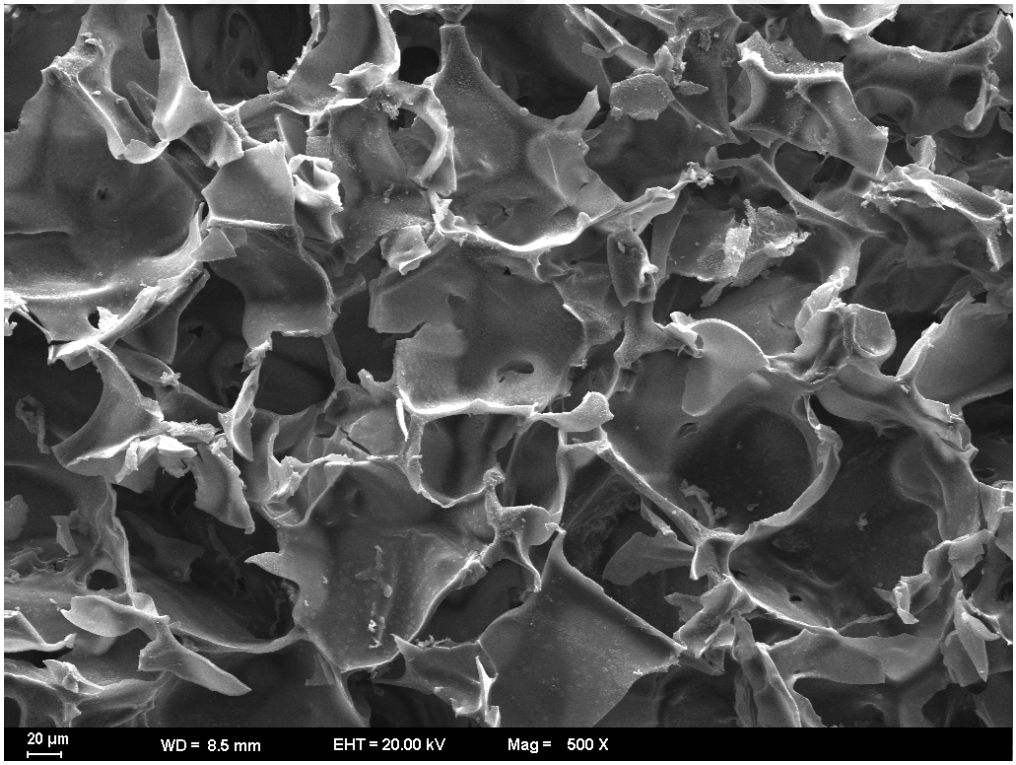
3.1. Kompozit Biyomalzemenin Karakterizasyon Sonuçları

3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

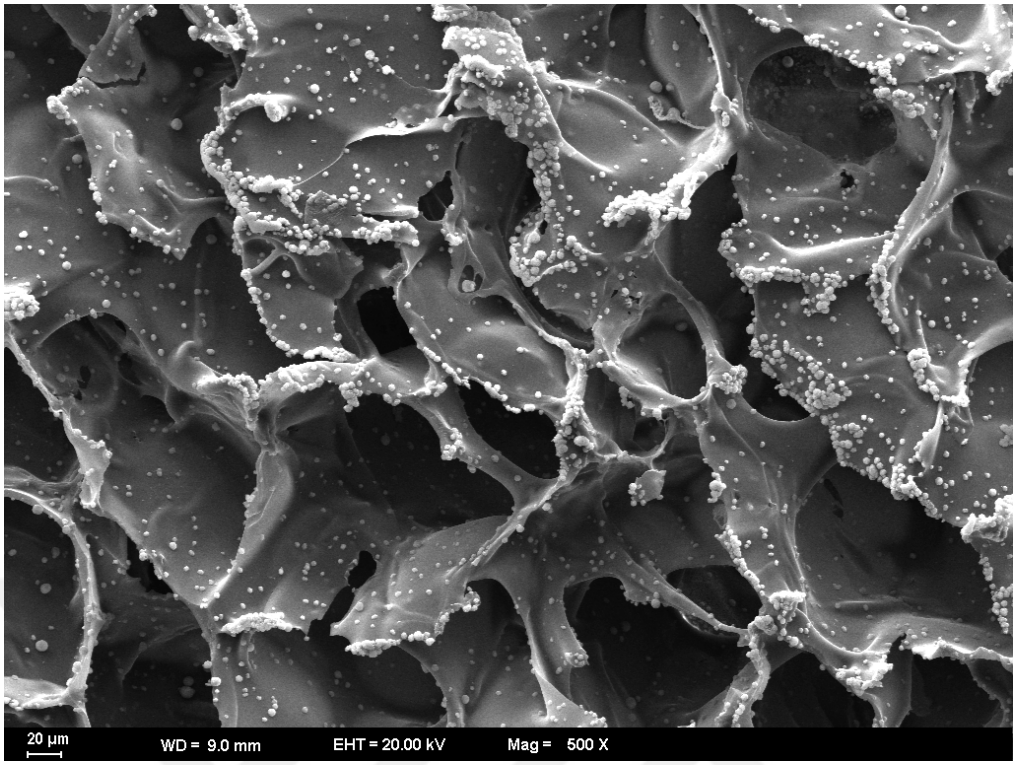
Geliştirilen kompozit biyomalzemeler morfolojik açıdan taramalı elektron mikroskobu kullanılarak 500X yakınlaştırma ile değerlendirildiğinde, biyomalzemenin 20 μm-100 μm arasında değişen çapta makro gözenekli yapıda olduğu ve iskelelerin SBF içerisinde inkübe edilmesinin gözenek çeperlerinde ve biyomalzemenin yüzeyinde hidroksiapatit çekirdeklenmeleri oluşturduğu gözlenmiştir. Biyomalzemenin SBF içinde kalma süresiyle doğru orantılı olarak oluşan hidroksiapatit çekirdeklenme miktarında artış belirlenmiştir (Şekil 3.1-3.6).



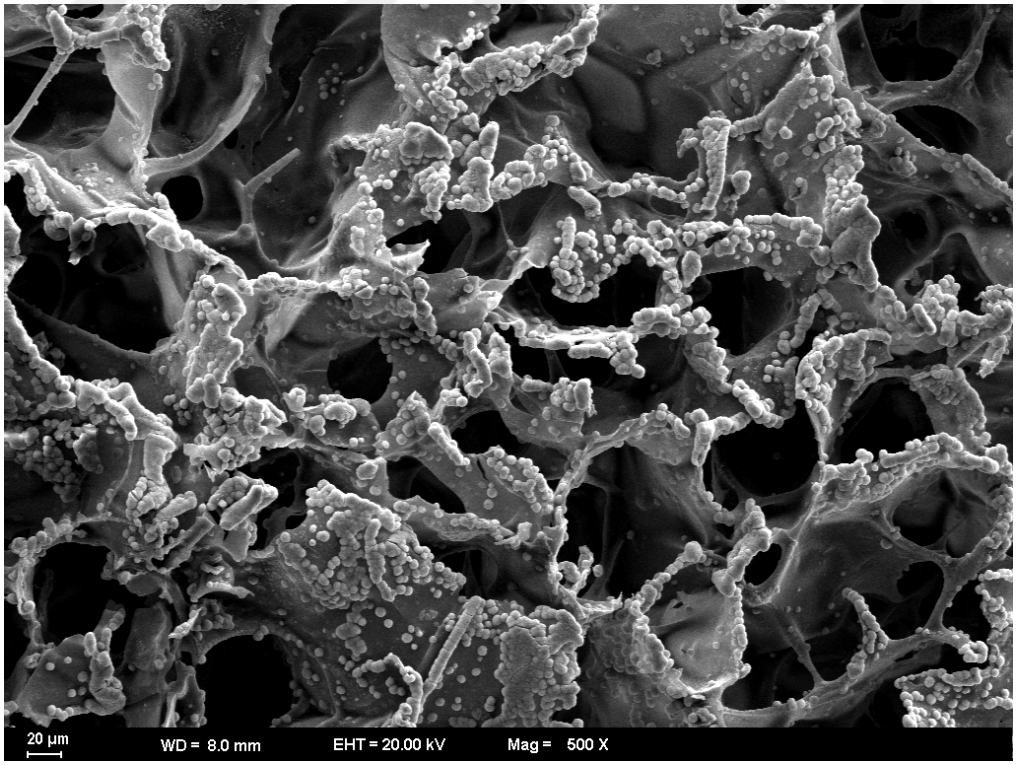
Şekil 3.1. İskelenin SBF içerisinde bir günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



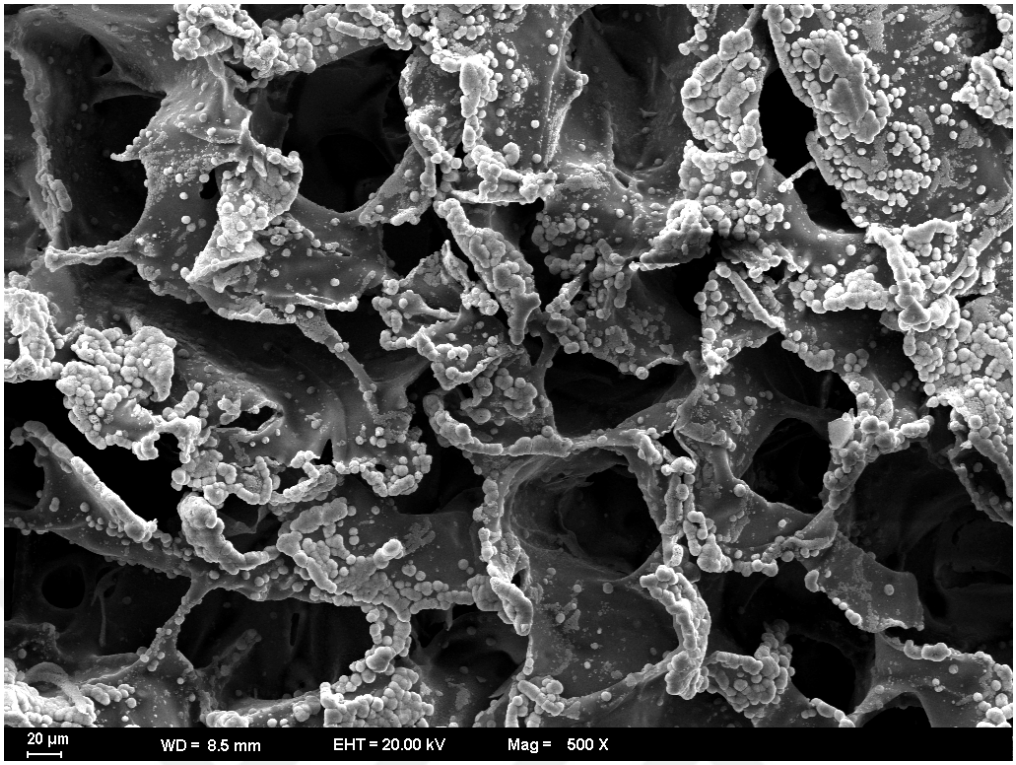
Şekil 3.2. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



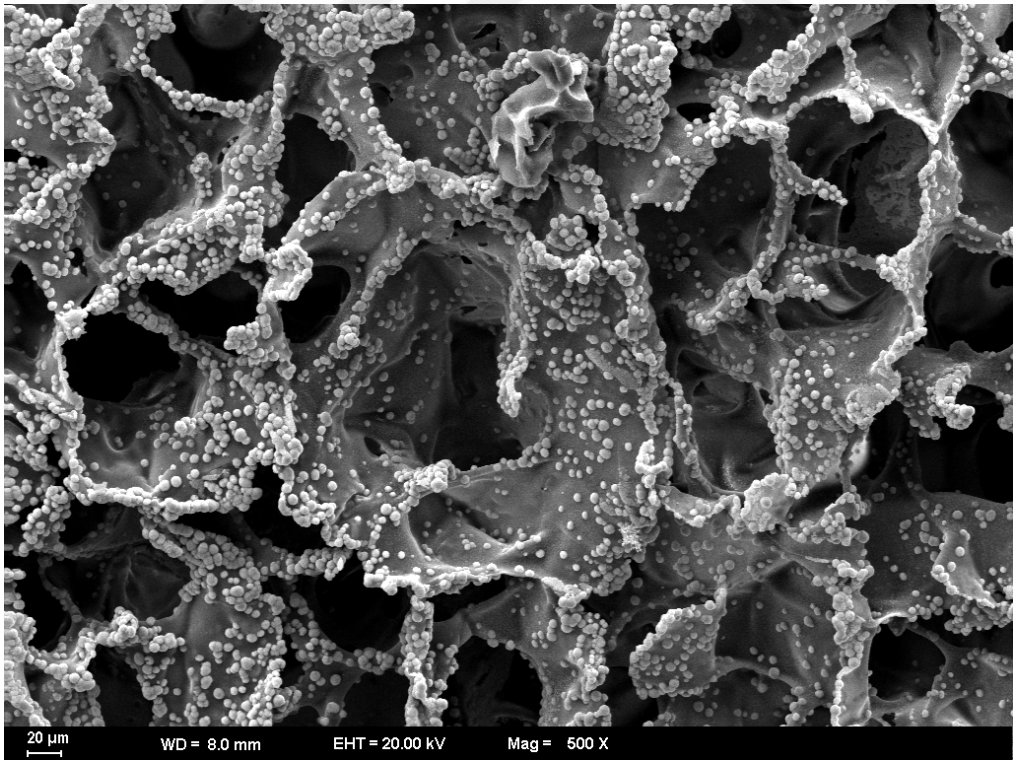
Şekil 3.3. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



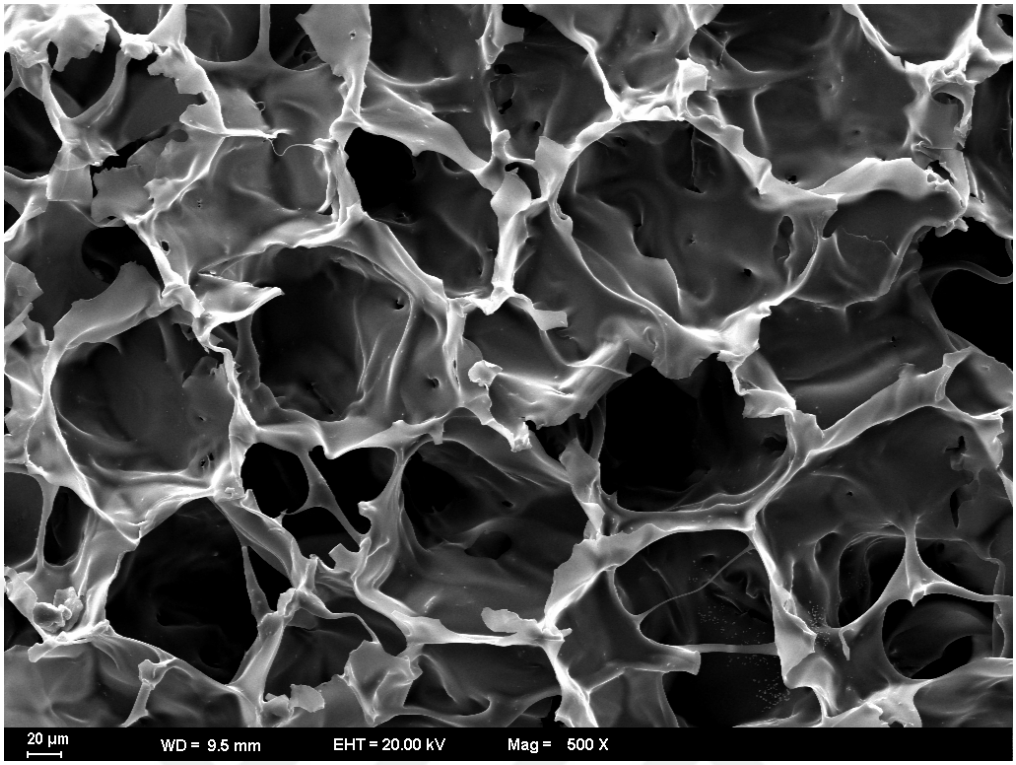
Şekil 3.4. İskelenin SBF içerisinde 10 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



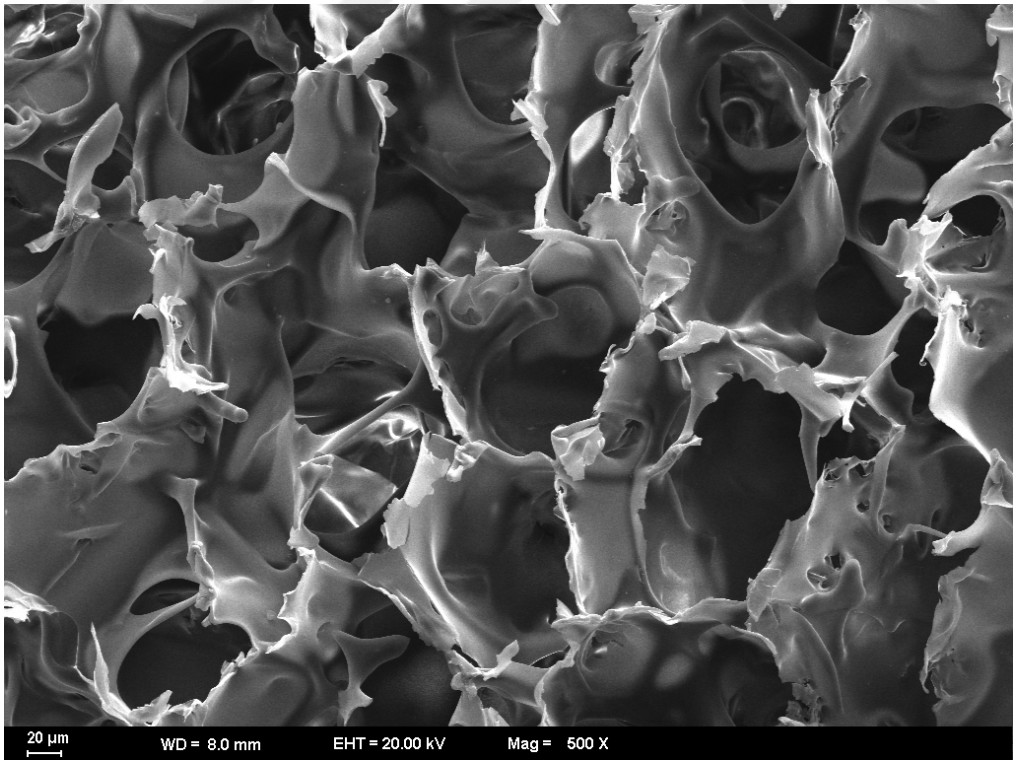
Şekil 3.5. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



Şekil 3.6. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



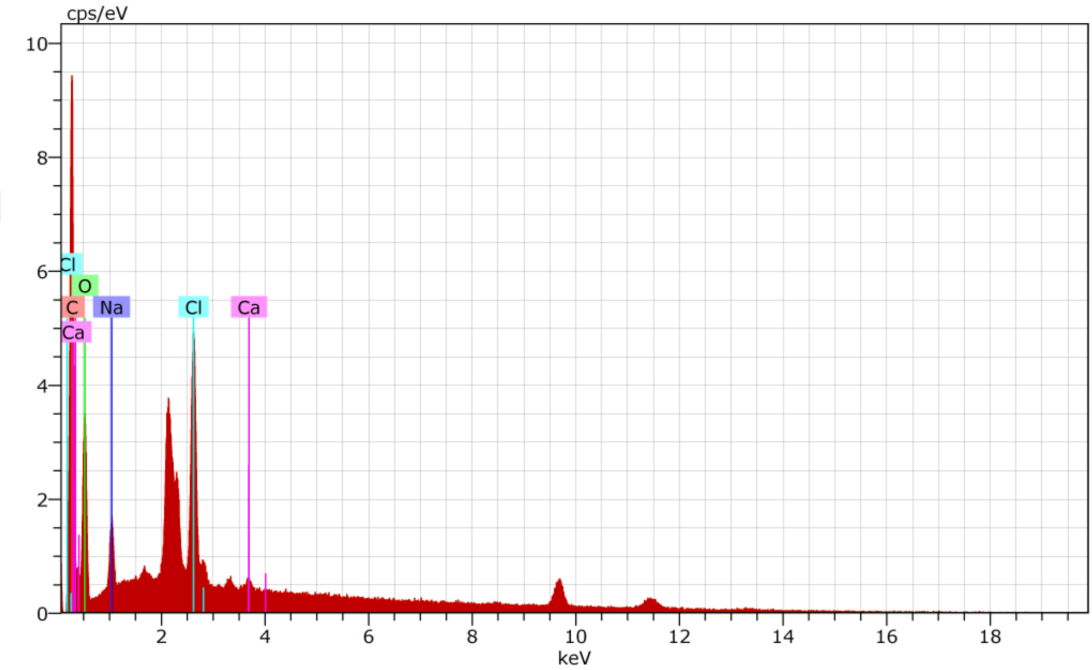
Şekil 3.7. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası SEM görüntüsü (500X büyütme)



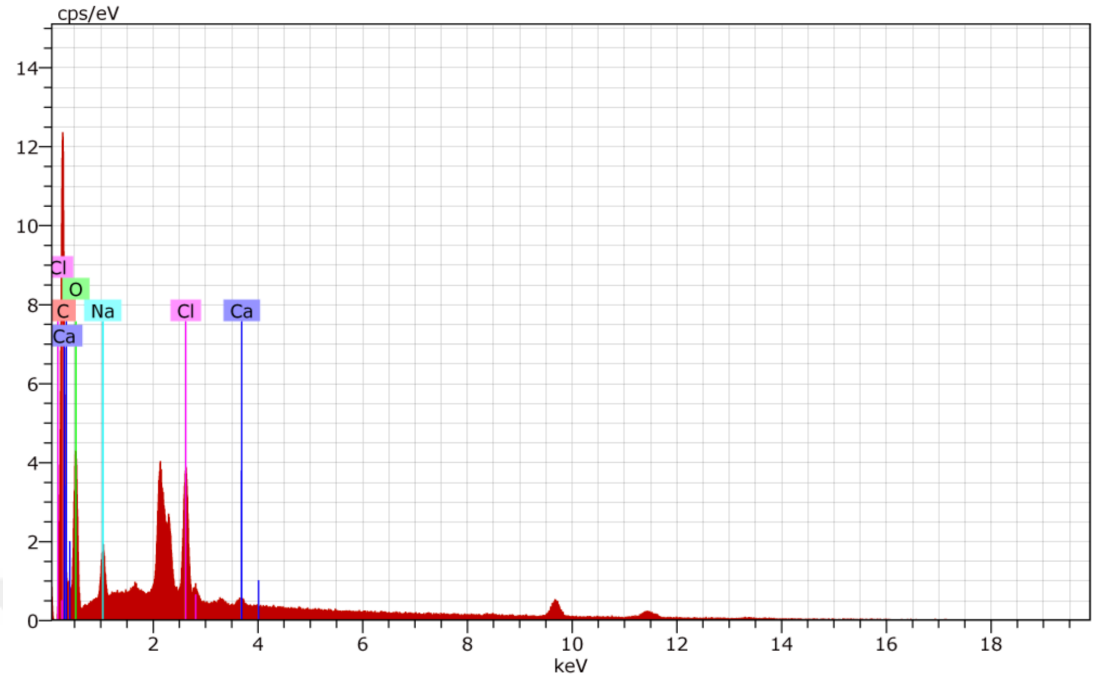
Şekil 3.8. İskelenin SBF içerisinde inkübasyon öncesi SEM görüntüsü (500X büyütme)

3.1.2. Enerji Dağılımı X-Işını Spektrometresi (EDS) Analizi Sonuçları

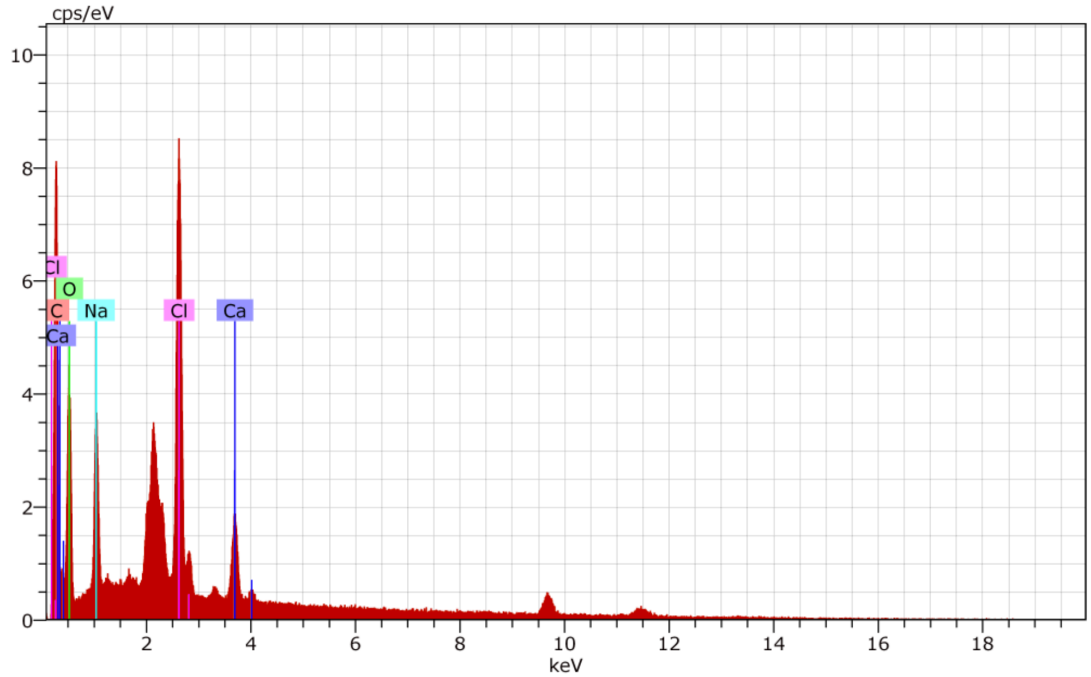
Yapılan EDS analizi ile biyomalzemenin SBF içinde inkübasyonu ile kalsiyum (Ca^{+2}) minerali biriktirdiği ve bu birikimin SBF içerisinde kalma süresi ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.9-3.14).



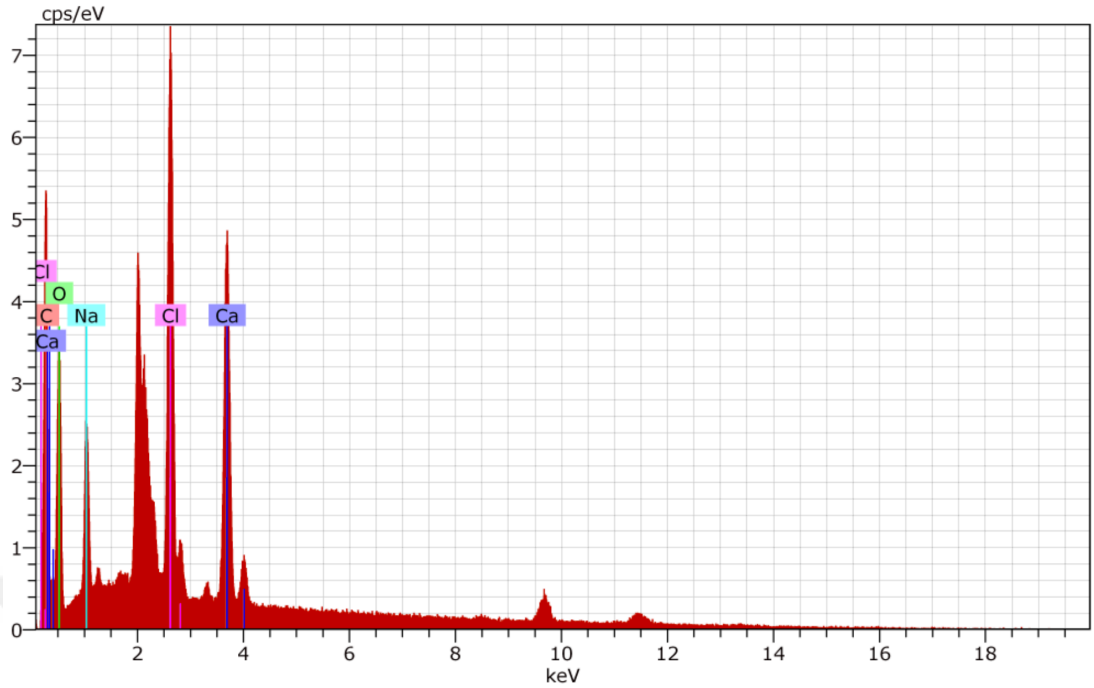
Şekil 3.9. İskelenin SBF içerisinde bir günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



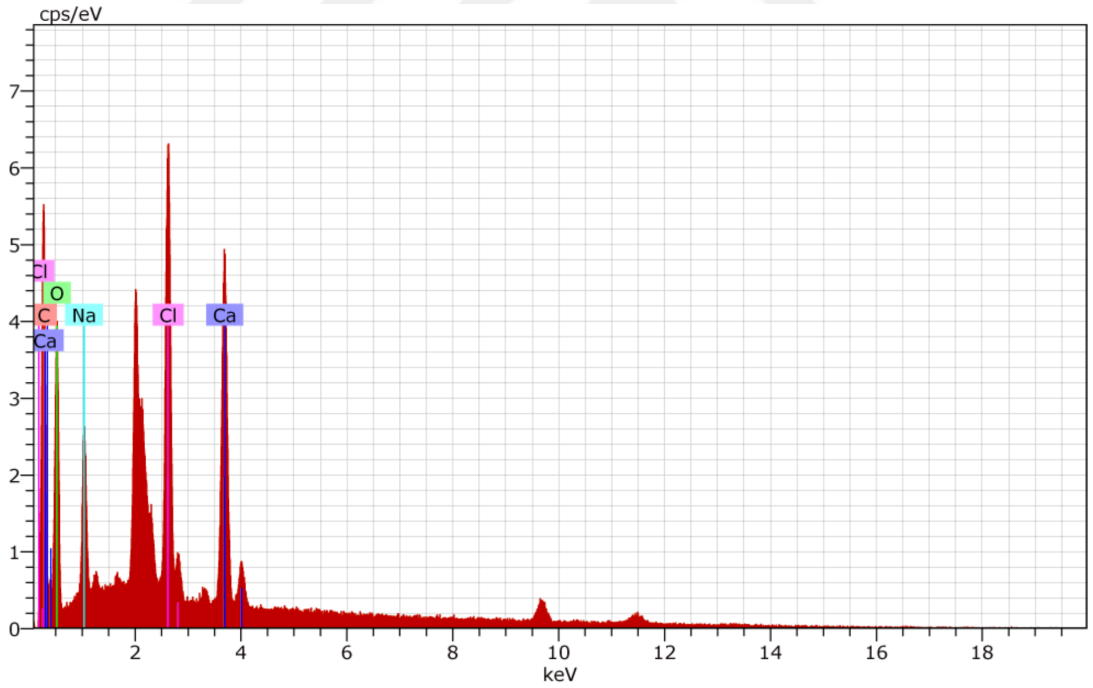
Şekil 3.10. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



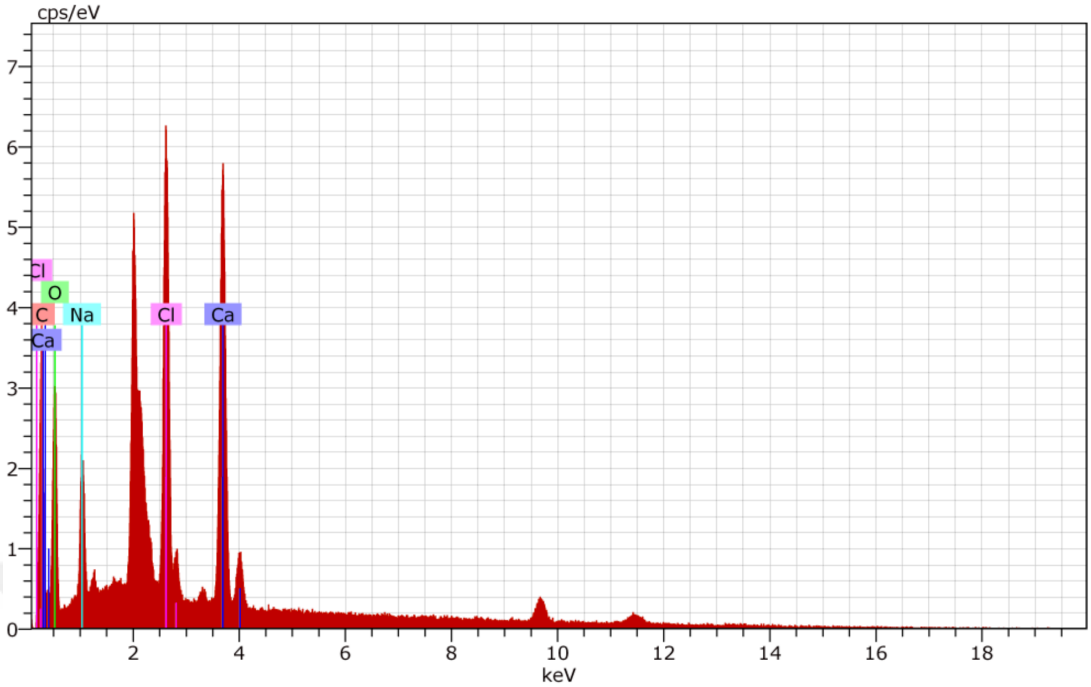
Şekil 3.11. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



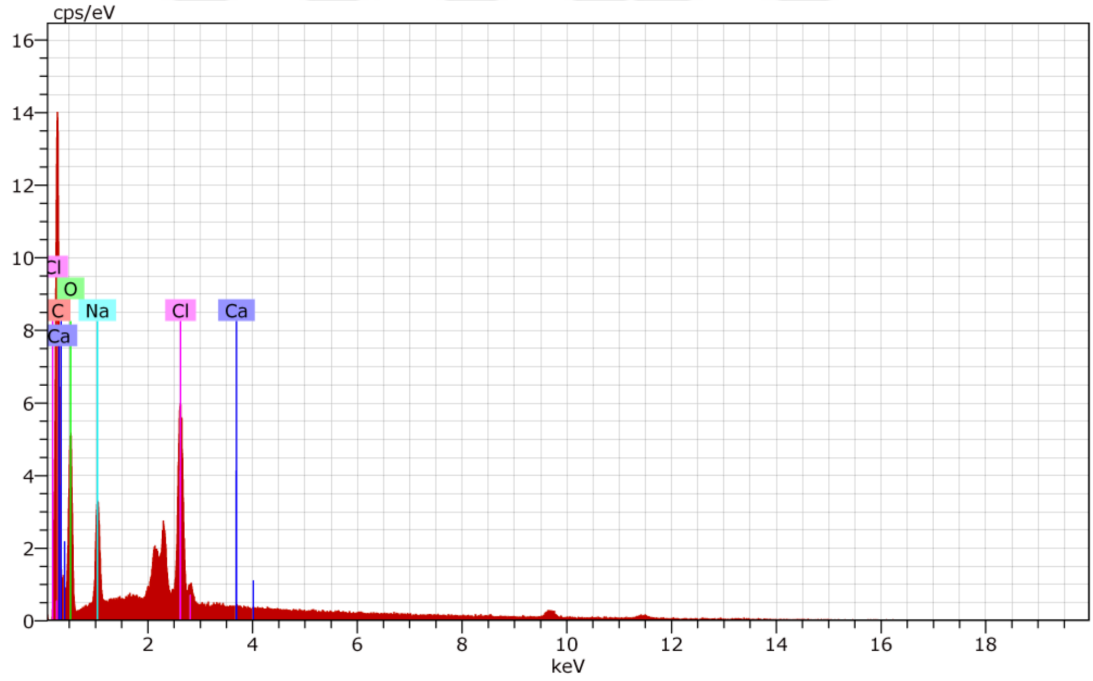
Şekil 3.12. İskelenin SBF içerisinde 10 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



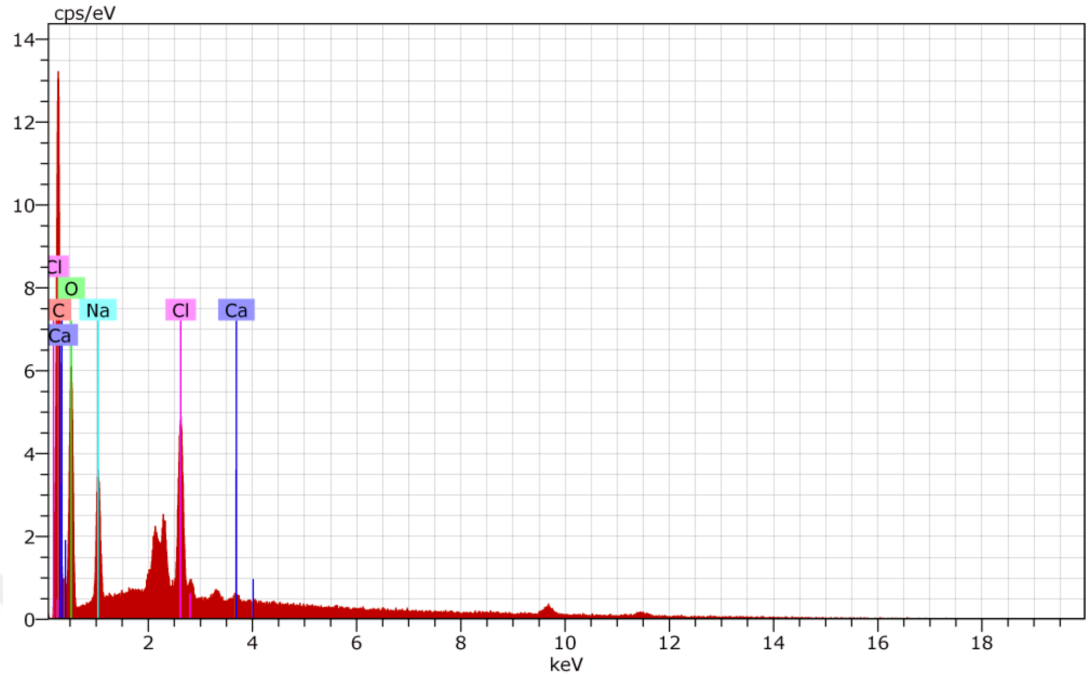
Şekil 3.13. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



Şekil 3.14. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası EDS spektrumu



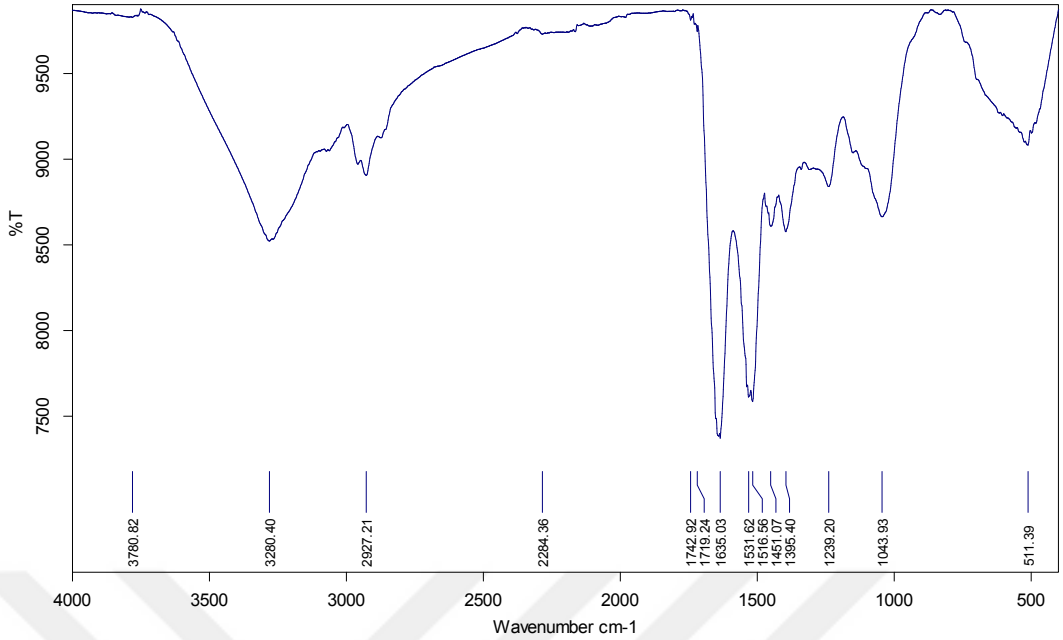
Şekil 3.15. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası EDS spektrumu



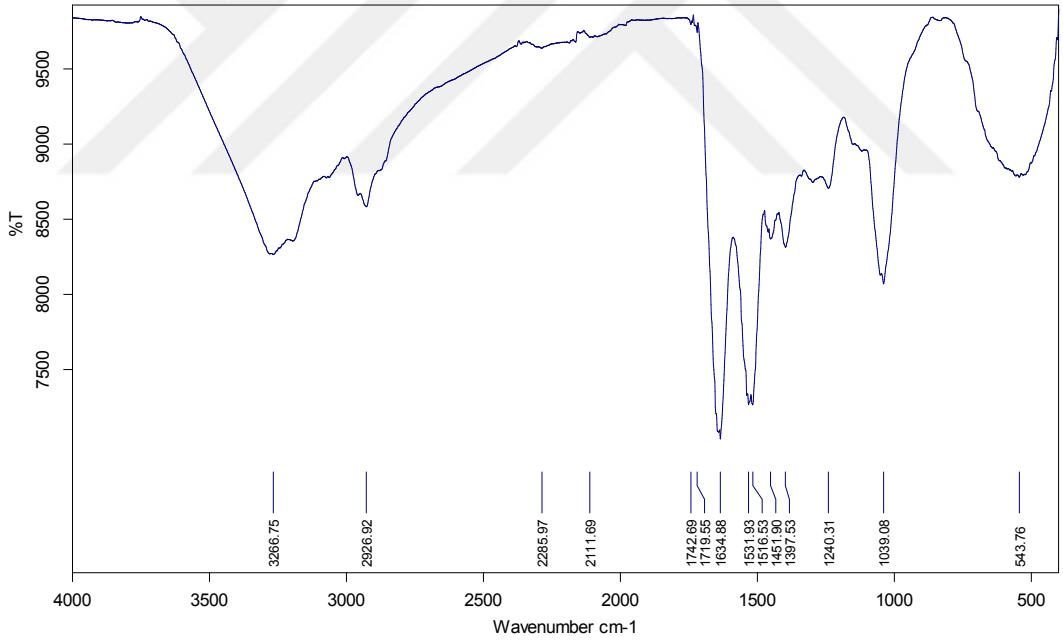
Şekil 3.16. İskelenin SBF içerisinde inkübasyon öncesi EDS spektrumu

3.1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi Sonuçları

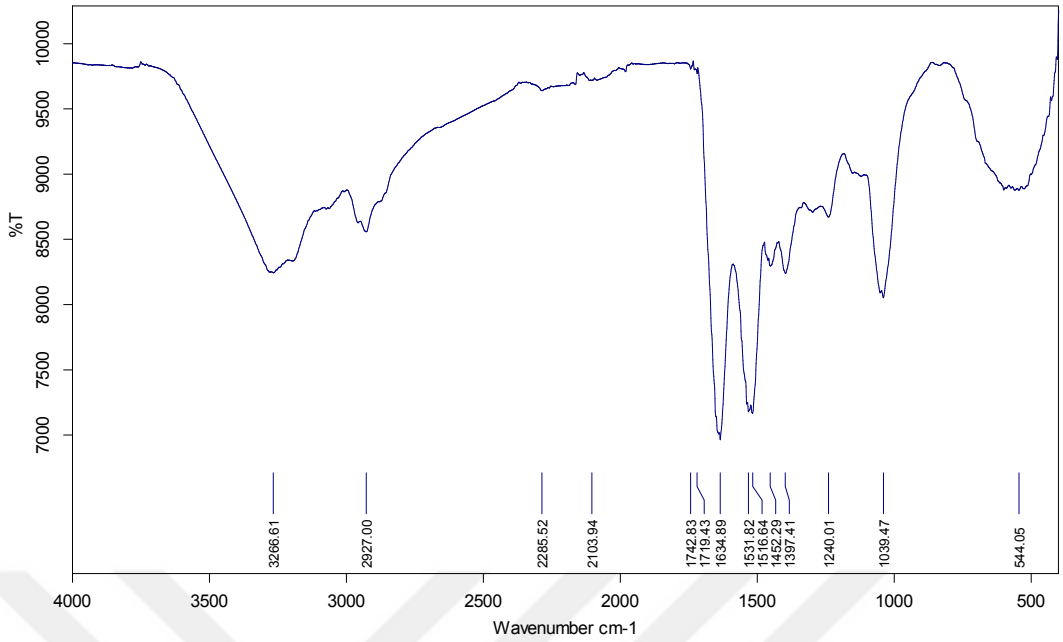
FTIR analizi ile biyomalzemenin SBF içerisinde inkübe edilmesinin hidroksiapatit formunda birikimlere yol açtığı, elde edilen pikler ile desteklenmektedir. 3265-3280 nm dalga boyunda O-H geniş bant, 2926-2928 nm dalga boyunda C-H zayıf titreşimi, 1516-1531 nm dalga boyunda C=O Amid I bandı, 1634-1635 nm dalga boyunda N-H Amid II bandı gözlenmiştir (Şekil 3.17-Şekil 3.22).



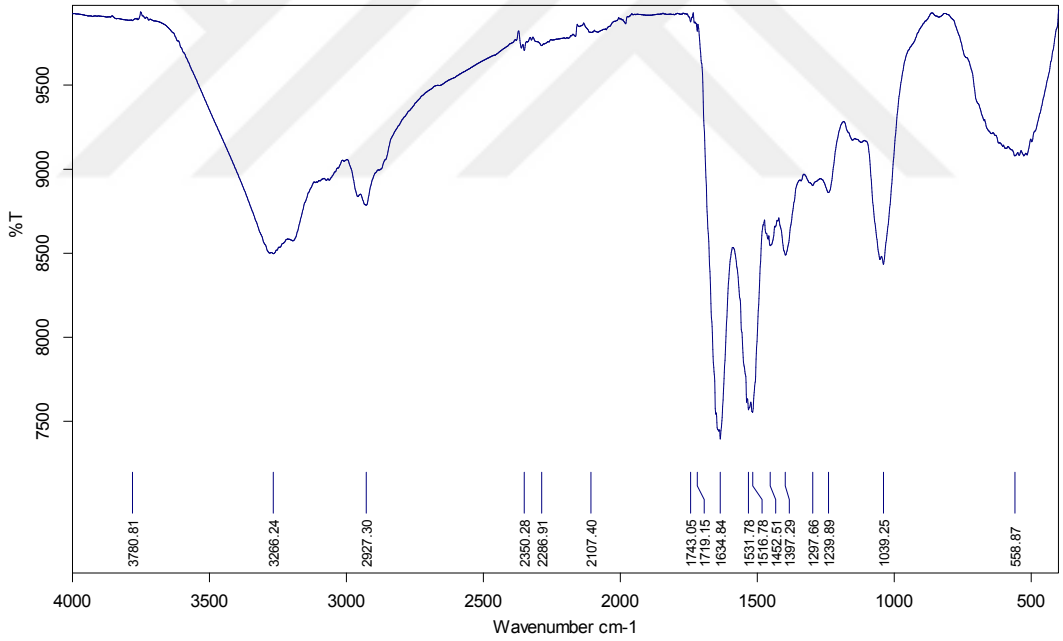
Şekil 3.17. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası FTIR spektrumu



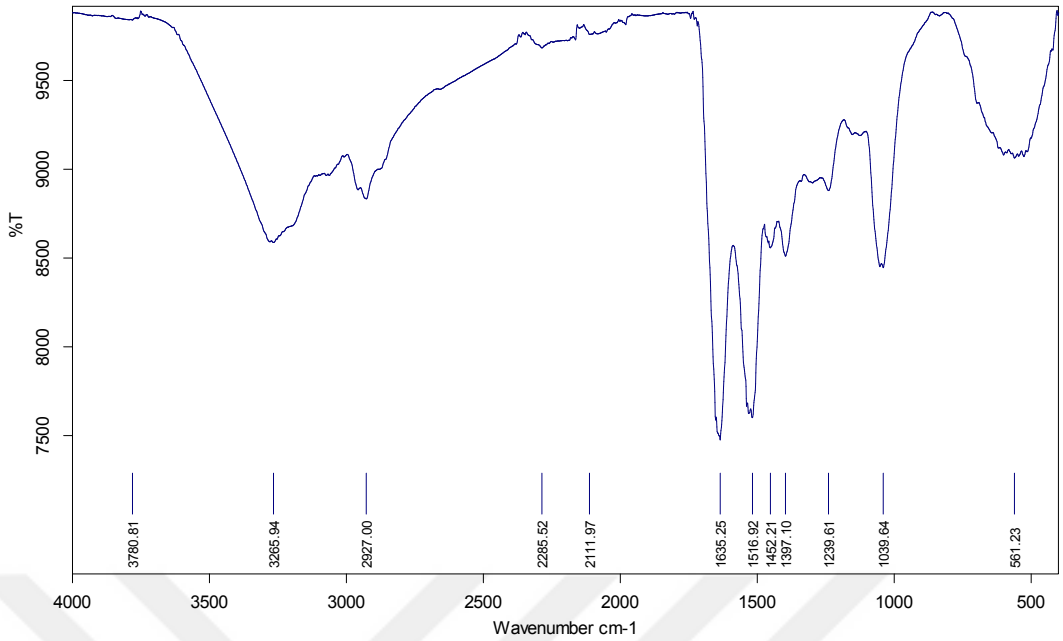
Şekil 3.18. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu



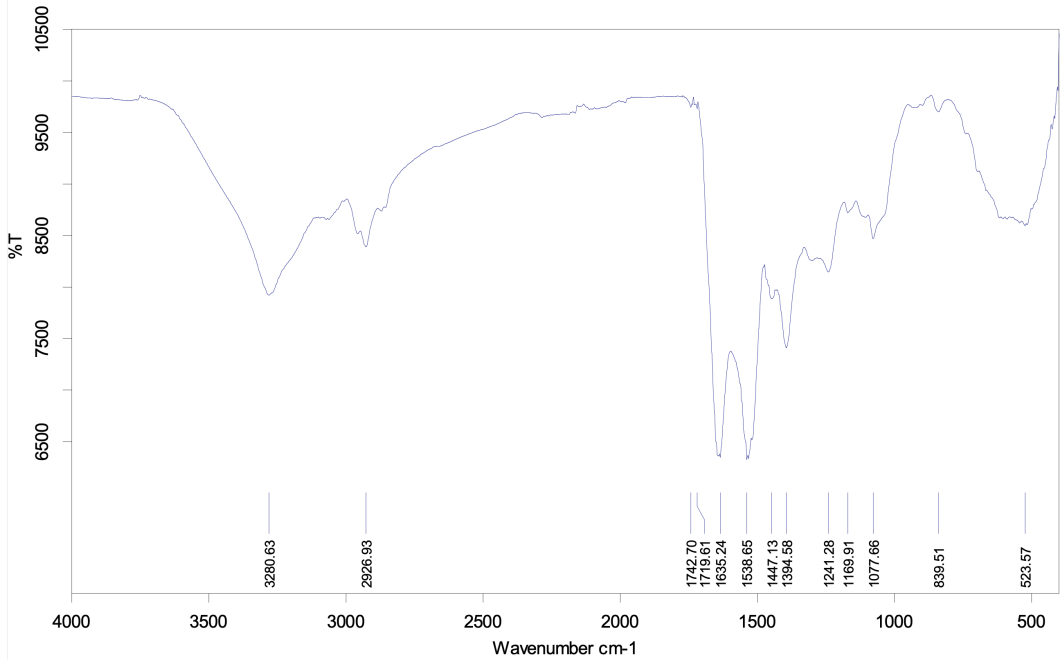
Şekil 3.19. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu



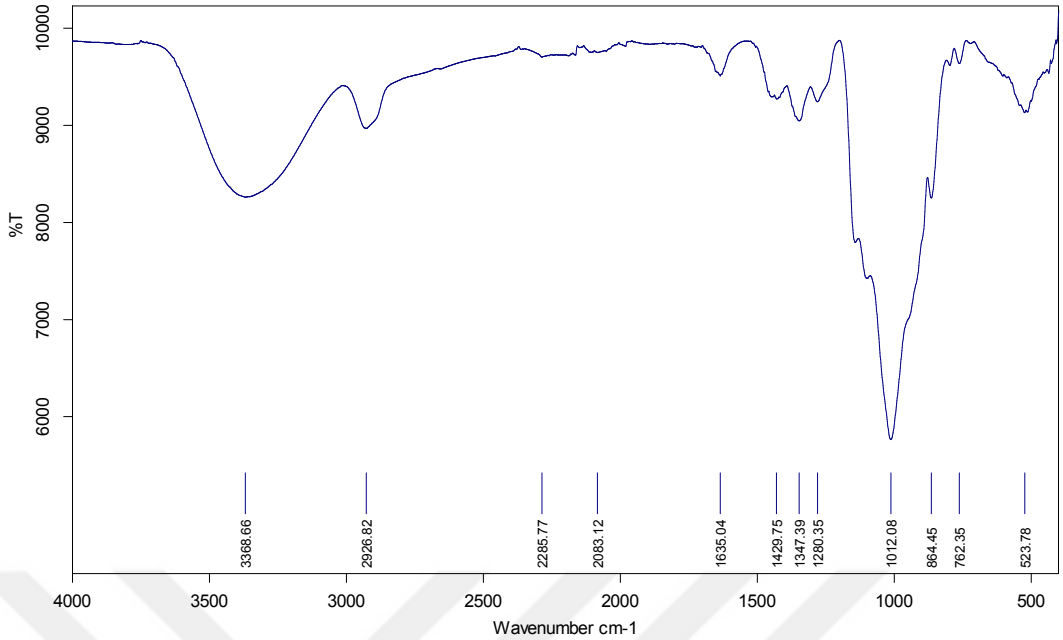
Şekil 3.20. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu



Şekil 3.21. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası FTIR spektrumu



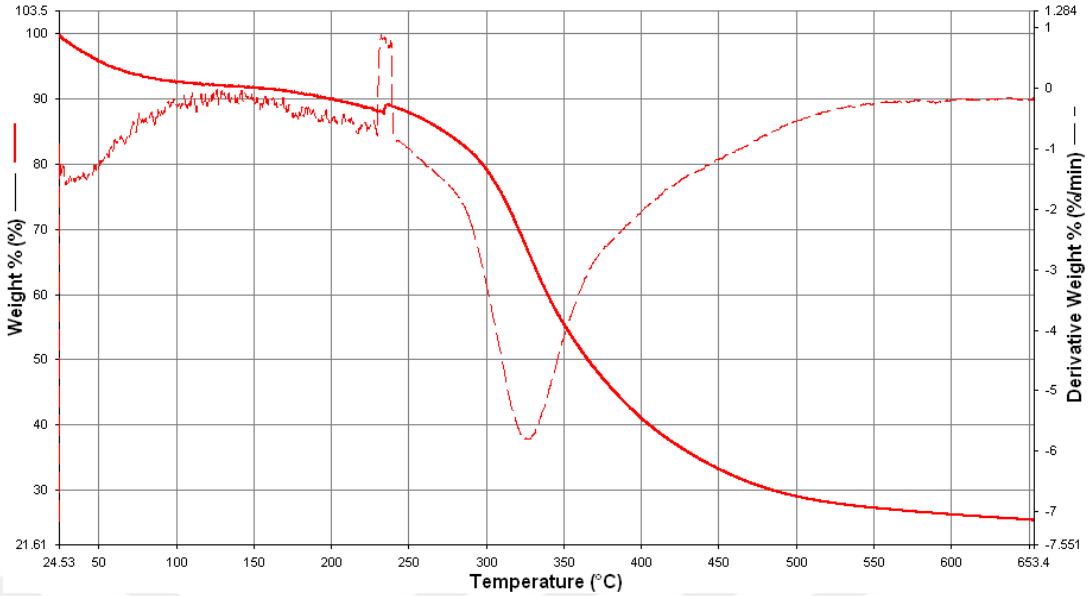
Şekil 3.22. Liyofilize trombosit lizatının FTIR spektrumu



Şekil 3.23. Liyofilize okside dekstranın FTIR spektrumu

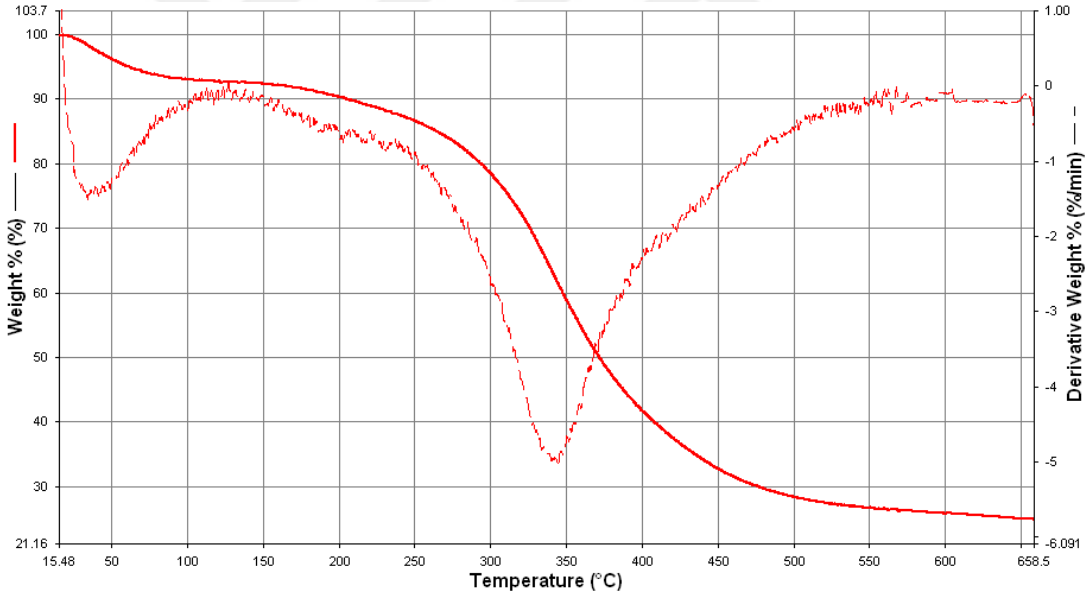
3.1.4. Termogravimetrik (TGA) Analiz Sonuçları

Yapı iskelelerinin TGA analizi sonucunda sıcaklığa bağlı kütle kaybının biyomalzemenin SBF içerisinde bekleme süresi ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.24-Şekil 3.27).



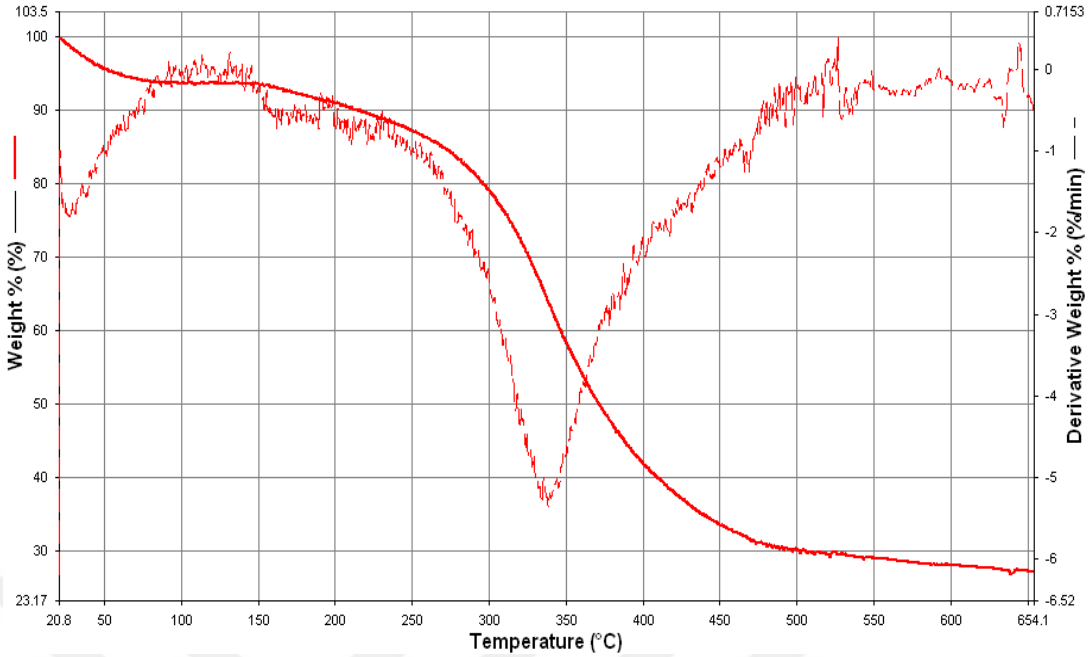
%Kayıp= 74.439%

Şekil 3.24. Kontrol grubu iskelenin PBS içerisinde inkübasyon sonrası TGA grafiği



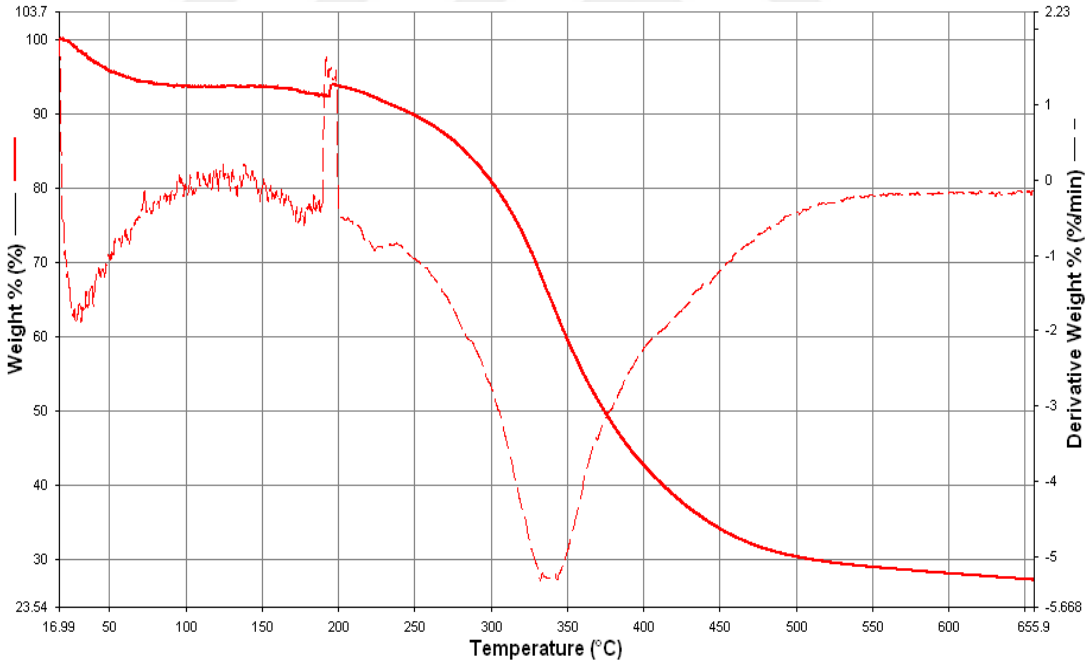
%Kayıp= 75.010%

Şekil 3.25. İskelenin SBF içerisinde üç günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği



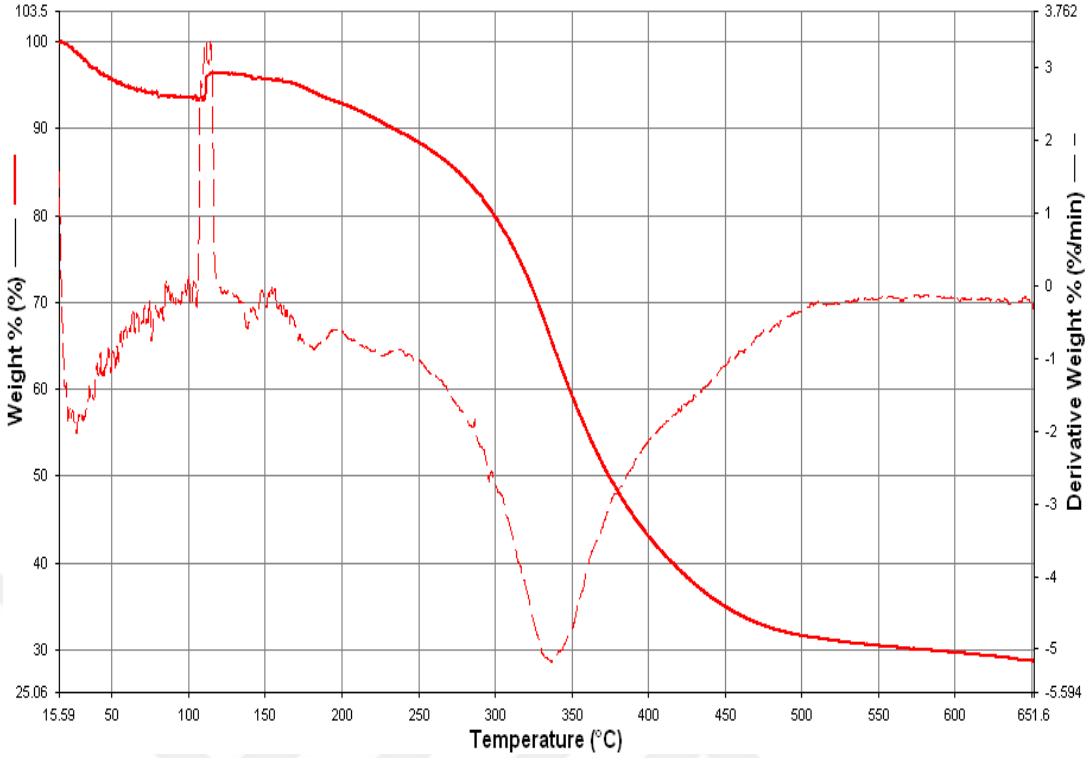
%Kayıp= 72.775%

Şekil 3.26. İskelenin SBF içerisinde yedi günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği



%Kayıp= 72.792%

Şekil 3.27. İskelenin SBF içerisinde 14 günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği

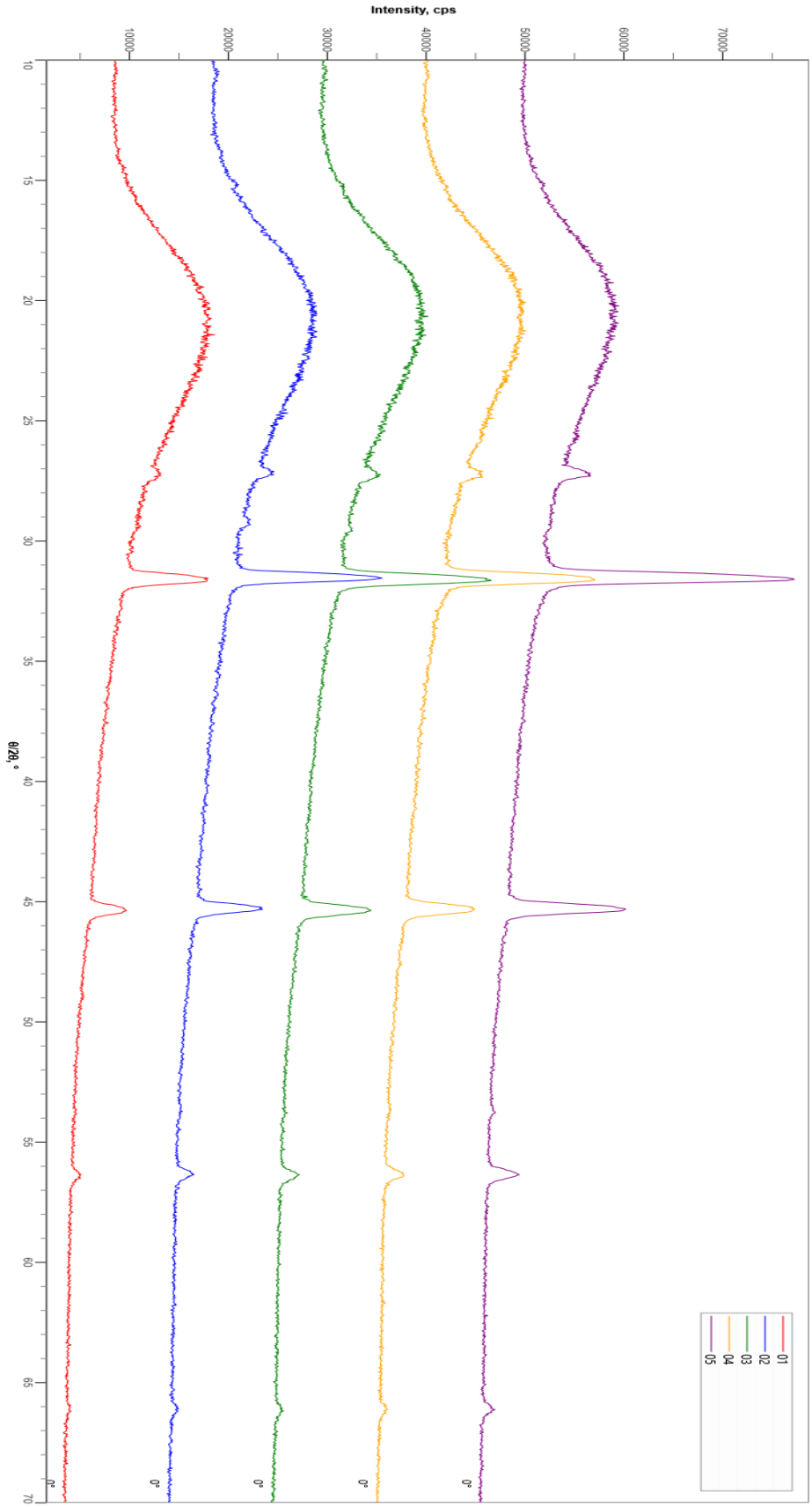


%Kayıp= 71.240%

Şekil 3.28. İskelenin SBF içerisinde 21 günlük inkübasyon sonrası TGA grafiği

3.1.5. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analizi Sonuçları

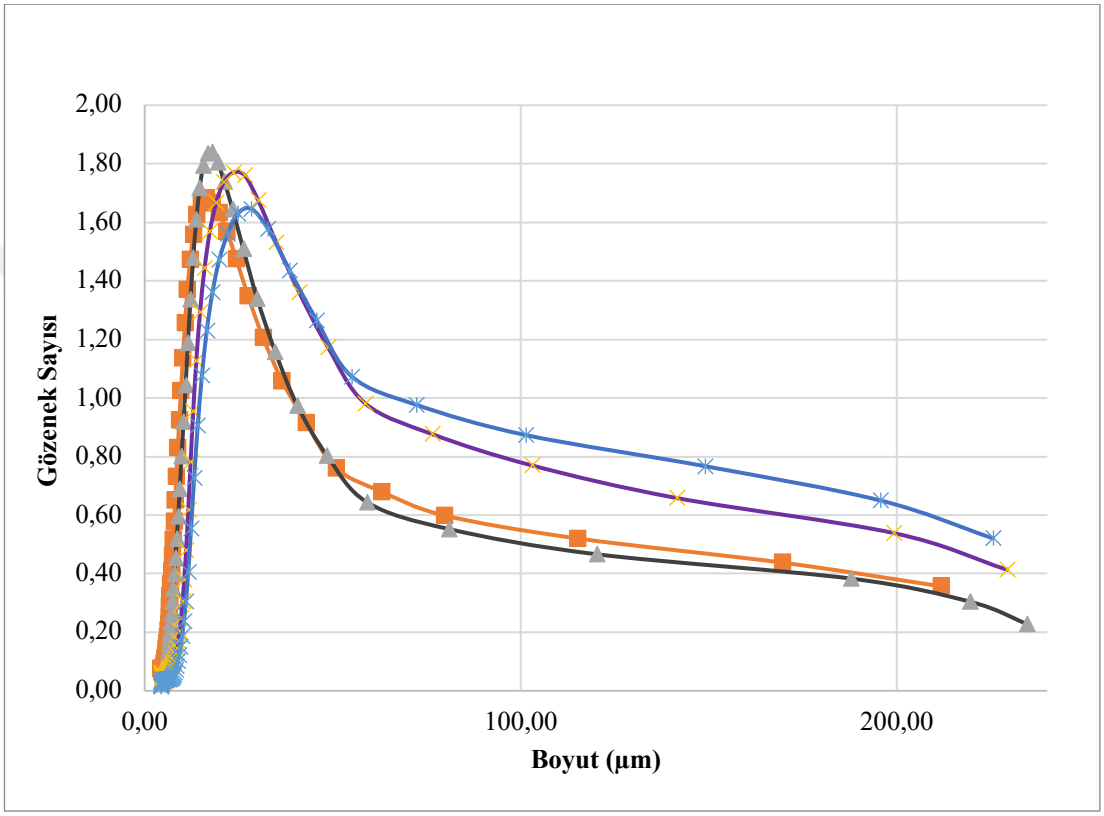
XRD analizi sonucunda biyomalzemenin SBF içerisinde inkübe edilmesi sonucu biriktirdiği trikalsiyum fosfata ait pik ile teyit edilmiş ve inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak pik şiddetinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Yapı iskelelerinin XRD grafiği

3.1.6. Cıva Porozimetresi Analizi Sonuçları

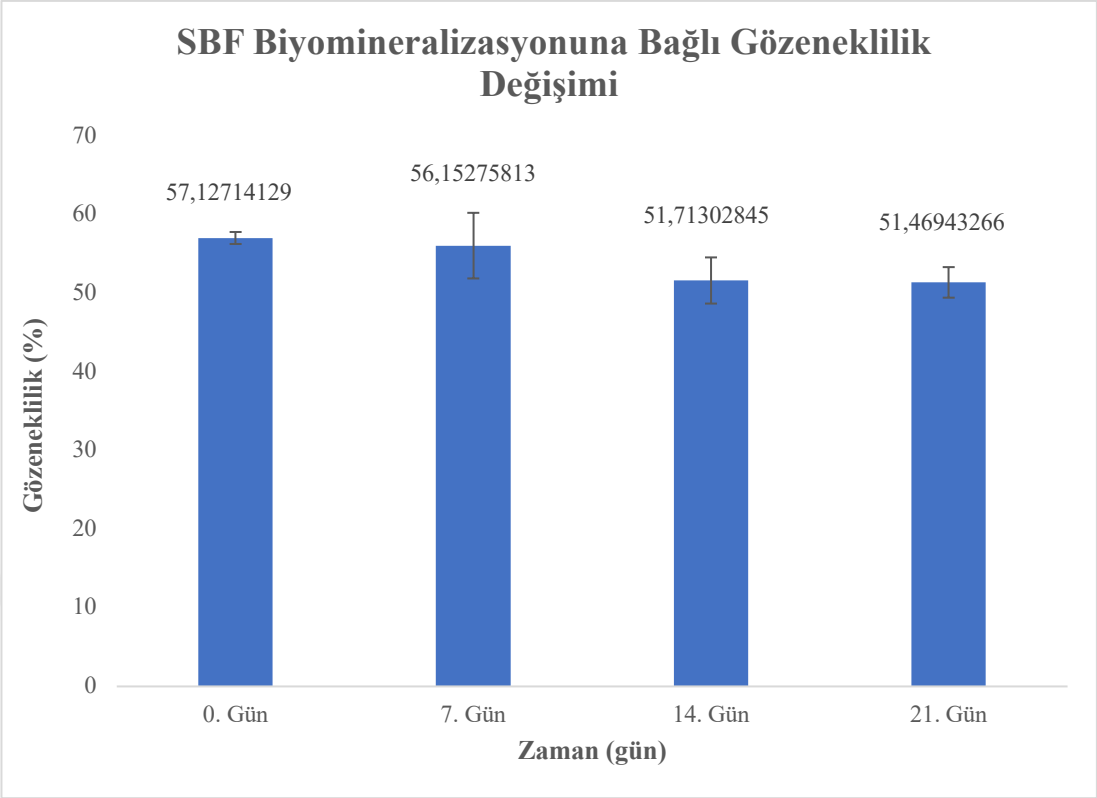
Cıva porozimetresi analizi ile biyomalzemenin gözenek dağılımına bakılmış ve gözenek boyutlarının ortalama 100 µm olduğu bulunmuştur (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. Yapı iskelelerinin cıva porozimetresi grafiği

3.1.7. Yoğunluk ve Gözeneklilik Ölçümü Sonuçları

Arşimet prensibi kullanılarak yapılan Etil alkol yer değiştirme deneyi sonucunda biyomalzemenin gözeneklilik değişimi SBF içerisinde inkübasyon süresi ile ters orantılı olduğu, SBF içerisinde bekleme süresi arttıkça artan gözenek çeperlerinde biriken hidroksiapatit çekirdeklenmelerinden dolayı gözenekliliğin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. İskelelerin SBF biyomineralizasyonuna bağlı gözeneklilik oranı değişimi

3.1.8. Şişme (Su Tutma) Testi Sonuçları

Geliştirilen liyofilize haldeki kompozit yapı iskelelerinin tartım sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İskelelerin kuru ağırlıkları

Deney Grubu	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
0. Gün	72,7 mg	73,2 mg	77,8 mg	75,8 mg
7. Gün	71,8 mg	83,0 mg	79,0 mg	87,2 mg
14. Gün	85,4 mg	74,7 mg	71,2 mg	73,4 mg
21. Gün	87,5 mg	84,0 mg	72,7 mg	83,6 mg
PBS	68,4 mg	68,3 mg	70,3 mg	57,6 mg

24 saat boyunca 37˚C sıcaklıkta, 0,1 M PBS içerisinde inkübe edilmelerinin ardından yüzeydeki fazla ıslaklıkları kurutma kâğıdı ile dikkatle alınan iskelelerin ıslak ağırlıkları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.2).

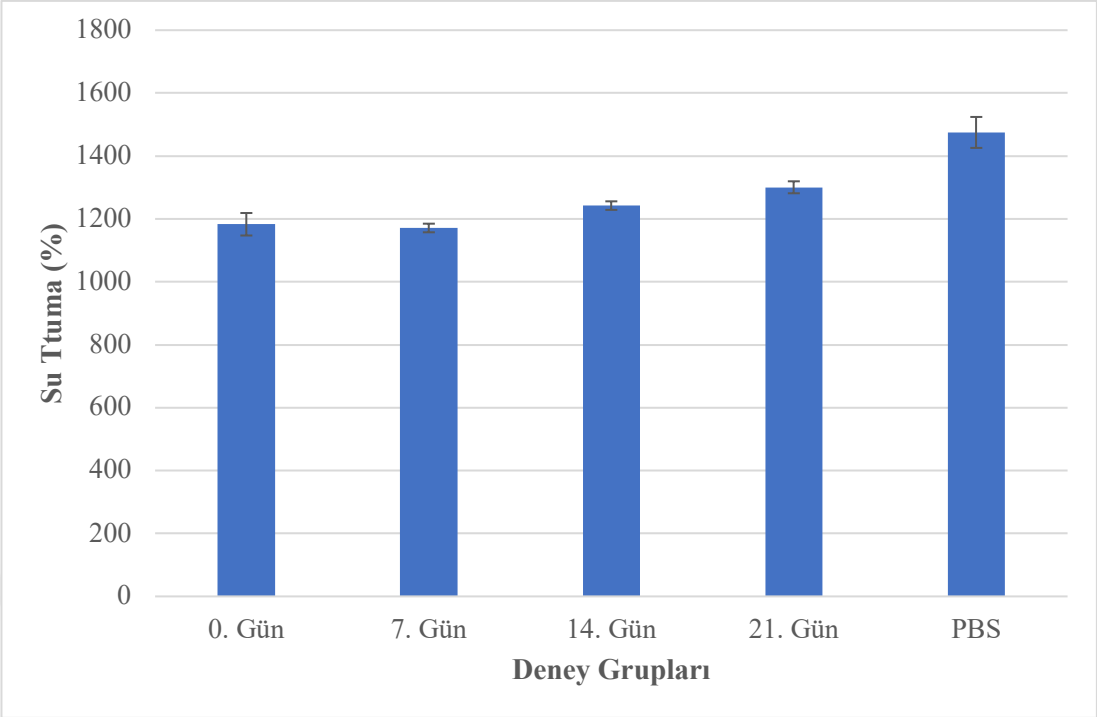
Çizelge 3.2. İskelelerin ıslak ağırlıkları

Deney Grubu	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
0. Gün	946,5 mg	926,8 mg	1028,6 mg	941,6 mg
7. Gün	908,0 mg	1042,6 mg	1017,0 mg	1113,4 mg
14. Gün	1132,6 mg	998,8 mg	966,4 mg	990,1 mg
21. Gün	1221,9 mg	1189,0 mg	1028,8 mg	1149,8 mg
PBS	1068,8 mg	1056,3 mg	1084,9 mg	949,1 mg

İskelelerin su tutma kapasiteleri Şekil 2.8'deki formül kullanılarak hesaplanmıştır ve aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.3, Şekil 3.32).

Çizelge 3.3. İskelelerin su tutma kapasiteleri

Deney Grubu	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Ortalama	Std Sapma
0. Gün	1201,93	1166,12	1222,11	1142,22	1183,09	35,76
7. Gün	1164,62	1156,14	1187,34	1176,83	1171,24	13,69
14. Gün	1226,23	1237,08	1257,30	1248,91	1242,38	13,59
21. Gün	1296,46	1315,48	1315,13	1275,36	1300,61	19,03
PBS	1462,57	1446,56	1443,24	1547,74	1475,03	49,20



Şekil 3.32. İskelelerin su tutma kapasiteleri

3.1.9. Enzimatik Biyobozunma Testi Sonuçları

Enzimatik biyobozunma için seçilen iskelelerin Tripsin/EDTA içerisinde inkübe edilmeden önceki ve üç günlük biyobozunma sonrası kuru ağırlıkları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.4).

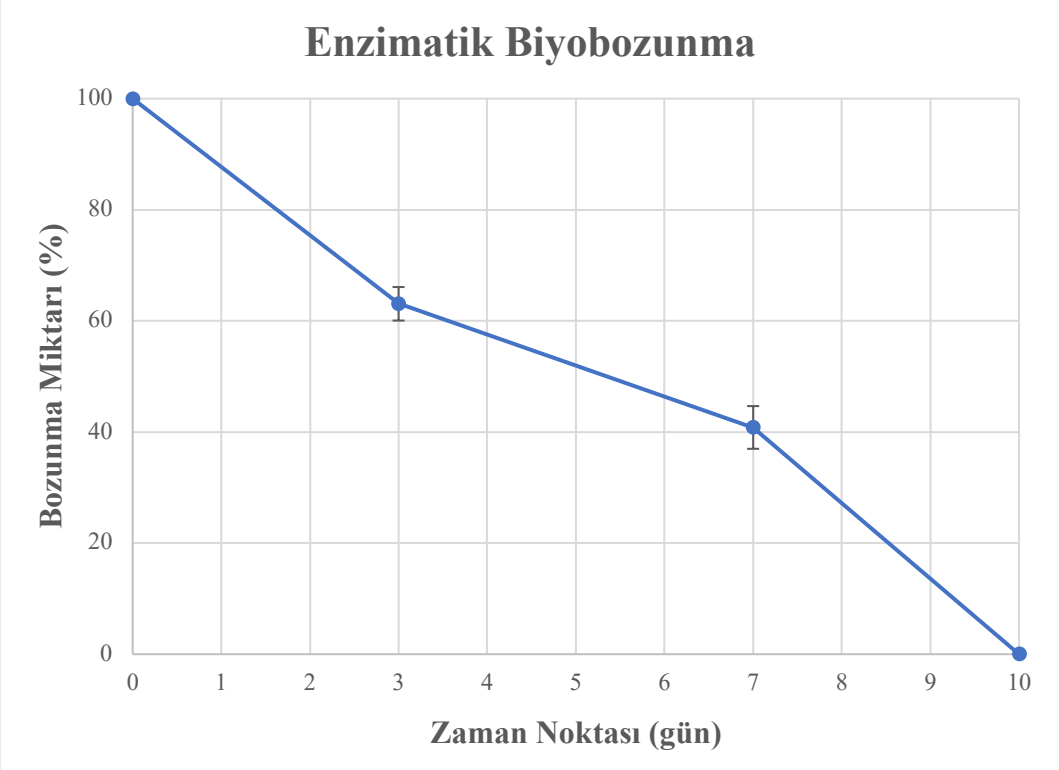
Çizelge 3.4. İskelelerin üç günlük enzimatik biyobozunma miktarı

	İlk ağırlık	Son ağırlık	Bozunan miktarı	Bozunma yüzdesi
	13,6 mg	8,9 mg	4,7 mg	%34,6
	17,0 mg	10,4 mg	6,6 mg	%38,8
Ortalama	15,3 mg	9,65 mg	5,65 mg	%36,9
Std Sapma	2,40	1,06	1,34	3,02

Enzimatik biyobozunma için seçilen iskelelerin Tripsin/EDTA içerisinde inkübe edilmeden önceki ve yedi günlük biyobozunma sonrası kuru ağırlıkları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. İskelelerin yedi günlük enzimatik biyobozunma miktarı

	İlk ağırlık	Son ağırlık	Bozunan miktarı	Bozunma yüzdesi
	16,5 mg	7,2 mg	9,3 mg	%56,4
	17,8 mg	6,8 mg	11,0 mg	%61,8
Ortalama	17,15 mg	7,0 mg	10,15 mg	%59,2
Std Sapma	0,92	0,28	1,20	3,84

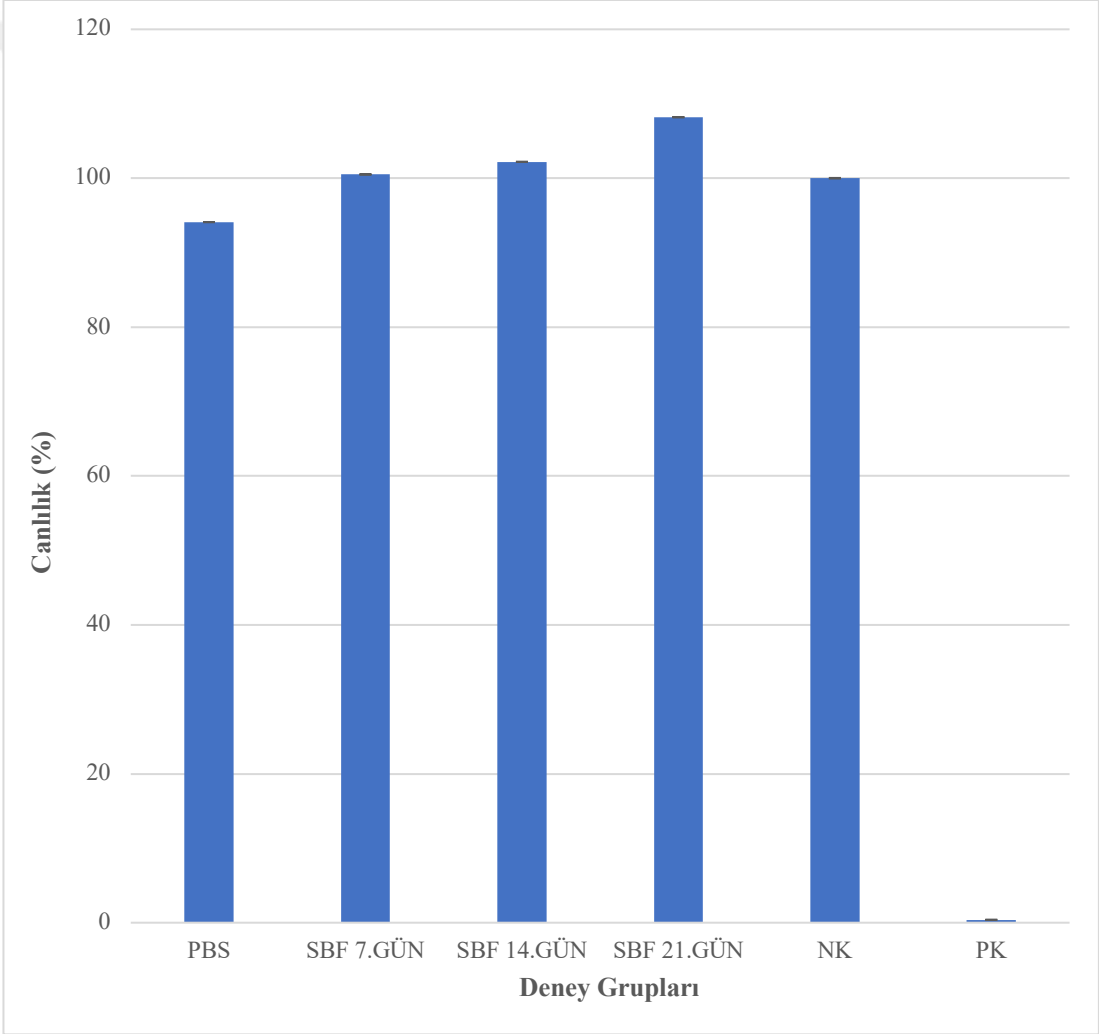


Şekil 3.33. İskelelerin biyobozunma miktarları

3.1.10. Biyouyumluluk Testleri Sonuçları

3.1.10.1. *İn vitro* Sitotoksisite Testi Sonuçları

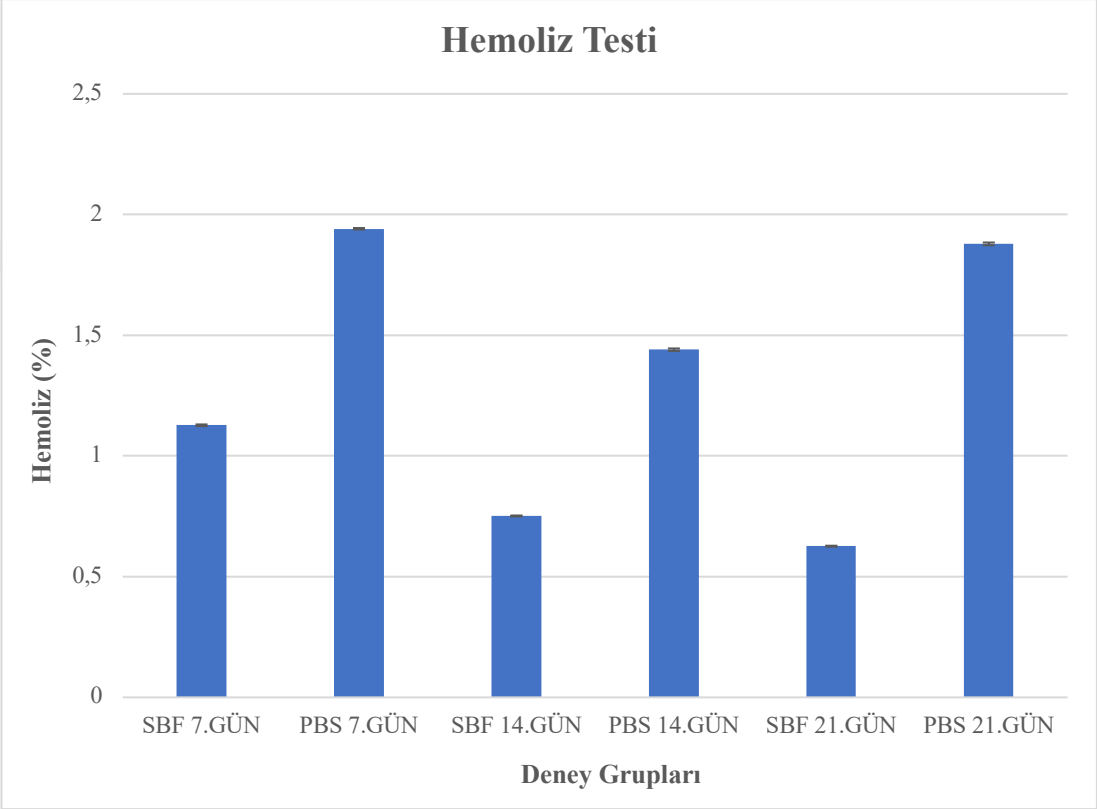
Biyomalzemelerin MTT reaktifi kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksisite analizi sonucunda dikkate değer sitotoksik etki gözlenmemiş olup, biyomalzemenin hücre proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir (Şekil 3.33).



Şekil 3.34. Deney gruplarının canlılık yüzdeleri

3.1.10.2. Hemoliz Testi Sonuçları

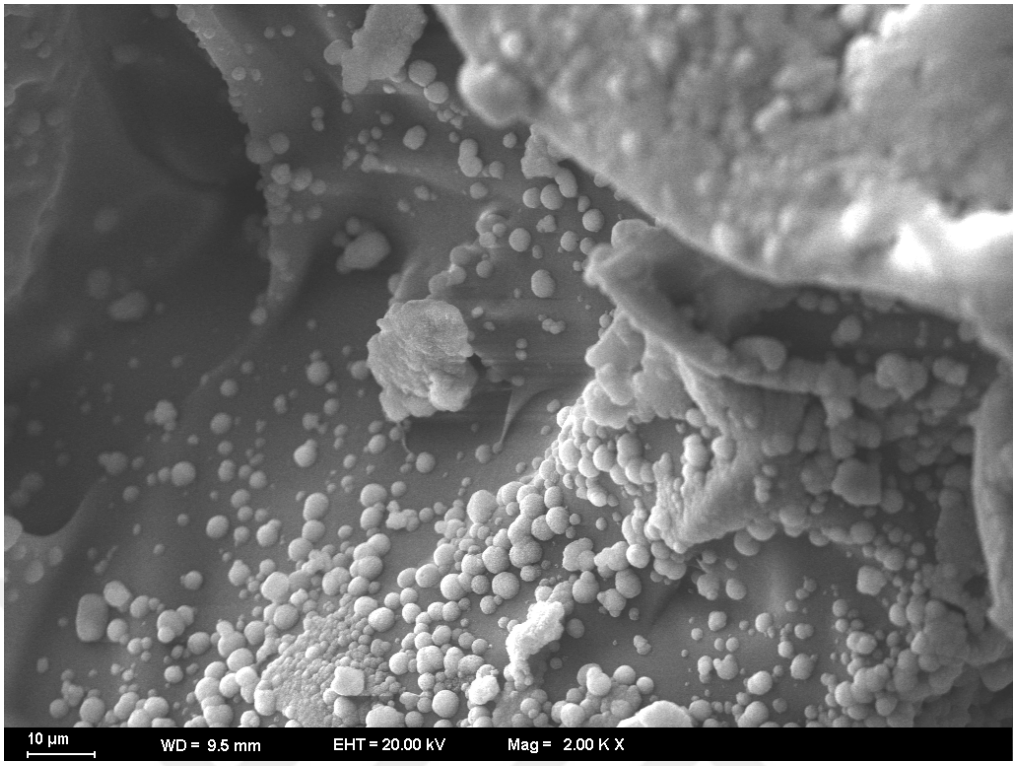
ISO 10993-4 standardına göre gerçekleştirilen testin sonucunda biyomalzemelerin dikkate değer hemolitik etki göstermediği bulunmuştur (Şekil 3.34).



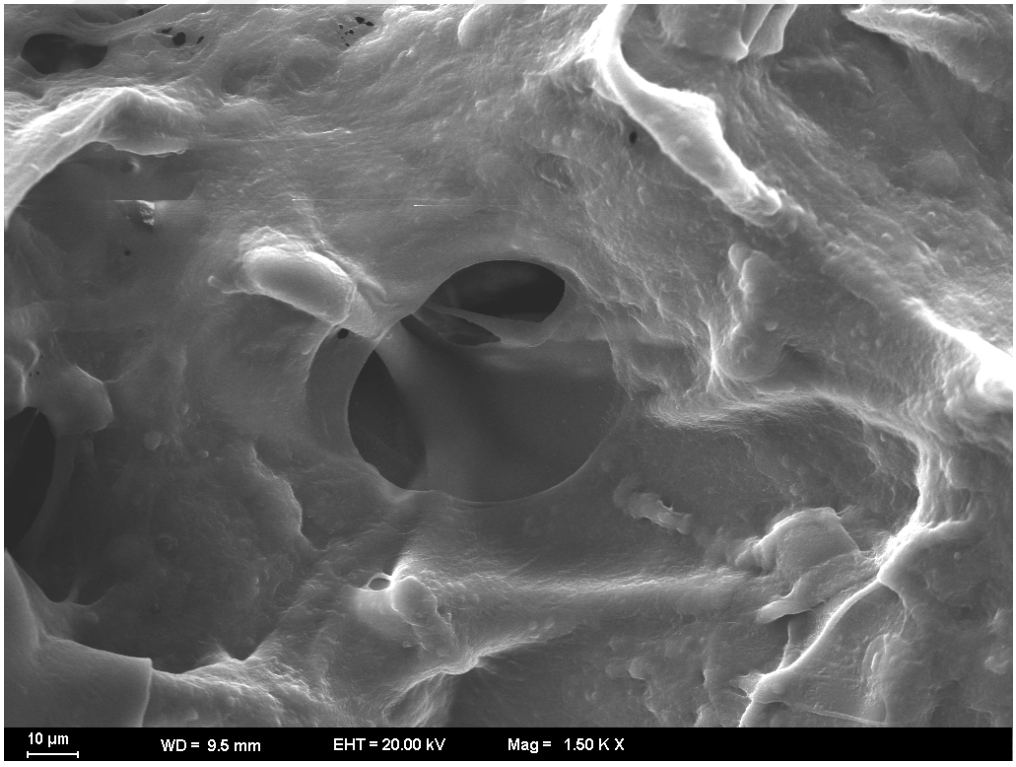
Şekil 3.35. Deney gruplarının hemoliz yüzdeleri (PK: %100)

3.2. Hücreli Yapı İskelelerinin SEM Analizi Sonuçları

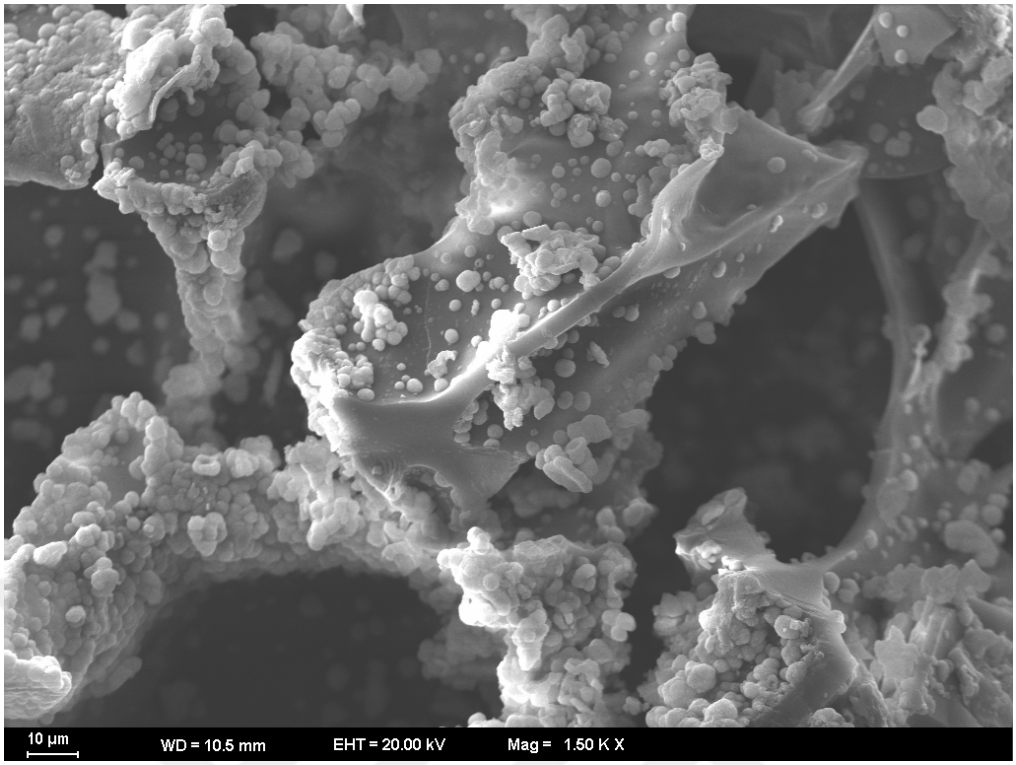
İnsan fetal osteoblast hücreleri ekilen biyomalzemelerin SEM kullanılarak yapılan morfolojik analizleri sonucunda hücrelerin gözeneklerin içerisinde tutunduğu, çoğaldığı ve bunula birlikte oluşturdukları hücre uzantıları görüntülenmiştir (Şekil 3.36-Şekil 3.47).



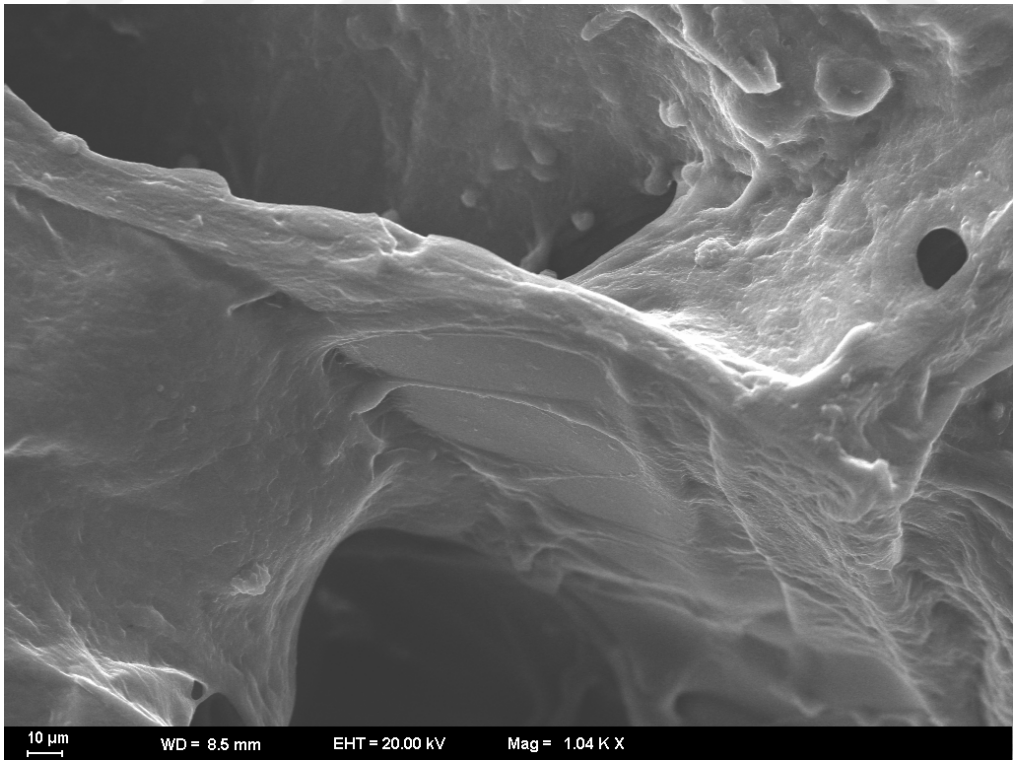
Şekil 3.36. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon koşullarında tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme)



Şekil 3.37. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon koşullarında tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme)



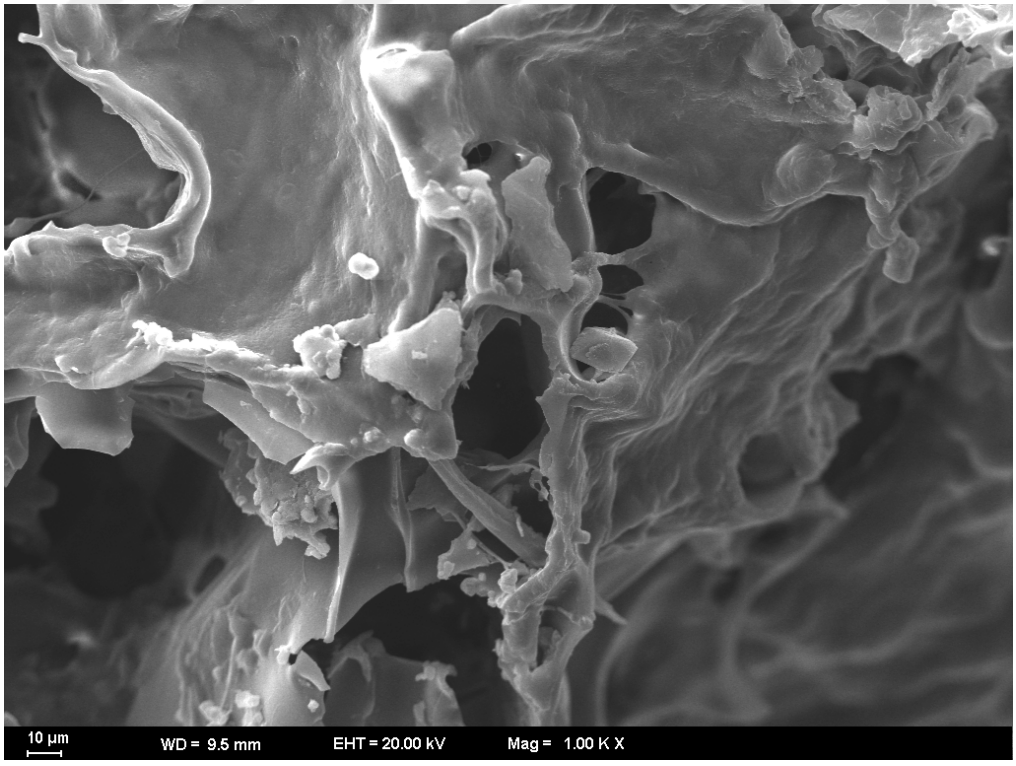
Şekil 3.38. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme)



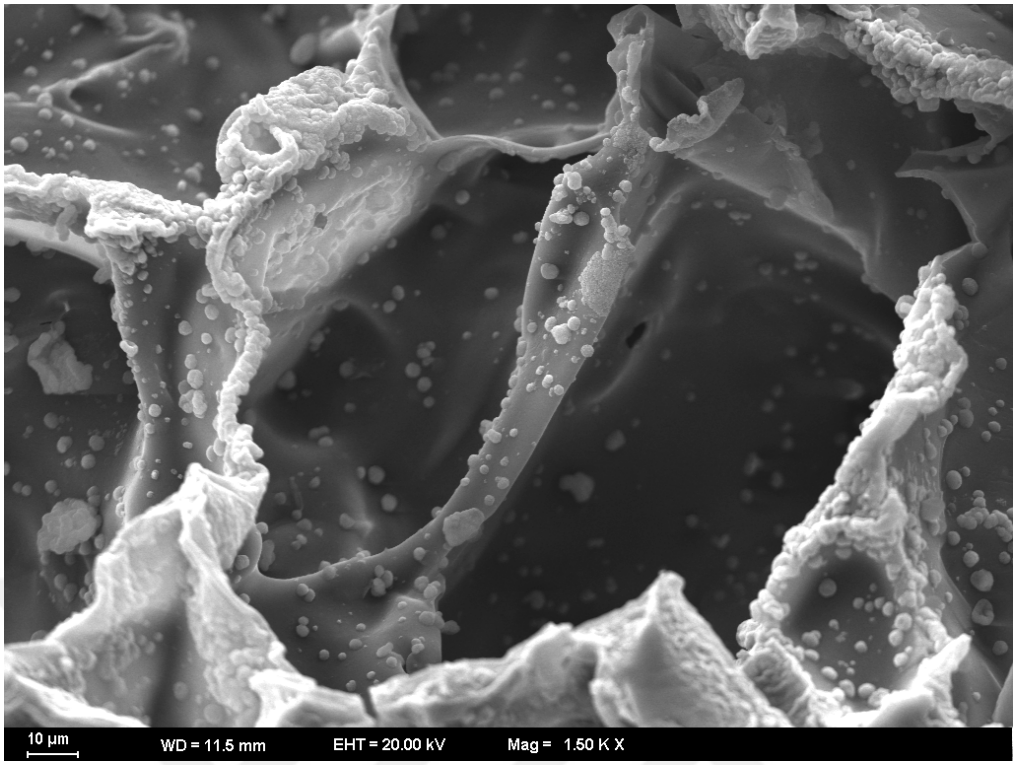
Şekil 3.39. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme)



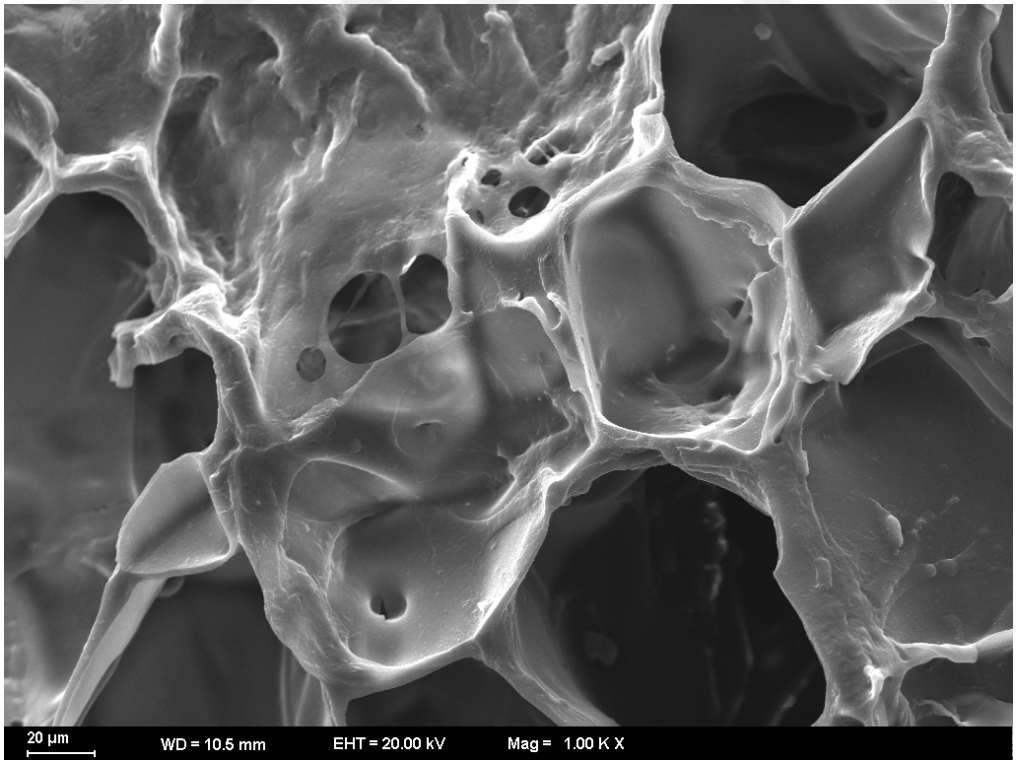
Şekil 3.40. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme)



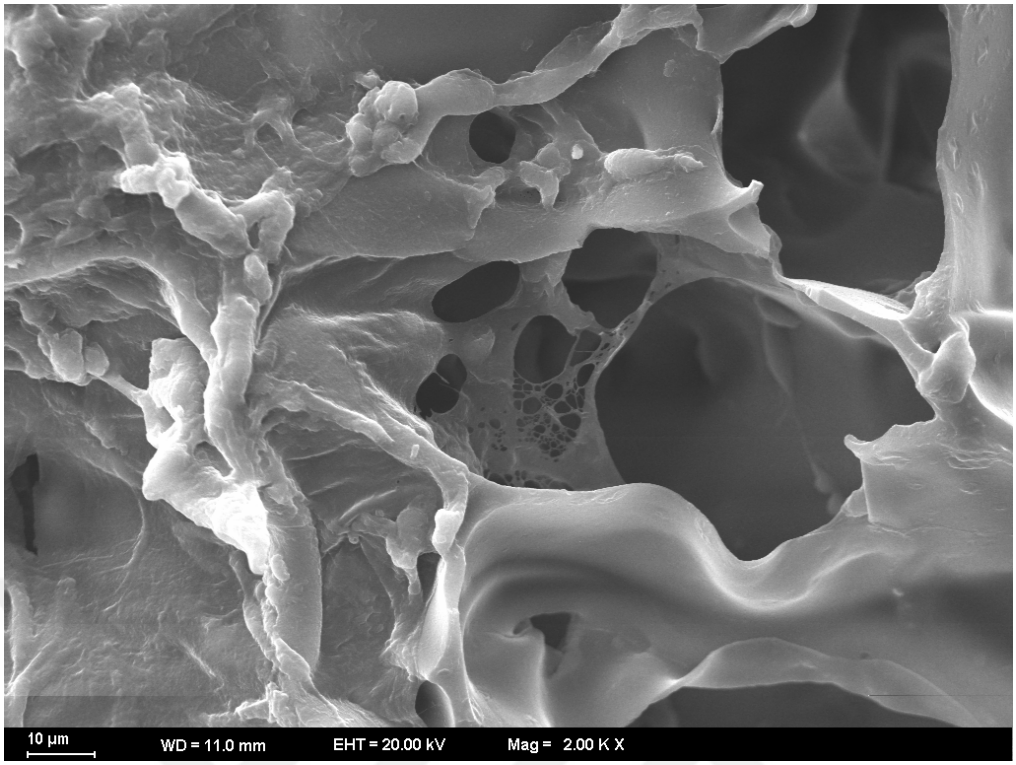
Şekil 3.41. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme)



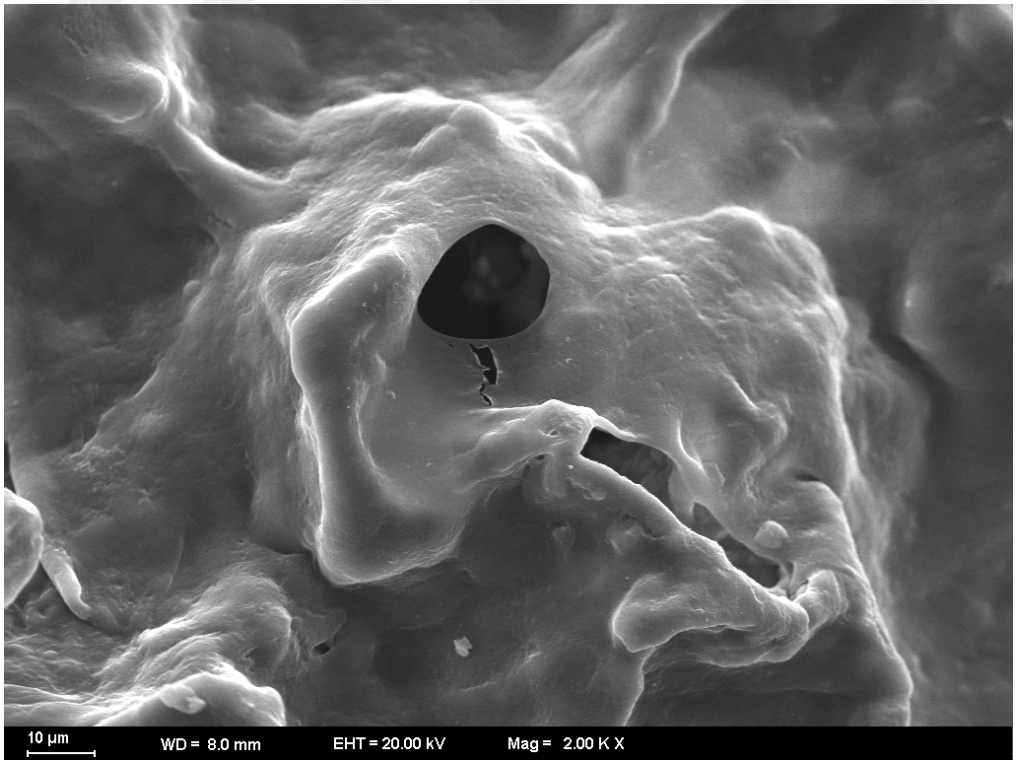
Şekil 3.42. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme)



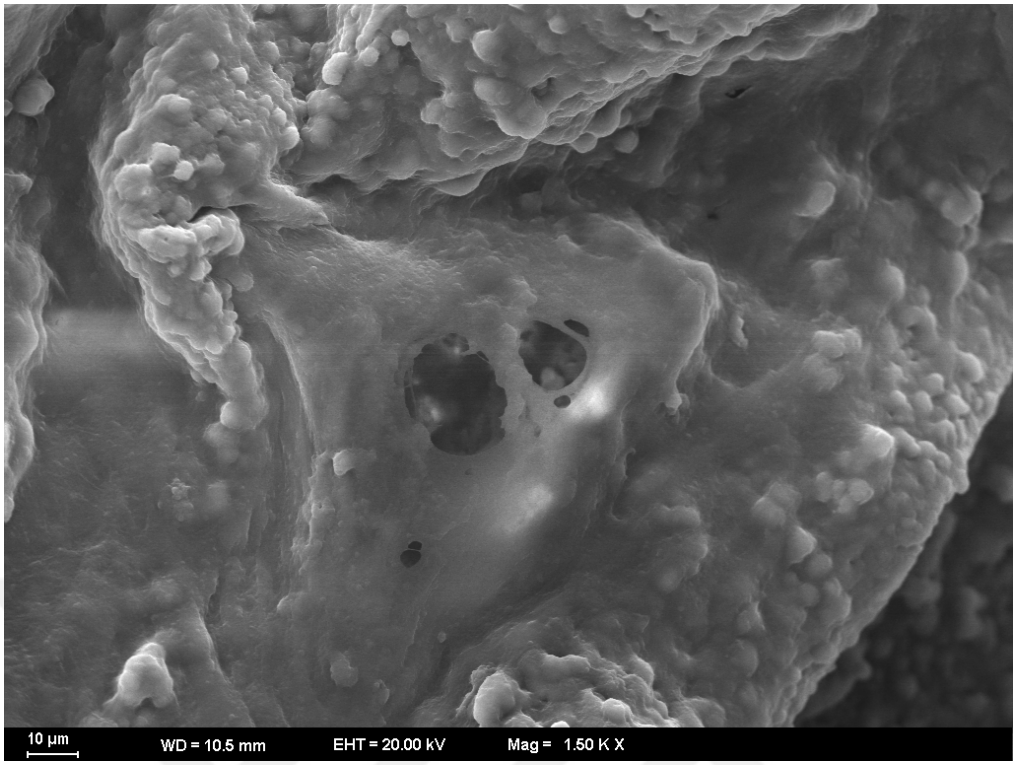
Şekil 3.43. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme)



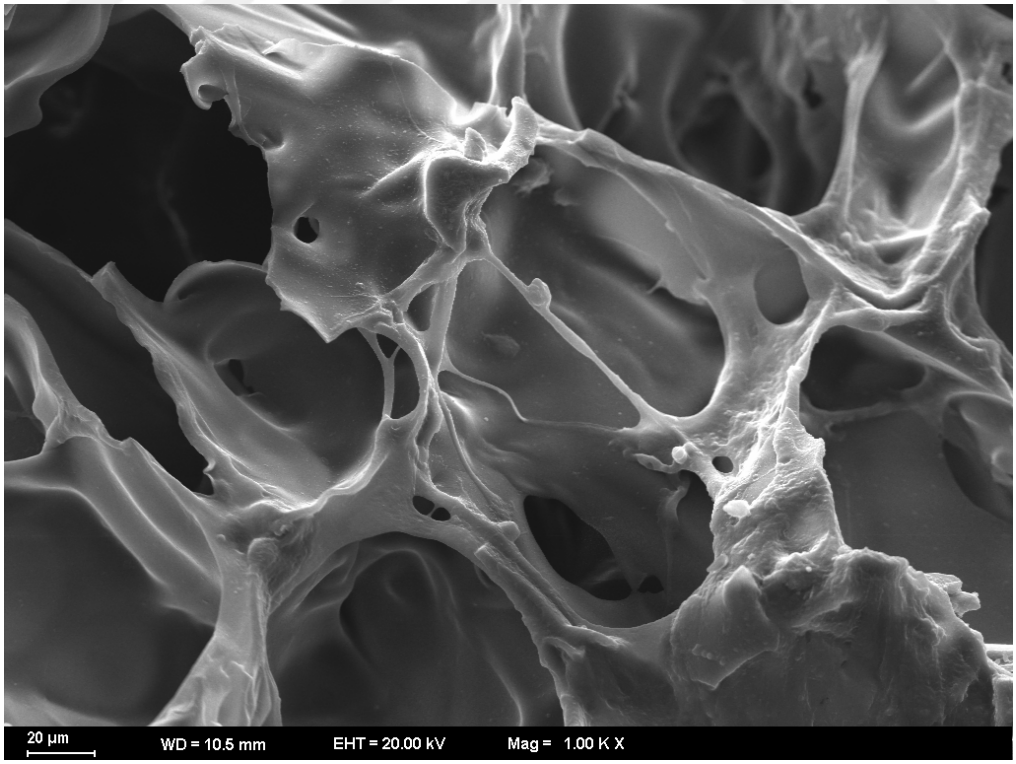
Şekil 3.44. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme)



Şekil 3.45. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (2000X büyütme)



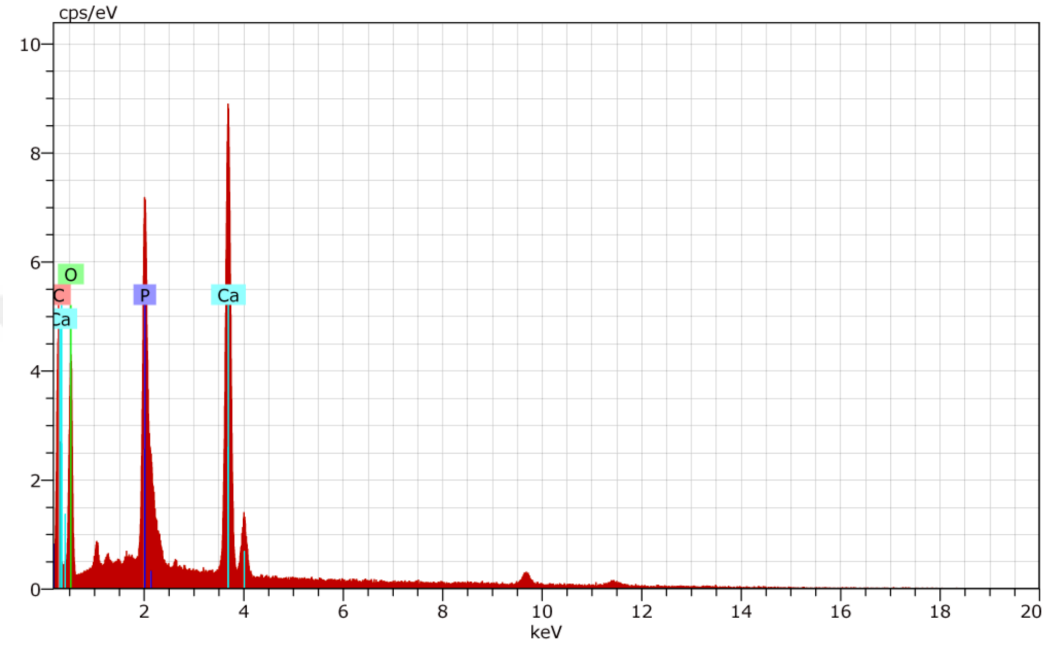
Şekil 3.46. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (1500X büyütme)



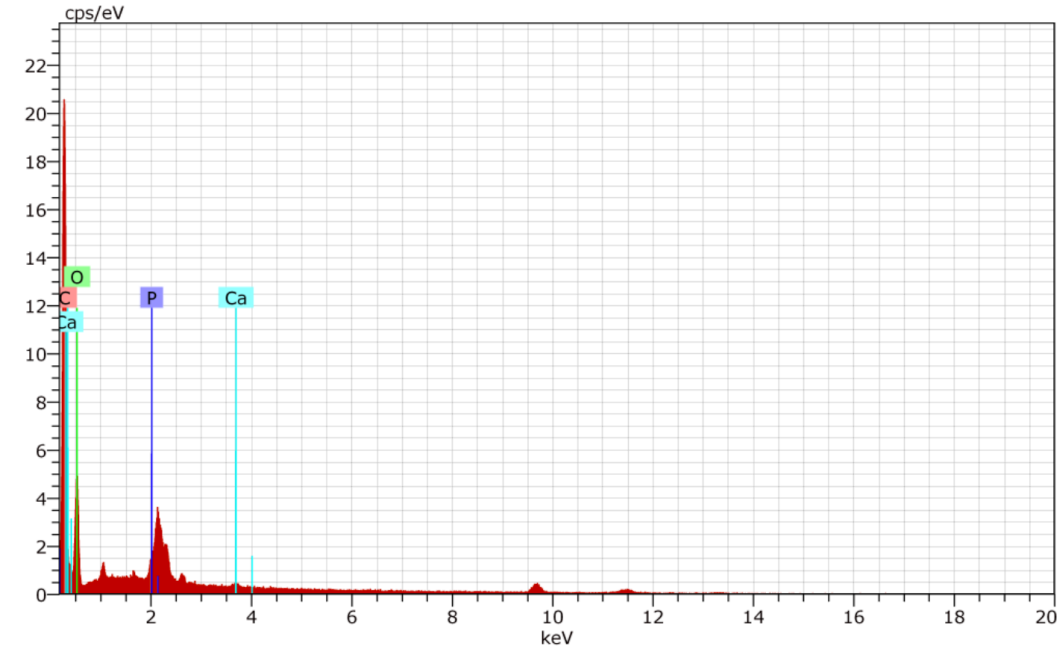
Şekil 3.47. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki SEM görüntüsü (1000X büyütme)

3.3. Hücreli Yapı İskelelerinin EDS Analizi Sonuçları

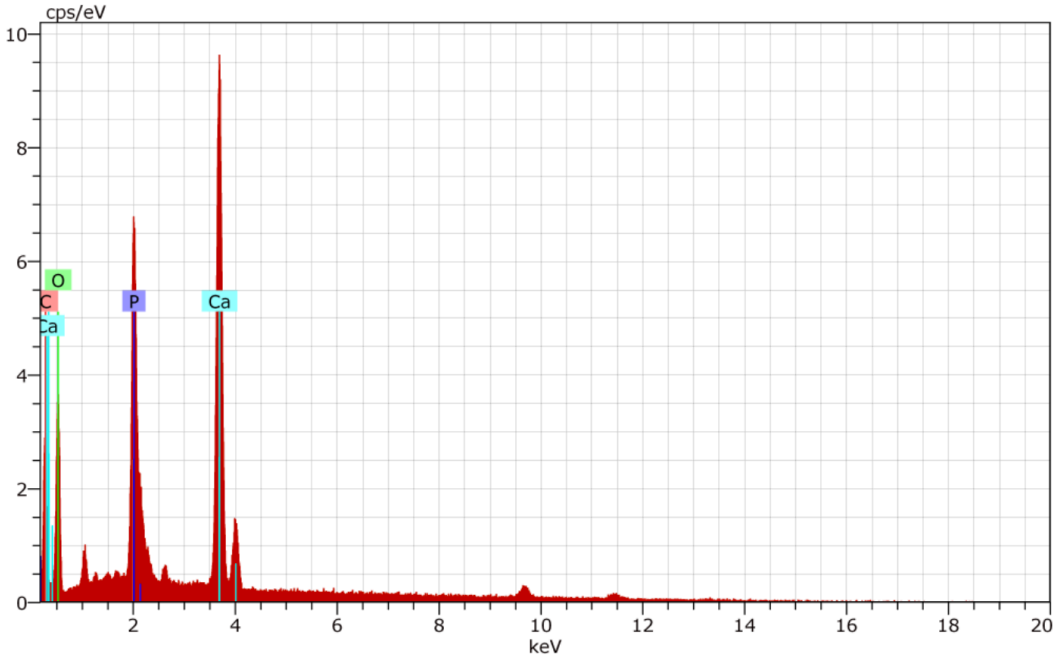
Yapılan EDS analizi sonucunda hücreli yapı iskelelerinde kalsiyum miktarının önce arttığı sonra azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.48-3.59).



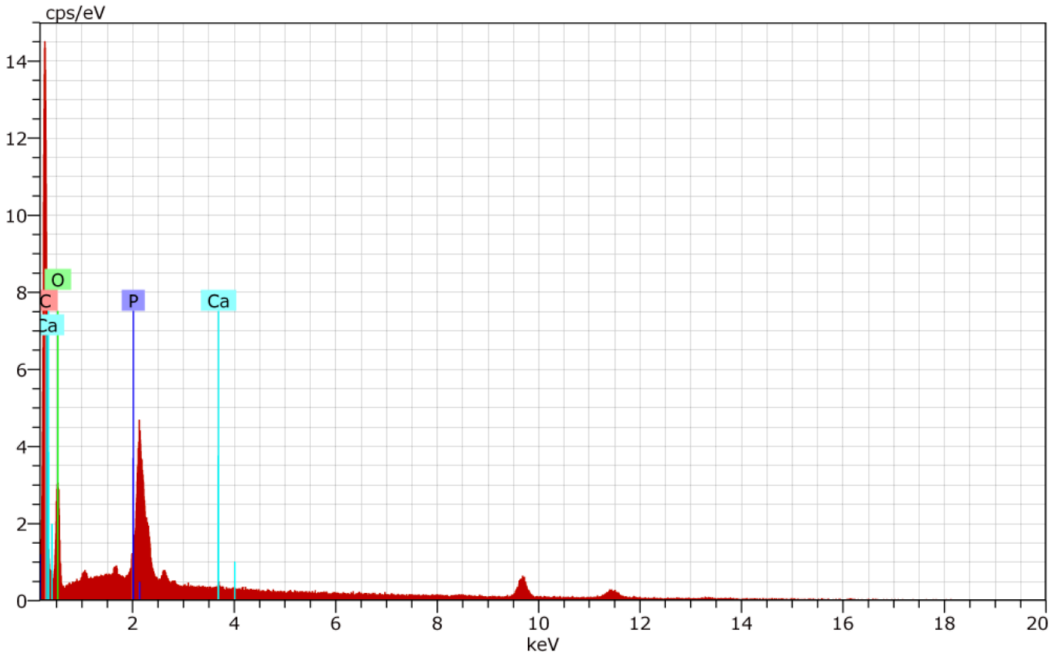
Şekil 3.48. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu



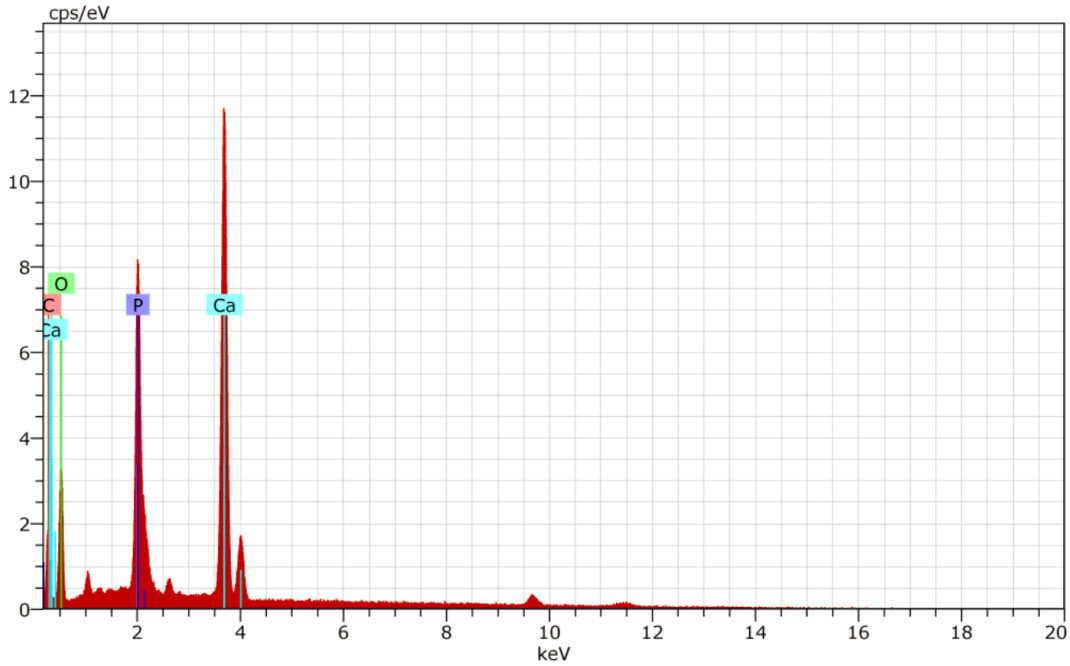
Şekil 3.49. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu



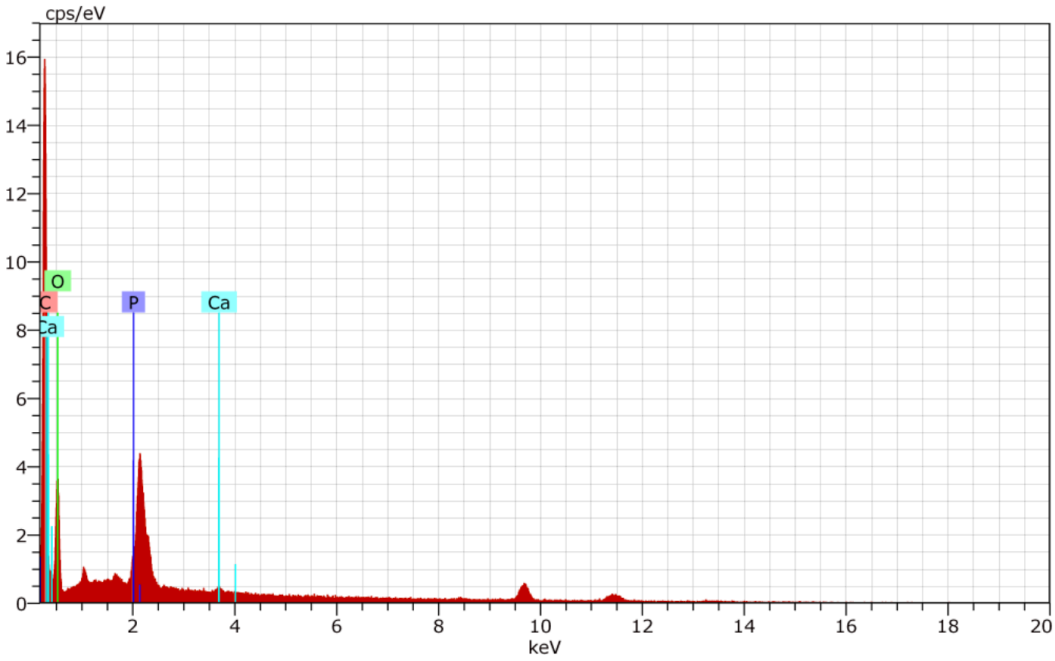
Şekil 3.50. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu



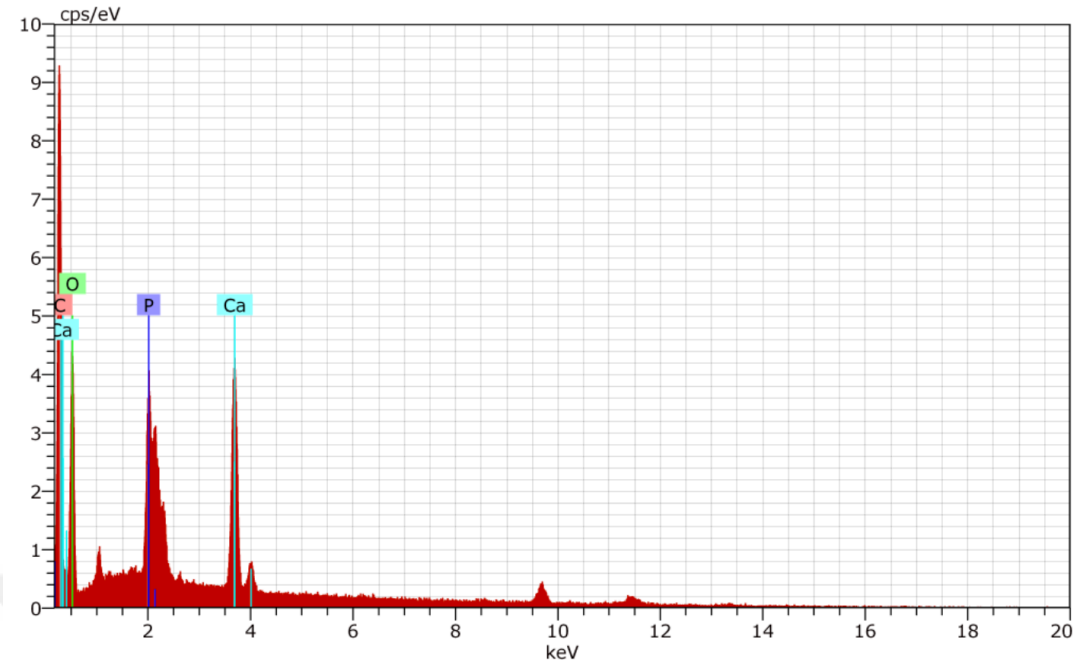
Şekil 3.51. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 36 saat sonraki EDS spektrumu



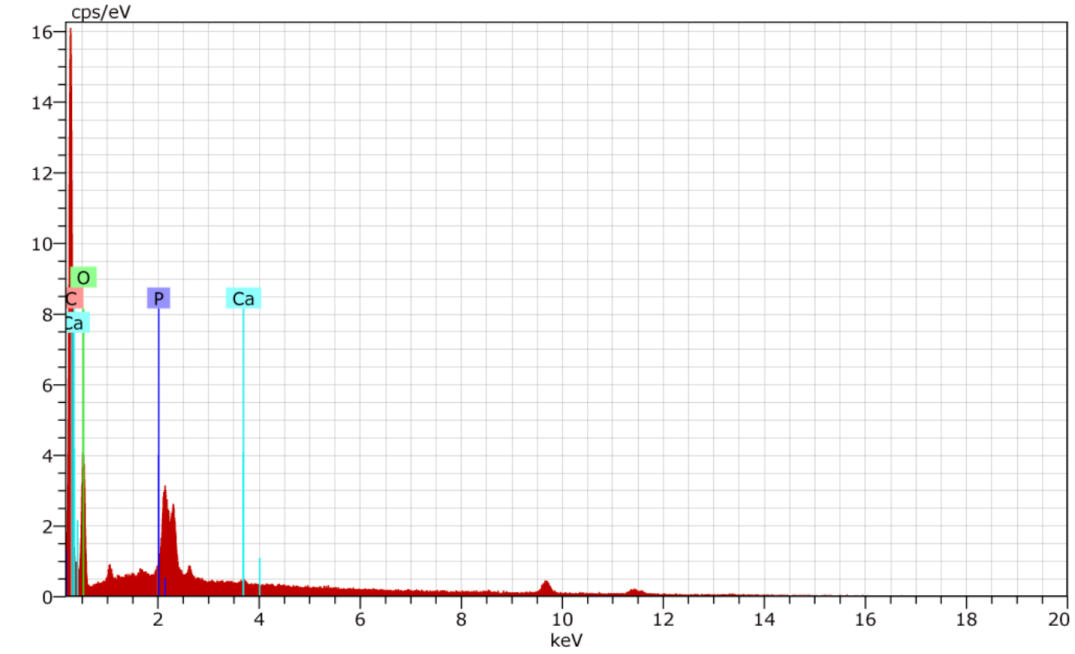
Şekil 3.52. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu



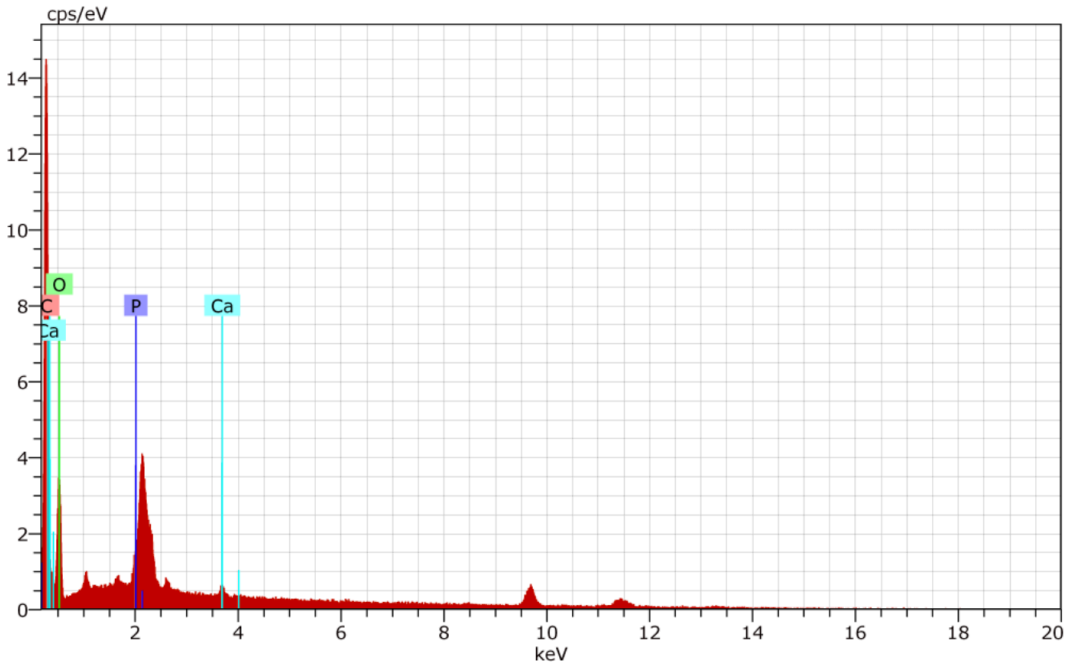
Şekil 3.53. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu



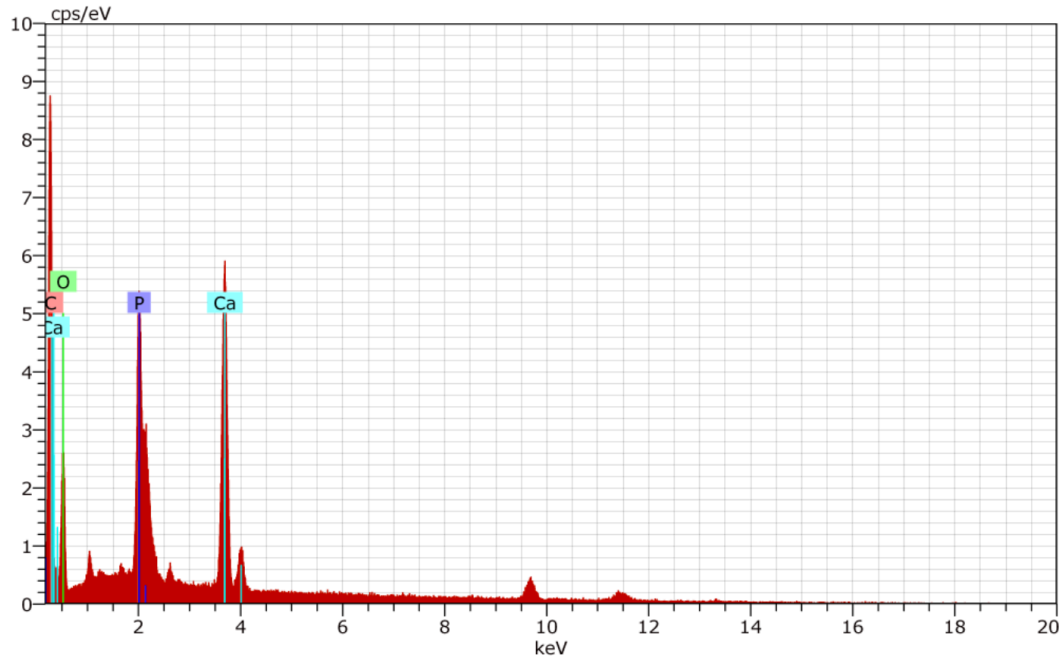
Şekil 3.54. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu



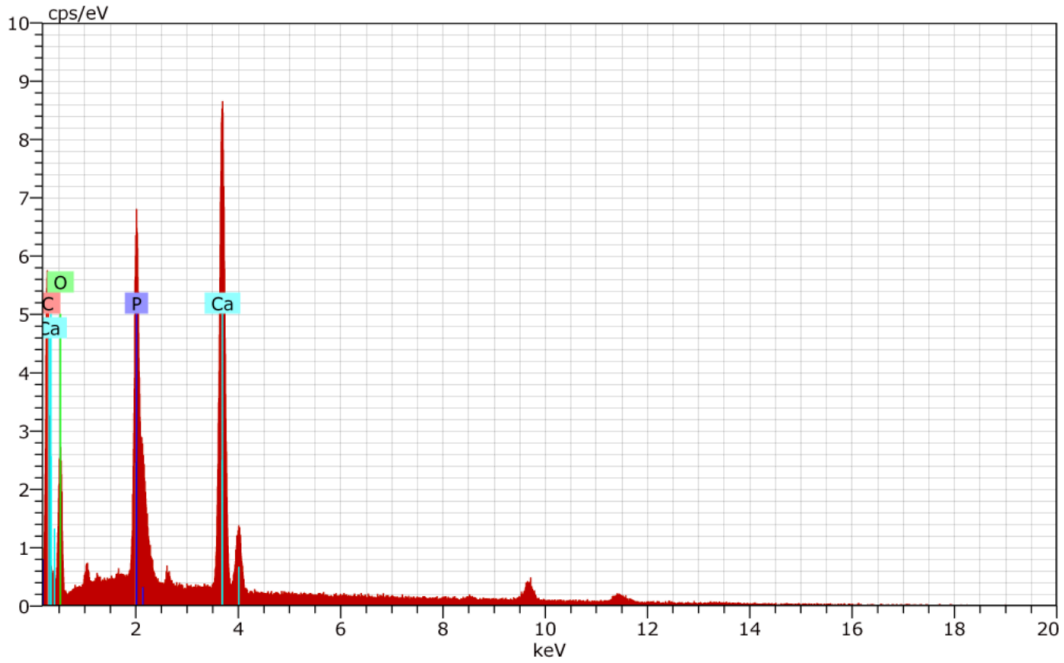
Şekil 3.55. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 14 gün sonraki EDS spektrumu



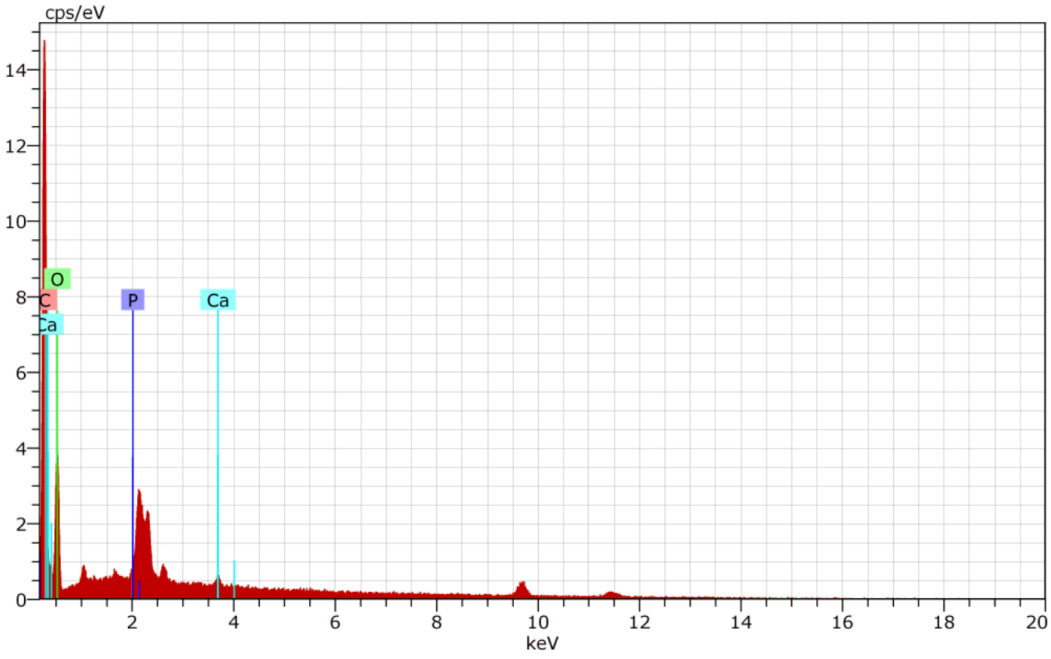
Şekil 3.56. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu



Şekil 3.57. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin osteojenik indüksiyon besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu



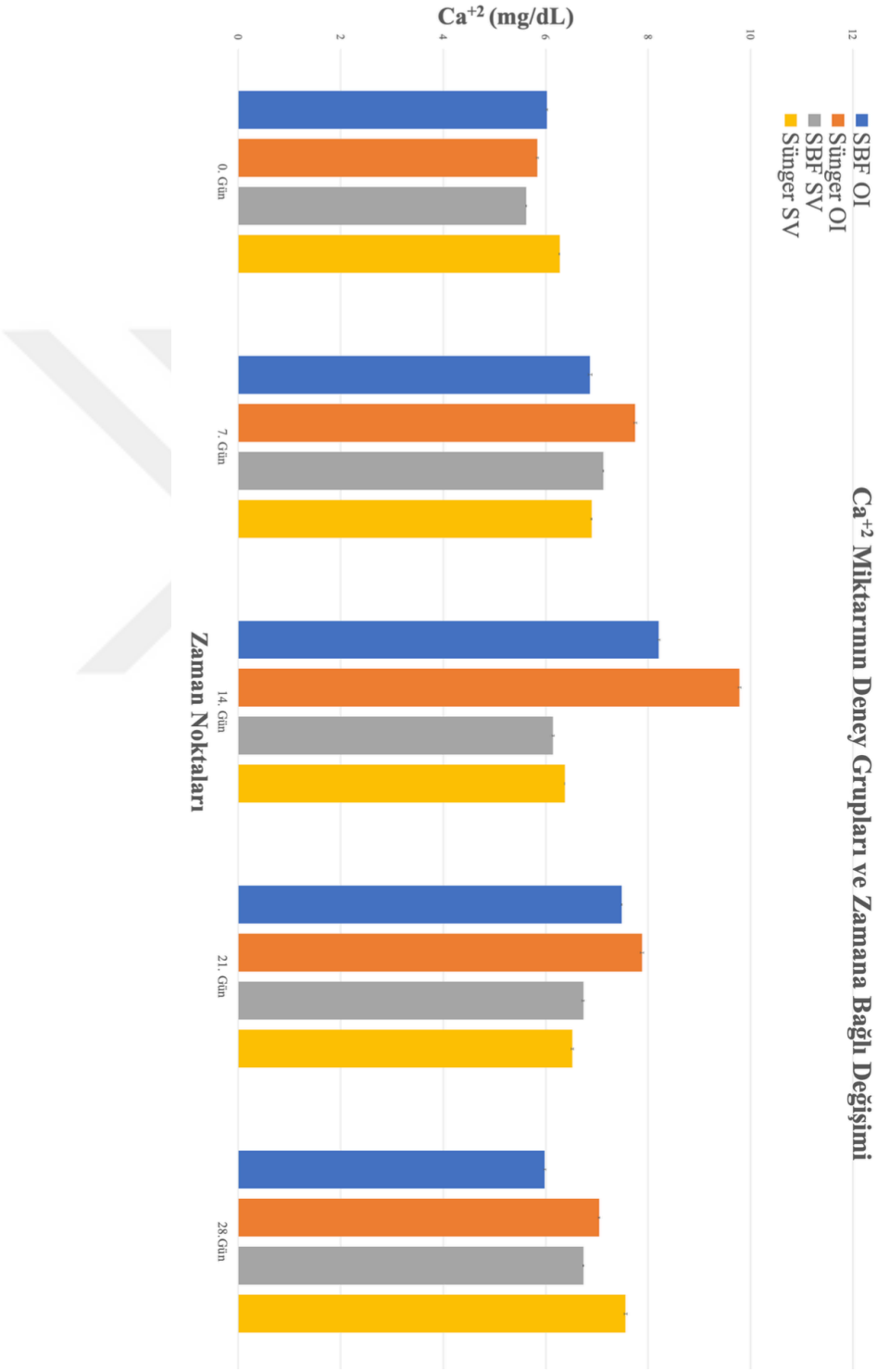
Şekil 3.58. SBF içerisinde biyomineralize edilmiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu



Şekil 3.59. SBF içerisinde biyomineralize edilmemiş iskelenin standart besiyerinde tohumlamadan 28 gün sonraki EDS spektrumu

3.4. Kalsiyum Miktar Tayini Sonuçları

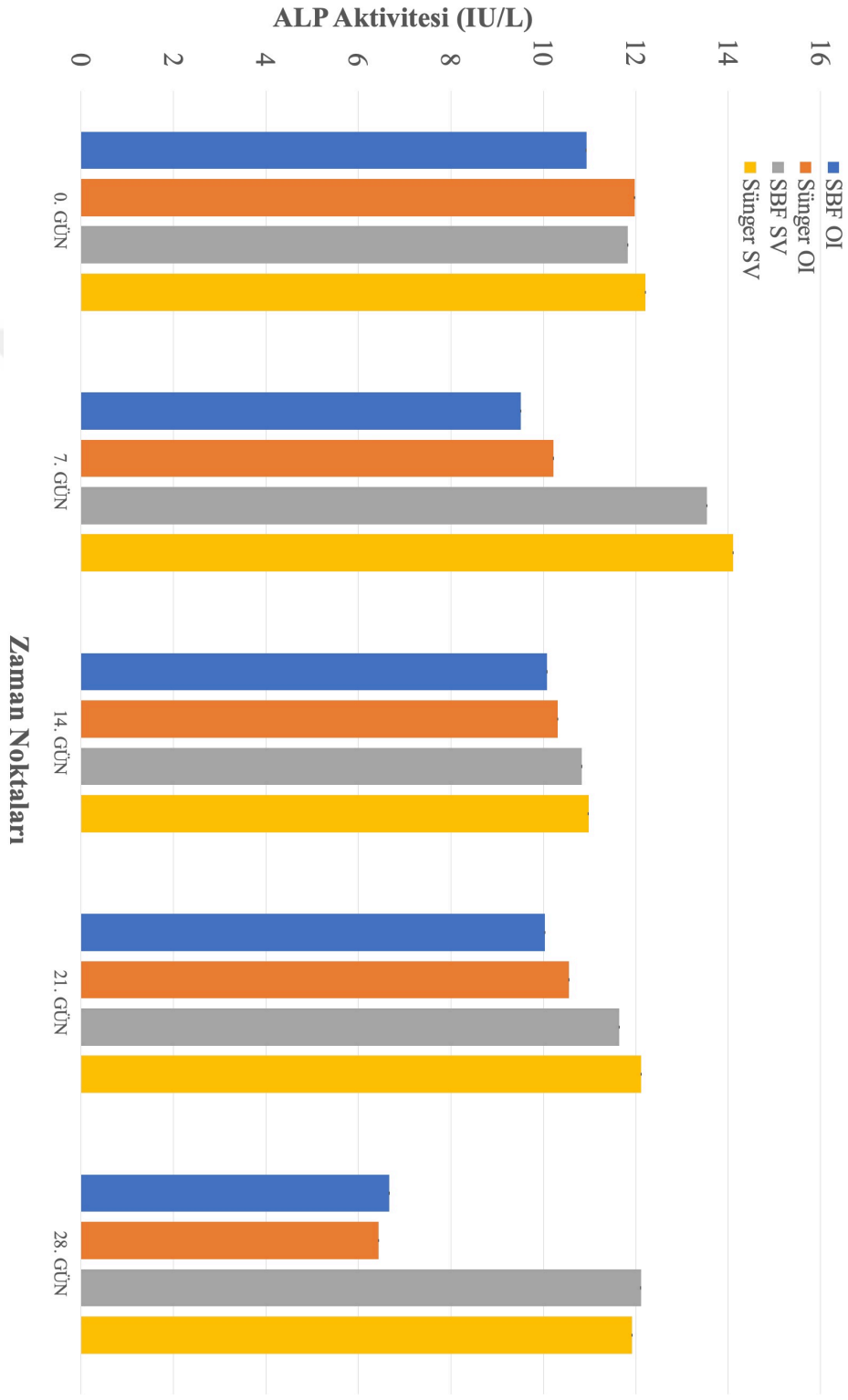
Kültür vasatına geçen kalsiyum miktarının 14. güne kadar arttığı, sonra azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.60).



Şekil 3.60. Kalsiyum miktarının deney grupları ve zamana bağlı değişimi

3.5. ALP Aktivite Analizi Sonuçları

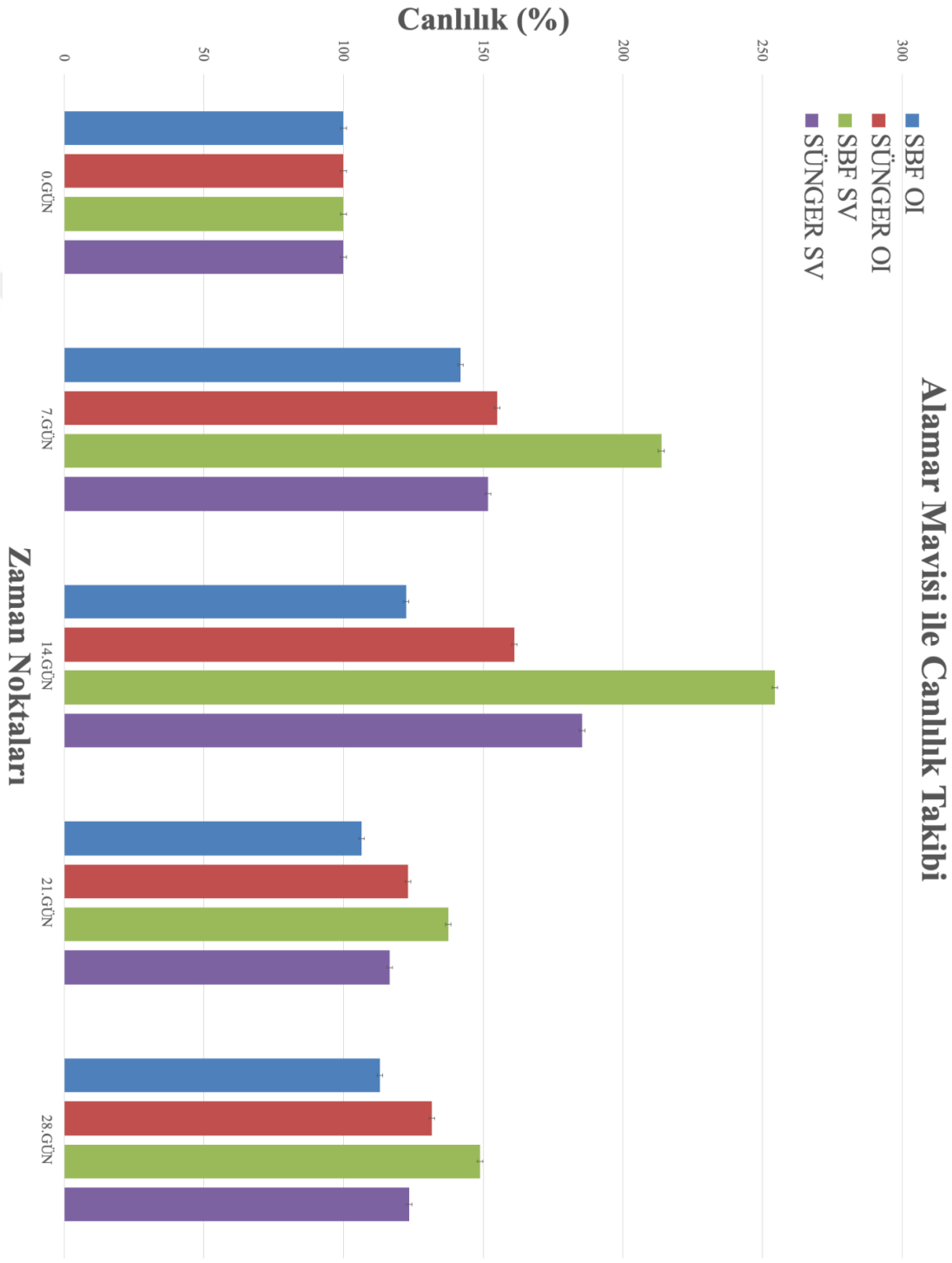
Kültür vasatından elde edilen örneklerdeki alkalen fosfataz aktivitesinin önce artan sonra azalan bir şekilde değişim gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.61).



Şekil 3.61. ALP aktivitesinin deney grupları ve zamana bağlı değişimi

3.2.4. Alamar Mavisi ile Canlılık Analizi

Belirlenen zaman noktalarında yapılan alamar mavisi canlılık analizi sonucunda canlılığın 14. güne kadar arttığı, sonrasında azaldığı görülmüştür (Şekil 3.62).



Şekil 3.62. Alamar mavisi ile canlılık testi

4. TARTIŞMA

SBF içindeki inkübasyon süresi uzadıkça biyomineralizasyon miktarı artmaktadır. XRD analizi sonuçlarında görülen piklerin (31,5˚ ;45,2˚; 56,2˚; 66˚) biyomineralizasyon süresi uzadıkça şiddetlenmesi ve keskinleşmesi de biyomalzemelerin içlerinde ve yüzeylerinde oluşan hidroksiapatit kristallenme derecelerinin de arttığını göstermektedir. 31,5˚ hidroksiapatit (112), (211) ve (300) düzlemlerinin kombinasyonunu göstermektedir (Xiao vd, 2021; Zhang vd, 2020; James vd, 2020).

TGA grafiklerinde de görülebileceği üzere biyomineralizasyon miktarı arttıkça biyomalzemelerin kütle kaybı azalmaktadır. Bu durum biyomineralizasyon miktarının artmasının biyomalzemelerin termal kararlılığını arttırdığını göstermektedir (Zhang vd, 2020; Yu vd, 2020; Wang vd, 2020).

FTIR analizinde görülen 3265-3280 cm^{-1} dalga sayısında O-H geniş bant, 2926-2928 cm^{-1} dalga sayısında C-H zayıf titreşimi, 1516-1531 cm^{-1} dalga sayısında C=O Amid I bandı, 1634-1635 cm^{-1} dalga sayısında N-H Amid II bandı pikleri trombosit lizatının protein yapısından gelirken 1039 cm^{-1} dalga sayısında PO_4^{3-} piki biyomineralizasyon sonucunda hidroksiapatit birikimini göstermektedir ve literatürdeki çalışmalar ile uyumludur (Babo et al., 2014; Bian & Xing, 2022; Chen vd, 2020; Tang vd, 2020).

ISO 10993-5 standardına uygun olarak insan fetal osteoblast hücre hatları kullanılarak yapılan MTT analizi ile *in vitro* sitotoksisite testinde negatif kontrol (NK) olarak kullanılan besiyerinde hücre canlılığı %100 alındığında pozitif kontrol (PK) olarak kullanılan %0,5 ve %1 fenol çözeltilerinde hücre canlılığı %0,39 bulunmuştur.

Deney gruplarında PBS içinde inkübe edilmiş biyomalzeme üzerinde hücre canlılığı %94,1; SBF içinde 7 gün inkübe edilmiş iskele üzerinde hücre canlılığı %100,5; 14 gün SBF içerisinde inkübe edilen biyomineralize iskele üzerindeki hücre canlılığı %102,2 ve 21 gün SBF içinde bekletilen iskelelerdeki hücre canlılığı %108,2 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre SBF inkübasyonu ile biyomineralize edilen yapı iskelelerinin insan fetal osteoblast hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bulgular, literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur (Şeker vd., 2020; Feroz vd., 2021; Kumar vd., 2020; Zhu vd., 2021; Qian vd., 2021).

Geliştirilen biyomineralize yapı iskelelerinin yoğunluk ve gözenek ölçümleri için Arşimet prensibinden yararlanılmış; etil alkol kullanılarak sıvı yer değiştirme yöntemi ile teorik gözeneklilik oranları bulunmuştur. SBF içerisinde inkübasyon süresi uzadıkça iskelelerin biyomineralizasyon ve gözeneklerin iç-duvar kısımlarında biriken hidroksiapatit miktarlarının artmasıyla gözeneklilik oranları %57'den %51,5'e düşmüş; ancak bu düşüşe rağmen cıva porozimetresi testi ile de desteklenen gözeneklilik sonuçları iskelelerin hücre tutunması, çoğalması ve göçü için uygun bir ortam olduğunu göstermiştir (Öfkeli vd., 2020; Gomez-Cerezo vd., 2021; Pooshidani vd., 2021; Zhou vd., 2021; Baier vd., 2021; Zamani vd., 2021).

Kompozit yapı iskelelerinin su tutma kapasitelerinin hesaplanmasında PBS içerisinde 24 saat inkübe edildikten sonra tartım sonuçlarının (ıslak ağırlıkları) liyofilize haldeki kuru ağırlıklarına göre yüzde artış oranı kullanılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda, SBF içerisinde farklı sürelerde inkübe edilen iskelelerin su tutma kapasitelerinin kuru ağırlıklarının 117,5-130 katı arasında değiştiği bulunmuştur. Kontrol grubu olarak kullanılan PBS içerisinde inkübe edilen grup ise kuru ağırlığının 147,5 katı su tutma kapasitesine sahiptir. Bu durum geliştirilen iskelelerin 3 boyutlu makro gözenekli ağ yapıda olduğunu desteklemektedir (Jarquín-Yáñez vd., 2016).

Tripsin/EDTA içerisinde 37˚C sıcaklıkta inkübe edilen kompozit yapı iskelelerinin 10 günün sonunda tamamen bozundukları gözlemlenmiştir. İskelelerden farklı zaman noktalarında örnekler alındığında biyobozunmanın 3. günün sonunda %37, 7. Günün sonunda %60 ve 10. günün sonunda %100 oranında olacak şekilde kademeli olarak gerçekleştiği bulunmuştur. Geliştirilen iskelelerin protein yapıda olmalarından kaynaklı olarak seçilen Tripsin/EDTA hücre kültürü deneylerinde kullanılan konsantrasyonda hazırlanmıştır.

ISO 10993-4 standardına göre yapılan kan uyumluluğu testi sonuçlarına göre pozitif kontrol olarak kullanılan distile su (dH_2O) PBS ile 1:4 oranında seyreltilmiş taze kan içerisindeki eritrositleri hemolize uğratmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan PBS eritrositlerin hemolize uğramasına neden olmamıştır. Deney gruplarına bakıldığında 7 gün SBF içerisinde inkübe edilen iskeleler %1,13 hemolize neden olurken, 14 gün SBF içinde biyomineralize olan iskeleler %0,75 hemolize neden olmuş ve 21 günlük SBF inkübasyonu ile biyomineralize edilmiş iskeleler de %0,62 hemolize neden olmuşlardır. Bu sonuçlar geliştirilen biyomineralize iskelelerin dikkate değer bir hemolitik etki göstermediklerini ortaya koymaktadır (Lakra vd., 2022; Eivazzadeh-Keihan vd., 2021; Pepe vd., 2021; Tripathi vd., 2021; Mohammadpour vd., 2021).

İskelelerden besiyerine geçen kalsiyum miktarının ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin osteojenik indüksiyon besiyerinde kültüre edilmiş iskelelerde 14. güne kadar artması, 14. günden sonra azalmaya başlaması iskelelerde hidroksiapatit çekirdeklenme artışıyla gözeneklerin kapanması, hidroksiapatitin iskele çevresinde bir bariyer oluşturması ve bu nedenle iskele dışına çıkan kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının ve alkalen fosfataz (ALP) enziminin daha az olması şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca alkalen fosfatazın osteojenik farklılaşmanın erken dönemlerinde etkin olmasından ve 14. günden sonra farklılaşmanın gerçekleşmesiyle aktivitesinin azalmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Di Luca vd., 2016; Lemos vd., 2021; Zamani vd., 2021).

Tüm gruplarda 14. günden sonra hücrelerin metabolik aktivitelerinin yavaşlama eğilimi göstermesi, canlılığın osteoblast hücrelerinin çoğalmayı bırakıp farklılaşmaya başlamalarından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Hidroksiapatit çekirdeklenmeleri, biyomalzeme gözeneklerini kapatmak suretiyle canlılığı etkileyen bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Pietraszek vd., 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Halihazırda var olan yaklaşımlara rağmen büyük kemik defektlerinin yenilenmesi ile ilgili sınırlamaların tam olarak çözülememesi nedeniyle kemik gelişimine katkı sağlayacak, kan kaynaklı otolog bileşene sahip biyomineralize matris yapısında bir kompozit yapı iskelesi geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu kapsamda trombosit lizatının okside dekstran kullanılarak çapraz bağlanmasıyla elde edilen kriyojel yapı iskeleleri yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde inkübasyon yöntemiyle mineralize edilmiş ve bu biyomineralize yapı iskeleleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan karakterize edilmişlerdir. Fiziksel karakterizasyon yöntemlerinde taramalı elektron mikroskobu ile iskelelerin morfolojileri incelendiğinde hücrelerin tutunması, çoğalması ve göçüne uygun yapıda makro gözeneklere sahip oldukları ve bu gözeneklerin iç yüzeyleriyle duvarlarında hidroksiapatit çekirdeklenmeleri, FTIR ve XRD analizlerinden alınan spektrumlarda hidroksiapatite ait pikler, EDS analizinden iskelelerin kalsiyum birikimi, SBF inkübasyonu ile biyomineralizasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir. TGA analizinde sıcaklığın artmasıyla gerçekleşen kütle kaybının biyomineralizasyon miktarıyla ters orantılı olduğu, yani biyomineralizasyonun iskelelerin dayanıklılığını arttırdığı bulunmuştur. Arşimet prensibi kullanılarak etil alkol yer değiştirme testi, cıva porozimetresi analizi ve şişme testi SEM görüntülerinde gözlenen makro gözenekli yapıyı desteklemektedir. Tripsin/EDTA içerisinde tutulan iskelelerin on gün içinde tamamen bozunması, hemolitik ve sitotoksik etki göstermemeleriyle biyouyumlu oldukları tespit edilmiştir. SBF içerisinde farklı sürelerde inkübe edilen iskeleler karşılaştırıldıklarında 14 ve 21 günlük inkübasyon arasında anlamlı bir fark bulunmadığı için iskeleler SBF içerisinde 14 gün inkübe edilmelerinin ardından üzerlerine insan fetal osteoblast hücrelerinin tohumlanmasıyla hücreli biyomineralize iskeleler elde edilmiştir. Biyomineralizasyonun osteojenik farklılaşmaya etkisini gözlemlemek için biyomineralize edilmemiş iskeleler üzerine de insan fetal osteoblast hücreleri ekilerek hücreli biyomineralize edilmemiş (TL/OD) iskelelerle çalışılmıştır. Hücreli biyomineralize edilmiş (SBF) ve hücreli biyomineralize edilmemiş (TL/OD)

iskeleler besiyeri koşullarının osteojenik farklılaşmaya etkisinin gözlenebilmesi için standart besiyeri (SV) ve osteojenik indüksiyon besiyeri (OI) olmak üzere iki farklı besiyeri koşulunda kültüre edilmişlerdir. Zamanın osteojenik farklılaşmaya etkisinin gözlenebilmesi için de 7-14-21-28 günlük inkübasyon süreleri kullanılmıştır. Bu dört farklı deney grubunun karşılaştırılması için kalsiyum ve ALP miktar tayini analizleri kullanılmıştır. Gelecekteki çalışmalarda, kalsiyum ve ALP miktar tayininde besiyerinden örnek almanın yanı sıra homojenize edilecek hücreli iskeleler ile de testlerin gerçekleştirilmesi düşünülebilir. Sonuçta 14 gün süreyle osteojenik indüksiyon besiyeri içerisinde inkübe edilen biyomineralize iskele (SBF-OI-14) grubunun potansiyel olarak diğerlerine göre daha yüksek rejeneratif kapasiteye ve daha iyi rejeneratif potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında geliştirilen yapı iskelelerinin *in vivo* koşullarda osteojenik farklılaşmaya olan etkilerinin incelenmesi gelecekteki çalışmaların konusu olabilir.

ÖZET

Kemik Yenilenmesine Yönelik Otolog Bileşenli Kompozit Yapı İskelesi Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada; tam kandan çeşitli santrifüj aşamalarının ardından elde edilen trombosit lizatı (TL), sentezlenen çapraz bağlayıcı ajan okside dekstran (OD) ile karıştırıldı ve kriyojelleşme tepkimesinin sonunda TL/OD kriyojel iskeleler elde edildi. Elde edilen bu iskeleler yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde farklı sürelerde inkübe edilerek biyomineralize olmaları sağlandı. İskeleler fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri bakımından karakterize edildi. SEM analizinde, morfolojik açıdan, iskelelerin makro gözeneklerinin iç yüzeylerinde ve çeperlerindeki hidroksiapatit çekirdeklenmeleri; EDS analizinde iskelelerdeki kalsiyum birikimi, FTIR ve XRD spektrumlarında hidroksiapatite ait pikler iskelelerin biyomineralizasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. TGA analizinde, SBF içindeki inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte kütle kaybının azaldığı ve dayanıklılığının arttığı ortaya konulmuştur. Cıva porozimetresi analizi ve etil alkol yer değiştirme testi ile gözenek boyutu ve yoğunluğunun SBF içindeki inkübasyon süresiyle ters orantılı olduğu bulunmuştur. Yapılan su tutma (şişme) testinin sonuçları gözenekli yapıyı destekler niteliktedir. Tripsin/EDTA içinde gerçekleştirilen enzimatik biyobozunma testi sonucunda yapı iskelelerinin 10 günde tamamen bozunduğu; hemoliz testi sonucunda iskelelerin %2'nin altında hemolize neden olduğu; *in vitro* sitotoksisite testi sonucunda iskelelerin hücre canlılığını %90'ın altına düşürmediği gözlemlenmiştir; bu sonuçlarla biyomineralize yapı iskelesinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için uygun gözeneklilik, mukavemet ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur. Biyomineralize edilmiş ve edilmemiş iskeleler üzerine osteoblast tohumlanması sonrasında, hücreli iskeleler standart besiyeri ve osteojenik indüksiyon besiyeri içerisinde 7-14-21-28 gün kültürde tutulmalarının ardından SEM ile morfolojik açıdan, EDS ile kalsiyum birikimi açısından, Alamar mavisi testiyle canlılık takibi açısından, kalsiyum miktar tayini ve ALP aktivite analizi ile osteojenik özellik yönünden karakterize edilmiştir.

Çalışma sonucunda potansiyel olarak rejeneratif kapasitesi en yüksek ve kemik oluşturma potansiyeli en iyi olan kompozit yapı iskelesinin; 14 günlük osteojenik indüksiyon besiyeri içerisinde inkübe edilmiş biyomineralize osteoblast tohumlanmış TL/OD iskele olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Biyomalzemeler, Kemik doku mühendisliği, Osteoblast, Otolog, Yenileyici Tıp

SUMMARY

Development and Characterization of Composite Scaffolds with Autologous Component for Bone Regeneration

In this study, first thrombocyte lysate (TL) was obtained from whole blood via centrifugation steps, then synthesized oxidized dextran (OD) was mixed into TL as crosslinking agent and at the end of cryogelation reaction TL/OD cryogel scaffolds were obtained. Those scaffolds were biomineralized via incubating in simulated body fluid (SBF) at different time intervals. The scaffolds were characterized with respect to their physical, chemical, and *in vitro* biological properties. Hydroxyapatite nucleation on and inside the surface of macroporous scaffolds was determined by morphological SEM analysis, calcium deposits in scaffolds was confirmed by EDS analysis, and successful biomineralization was determined from the hydroxyapatite-specific peaks in the FTIR and XRD spectra.

TGA confirmed that as incubation time in SBF increased, the weight loss of the scaffolds decreased thus the mechanical stability improved. With the help of mercury intrusion porosimetry and ethanol replacement test, it was found that pore size and porosity were inversely proportional to incubation time in SBF. Swelling test results supported macroporous structure. After 10 days in Trypsin/EDTA the scaffolds entirely degraded. Scaffolds neither had *in vitro* hemolytic (< 2% hemolysis) nor *in vitro* cytotoxic (> 90% cell viability) effects. These results showed that the scaffolds had macroporous structure, stability, and biocompatibility. Osteoblast seeded biomineralized and non-biomineralized scaffolds were cultured in standard or osteogenic induction medium for 7-14-21-28 days, then the cell seeded scaffolds were characterized via SEM morphologically, calcium deposition via EDS, cell viability using Alamar blue assay and in terms of osteogenic differentiation via quantification of calcium and ALP activity.

This study has shown that, the scaffold, with the highest potential regenerative capacity and bone forming potential is the biomineralized, cell seeded TL/OD scaffold, incubated in osteogenic induction medium for 28 days.

Keywords: Autologous, Biomaterials, Bone Tissue Engineering, Osteoblasts, Regenerative Medicine

KAYNAKLAR

ASLAM KHAN MU, ABD RAZAK SI, AL ARJAN WS, NAZIR S, SAHAYA ANAND TJ, MEHBOOB H, & AMIN R. (2021). Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review. *Molecules*, **26:** 619.

AL-HIMDANI S, JESSOP ZM, AL-SABAH A, COMBELLACK E, IBRAHIM A, DOAK SH, ... & WHITAKER IS. (2017). Tissue-engineered solutions in plastic and reconstructive surgery: principles and practice. *Frontiers in surgery*, **4:** 4.

BABO P, SANTO VE, DUARTE ARC, CORREIA C, COSTA MH, MANO JF, & GOMES, M. E. (2014). Platelet lysate membranes as new autologous templates for tissue engineering applications. *Inflammation and Regeneration*, **34:** 033-044.

BAIER RV, RAGGIO JIC, GIOVANETTI CM, PALZA H, BURDA I, TERRASI G, ... & AIYANGAR AK. (2021). Shape fidelity, mechanical and biological performance of 3D printed polycaprolactone-bioactive glass composite scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 112540.

BAO C, CHONG MS, QIN, L., FAN, Y., TEO, E. Y., SANDIKIN, D., ... & CHAN, J. K. Y. (2019). Effects of tricalcium phosphate in polycaprolactone scaffold for mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering. *Materials Technology*, **34:** 361-367.

BERILLO D, & VOLKOVA N. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of cryogel based on gelatin and oxidised dextran. *Journal of materials science*, **49:** 4855-4868.

BIAN T, & XING H. (2022). A collagen (Col)/nano-hydroxyapatite (nHA) biological composite bone scaffold with double multi-level interface reinforcement. *Arabian Journal of Chemistry*, **15:** 103733.

CANCEDDA R. (2009). Cartilage and bone extracellular matrix. *Current pharmaceutical design*, **15:** 1334-1348.

CERVELLI V, LUCARINI L, SPALLONE D, PALLA L, COLICCHIA GM, GENTILE P, & DE ANGELIS B. (2011). Use of platelet-rich plasma and hyaluronic acid in the loss of substance with bone exposure. *Advances in skin & wound care*, **24:** 176-181.

CHEN P, LI L, DONG L, WANG S, HUANG Z, QIAN Y, ... & YANG L. (2020). Gradient Biomineralized Silk Fibroin Nanofibrous Scaffold with Osteochondral Inductivity for Integration of Tendon to Bone. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **7:** 841-851.

CHESTERMAN J, ZHANG Z, ORTIZ O, GOYAL R & KOHN J. (2020). Biodegradable polymers. *Principles of Tissue Engineering*, 317-342.

DI LUCA A, OSTROWSKA B, LORENZO-MOLDERO I, LEPEDDA A, SWIESZKOWSKI W, VAN BLITTERSWIJK C & MORONI L. (2016). Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Scientific reports*, **6:** 1-13.

DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D & GIANNOUDIS PV. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*, **9:** 66.

EIVAZZADEH-KEIHAN R, ALIABADI HAM, RADINEKIYAN F, SOBHANI M, MALEKI A, MADANCHI H, ... & SHALAN AE. (2021). Investigation of the biological activity, mechanical properties and wound healing application of a novel scaffold based on lignin–agarose hydrogel and silk fibroin embedded zinc chromite nanoparticles. *RSC Advances*, **11:** 17914-17923.

ELÇIN YM. (2008). Tissue engineering (Doku mühendisliği). *Turkiye Klinikleri Journal of Hematology Oncology-Special Topics*, **1:** 36-43.

EVERTS PA. (2018). Autologous platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells for the treatment of chronic wounds. In *Wound Healing-Current Perspectives*. IntechOpen.

FEROZ S, & DIAS G. (2021). Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked keratin/hydroxyapatite (HA) scaffold fabrication, characterization and in vitro biocompatibility assessment as a bone graft for alveolar bone regeneration. *Heliyon*, **7:** e08294.

GENTILE P, BOTTINI DJ, SPALLONE D, CURCIO BC, & CERVELLI V. (2010). Application of platelet-rich plasma in maxillofacial surgery: clinical evaluation. *Journal of Craniofacial Surgery*, **21:** 900-904.

GÓMEZ-CEREZO MN, PEÑA J, IVANOVSKI S, ARCOS D, VALLET-REGÍ M, & VAQUETTE C. (2021). Multiscale porosity in mesoporous bioglass 3D-printed scaffolds for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, **120:** 111706.

HOMAEIGOHAR S, MONAVARI M, KOENEN B, & BOCCACCINI A R. (2021). Biomimetic biohybrid nanofibers containing bovine serum albumin as a bioactive moiety for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, **123:** 111965.

ISO - 10993-4, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 4: Selection of Tests for Interactions With Blood, International Organization for Standardization, Geneva, 1999.

ISO - 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: *In vitro* Methods, International Organization for Standardization, Geneva, 1999.

JAMES BD, GUERIN P, IVERSON Z, & ALLEN JB. (2020). Mineralized DNA-collagen complex-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, **161:** 1127-1139.

JARQUÍN-YÁÑEZ K, ARENAS-ALATORRE J, PIÑÓN-ZÁRATE G, ARELLANO-OLIVARES RM, HERRERA-ENRÍQUEZ M, HERNÁNDEZ-TÉLLEZ B, & CASTELL-RODRÍGUEZ AE. (2016). Structural effect of different EDC crosslinker concentration in gelatin-hyaluronic acid scaffolds. *J Bioeng Biomed Sci*, **6:** 182.

KANCZLER JM, WELLS JA, GIBBS DMR, MARSHALL KM, TANG DKO & OREFFO RO. (2020). Bone tissue engineering and bone regeneration. *Principles of tissue engineering*, 917-935.

KHADEMHOSSEINI A & LANGER R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc,* **11:** 1775–1781.

KHOSLA S, WESTENDORF JJ, & MÖDDER UI. (2010). Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. *Stem cells*, **28:** 2124-2128.

KUMAR P, SAINI M, DEHIYA BS, UMAR A, SINDHU A, MOHAMMED H, ... & GUO Z. (2020). Fabrication and in-vitro biocompatibility of freeze-dried CTS-nHA and CTS-nBG scaffolds for bone regeneration applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **149:** 1-10.

LAKRA R, KIRAN MS, & KORRAPATI PS. (2022). Collagen scaffold reinforced with furfural for wound healing application. *Materials Letters*, 131956.

LALEGÜL-ÜLKER Ö, ŞEKER Ş, ELÇIN AE, & ELÇIN YM. (2019). Encapsulation of bone marrow-MSCs in PRP-derived fibrin microbeads and preliminary evaluation in a volumetric muscle loss injury rat model: modular muscle tissue engineering. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **47:** 10-21.

LEMOS R, MAIA FR, RIBEIRO VP, COSTA JB, COUTINHO PJ, REIS RL, & OLIVEIRA JM. (2021). Carbon nanotube-reinforced cell-derived matrix-silk fibroin hierarchical scaffolds for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry B*, **9:** 9561-9574.

LIAO HT, MARRA KG, & RUBIN JP. (2014). Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **20:** 267-276.

LIN Y, HUANG S, ZOU R, GAO X, RUAN J, WEIR MD, ... & XU HH. (2019). Calcium phosphate cement scaffold with stem cell co-culture and prevascularization for dental and craniofacial bone tissue engineering. *Dental Materials*.

LU H, HOSHIBA T, KAWAZOE N, & CHEN G. (2011). Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **32:** 2489-2499.

MOHAMMADPOUR M, SAMADIAN H, MORADI N, IZADI Z, EFTEKHARI M, HAMIDI M, ... & ELBOUTACHFAITI R. (2021). Fabrication and Characterization of Nanocomposite Hydrogel Based on Alginate/Nano-Hydroxyapatite Loaded with Linum usitatissimum Extract as a Bone Tissue Engineering Scaffold. *Marine drugs*, **20:** 20.

NASKOU MC, SUMNER SM, CHOCALLO A, KEMELMAKHER H, THORESEN M, COPLAND I, ... & PERONI JF. (2018). Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, **9:** 75.

NEUBAUER VJ, & SCHEIBEL T. (2020). Spider Silk Fusion Proteins for Controlled Collagen Binding and Biomineralization. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **6:** 5599-5608.

NIE L, LI X, CHANG P, LIU S, WEI Q, GUO Q, ... & SHAVANDI A. (2022). A fast method for in vitro biomineralization of PVA/alginate/biphasic calcium phosphate hydrogel. *Materials Letters*, **308:** 131182.

NIE L, LI X, WANG Z, HU K, CAI R, LI P, ... & YANG S. (2020). In vitro biomineralization on poly (vinyl alcohol)/biphasic calcium phosphate hydrogels. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, **9:** 122-128.

PEPE A, GUEVARA MG, ABRAHAM GA, & CARACCIOLO PC. (2021). Lysine-oligoether-modified electrospun poly (carbonate urethane) matrices for improving hemocompatibility response. *Polymer Journal*, **53:** 1393-1402.

PERSSON M, LEHENKARI PP, BERGLIN L, TURUNEN S, FINNILÄ MA, RISTELI J, ... & TUUKKANEN J. (2018). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold. *Scientific reports*, **8:** 1-12.

PIETRASZEK A, LEDWÓJCIK G, LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA J, HORAK W, LACH R, ŁATKIEWICZ A, & KAREWICZ A. (2020). Bioactive hydrogel scaffolds reinforced with alkaline-phosphatase containing halloysite nanotubes for bone repair applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **163:** 1187-1195.

POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVES M, & RAMIREZ-VICK JE. (2014). Scaffold design for bone regeneration. Journal of nanoscience and nanotechnology, **14**: 15-56.

POOSHIDANI Y, ZOGHI N, RAJABI M, HAGHBIN NAZARPAK M, & HASSANNEJAD Z. (2021). Fabrication and evaluation of porous and conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **32**: 1-12.

QIAN G, ZHANG L, LIU X, WU S, PENG S, & SHUAI C. (2021). Silver-doped bioglass modified scaffolds: A sustained antibacterial efficacy. Materials Science and Engineering: C, **129**: 112425.

QUINLAN E, LÓPEZ-NORIEGA A, THOMPSON E, KELLY HM, CRYAN SA, & O'BRIEN FJ. (2015). Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. Journal of Controlled Release, **198**: 71-79.

SHANBHAG S, STAVROPOULOS A, SULIMAN S, HERVIG T, & MUSTAFA K. (2017). Efficacy of humanized mesenchymal stem cell cultures for bone tissue engineering: a systematic review with a focus on platelet derivatives. Tissue Engineering Part B: Reviews, **23**: 552-569.

SMITH JD, WEISS LE, BURGESS JE, WEST AI, & CAMPBELL PG. (2013). Biologically active blood plasma-based biomaterials as a new paradigm for tissue repair therapies. Disruptive Science and Technology, **1**: 127-137.

ŞEKER Ş, ELÇIN, AE, & ELÇIN YM. (2019). Autologous protein-based scaffold composed of platelet lysate and aminated hyaluronic acid. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **30**: 127.

ŞEKER Ş, ELÇIN AE, & ELÇIN YM. (2020). Macroporous elastic cryogels based on platelet lysate and oxidized dextran as tissue engineering scaffold: In vitro and in vivo evaluations. Materials Science and Engineering: C, 110703.

TANG S, WANG L, LI L, ZHANG Y, WANG Q, JIANG Q, ... & ZHANG F. (2022). A Biomimetic Platelet-Rich Plasma-Based Interpenetrating Network Hydrogel for Bone Regeneration.

TITORENCU I, GEORGIANA ALBU M, NEMECZ M, & V JINGA V. (2017). Natural polymer-cell bioconstructs for bone tissue engineering. Current stem cell research & therapy, **12**: 165-174.

TRIPATHI S, SINGH BN, DIVAKAR S, KUMAR G, MALLICK SP, & SRIVASTAVA P. (2021). Design and evaluation of ciprofloxacin loaded collagen chitosan oxygenating scaffold for skin tissue engineering. Biomedical Materials, **16**: 025021.

WANG J, MI R, ZHAO G, SHI J, CHEN J, LIU C, ... & XIA J. (2020). A silk-based high impact composite for the core decompression of the femoral head. Journal of Materials Chemistry B, **8**: 9734-9743.

WESTHAUSER F, KARADJIAN M, ESSERS C, SENGER AS, HAGMANN S, SCHMIDMAIER G, & MOGHADDAM A. (2019). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented β-TCP composite scaffold: An in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. PloS one, **14**: e0212799.

WILLIAMS DF. (1999). The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press.

WINKLER T, SASS FA, DUDA GN, & SCHMIDT-BLEEK K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. Bone & joint research, **7**: 232-243.

XIAO L, WU M, YAN F, XIE Y, LIU Z, HUANG H, ... & CAI L. (2021). A radial 3D polycaprolactone nanofiber scaffold modified by biomineralization and silk fibroin coating promote bone regeneration in vivo. International Journal of Biological Macromolecules, **172**: 19-29.

YIN S, ZHANG W, ZHANG Z, & JIANG X. (2019). Recent Advances in Scaffold Design and Material for Vascularized Tissue-Engineered Bone Regeneration. Advanced healthcare materials, **8**: 1801433.

YU L, ROWE D W, PERERA I P, ZHANG J, SUIB S L, XIN X, & WEI M. (2020). Intrafibrillar mineralized collagen–hydroxyapatite-based scaffolds for bone regeneration. ACS Applied Materials & Interfaces, **12**: 18235-18249.

ZAMANI Y, AMOABEDINY G, MOHAMMADI J, ZANDIEH-DOULABI B, KLEIN-NULEND J, & HELDER MN. (2021). Increased osteogenic potential of pre-osteoblasts

on three-dimensional printed scaffolds compared to porous scaffolds for bone regeneration. Iranian Biomedical Journal, **25**: 78.

ZHANG H, YOU R, YAN K, LU Z, FAN Q, LI X, & WANG D. (2020). Silk as templates for hydroxyapatite biomineralization: A comparative study of Bombyx mori and Antheraea pernyi silkworm silks. International Journal of Biological Macromolecules, **164**: 2842-2850.

ZHOU X, ZHOU G, JUNKA R, CHANG N, ANWAR A, WANG H, & YU X. (2021). Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **197**: 111420.