

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKSOZOM İÇEREN MANYETİK DOKU İSKELELERİNDE OSTEOJENİK
FARKLILAŞMANIN AYRINTILI DEĞERLENDİRİLMESİ

Rihab Ksouri

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Sedat Odabaş

Eylül

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Rihab Ksouri

ONAY

Doç. Dr. Sedat Odabaş danışmanlığında Rihab Ksouri tarafından hazırlanan bu çalışma 29/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Doç.Dr.Sedat ODABAŞ (Danışman)

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hasret Tolga ŞİRİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Eksozom İçeren Manyetik Doku İskelelerinde Osteojenik Farklılaşmanın Ayrıntılı
Değerlendirilmesi

Rihab Ksouri

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç.Dr. Sedat Odabaş

Kemik doku mühendisliği ve rejenerasyonu stratejileri, kemik büyümesini sürdürebilen osteojenik bir mikro çevre sağlayan yaklaşımlar önemsenmektedir. Son zamanlarda biyoaktif moleküllerle zenginleştirilmiş (3B baskı) doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliği dikkate değer bir başarıya ulaştı. Bu tez kapsamında, osteosarkom hücre türevli eksozomlar ile zenginleştirilmiş 3B baskılı manyetik PLA (mg.PLA) geliştirilerek İnsan Adipoz Kaynaklı Kök Hücrelerde (hAdMSC'ler) osteojenik farklılaşma ayrıntılı değerlendirmesi çalışılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* sonuçları, mg.PLA / hAdMSC / eksozom ile uygulanan grubun incelenmesinde alizarin kırmızısı ve alkalen fosfataz aktiviteleri ile doğrulanan kemik rejenerasyonu ve mineralizasyon sürecinin aktivasyonu gösterilmiştir. Bu süreçte RUNX2, COL1A1, OPN ve OCN genlerinin artan regülasyonu mg.PLA ve eksozomların varlığını anlam katmaktadır. Bununla birlikte, bu sonuçlar, manyetik parçacıklarla ilişkili eksozomların, gelişmiş farklılaşma ile kemik aktivitesini artırabildiğini ve osteogenez stratejilerinde yeni bir düzenleyici sistem önerdiğini kanıtlamaktadır. Sonuç olarak kemik greftlerini geliştirmek ve kemik rejenerasyonun araştırmaları amacıyla bu çalışma yeni bir strateji olarak öne sürülmüştür.

2021, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: Osteojenik Farklılaşma, PLA, Manyetik Partiküller, Eksozom

ABSTRACT

Master Thesis

Comprehensive Evaluation of Osteogenic Differentiation in Exosome Incorporated Magnetic Scaffolds

Rihab Ksouri

Ankara University Biotechnology Institute

Doç.Dr. Sedat Odabaş

Bone tissue regeneration strategies require approaches that provide an osteogenic microenvironment able to drive bone growth. Recently, the development of 3D printing biomaterials enriched with bioactive molecules has reached remarkable success in bone tissue engineering. During this thesis , printed 3D magnetic mg.PLA enriched with Human adipose mesenchymal stem cells (hAdMSCs) and osteosarcoma cell derivatives known as exosome, have been evaluated on the osteogenic differentiation In this study, in vitro results showed that the examination of the group treated with mg.PLA/hAdMSC/exosome showed activation of bone regeneration and mineralization process, confirmed by the activity of alizarin red and alkaline phosphatase. During this process, increased regulation of RUNX2, COL1A1, OPN, and OSC was evident in cells present with mg.PLA and exosomes. Nevertheless, these results prove that exosomes associated with magnetic particles can enhance bone activity in combination with enhanced differentiation, suggesting a new regulatory system in osteogenesis strategies. Thus, with the aim of developing bone grafts and promoting bone regeneration, this study can be considered as a new strategy for this purpose which is of great interest for regenerative medicine and bone tissue engineering.

2021, 100 pages

Keywords: Osteogenic Differentiation, PLA, Magnetic Particles, Exosome

TEŞEKKÜR

Türkiye’de yüksek lisans eğitimim boyunca beni maddi olarak destekleyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı’na,

Her şeyden önce, bize hedefe yönelik eğitim vermemize katkıda bulunan Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki tüm öğretim üyelerine,

Doç. Dr. Atiye Seda Yar Sağlam, Dr. Öğretim Üyesi Cem Bayram, ve Öğr. Görevlisi Hakan Eskizengin'e tez ile ilgili bazı analizler sırasındaki cömert yardımlarından,

Bu tez sürecindeki yardımları ve yapıcı katkıları için Doç. Dr. Burak Derkuş'a,

Doğal olarak, laboratuvarımızın tüm üyelerine dostlukları, yardımları ve sempatileri için,

Danışmanım Doç. Dr. Sedat Odabaş'a güveni, yardımları, yapıcı ve açıklayıcı eleştirileri ve hepsinden önemlisi araştırma tezim sırasında yararlandığım bilimsel bilgisi için , Umarım bu çalışmada sizinle çalıştığım kadar satısfe olursunuz.

Beni karşılıksız seven ve her adımda maddi-manevi destekleyen sevgililerime, Babam Abdessalam’a, Annem’e Hayat, Ablam’a Khouloud, Ulanbek Toktogulov’a ve Dr. Musa Kaya’ya,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

Ayrıca jüri üyelerine bu çalışmayı değerlendirmeyi kabul ettikleri için teşekkür etmek istiyorum. Yapıcı sözleri ve eleştirileri benim için bir zenginlik kaynağı olmuştur.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ONAY	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. 3D BASKI TEKNOLOJİSİNE DAYALI İSKELE ÜRETİMİ.....	3
2.2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA POLİKAKTİK ASİT'İN YERİ	6
2.3. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER..	8
2.3.1. NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE ETKİ MEKANİZMASI	9
2.3.2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MANYETİK PARTİKÜLLERİN MEKANİZMASI VE KULLANIMI	10
2.4. OSTEOJENEZ MEKANİZMASI	12
2.5. EKSOZOMLAR, BİYOGENEZİ VE KEMİK DOKUSU MÜHENDİSLİĞİNDEKİ UYGULAMALARI.....	16
2.5.1. EKSOZOMLARIN BİYOGENEZİ	17
2.5.2. KANSER HÜCRE TÜREVLİ EKSOZOMLAR VE KEMİK REJENERASYONUNDAKİ UYGULAMALARI	19

3. GEREKÇE VE AMAÇ	22
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
4.1. MATERYAL	24
4.2. PLA YAPI TASARIM PROSEDÜRÜ.....	24
4.3. PLA’NIN 3 BOYUTLU BASIMI.....	26
4.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ İLE PLA YAPI ANALİZİ	27
4.5. PLA’NIN BİYODEGRADASYON ÇALIŞMASI	27
4.6. X-RAY DİFRAKTOMETRİ ANALİZİ	28
4.7. FOURİER TRANSFORM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ ANALİZİ	28
4.8. SAOS-2 HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ	28
4.9. EKSOZOMUN İZOLASYONU.....	28
4.10. EKSOZOMLARIN TEM ANALİZİ.....	29
4.11. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ	29
4.12. IN VITRO ÇALIŞMALAR.....	29
4.12.1. OSTEOJENİK İNDÜKSİYON	29
4.12.2. MEZENKİMAL HÜCRELERİN BOYAMASI.....	30
4.12.3. MALZEMELERİN BİYOUYUMLULUĞU.....	30
4.12.4. HÜCRE ÇOĞALMA DAVRANIŞI	30
4.12.5. HÜCRELERDE KALSİYUM BİRİKİMİNİN DEĞERLENDİRMESİ....	31
4.12.6. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ.....	31
4.12.7. MALZEME-HÜCRE ETKİLEŞİMİ VE MORFOLFOLJİK DEĞERLENDİRMESİ	31
4.12.8. KANTİTATİF GEN İFADESİ	32
4.12.8.1 RNA İzolasyonu	32
4.12.8.2 cDNA Sentezi.....	32
4.12.8.3 qPCR Analizi.....	34

4.13. İSTATİKSEL ANALİZ.....	37
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
5.1. SEM SONUÇLARININ ANALİZİ	39
5.2. XRD SONUÇLARININ ANALİZİ	40
5.3. FTIR SONUÇLARININ ANALİZİ	42
5.4. BİYOBOZUNMA ÇALIŞMASI	43
5.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE EKSOZOM İZOLASYONU	46
5.6. BCA TESTİ İLE PROTEİN MİKTARININ TAYİNİ.....	46
5.7. TEM İLE EKSOZOMLARIN TESPİTİ	47
5.8. SİTOTOKSİTE TEST SONUÇLARI.....	48
5.9. HÜCRELERDE KALSİYUM BİRKİMİNİ DEĞERLENDİRMESİ SONUÇLARI	49
5.10. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ.....	50
5.11. HÜCRE PROLİFERASYONU	51
5.12. HÜCRE-MALZEME ETKİLİŞİMİ	53
5.13. GEN İFADESİNİN ANALİZİ.....	55
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
6.1. TARTIŞMA	59
6.2. SONUÇ	62
KAYNAKLAR.....	64
EKLER.....	78
Ek 1. Teçhizat listesi.....	78
Ek2. BCA'nın standart grafiği	79

ÖZGEÇMİŞ	80
TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....	82



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. FDM Teknolojisi prosedürü.....	5
Şekil 2. 2. Polilaktik asit'in kimiyasal formülü	6
Şekil 2. 3. Kemik defekti için kullanılan çeşitli PLA bazlı formların yapısı ve tasarımı.	7
Şekil 2. 4. Kemik doku mühendisliğinde manyetik partikül uygulaması.	11
Şekil 2. 5. Osteogenez mekanizması.....	14
Şekil 2. 6. Ekzosom biyogenez mekanizması.	18
Şekil 2. 7. Kanser hücresi kaynaklı eksozomların etki	20
Şekil 3. 1. Çalışmanın amacı ve metodolojisi	22
Şekil 4. 1. TinkerCad tasarım programının arayüzü	25
Şekil 4. 2.Cura programının Dilimleme prosedürü ile arayüzü.....	25
Şekil 4. 3.Basılan PLA'ların farklı tasaram ve magnet ile PLA'ların tutulması	26
Şekil 5. 1. Düz PLA yapılarının SEM görüntüleri, boyutları ve EDX spekturum	39
Şekil 5. 2. Manyetik PLA yapılarının SEM görüntüleri boyutları ve EDX spekturumu	40
Şekil 5. 3. PLA ve mg.PLA XRD spektrumu.....	41
Şekil 5. 4. PLA yapılarının FTIR spektrumları	42
Şekil 5. 5. mg.PLA yapılarının FTIR spektrumları	43
Şekil 5. 6. Düz PLA ve mg.PLA'nin degradasyon orantıları	44

Şekil 5. 7. Biyobozulmadan sonra PLA ve mg.PLA'nın SEM görüntüleri.....	45
Şekil 5. 8. Bağlı bolluğa ulaşan Saos-2 hücreleri ve eksozomların peleti	46
Şekil 5. 9. TEM mikroskopu ile eksozomların tespiti	47
Şekil 5. 10. Malzemelerin hücre canlılığına etkisinin 24. ve 48. saatte incelenmesi	48
Şekil 5. 11. Alizarin kırmızısı kalitatif test sonucu.....	49
Şekil 5. 12. Doku iskelerinin Alizarin Kırmızısı kantitatif test sonuçları.....	50
Şekil 5. 13. Hücre-Malzeme etkileşimde Alkalen fosfatazın aktivitesi.....	51
Şekil 5. 14. Hücre-Malzeme etkileşimde proliferasyon oranı.....	52
Şekil 5. 15. Hücre-Malzeme etkileşimde Akridin Boyaması görüntüleri.....	53
Şekil 5. 16. PLA 3. gün hücre morfolojisi SEM görüntüsü	54
Şekil 5. 17. mg.PLA 3. gün hücre morfolojisi SEM görüntüsü	55
Şekil 5. 18. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda RUNX2 ifadeleme düzeyi.....	56
Şekil 5. 19. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda COL1A1 ifadeleme düzeyi	57
Şekil 5. 20. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda OSN ifadeleme düzeyi.....	57
Şekil 5. 21. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda OSC ifadeleme düzeyi	58

ÇİZELGER DİZİNİ

Çizelge 4. 1. Kullanılan hücre hatları	24
Çizelge 4. 2. cDNA stenteze bağlı RT-PCR tepkime karışımı.....	33
Çizelge 4. 3. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program.....	33
Çizelge 4. 4. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları.....	35
Çizelge 4. 5. RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH Real-time PCR karışımı.....	35

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ALIX	Apoptoza bağlı gen 2-etkileşimli protein X
ALP	Alkalen fosfataz
BCA	Bikinokinik Asit
CAD	Bilgisayar destekli tasarım
CHCl ₃	Kloroform
COL1A1	Kollajen 1-A1
CPC	Setilpiridinyum klorür
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EM	Elektron mikroskobu

Ex	Eksozom
FDM	Eriyik yığma modelleme
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
hAdMSC	İnsan Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler
ILV	intralüminal veziküller
mg	milligram
Mg.PLA	Manyetik Polilaktik asit
MNP	Manyetik partikül
MSC	Mezenkimal kök hücre
MVB	Endozomal veziküller
OSN	Osteokalsin
OSP	Osteopontin
PBS	Fosfat tuz çözeltisi
PCL	poli(ε-kaprolakton)
PDLA	Poli(D-laktat)
PDLLA	Poli(DL-laktat)
PEGDA	Poli(etilen glikol) diakrilat
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Polilaktik asit
PLLA	Poli L- Laktat
RUNX2	Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirmeli elektron mikroskobu
TGFβ	Dönüştürücü büyüme faktörü beta

TSG101	Tümör duyarlılığı gen 101 proteini
VPS4	Vakuolar protein sıralama ile ilişkili protein 4
VTA1	Vezikül İzleme 1
XRD	X-Işını Kristalografisi



1. GİRİŞ

Organ yetmezliği, 400 milyar doları aşan maliyetli bir sorun olması sebebiyle, yaşlanan ve hastalıklı doku için sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesi küresel bir zorluk olarak görünmektedir (1). Doku mühendisliği, günümüzde doku iyileşmesi ve onarımındaki muazzam ilerlemelerin başında gelmektedir. Doku mühendisliği 1980'lerin sonlarında keşfedilmiştir ve çeşitli iskele tabanlı teknolojiler kullanılarak kusurlu, hasarlı veya işlevsel olmayan dokuların yeniden yapılandırılması anlamına gelmektedir. Doku mühendisliği uygulamasının keşfi ilk kez 1990'larda Langer ve Vacanti tarafından üç yaklaşıma dayalı olarak tanımlanmıştır: hücreler (örn. kök, progenitör, somatik hücreler), uyarımı farklılaşmayı indükleyebilecek faktörler ve hücre büyümesi için sağlanan desteği temsil eden fiziksel yapılar (2).

Doku kaybı ve organ yetmezliği, kemik doku mühendisliği araştırmalarındaki en trajik ve zorlu problemdir. Cerrahi müdahale otogreftleri, allogreftler, sentetik greftler ve serbest vaskülarize fibula kullanımları dahil olmak üzere kemik hasarı için tedavi stratejileri, hastalıklı kemik tedavisinde umut verici olmayan sonuçlar sergilemektedir. Sentetik veya doğal fonksiyonel doku iskelelerden, büyüme faktörlerinden ve hücreden oluşan sinerjik bir kombinasyon kullanıma ihtiyaç duyulmaktadır (3, 4).

Canlı doku veya organı taklit eden ve yaralanmış doku/organı onarmak veya yenilemek için hücre/ doku iskelesi topluluğundan oluşan üç boyutlu (3B) bir yapının (iskele) oluşturulması doku mühendisliğinde en temel yaklaşımlardan biridir (5). Bu yapıların amacı besinleri taşımak, hücre yapışmasını ve büyümesini desteklemektir (3, 6). Klinik kullanım için bu iskeleler, biyouyumluluk, biyobozunurluk, mekanik dayanıklılık ve matris özellikleri dahil olmak üzere bazı temel niteliklere sahip olması gerekmektedir. Ayrıca, lif ve gözenek boyutları, göç, çoğalma ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli hücresel tepkileri etkileyebilen kilit bir rol oynamaktadır.

Bu nedenlerden dolayı, minimum immün yanıt oluşturan veya hiç immün yanıt oluşturmeyan kemik implantları olarak adlandırılan yeni doku iskeleler, özellikle sentetik polimerler, son zamanlarda doku mühendisliği terapilerinde ve tam olarak kemik dokusu rejenerasyonunda büyük bir ilerleme olduğunu göstermiştir. Spesifik olarak, kopolimerleri de dahil olmak üzere poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(laktik) (PLA), biyobozunabilen bir malzemedir ve normalde biyolojik olarak, biyouyumluluk, termal plastisite ve uygun mekanik etkiler (7) gibi iyi özellikleri sayesinde kemik dokusu replasman amaçları için doku mühendisliğinde kullanılır (7).

Belirli bir sistemi kullanarak fiziksel stresin üretilmesi, hücre davranışına aracılık etmek için iyi yönlendirilmiş bir strateji olabilmektedir. Önemli yaklaşımlardan biri, manyetik partiküllerin tek başına kullanılması veya gen ekspresyonu, protein sentezi gibi metabolik aktivitelerini değiştirebilen uygun iskele kimyasal sinyalleri ile birleştirilmesidir (8, 9). Hücre zarındaki mekanik sensörler aracıyla, ve belirli bir manyetik alanda titreşimi uğran partiküllerin, mekanik stres oluşturabilmektedir (10). Sonunda, hücreler bu stresi hücrel sinyallere ve sonuçta biyokimyasal cevaba ve fenotipe dönüştürebilmektedir.

Artan kanıtlar göstermektedir ki, hücrelerin çoğunluğu tarafından salgılanan heterojen bir membranöz yapı havuzunu içeren eksozomlar (Ex) gibi hücre dışı veziküllerin (EV'ler), hassas çok işlevli moleküler yükler nedeniyle hücre dışı tedavi için güçlü araçlar olarak hizmet edebilir. mRNA ve mikroRNA (miRNA) gibi fonksiyonel proteinler, lipidler ve nükleik asitler hücre dışı veziküller içinde bulunmaktadır (11). Önceki çalışmalar, insan MSC'lerinden elde edilen EV'lerin osteoblastlara girebildiğini, osteojenik miRNA'yı endositoz yoluyla iletebildiğini ve bu şekilde osteojenik gen ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir (12, 13).

Bu çalışma, kanser hücresi kaynaklı eksozomlarla yüklü geliştirilmiş 3D baskılı manyetik PLA'nın kök hücrelerin osteojenik farklılaşma üzerindeki etkisinin çok yönlü incelenmesi amaçlamaktadır. Bir Kemik Osteosarkom hücre hattı olan Saos-2 hücrelerinden izole edilen eksozomlar izole edilmiştir ve PLA ve mg.PLA ile entegre edilmiştir. Sitotoksosite, proliferasyon etkisi, mineralizasyon ve gen ekspresyonunu saptamak için osteojenik farklılaşma 14 gün boyunca sürdürülmüştür.

2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Kemiğin, yetişkin yaşamında kalıcı rejenerasyon potansiyeline sahip bir organ olduğu ve yaşam boyunca sürekli yeniden şekillenmeye maruz kalan tek doku olduğu bilinmektedir (14). Hastalıklardaki çeşitlilik ve birleşme, travma, kemik kanseri metastazı gibi büyük boyuttaki kemik defektleri, doku mühendisliğinde keşifleri ve araştırmaları çok önemli kılmaktadır.

Tasarlanmış kemik dokusu, sınırsız malzeme erişimi ve zayıf hastalık bulaşmaları nedeniyle kemik greftlerinin geleneksel kullanımına potansiyel bir alternatif olarak görülmüştür. Yeni tıbbi onarım malzemeleri üzerinde yapılan araştırmalarda yüksek oranda defekte olan kemiğin onarımı için biyolojik materyaller ve doku mühendisliği içeren rejeneratif tıp yaklaşımlarının kullanımı büyük umutlar vadetmektedir.

Yıllarca süren çalışmalardan sonra, araştırmacılar çeşitli kemik dokusu onarım materyalleri geliştirmiştir. İskele malzemesi, hücre dışı matris rolünü taklit eden ve hücreler için mekanik destek sağlayan ve doku mühendisliğinde kullanılan üç boyutlu (3B) yapılardır. 3D doku iskeleler, spesifik protein sentezini indükleyebilir, bazı hücresel aktiviteleri uyatabilmektedir. Ayrıca, hücre yapışmasını kolaylaştırabilir ve *in-vivo* olarak kemik dokusu oluşumunu uyatabilmektedir. Kemik dokusu mühendisliğinin en zor yanlarından biri, doku hastalıklarını ve dejenerasyonu önleyebilen, hücre kültürlerinin taşıyıcısı olarak hizmet eden, büyümelerini kontrol eden biyoaktif materyallerin ve yapay destek iskelelerinin gerçekleştirilmesidir (4).

2.1. 3D BASKI TEKNOLOJİSİNE DAYALI İSKELE ÜRETİMİ

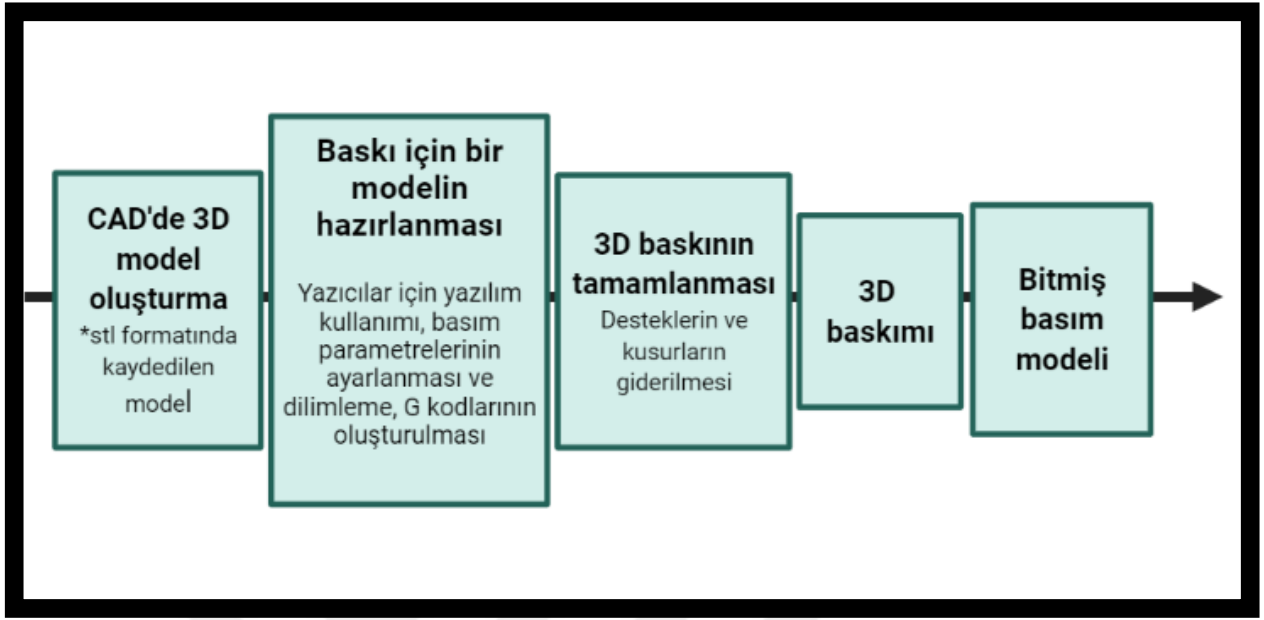
Fonksiyonel iskele üretimi için kullanılan teknikler genellikle heterojen yapılar üretemez ve bu nedenle doğal dokularda bulunan hücrelerin karmaşık tiplerini, yoğunluklarını ve uzaysal düzenlemelerini yeniden üretemez (15, 16). Doku mühendisliği yapılarının hazırlanmasına yönelik gelişmelerden biri 3D biyobaskıdır. Biyobaskı, desenli hücreler, doku iskeleler ve biyomoleküller aracılığıyla dokuyu taklit eden yapıları üretmek için etkili bir yöntemdir. Bu nedenle, 3D baskı, malzeme birikiminin uzaysal kontrolü ile, doku heterojenlik sorunlarını çözebilecek bir yol sunmaktadır (16).

Ekstrüzyon tabanlı 3D baskı veya Eriyik yığma modelleme olarak da bilinen doku iskelelerin kullanımları giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu teknoloji, uzaysal olarak heterojen yapılar üretme potansiyeline sahiptir. Bu yapılar, doku iskelelerin eklemeli imalat yoluyla biyofonksiyonel yapıların ve doku sübstütülerinin hızlı ve hassas bir şekilde üretilmesini sağlamaktadır. Sentetik hidrojeller ve polimerler gibi mühendislik dokularının zayıf mekanik özellikleri, 3D baskılı biyoyapılar ile kapatılabilmektedir. 3D baskı, menisküs ve kapsüllenmiş hücrelerle tamamlanmış omurga diskleri gibi sert doku iskelelerini tasarlamak için kullanılmıştır (17).

3D baskı teknolojisi ile iskele üretiminde temel kriterler; genişletilebilir elastomerik hücre dostu malzemeleri adapte etmek ve hem iç hem de dış geometrik özelliklere sahip yapıları karmaşık ve yumuşak dokuların kullanımı için uygulanmaktadır. Bu alanda temel olarak eriyik yığma (FDM) modellemesi uygulamaktadır.

FDM, 1989 yılında Stratasys'in kurucu ortağı Scott Crump tarafından keşif edilmiştir. Yumuşak doku mekaniğini araştırmak için yaygın olarak kullanılan, maliyeti düşük, yüksek oranda özelleştirilebilir teknolojiler arasındadır (18). Bu teknoloji, 3D baskı teknolojisinin malzeme ekstrüzyon kategorisine girmektedir. Bir FDM yazıcı, üç boyutlu malzemeler meydana getirmek için filament halinde bir termoplastik polimerden faydalanmaktadır. Bu süreç, çok çeşitli malzemeleri ekstrüde edebilmek amacıyla, katmanları dilimleyerek ve katmanları yukarı doğru oluşturarak 3D bilgisayar destekli tasarım modellerini yeniden oluşturabilmektedir.

Bir FDM yazıcıda, filament sıcak ekstrüder'e itilmektedir. Filament önce ısıtılır ve daha sonra, tam nesneyi oluşturmak için iğne aracılığıyla bir yapı platformu üzerine katman-katman biriktirilmektedir. Bu sistem, bir vidalı ekstrüder kullanarak ve bilgisayar kontrollü bir konumlandırma sistemiyle, bileşenleri oluşturabilmektedir. Bilgisayar destekli tasarım (teknoloji CAD veya TCAD), 3D baskı tasarımı için dikkat çekici bir teknolojidir.



Şekil 2. 1. FDM Teknolojisi prosedürü

CAD, yarı iletken üretimi ve yarı iletken cihaz çalışmasını modelleyen elektronik tasarım otomasyonunun bir dalıdır. Üretim sürecinde, CAD programı bir model oluşturarak başlamakta, daha sonra model, kafa hareketi, besleme hızı, tabaka kalınlığı, dolgu, kafa ve masa sıcaklıkları, dilimleme, destek uygulaması gibi proses parametrelerinin kontrolünü sağlayan programa dahil edilmektedir. Böyle bir program, bir 3D yazıcıya yüklenen bir G-kodu üretir ve gerçek bir model oluşturmayı sağlamaktadır (Şekil 2.1).

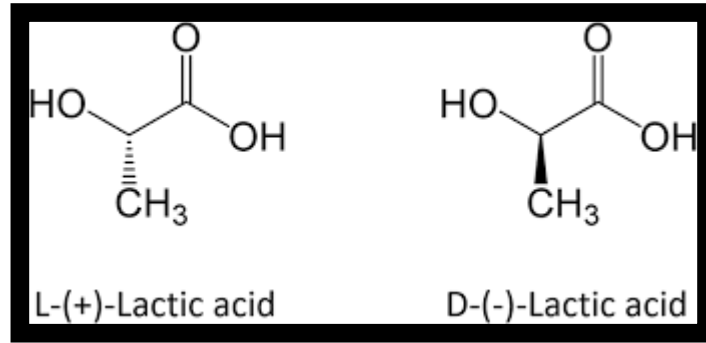
FDM şekillendirme işleminde, şekillendirmenin doğruluğunu etkileyen başlıca faktörler arasında CAD işleminin ayrıştırılması, filament malzemesinin performansı, iğnenin tam genişliği, sıcaklık (hem iğnenin sıcaklığı hem de şekillendirme odasının/tablasının sıcaklığı), malzeme ekstrüzyon ve doldurma hızı, tabaka kalınlığı ve yönü bulunmaktadır. Bu çalışmada, 3D FDM yazıcı iğnesinin çapı 0.4 mm'dir; XY eksen konumlandırması 10 mikrondur ve Z eksen konumlandırması ise 2 mikrondur. Yazıcının katman kalınlığı yüksek ayardan (100 mikron) düşük ayara (300 mikron) düzenlenmiştir. Hassasiyet ne kadar yüksek olursa, baskı işlemini bitirmek o kadar uzun sürmektedir (19, 20).

2.2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA POLİKAKTİK ASİT'İN YERİ

PLA, geleneksel polimerlere sürdürülebilir bir alternatiftir, çünkü laktikler, tarımsal yan ürünlerin, özellikle karbonhidrat açısından zengin maddelerin mikrobiyal fermentasyonu ile toplu olarak üretilmektedir . PLA, gıda paketlenme polimeri, doku mühendisliği için iskele, ortopedik cihazlar ve köklü biyobozunurluğu ve biyouyumluluğu nedeniyle ilaç dağıtım sistemleri olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (21, 22).

Birçok biyo-bazlı polimer arasında, tipik bitki kaynaklı biyobozunur polimerlerden biri olan PLA, başta nişasta, mısır veya şeker olmak üzere yenilenebilir bitki kaynaklarından elde edilebilmektedir (23).

$\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$ kimyasal formül sahip laktik asit (2-hidroksipropiyonik asit), L- ve D-laktik asit olarak iki enantiyomer şeklinde bulunan kiral bir moleküldür. Optik olarak aktif olmayan D, L veya mezo formu, D(-) ve L(+) izomerlerinin eşmolar (rasemik) bir karışımıdır (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Polilaktik asit'in kimyasal formülü

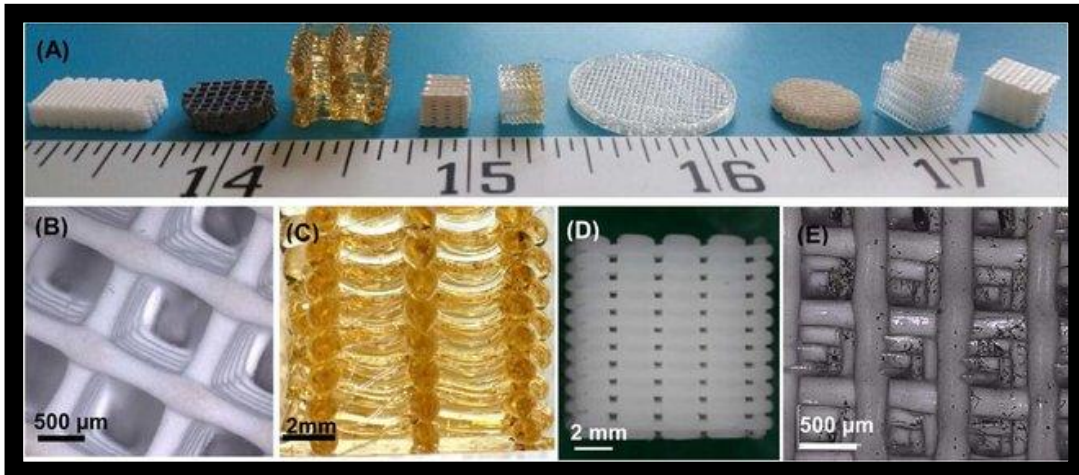
PLA, biyobozunuma uğrayan ve %100 yenilenebilir kaynaklardan elde edilen, alifatik bir polyesterdir. Kemik sabitleme materyali, ilaç salımı ve doku mühendisliğiyle birlikte, biyomedikal alanlarda kapsamlı uygulamaları vardır. Bu niteliklere dayanarak PLA, tıbbi uygulamalarda kullanım için geniş çapta incelenmiştir. PLA, 1932'de Carothers (DuPont)

tarafından icat edilmiştir. Bu keşif, laktik asidin vakum altında ısıtılmasıyla düşük moleküler ağırlıklı bir ürünün üretilmesiyle başlamıştır (7).

PLA poli(L-laktit) (PLLA), poli(D-laktit) (PDLA) ve poli(DL-laktit) (PDLLA) gibi ve kiral bir molekül olduğunda bu stereoizomerlere içermektedir.

İzotaktik ve optik olarak aktif PLLA ve PDLA kristaldir, buna karşın nispeten ataktik ve optik olarak aktif olmayan PDLLA amorfudur. PLLA, mükemmel biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte, parçalarının yüksek kristallliği ile birleştğinde uzun bozunma süreleri vücutta inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bunun üstesinden gelmek için, PLLA, L-laktik ve D, L-laktik asit monomerlerinin bir malzeme kombinasyonu olarak kullanılabilir, bu işlem sırasında kristalli parçalar oluşmadan hızla bozunur. PLA, tüm gıda tipi uygulamaları ve ilaç salım sistemleri gibi bazı cerrahi uygulamalar için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafında onaylamıştır.

PLA, doku mühendisliği uygulamalarında değişen tasarımlarla görülmekte ve çalışmaya uygun tasarım yapılmaktadır. Şekil 2.3. literatürde kullanılan 3D baskılı kemik dokusu örneklerini sunmaktadır. İskele malzemesi soldan sağa; PCL, Jelatin/ biyoaktif cam/ polistiren sülfonat, PLA, PLGA, PLA, PLA, β -TCP/HA, PLA, PCL. Bu iskelelere esas olarak osteoblast hücreleri ekilmiştir (Şekil 2.3) (24).



Şekil 2. 3. Kemik defekti için kullanılan çeşitli PLA bazlı formların yapısı ve tasarımı (24).

Kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için, PLA nanofiberleri, çok katmanlı nanofiber kumaşlar, gözenekli yapı iskeleleri, hydroxyapatite içeren nanofiberler, büyüme faktörleri ile birleştirilmiş gözenekli yapı iskeleleri gibi çok çeşitli formlarda kullanılmıştır. PLLA nanofiberlerinin fare kemik iliği stromal hücre (mBMSC) yapışmasını geliştirdiği, hücre çoğalmasını ve mBMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (25). Kim et al. PLA'da süspansiyon halinde biyoseramik hidroksiapatit (HA) kombinasyonu geliştirilmiştir. Hücresel deneyler, mükemmel hücre bağlanmasını ve çoğalmasını ve ayrıca alkalin fosfataz aktivitesinin arttırdığını göstermiştir (26). Diğer çalışmalar, kemik dokusu mühendisliği için zaman içinde osteoindüktif bir etki gösteren orijinal olarak tasarlanmış ve uygun iskele yapıları oluşturmak için ticari olarak mevcut bir 3D yazıcı ve polilaktik asit kullanmıştır (27). Kemik rekonstrüksiyonuna yönelik çalışmalardan, 3D biyobasımı yapılan PCL-PLGA- β TCP'nin (Poli(ϵ -kaprolakton), poli(L-laktid-ko-glikolid), β -trifosfat) implant çevresinde yeni kemik oluşturma yeteneği sayesinde osteo-entegrasyona sahip olduğunun gösterildiğini söyleyenebilir (28). PLLA/nano-hidroksiapatit kompoziti, kemik onarımı için iskeleler, düşük maliyetli ve FDM teknolojisi ile başarılı bir şekilde yapılmıştır. Sonuçlar, PLLA/nano-hidroksiapatit kompozit mürekkebinin baskının düzgünlüğünü sağladığını ve doğruluğun kişiselleştirilmiş kemik onarım uygulamasının gereksinimlerini de karşıladığını göstermiştir (29).

Sunulan tez çalışmasında yukarıda kısaca özetlenen literatürden farklı olarak, hAdMSC üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, birincisi düz ve ikincisi manyetik partikül temelli iki yapıya sahip PLA tabanlı bir iskele geliştirilmiştir.

2.3. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Araştırmacılar, malzeme bilimi ve kimyasal biyolojinin gelişmesiyle birlikte, kök hücrelerin incelenmesi ve kontrolü için uzun yıllar demir oksit nanopartikülleri bir araç olarak kullanmaktadırlar, ve çalışmalar göstermektedir ki manyetik alanla etkisinde, demir oksit nanopartikülleri, hücre yapışmasını, çoğalmasını, hareketini ve dağılımını için kullanılmaktadır ve kök hücrelerin kemik yönlü farklılaşması için kullanılmıştır (30)

Spesifik bölgelere veya gözenekli iskelelere uygulanan sınırlı uzaysal uyarımı, yapay doku büyümesinin mekanik uyarımı için manyetize edilebilmekte, değerli ve oldukça kontrol edilebilen bir alternatif konseptle çevreleyen bir manyetik alanla kaplanabilmektedir. Manyetik alanın, hücre proliferasyonu indüksiyonu ve farklılaşması üzerinde endüktif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Son araştırmalarda demir, paramanyetizması ile en yaygın kullanılan malzemedir (31). Partiküllerin boyutu 30 nm'nin altında olan manyetik nanopartiküller (MNP'ler) süperparamanyetik etkiye sahiptir ve her partikül tek bir manyetik alan olarak kabul edilebilir. Manyetik alanın, yapay doku iskelelerini belirli bölgelerinin uzaysal olarak zayıf uyarılmasının dezavantajını kapatabilmek amacıyla, ve gözenekli yapı iskeleleri üzerinde hücre tarafından eşit olmayan kuvvet iletimini kapsayabildiği gösterilmiştir. Doku iskelesini çevreleyen manyetik ve mıknatıslanabilen alan, yapay doku büyümesinin mekanik uyarımı için değerli ve oldukça kontrol edilebilen bir alternatif olabilmektedir (10, 32).

2.3.1. NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin sentezi nispeten basit ve ekonomiktir; pratik olarak toksik yan ürünler olmadan elde edilebilir ve biyolojik sistemlere toleransı yüksektir (33). Fe_3O_4 , Fe, Co, Ni, MgFe_2O_4 ve $\text{Co Fe}_2\text{O}_4$ dahil olmak üzere manyetik nanomalzemelerde çeşitli element bileşimleri kullanılmaktadır. Manyetik nanomalzemelerin en klasik ve yaygın bileşimi Fe_3O_4 'tür. İki ana manyetik Fe_3O_4 hazırlama yöntemi türü, kuru yöntem ve ıslak yöntemdir. Bunlar arasında ıslak yöntem daha yaygın olarak uygulanır, Bu yöntem esas olarak hidrotermal yöntemi, solvotermal yöntemi, kimyasal birlikte çökeltme yöntemini, bilyalı öğütme yöntemini, sol-jel yöntemini ve atomik katman biriktirme yöntemini içermektedir (34).

Manyetik partiküller, sulu çözeltide hazırlandıktan sonra organik bazlı yöntemle elde edilebilir. Çözelti daha sonra bir alkali madde, mikrodalga sentezi ve hidrotermal reaksiyonlar kullanılarak birlikte çöktürme yöntemlerine uygulanacaktır (34, 35).

Son kullanılmalarda, ilaç dağıtımı, nükleer manyetik görüntülemeye ve biyolojik numunelerin ayrılmasında yaygın olarak uygulanmıştır. Manyetik partiküllerin hücre üzerindeki etki mekanizması, manyetik alanın etkisi altında hücre zarının yüzeyinde birikmesiyle ilgilidir. Bu sebeple, hücreler endositoz aracılığıyla manyetik partikülleri yutar. Bu girişim hücrenin fizyolojik mekanizmasını etkilemeyi basitleştirir (36, 37). Manyetik partiküllerin etkisinin, hücre zarı üzerindeki kalsiyum iyonları taşıma kanalındaki değişikliklerle bir ilişkisi olduğu doğrulanmıştır (38).

2.3.2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MANYETİK PARTİKÜLLERİN MEKANİZMASI VE KULLANIMI

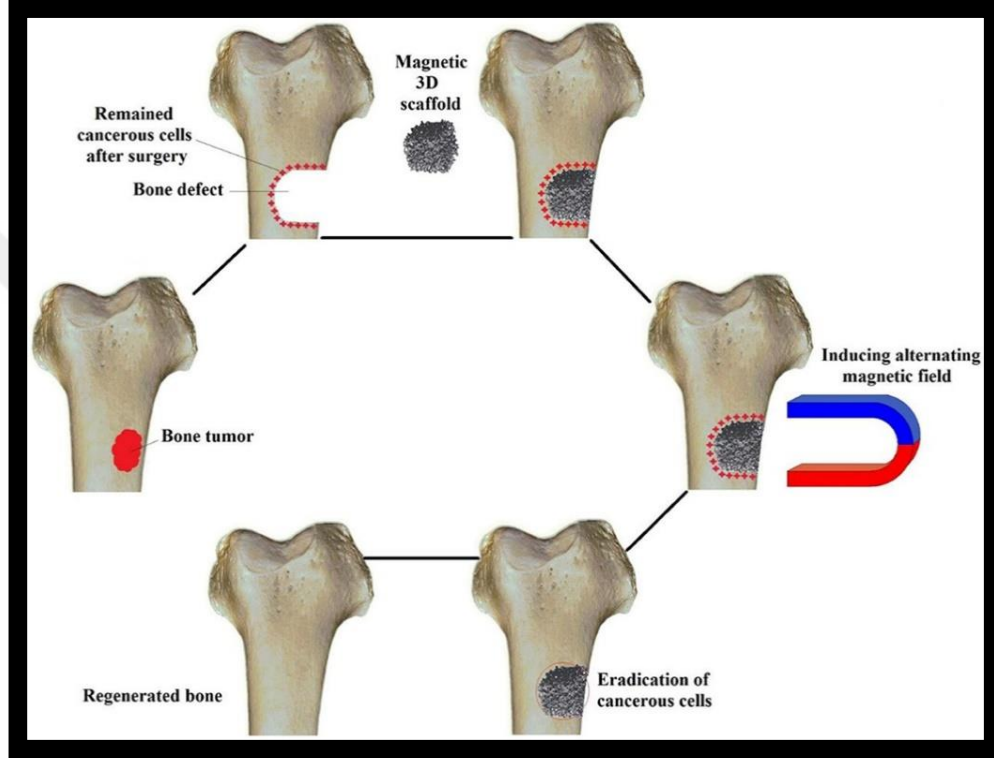
Manyetik partiküllerin osteoblastta biyomineralizasyon sürecini indüklediği gösterilmiştir. Manyetik alan hem biyomineralizasyon davranışını etkiler hem de osteojenik farklılaşmada görev alan genlerinin ifadesini ve proteinlerin sentezini etkilemektedir (39).

Yürütülen bazı çalışmalarda, doku mühendisliği uygulamaları için kolajen, aljinat, PCL ve PLA gibi farklı doku iskelelerle manyetik partiküller birleştirilmiştir. Böylece, bu kombinasyon, bu kompozitlerin toksik olmadığını ve gelişmiş hücre farklılaşması ile yüksek oranda biyouyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir (39).

Nanopartiküllerin doku mühendisliğindeki uygulamalarından, özellikle sinir ve kırık onarımı olmak üzere farklı alanlardan söz edilmektedir. Kemik dokusu mühendisliği için, kemikle ilgili sorunlarla başa çıkmak için son zamanlardaki manyetik hidrojel çalışmaları yapılmıştır. Manyetik hidrojeller üzerine yapılan bir çalışmada, ilk olarak aşılama yöntemiyle sentezlenen Fe_3O_4 manyetik partikülleri ile polivinil alkolün modifikasyonuna dayanmaktadır ve bu şekilde, kırık doku mühendisliği için potansiyel bir aday olduğu görülmektedir.

Manyetik hidrojeller üzerine yapılan bir çalışmada, potansiyel kırık doku mühendisliği için manyetik hidrojellerin önceki bir çalışması, ilk olarak aşılama yöntemiyle sentezlenen Fe_3O_4 manyetik partikülleri ile Polivinil alkolün modifikasyonuna dayanmaktadır (40).

Şekil 2.4., $Mg_2SiO_4-CoFe_2O_4$ nanokompozit iskelesinin, ameliyattan sonra kalan kanserli kemik dokularını yok etmek ve doku mühendisliğinde manyetik partikül uygulamasının temeli olarak kalan kusuru yeniden oluşturmak için çok işlevli bir manyetik iskele uygulamasını temsil etmektedir (34).



Şekil 2. 4. Kemik doku mühendisliğinde manyetik partikül uygulaması (34).

Nanopartiküller yüklü ilaçlar üzerinde yapılan çalışmalar, hastalıklı dokuları ve hücreleri doğrudan etkileyerek biyolojik aktivitede bir artış olduğunu göstermiştir. Manyetik sinyallarına etkilenen hidrojellerin geliştirilmesi üzerine sürdürülen çalışmalar, canlı hücrelerin kapsüllenmeden, yapı iskelelerinin 3D çizimi için uygun biyomürekkeplerde demir oksit bazlı nanopartiküller gibi manyetik bileşenlerin kullanımını önerilmiştir (41, 42). Elektromanyetik alanın kendisinin bile kondrojenik gelişme seviyelerini etkilediği tanımlanmıştır. Kemik dokusu mühendisliğinde, birkaç yıl önce manyetize hidroksiapatit/kollajen yapı iskelelerine dayalı yeni bir konsept önerilmiştir; burada yapı iskeleti, büyüme faktörlerini, kök hücreleri ve manyetik partiküllere bağlı diğer biyoaktif maddeleri çeken bir mıknatıs görevi görebilmektedir. Süperparamanyetik nanopartiküller veya

demir katkılı hidroksiapatit nanokristaller tarafından manyetize edilen bu yapı iskeleleri, hem *in vitro* osteojenik farklılaşma çalışmasına ve *in vivo* kemik defekti iyileşmesi çalışmasına başarıyla uygulanmıştır (43).

PCL ve demir katkılı hidroksiapatite dayalı 3D baskılı bir manyetik nanokompozit iskelelerinin, manyetik alanda hMSC'nin yapışması ve çoğalması üzerindeki destekleyici etkileri, yapı iskelesinin anlamlı bir deformasyona uğramadan gösterilmiştir (44). Diğer çalışmalar, manyetik partiküllerinin ve kaplamalarının hücre proliferasyonu ve *in vitro* canlılığı üzerinde anlamlı olmayan olumsuz etkisi olduğunu bildirmiştir (45).

Literatürdeki çalışmalarda, manyetik PLA tabanlı iskelenin geliştirilmesi yapılmamıştır ve hAdMSC'nin akıbeti açıklanmamıştır. Dolayısıyla buradaki amaç, geliştirilen Mg.PLA iskeleleri tarafından kemik dokusu mühendisliği araştırmalarındaki bu eksikliği vurgulamaktır.

2.4. OSTEOJENEZ MEKANİZMASI

Kemik rejenerasyonunda yeni yaklaşımlar geliştirmek için, kemiğin biyogenezini ve uyarmasını anlamak bir ön koşuldur. Kemik yeniden şekillenmesi, kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu ile dengelenmektedir. Ayrıca, ekilmiş hücrelerin miktar ve fonksiyonlarındaki değişiklikler, kemik durumunun korunmasına veya bozulmasına neden olmaktadır. Kemik iki farklı şekilde yenilenebilir: intramembranöz ossifikasyonu veya endokondral ossifikasyonu (46).

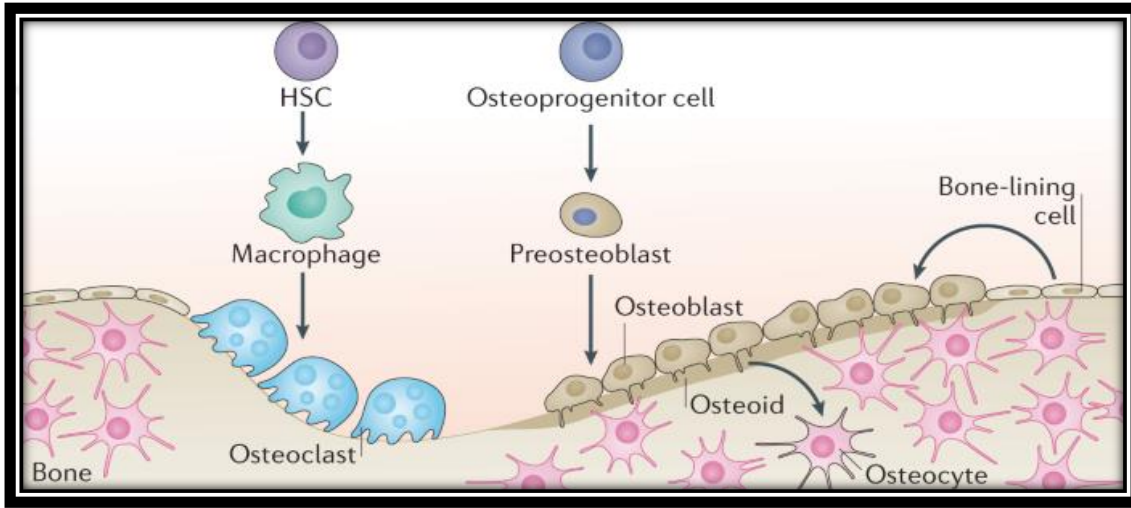
Mezenkimal kök hücreler (MSC), kemik oluşturmak için osteoblastlara yol açmak üzere farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir. İnsan MSC'lerinin osteojenik farklılaşması, kırık iyileşmesinde merkezi bir konu olarak kabul edilmiştir. Osteoblastlar, osteoklastlar ve kondrositler, kemik rejenerasyonunda oynayan ana hücrelerdir. Otokrin ve parakrin sinyalleri içeren karmaşık bir düzenleme içinde, MSC hücreler osteoblastlara farklılaşabilmektedir. Kemik rejenerasyonu, kemik matrisi oluşturan ve mineralize eden osteoblastik hücrelere farklılaştıkça gerekli immünomodülatör ve rejeneratif rolleri yerine getiren MSC'lerin görevini yerine getirmesine ve farklılaşmasına bağlıdır (47).

Kemik oluşumu sırasında osteoblastların, mineralize kemik oluşturmak için kalsiyum ve fosfat bazlı mineraller ürettiği gösterilmiştir. Süreç, osteoprogenitör hücrelerin bağıllığı ve sonunda olgun osteoblastlara dönüşen ön osteoblastlara farklılaşma ile başlamaktadır. Buna karşılık, olgun osteoblastlar osteosit haline gelmek için osteoid içine gömülecektir. Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2), alkalen fosfataz (ALP) ve Kollajen I dahil olmak üzere, zamanında eksprese edilen genlerin ekspresyonu ve hücre dışı matrisin mineralizasyonu gözlemlenebilmektedir. Kemik ossifikasyon süreci, MSC, pre-osteoblastlar, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar dahil olmak üzere bir hücre topluluğu gerektirmektedir.

- 1) MSC, herhangi bir hücre tipine farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir ve salgılanan aktif Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1'in (TGF β) uyarılması altında osteoblasta farklılaşan ana hücrelerdir (48, 49).
- 2) Preosteoblastlar, MSC'nin olgun osteoblast hücrelerine geçiş adımını temsil eder ve bu fenomen, SOX9 transkripsiyon faktörünün etkileri altında korunmaktadır (48).
- 3) Osteoblast hücreleri, olgun osteositlere farklılaşmaya hazırlanan ve ECM'nin aktif salgılanması için özelleşmiş kemik hücrelerinin öncüsüdür. Tip I kollajen açısından çok zengin olan ECM, ilk biriktiğinde ve henüz mineralize olmadığında “osteoid” olarak bilinmektedir. Bu fenomenler, osteogenez mekanizmasında önemli bir oyuncu olan Runt ile ilgili transkripsiyon faktörünü (RUNX2) içermektedir, ancak Runx2 ekspresyonu osteoblast olgunlaşması için yeterli değildir. Bu, transkripsiyon faktörlerinin ve kollajen I, osteokalsin, osteopontin ve kemik morfojenik protein 2 gibi hücre dışı sinyallerin katılımıyla uyarılmaktadır (48).
- 4) Osteositler, kemik bileşiminin çoğunu sunan ve en bol bulunan hücrelerdir. Kemik oluşumu sırasında mineralize olmayan matris (osteoid) ile çevrili olgun osteoblastlardan türetilirler. Bunlar başlıca mekanik duyarlı iskelet hücre tipidir ve osteoblast ve osteoklast farklılaşması ve fonksiyonunun düzenlenmesinde kritik rollere sahiptirler. Osteositler, osteoklastların aktivasyonu yoluyla kemik rezorpsiyonunu

destekleyen nükleer faktör- κ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünü eksprese eder (50).

- 5) Osteoklastlar, birincil işlevi kemik rezorpsiyonu olan çok çekirdekli hücrelerdir. Hematopoetik soydan türerler ve makrofajların etkileşimi yoluyla olgun osteoklastlara farklılaşırlar. Kemğin yeniden şekillenmesi sırasında, osteoklastogenez, RANKL eksprese eden osteositler tarafından osteoklast öncüllerinin alınmasıyla başlar.



Şekil 2. 5. Osteogenez mekanizması (51).

Kemik oluşumu ve gelişimine bağlı olarak endokondral ve intramembranöz kemik oluşumu/ossifikasyonu olarak adlandırılan iki kısma ayrılabilir.

İntramembranöz kemik oluşumu sırasında farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin bağ dokusu membranı, kemik ve matris kemik hücrelerinde değişebilmektedir. İlk adım, fibröz bağ dokusu zarında bir kemikleşme merkezinin gelişmesiyle başlamaktadır (48, 52). Embriyonik iskeletteki MSC toplanır ve özel hücrelere farklılaşmaya başlamaktadır. MSC'lerin bazıları kılcal damarlara farklılaşır, diğerleri osteojenik hücreler ve osteoblastlar haline gelmektedir, böylece kemikleşme merkezi oluşturabilmektedir. Bu durumda, ektomezenkim yoğunlaşma merkezinden farklılaştırarak ve kemik fibröz matrisi oluşturarak, osteoblastlar, osteoid doku üretmektedir. Üçüncü adım, periost yapılarından oluşmaktadır. Hücrelerin ve kan damarlarının kapsüllenmesi meydana gelmektedir. Osteoblastlar tarafından osteoid birikimi devam

ettiğinde, örtülü hücreler osteositlere dönüşmektedir (52). Bu mekanizma, kemiğin matrisi veya hücreler arası maddesi kalsifikasyon ile sonlanır ve kemik haline gelmektedir. (52, 53).

Kemik benzeri hücrelerin büyümesi, periost veya kemik eksplantının kültürlenmesinden etkilenebilir ve büyüyen hücreler, fibroblastik, osteojenik veya retiküler tiplere farklılaşabilmektedir.

Olgunlaşmamış bir osteoblastın olgun bir osteoblasta gelişimi, çoğalma, olgunlaşma, matris sentezi ve matris mineralizasyonu aşamaları olarak kategorize edilebilmektedir. kemiği oluşturmak göreviyle, osteoblastlar, temel olarak kemik matrisini sentezlemeye ile başlar ve daha sonra kemiğin yeniden şekillenmesinde ve mineral metabolizmasında işlev görmektedir. MSC'nin adipojenik veya osteojenik hücre akibetine bağlılığı ve farklılaşması, çeşitli sinyal ve transkripsiyon faktörlerine ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Çeşitli deneysel çalışmaları, adipogenez ve osteogenez arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermektedir (54).

Kemik morfojenik proteini (BMP) ve Wnt ligandları, hormonlar ve büyüme faktörleri, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), tümör nekroz faktörü (TNF) ve sitokinler dahil olmak üzere, osteoblastların tarafından kemiğin oluşumu, bu tip çoklu sinyalleri içermektedir. Bu faktörlere ziyade, dokuya özgü transkripsiyon ve ko-faktörleri, kemik matrisinin biyosentezi ve mineralizasyonu ile kemiğin yeniden modellenmesi ve formasyonu için genlerin ekspresyonuna içermektedir (55-59). Osteoblastlar, kemik dokusuna mineralize olan kemik matrisi ürettikten sonra, kemik oluşumu sırasında matriste yutulmaktadır. Ayrıca, MSC'lerin indüksiyonunun başlatılması sitokin uyarılarını içeren sinyalleşme kaskadı tarafından düzenlenmektedir. Bunların osteoblastlar öncesi farklılaşmasına yol açmaktadır. Ön osteoblastlar daha sonra osteoblastlara farklılaşmakta ve kromatin değiştiriciler, transkripsiyon faktörleri veya miRNA değişikliklerinden etkilenen gen ekspresyonu ile kontrol edilebilmektedir (60).

2.5. EKSOZOMLAR, BİYOGENEZİ VE KEMİK DOKUSU MÜHENDİSLİĞİNDEKİ UYGULAMALARI

Eksozomlar, 30-250 nm arasında değişen, doğal olarak salgılanan nano-veziküllerdir, endozomal membranların, spesifik kargo ile doldurulmuş eksozomları serbest bırakmak için plazma membranı ile kaynaşan çoklu veziküler endozomlar oluşturmak üzere işlenmesiyle oluşturulan iki katmanlı lipid veziküllerdir (61). Eksozomal içeriği, proteinler, mRNA'lar, miRNA'lar ve başka küçük mRNA'lardan düzenlemektedir. Tanı araçları ve hastalığa özgü haberciler olarak ortaya çıkan RNA'lar, metabolitler, lipidler ve proteinler dahil olmak üzere biyokimyasal moleküllerden oluşabilmektedir.

Yerel ve sistemik faktörler aracılığıyla, MSC'lerin düzenlenmektedir. Yerel olarak, MSC'ler parakrin ve otokrin çözünür sinyallerden, hücre arasındaki sinyallerden, hücre dışı matrisin çözünmeyen sinyallerinden ve hücre dışı mekanik ipuçlarından etkilenmektedir. Hücre sekretomunun bileşenleri, çözünür parakrin ve otokrin sinyalleri oluşturmaktadır. Parakrin fonksiyonunun yeni keşifleri, eksozomlar olarak adlandırılan hücre dışı vezikülleri, hücreden hücreye sinyalleşmede yer alan sekretomun ek bileşenleri olarak belirlenmiştir (62).

Eksozom tanımlaması temel olarak morfolojik özelliklere, partiküllerin boyutuna ve aşağıdakileri içeren anahtar proteinlere dayanmaktadır.

- (i) Membran taşıma ve füzyonla ilgili proteinler, Annexin, Rab-GTPase (Ras ile ilgili protein GTPase Rab) gibi ve Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 dahil ısı şoku proteinleri (HSP'ler) (63);
- (ii) CD9, CD63, CD81, CD82, CD106, Tspan8, ICAM (hücreler arası yapışma molekülü)-1 olarak dört transmembran çapraz bağlı proteinler olarak adlandırılan tetraspaninler (64).
- (iii) Eksozom karakterizasyonu için stereotipik biyobelirteç olarak bilinen multivezikül cisimler (MVB'ler) ile ilgili proteinler (ALIX ve TSG101) (65).

- (iv) Integrinler (hücre yapışması ile ilgili proteinler), aktin ve miyozin (hücre iskeleti oluşumuna katılan) gibi katılan diğer proteinler.

Ayrıca, eksozomlar, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile tanımlanabilmekte veya doğrudan tanımlamak için Geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) kullanabilmektedir. SEM, eksozom yüzey mikro yapısını gözlemlerken, TEM maksimum 0.2 nm çözünürlüğe sahiptir ve eksozomların iç yapısını ve morfolojisini ortaya çıkarabilmektedir (66).

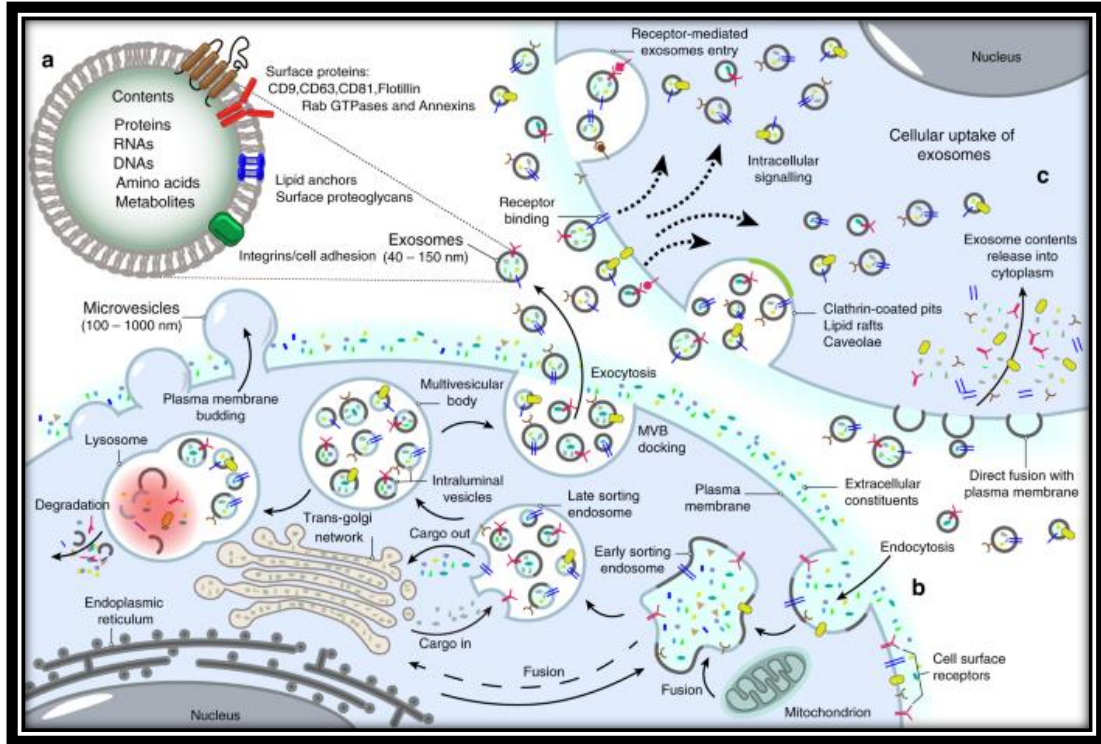
Eksozomlar, eksozom izolasyonunun altın yöntemi olarak kabul edilen ultrasantrifüjleme ile elde edilebilmektedir. Bu yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme ve diferansiyel ultrasantrifüjleme olarak ayrılmaktadır. Bu ayırma yönteminde genellikle $\times 100\ 000$ ile $150\ 000$ g arasında bir merkez kaç kuvveti kullanılmaktadır (67). Ultrafiltrasyon gibi Boyuta dayalı yöntemler, başka bir tür izolasyon yöntemidir ve idrar, serum, beyin omurilik sıvısı ve hücre kültürü ortamından eksozomları partikül boyutu veya moleküler ağırlığa göre toplamak için kullanılmıştır (68). İzolasyon ayrıca, spesifik antikorlarla, immünopresipitasyon yoluyla seçici olarak ayrıştırılabilen eksozomların iki katmanlı zarlarındaki işaretleyici proteinlere dayalı immünoafinite saflaştırma yoluyla da yapılabilmektedir. Yukarıdaki yöntemlere ek olarak polietilen glikoller (PEG'ler), Mikroakışkan tabanlı izolasyon teknikleri atomik kuvvet mikroskobu, ayarlanabilir dirençli darbe algılama ve dinamik ışık saçılması (DLS) ile çökeltme de eksozomların tanımlanması için kullanılabilmektedir (67).

2.5.1. EKSOZOMLARIN BİYOGENEZİ

Eksozomlar, geç endozomların (MVB'ler) sınırlayıcı zarının içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşturulan intralüminal veziküller , endositik kökenlidir. MVB'ler daha sonra plazma zarına girmekte ve onunla kaynaşmaktadır, bunun üzerine ILV içeriklerini (şimdi eksozomlar olarak adlandırılır) hücre dışı ortama bırakmaktadır.

Eksozomların biyogenezi, endozomdaki kökenlerini ve diğer hücre içi veziküller organelleri ile etkileşimini içermektedir. Eksozom biyogenezindeki ilk adım, erken endozom olarak bilinen zara bağlı bir vakuol oluşturmak için plazma zarının içe doğru tomurcuklanmasını içermektedir. Bu, olgunlaştıkça geç bir endozom oluşturmak üzere çeşitli değişikliklere

uğramaktadır (Şekil 2.6.). Geç endozomun sınırlayıcı membranı içe doğru tomurcuklanmakta ve daha sonra MVB olarak anılacak olan geç endozom içinde ILV'leri olarak bilinen zarla çevrili veziküller oluşturmak üzere sıkıştırılmaktadır (69). Bu noktada, ILV yüklü MVB'lerin birincil rolü, MVB'lerin lizozomlarla kaynaşarak ILV'nin bozunmasıyla sonuçlanan lizozomal bozunma yolunda ara ürünler olarak işlev görmesidir (70). Alternatif olarak, eksozomların oluşumu için hedeflenen MVB'ler, endozomal geri dönüşüm sistemine entegre edilir ve plazma membranı füzyonları ile sonuçlanır ve ILV'lerin kargolarını (bu noktada eksozomlar olarak adlandırılır) hücre dışı boşluğa bırakır (Şekil 2.6.) (71, 72). Nakil için gerekli olan dört endozomal sıralama kompleksinin (ESCRT-0-III), ILV protein kargolarının seçiminde geri dönüşümlü protein ubiquitilasyonunu içeren bir süreç olan MVB-ILV bazlı eksozom oluşumunun temel itici güçleri olduğu bilinmektedir (73).



Şekil 2. 6. Eksozom biyogenez mekanizması (74).

Eksozomun oluşumu iki invajinasyonu içerir. Birinci invajinasyon kupa şekli bir yapı oluşturur ve bu hücre zardaki proteinleri dahil eder. Bu aşama erken endosomal oluşumuna yol açar. Bu aşamada golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum bu oluşumlara ve içeriğine

katkıda bulunmaktadır. Erken endosom sınırlayıcı zarlarının invajinasyonu ile geç endosoma olgunlaşır. Bu MVC birkaç ILV (gelecekteki eksozomlar) içerir.

Eksozom oluşturma yolu, taşıma (ESCRT) kompleksleri (ESCRT'ye bağlı yol olarak adlandırılır) için gerekli endozomal sıralama kompleksi veya ESCRT'den bağımsız bir yol yoluyla düzenlenebilmektedir (75). ESCRT'ler mekanizması için gerekli olan endozomal sıralama kompleksinin MVB'lerin ve ILV'lerin biyogenez sürecinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. ESCRT'lerin bileşenleri (~20 protein içeren), dört kompleks ESCRT-0, -I, -II ve -III olarak adlandırılan ve ALIX (PDCD6IP tarafından kodlanan Apoptoz-bağılı gen 2-etkileşimli protein X) , VTA1 (Vezikül İzleme 1), VPS4 (Vakuolar protein sıralama ile ilişkili protein 4) ve TSG101 (Tümör duyarlılığı gen 101 proteini) dahil olmak üzere ilişkili proteinlerle birlikte içermektedir (76, 77). ESCRT-0, -I ve -II, ubikuitin etiketli kargoyu yakalayabilen ubikuitin bağlayıcı alt birimler içerirken, ESCRT-III vezikül tomurcuklanmasına ve kesilmesine katkıda bulunmaktadır (78, 79). Bununla birlikte, bazı durumlarda, eksozomların oluşumu, lipidlerin desteğiyle oluşumları nedeniyle karmaşık ESCRT'yi gerektirmemektedir (79)

2.5.2. KANSER HÜCRE TÜREVLİ EKSOZOMLAR VE KEMİK REJENERASYONUNDAKİ UYGULAMALARI

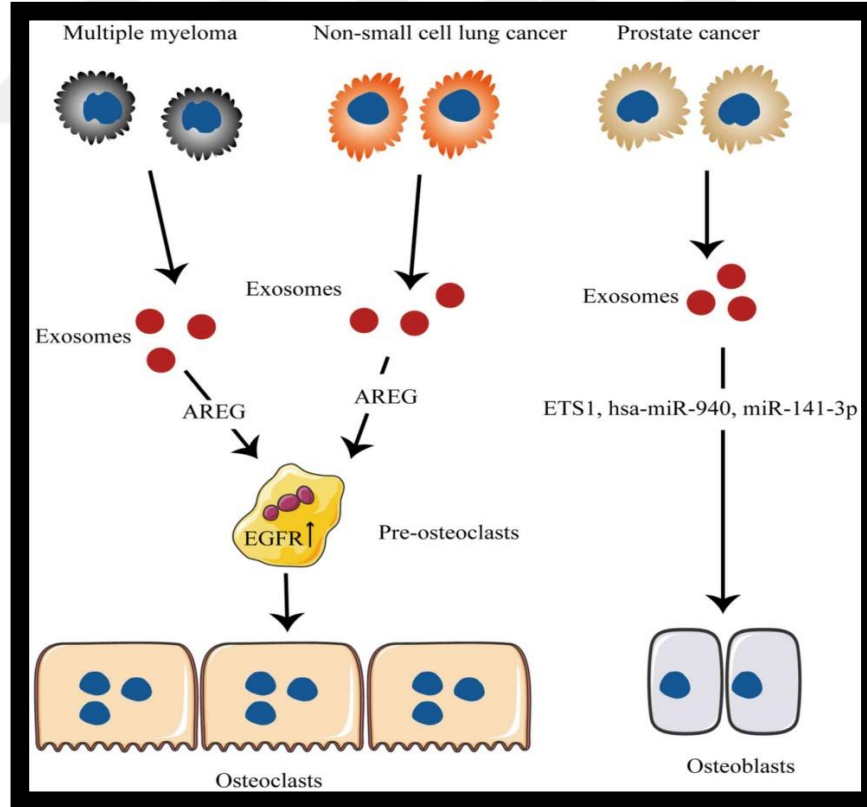
Son yıllarda araştırmacılar, hastalık tedavisinde eksozomların kullanımına giderek daha fazla odaklanmaktadır. Kök hücrelerin tedavi edici ve yenileyici gücü önde alındığında, özel proteinler ve genetik materyaller içeren eksozomların kök hücreler tarafından salındığı kesindir.

Kök hücrelerden elde edilen eksozomların farklı hastalıkları karşıya çıkmak için, onların kullanımını gösteren bazı veriler bulunduğu halde, kök hücreler ile tedavi edilecek hastalık türü arasında kesin bir ilişki bulunmamıştır.

Eksozomlar, MSC sekretomunun önemli bileşenleridir ve kargoları çok sayıda miRNA içermektedir. Büyüme faktörlerinin veya onları kodlayan genlerin bir kombinasyonunun verilmesi, in vivo olarak bir dereceye kadar kemik iyileşmesini uyarmıştır (80).

Tümör kaynaklı eksozomlar (TDE'ler) kendi benzersiz fenotipik işlevlerine sahiptir. Tümör hücresi kökenine bağlı olarak, TDE'lerin içeriği değişir. Kök hücreden türetilen eksozomlar, iskelet mikroçevresindeki tümör ve kemik hücreleri arasındaki patolojik iletişimde rol oynar. TDE'ler ayrıca osteoblast proliferasyonunu ve aktivitesini doğrudan düzenleyerek kemik rejenerasyonunu uyarabilir ve ayrıca uzak kolonizasyon ve proliferasyonu teşvik etmek için uzak metastaz mikroçevresindeki mezenkimal hücreleri düzenleyebilir (81).

Son çalışmalar, prostat kanseri EV'lerinin stromal modelleme, tümör anjiyogenezi ve adipoz kaynaklı kök hücrelerin transformasyonundaki rolünü göstermektedir (10), ayrıca prostat kanseri hücresinden türetilen eksozomların, bu vezikülleri yoluyla insan osteoblast proliferasyonunu 1.5 kat arttırdığı gösterilmiştir (82). Diğer çalışmalar, çoklu melanom hücre kaynaklı eksozomların, fonksiyonlarını ve farklılaşmasını modüle eden çok çekirdekli osteoklastlarda farklılaştığı göstermiştir.



Şekil 2. 7. Kanser hücresi kaynaklı eksozomların etkisi (83).

Multipl miyeloma (MM), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi kanser hücrelerinin, miRNA veya gen regülasyonu ortalaması ile osteoklastlar ve osteoblast oluşumu için anahtar düzenleyici olarak görev yapan mikroveziküllerle bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir

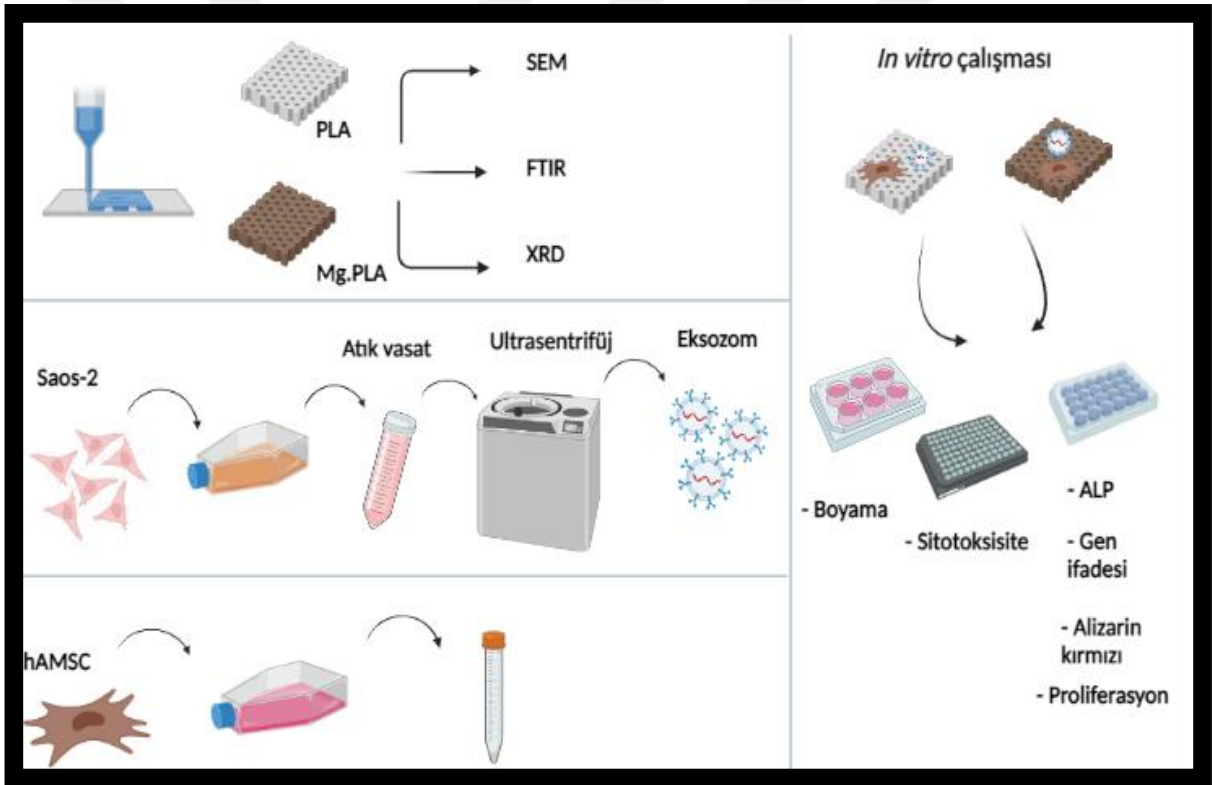
MM'den türetilen eksozomlarda EGFR'in aktivasyonu, ön osteoklastlarda EGFR'nin aktivasyonuna yol açmaktadır, MM kaynaklı osteoklastogenezde yer almakta, çünkü prostat kanseri hücrelerinden türetilen eksozom, miRNA içeriği yoluyla osteoklastogenezde de bulunmaktadır (83).

Multipl osteosarkom hücre dizisinden türetilen EV'lerin proteomik analizi, tümör ilerlemesi, anjiyogenez, hücre yapışması ve metastaz ile ilişkili proteinler içerdiğini ortaya çıkarmıştır (84). Osteosarkom 143B hücrelerinden elde edilen EV'leri, murin osteoklast oluşumunu indükleyen ve kemik rezorpsiyon aktivitelerini uyaran pro-osteoklastojenik kargo veya spesifik miRNA'lar içerir ve ayrıca *in vitro* göçü ve insan osteoblast hücrelerinin invazasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (85-87).

Saos-2 hücresinden türetilen kemiğin yeniden şekillenmesi ve yenilenmesi üzerindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, Saos-2 hücrelerinin osteojenik farklılaşma ve kemik rejenerasyonu üzerindeki rolüne odaklanmaktadır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kısaca bu çalışmanın amacı, 3D baskı teknikleri ile manyetik polilaktik tabanlı bir iskele geliştirmektir. Bu biyolojik yapılar, hücre yapışması, büyümesi ve farklılaşması için bir destek olarak hareket edebilmektedir. Bu çalışmanın başka bir bölümünden sarkom hücrelerinden türetilen eksozom bu iskeleler üzerine ekilmektedir. Eksozomun rolü, hücre farklılaşması, bunların kemik mineralizasyonu üzerindeki etkileri, alkalen fosfataz aktivitesi ve gen ekspresyonu üzerinde çalışabilmektedir. Ayrıca eksozomların varlığı osteojenik farklılaşma sırasında miRNA ekspresyon seviyesini etkileyebilmektedir.



Şekil 3. 1. Çalışmanın amacı ve metodolojisi

Sunulan tezin amacı ile uyumlu şekilde ortaya koyulan hedefleri:

- - Kemik destek malzemesinin modellenmesi,

- - Modellenen kemik destek malzemesinin 3B yazıcıda açık kaynak kodlu Cura yazılımı kullanılarak basılması ve karakterize edilmesi
- - Basımları gerçekleştirilen PLA kemik destek malzemelerinin yüzeylerinin eksozom yüklenmesi
- - Hazırlanan eksozom içeren manyetik PLA kemik doku destek malzemelerin *in vitro* testler ile kemik hücreleri üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi olarak sıralanmaktadır.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

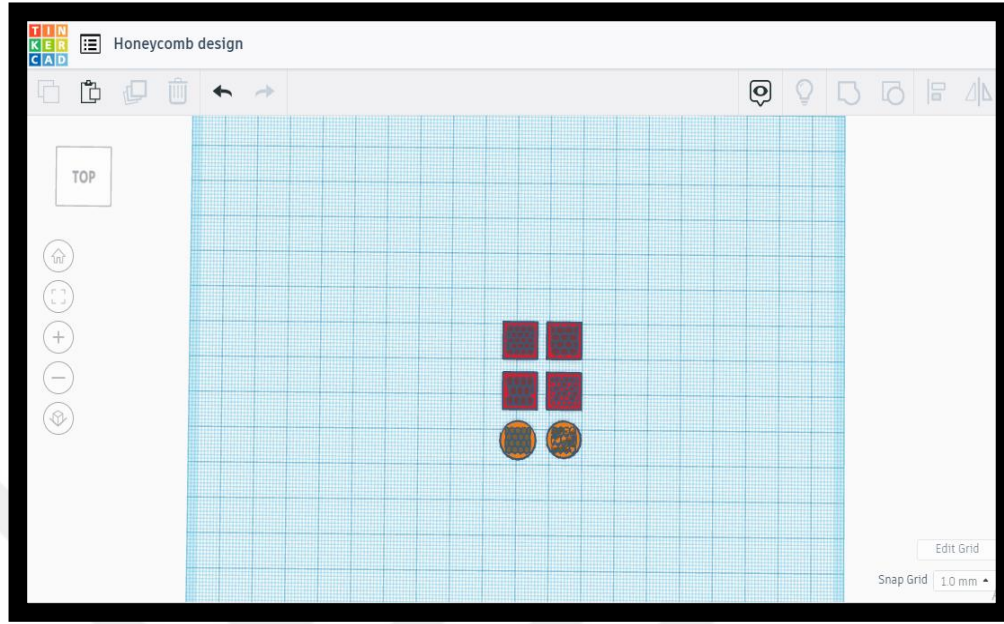
Çizelge 4. 1. Kullanılan hücre hatları

Hücre hattı	Hücre adı	Pasaj numaraları	Ortam içeriği
hAdMSC	İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre	Pasaj 6-7	DMEM +%10FBS +Penisilin/Streptomisin + 2mM L-Glutamin+ 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL L- askorbik
Saos-2	Osteokarsoma hücre hattı	Pasaj 4-5	DMEM +%2FBS + %1AA + 2mM L- Glutamin

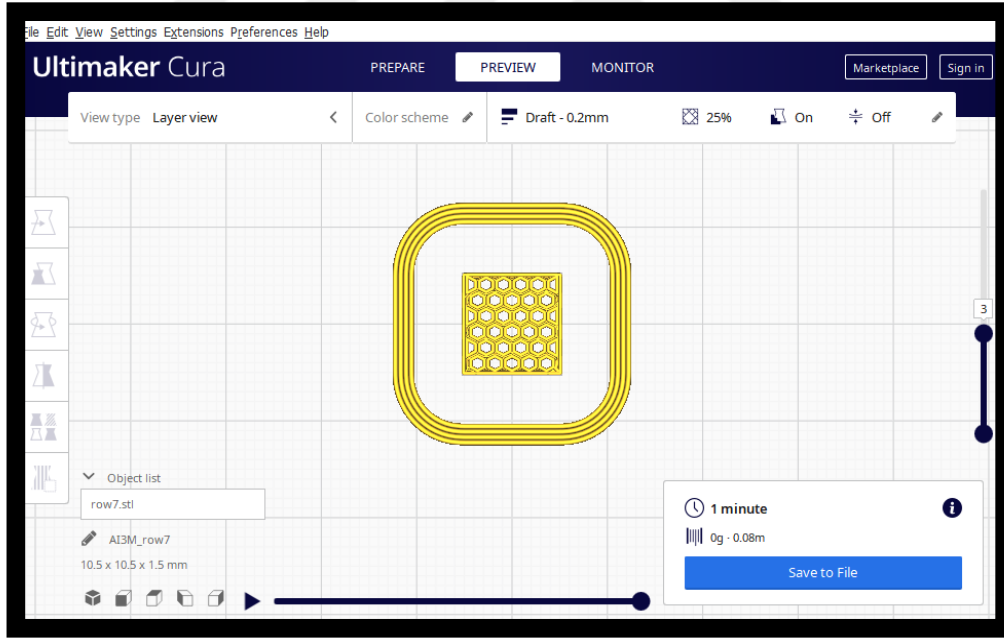
- DMEM-F12, DMEM-hg (yüksek şeker), Fosfat tuz çözeltisi (PBS), Polilaktik asit filament, ringer tamponu, manyetik polilaktik asit filament, Anyubic 3D yazıcı, Fetal sıgır serumu (FBS), Antibiyotik-antimikotik çözeltisi (AA), Lizozim, Tripsin EDTA çözeltisi, High Pure RNA Isolation Kit, BCA kiti

4.2. PLA YAPI TASARIM PROSEDÜRÜ

Bu tez için basılacak yapıların 3B tasarımı Tinkercad çevrimiçi tasarım programında yapıldı. Bu programda, farklı yapılar, farklı boyutlarda ve gözenek boyutlarında modeller ve sıradan bir 3B yazıcıda basılmak üzere test edildi. Sonrasında modellenen yapılar STL uzantısına kaydedilmiştir, ardından 3B yazıcıya uygun ayarların yapılabilmesi için Cura programından G.Code (programlama dili) formu alınmıştır. Modellenen yapıların arayüz görüntüleri ve program arayüzü Şekil 4.1. ve 4.2.'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 1. TinkerCad tasarım programının arayüzü



Şekil 4. 2.Cura programının Dilimleme prosedürü ile arayüzü

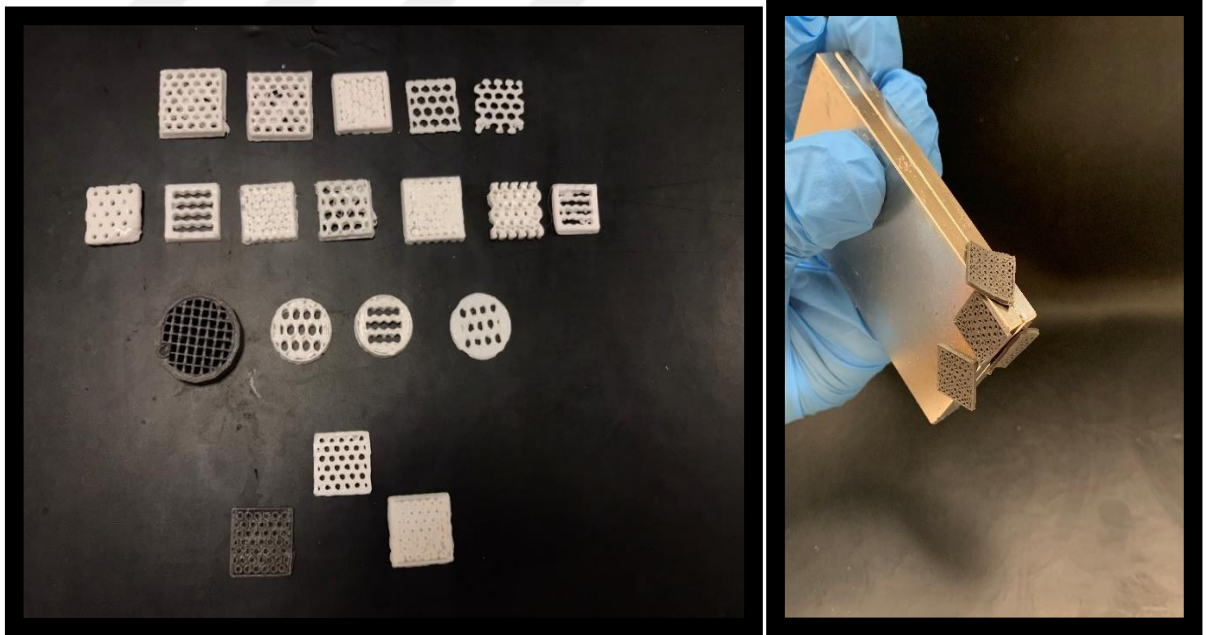
Cura üzerindeki seçilen parametreleri ve tasarlanan 3B modelleri ticari PLA filamentinin özelliklerine göre uyarlanmıştır. Üretici talimatına göre, Proto-pasta markalı manyetik demir metaldan yapılan PLA kompozittir ve manyetik PLA filamentleri olarak bilinen, paslanabilir bir

ferromanyetiktir. Manyetik PLA filamenti PLA reçine bazlı ve 250 (0,25 mm) mikrondan az gerçek demir tozu katkısından oluşmaktadır. Ticari manyetik PLA% 55 polilaktid reçinesi ve % 45 demir karışımıdır. Mıknatıslara tepki verir ve saf demire benzer şekilde davranır.

Manyetik Demir PLA, standart PLA'dan biraz daha kırılgandır ve standart PLA'dan daha aşındırıcıdır ve 1. katman ayarlamaları gerektirebilir. Manyetik demir pla standart PLA ile karşılaştırıldığında oldukça yoğundur. Sonuç olarak, 500 g bir filament manyetik demir PLA, yaklaşık 100 metre filament içerir, standart PLA'nın 500 g bobininde yaklaşık 200 metre uzaklıktadır.

4.3. PLA'NIN 3 BOYUTLU BASIMI

3D küboid modeli Cura yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır, STL dosyaları olarak dışa aktarıldı ve cura ® yazılımı kullanılarak katmanlara dilimlenmiştir. 3D yapılar daha sonra 10 mm•10 mm•2 mm (W•L•H) boyutunda, 400 µm'lik tek kullanımlık iğne uçları, 200 µm'lik bir Dilimleme kalınlığı ve 1.0 mm'lik iplikçik aralığı kullanılarak katman katman üretilmiştir.



Şekil 4. 3.Basılan PLA'ların farklı tasarımı ve mıknatıs ile PLA'ların etkileşimi

Seçilen modeller gözenek boyutu ve hücre eki için uyumluluk ile ilişkiliydi. Ekteki şekil farklı yapıları ve tasarlanmış PLA yapılarını göstermektedir. Sadece en küçük gözenek boyutuna sahip bir model seçilmiştir. mg.PLA, ikinci fotoğrafta olduğu gibi manyetik özelliklerini onaylamak için bir mıknatısla test edildi.

4.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ İLE PLA YAPI ANALİZİ

PLA ve manyetik PLA yapılarının yüzey morfolojisi ve atomik kompozisyonları, TESCAN GAIA3 TRIGLAV markalı taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmiştir. 3D PLA yüzey kararlılığı ve biyolojik bozunma çalışmalarından sonra yapıların morfolojileri SEM ile incelenmiştir. Tüm rnekler SEM analizleri öncesinde LEICA EM ACE600 cihazı ile vakum altında 3 nm Au/Pd ile kaplanmıştır.

4.5. PLA'NIN BİYODEGRADASYON ALIşMASI

Ester bağlarının rastgele hidrolizini içeren PLA polimerlerinin bozunma davranışını incelemek için biyolojik bozunma srdrlmştir. Elde edilen PLA yapılarının enzimatik davranışı 4 ay boyunca araştırılmıştır. Enzimatik biyobozunma alışması, MEMMERT marka, WNB 45 model çalkalamalı su banyosunda 37°C, 75 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Bozunma zeltisi, 1M Ringer tamponuna %0.5 lizozim, %0.005 sodyum azit (NaN₃) eklenerek, pH=7.4'de hazırlanmıştır (88).

Her 48 saat bir enzim solüsyonu yenilenmiştir. Numunelerin ağırlık kaybındaki değişiklikler, aşağıdaki formüle göre gravimetrik olarak llmştir:

$$\text{Ağırlık Kaybı \%si} = [(W_i - W_s) / W_i] \times 100$$

W_i ile: Başlangıç kütlesi ; W_s: Bozunma sonrası kütle

Biyobozunmadan sonra yapıların kalan kütlesi, zaman içinde yüzde değişim olarak kaydedilmiştir. Biyolojik bozunma çalışmalarında, her numune için üç tekrar yapılmıştır. Numunelerin hidrolitik biyobozunması 3 ay boyunca 37 °C'de gerçekleştirildi, ancak yapıların ağırlıklarında ölçülebilir bir azalma gözlenmemiştir.

4.6. X-RAY DİFRAKTOMETRİ ANALİZİ

Hazırlanan doku iskelelerinin ana bileşenlerinin kristalin yapı özellikleri ölçümlerinin X-ışını difraktometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler ODTÜ metalurji ve malzeme mühendisliğinde Rigaku Ultima-IV Japan markalı cihaz ile Cu Ka radyasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılarının karakteristik piklerini bulmak için 2θ ölçüm aralığı $10-60^\circ$ aralığı ile taranmıştır.

4.7. FOURİER TRANSFORM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ ANALİZİ

PLA kemik doku destek malzemelerin kimyasal özellikleri Hacettepe Üniversitesi Hünitek bünyesinde bulunan Thermo Fisher marka Nicolet is50 (USA) ATR-FTIR spektrometresi ile incelenmiştir. Numunelerin kimyasal analizi FTIR ile $600-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında elde edilmiştir.

4.8. SAOS-2 HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ

Saos-2 hücreleri ODTÜ üniversitesinden temin edilmiştir. Hücreler, 37°C 'de minimum %2 FBS (h/h), 2 mM L-glutamin, penisilin/streptomisin (100 birim/mL penisilin-100 L/mL streptomisin) oranıyla DMEM-F12'de kültürlenmiştir. Hücreler bağıl bolluğa ulaştıklarında kültür ortamları (atık) toplanmıştır ve eksozom izolasyonu için süzölmüştür.

4.9. EKSOZOMUN İZOLASYONU

Tez kapsamında eksozomlar, filtrelenmiş serum örneklerinden seri ultrasantrifüjleme ile izole edilmiştir. Kısaca, 200 ml, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ filtrelerden süzölmüştür. Hücreleri elimine etmek için 300 g ve 4°C 'de 15 dakika santrifüjlendi. Apoptotik cisimleri, mikrovezikülleri ve hücre döküntülerini çıkarmak için, 10.000 g ve 4°C 'de 15 dakika santrifüjlendi. Son olarak eksozomları peletlemek için Himac CP100WX, Hitachi, ABD cihazı kullanarak, 120.000 g ve 4°C 'de 180 dakika boyunca ultrasantrifüjlenmiştir. İzole edilen eksozomlar PBS'ye yeniden yerleştirilmiştir ve kullanıma kadar -20°C 'de saklanmıştır. İzole edilen ve pelet halinde toplanan eksozomlar PBS ortamda çözölmüş, ardında, bir bikinkoninik asit (BCA) test kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile karakterize edilmiştir.

4.10. EKSOZOMLARIN TEM ANALİZİ

İzole edilen eksozomlar, tarif edildiği gibi bir bisinkoninik asit (BCA) testi ve Geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) (Jeol jem-100CX II ; 80kv-100kv) kullanılarak karakterize edilmiştir.

TEM analizi için kısaca, eksozom bakır ızgaralar üzerine yerleştirildi, immün reaksiyonu stabilize etmek için 5 dakika boyunca PBS içinde %5 glutaraldehit ile sabitlendi, steril damıtılmış su içinde yıkandı, pH 7'de 10 dakika boyunca %1 uranil-asetat çözeltisi ile kontrastlandı.

BCA testi için, kitte verilen talimatlara göre, 12,5µl eksozomdan 12,5µl distile suda çözölmüş, ardından 1 µl reaktif A'dan, 50 µl reaktif B'den toplam 200 µl olacak şekilde toplam çözeltisi eksozom üzerinde eklendi ve 1 saat bekletildi. Absorbans 585nm okundu.

Tez kapsamında osteojenik farklılaşmanın ayrıntılı değeriendirilmesi amacıyla yapılacak doku iskelesi-hücre etkileşimi *in-vitro* çalışmalarında 50 µg/µL eksozom konsantrasyonu kullanılmıştır.

4.11. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada hAdMSC hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler %10 FBS (v/v), 2 mM L-glutamin, penisilin/streptomisin (100 birim/mL penisilin-100 L/mL streptomisin) içeren DMEM-hg içinde çoğaltılmıştır. Kültür ortamı 2-3 günde bir taze besiyeri kullanılarak değıştirilmiştir. Hücre kültürü çalışması sırasında pasaj 5-6 hücreler kullanılmıştır.

4.12. IN VITRO ÇALIŞMALAR

4.12.1. OSTEOJENİK İNDÜKSİYON

hAdMSC, Alpha Minimum Essential Medium (MEM α) içinde, %10 FBS (v/v), 2 mM L-glutamin, penisilin/streptomisin (100 birim/mL penisilin-100 L/mL streptomisin) kullanarak kültüre edilmiştir. Hücre kültürü çalışması sırasında pasaj 7-8 hücreleri kullanılmıştır. 1×10^6 hücre, Petri kabına hücre tabakaları elde etmek için ekme yoğunluğu olarak belirlenmiştir.

Hücreler hem büyüme ortamında hem de osteojenik farklılaşma ortamında aşırı birleşmeye ulaşana kadar 10 gün boyunca kültürlenmiştir. Farklılaşma grubu için kültür ortamı 24 saat sonra 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL L-askorbik asit içeren farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Her grup için, kültür ortamı her 3-4 günde bir önceden ısıtılmış taze olanla doldurulmuştur.

4.12.2. MEZENKİMAL HÜCRELERİN BOYAMASI

Akridin turuncusu, DNA'nın yeşil floresan ışığı yaymasına ve RNA'nın turuncu-kırmızı floresan ışığı yayılmasına neden olan bir florokromdur. 6 günlük kültürden sonra hAdMSC'lere Akridin Turuncu floresan boyama uygulanmıştır. $25 \cdot 10^4$ hAdMSC hücresi DMEM-hg'de 6 kuyucuklu plakaya ekilmiştir ve ortam her 2 günde bir değiştirilmiştir. Boyama 6. günde eski ortam aspire edilerek, iki kez PBS ile yıkanarak ve ardından 1mg/1ml 1mM akridin turuncusu boyaması uygulanarak uygulanmıştır.

4.12.3. MALZEMELERİN BİYUYUMLULUĞU

Hücre sitotoksite testi (MTT), hAdMSC ile dolaylı olarak yapılmıştır. PLA, Mg-PLA UV ışığı ile 20dk. sterilize edilmiştir, sonrasında %80 etanol (20dk.) muamele edilmiş ve ardından PBS ile yıkanmıştır ve kurumaya bırakılmıştır. PLA'nın etkisi ve sitotoksite, temel MTT denemesi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada 96 kuyucuklu plakalara $2.5 \cdot 10^5$ hücre ekimi yapılmış ve 48 saate kadar inkübe edilmiştir. MTT ölçümünden önce ölçülecek numunelere 0.75 μ L MTT boyası ilave edilerek 3-4 saat beklenmiştir. Bekleme işlemi bittikten sonra kuyulardaki karışım çekilmiştir. Bu karışım daha sonra 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır. Örnekler bir mikroparka okuyucuda 490 nm'de spektroskopik olarak okunmuştur. MTT testi 24 saat ve 48 saat boyunca yapılmıştır.

4.12.4. HÜCRE ÇOĞALMA DAVRANIŞI

Hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki çoğalma davranışı alamar mavisi (alamarBlue) kullanılarak 3,7,10 ve 14. günlerde incelenmiştir. Bu amaçla bu günlerde kültür ortamı aspire edilmiştir ve alamarBlue solüsyonu (BioRAD, CA,US) ile seyreltilmiş DMEM-F12 (1:10)

kültür ortamı örnekler eklenmiştir. 3 saatlik inkübasyondan sonra, indirgenmiş alamarBlue çözeltileri aseptik olarak 96 kuyucuklu bir plakaya aktarılmıştır ve numuneler taze bir ortamla yeniden süspanse edilmiştir. Bir mikro-plaka okuyucu (iMark Microplate Absorbance Reader, BioRAD, CA, US) kullanılarak 570nm uyarma filtresi ve 600nm emisyon filtresinde ölçümler alınmıştır (89).

4.12.5. HÜCRELERDE KALSİYUM BİRİKİMİNİN DEĞERLENDİRMESİ

Alizarin kırmızısı, hücrelerdeki kalsiyum birikimi miktarını ölçmek için yapılan bir testtir. Bu çalışma her bir örneğin üzerine yaklaşık 10^5 Saos hücresi ekilerek gerçekleştirilmiştir. Örneklerin 2 gün de bir besiyerleri değiştirilmiştir. Besiyeri olarak kalsiyum birikimini artırmak için osteonejik besiyeri kullanılmıştır. Örnekler osteojenik farklılaşmanın izlenmesi açısından alizarin kırmızısı ile boyanmıştır ve setilpiridinyum klorür (CPC) kullanılarak kantitatif ölçümler gerçekleştirilmiştir. Örnekler mikropak okuyucusunda 562 nm’de absorbans ölçümü ile standart grafik üzerinden hesaplanmıştır. Alizarin kırmızısı testi 3, 7 ve 14 gün için yapılmıştır.

4.12.6. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ

Kemik gelişiminin mineralizasyon evresinde inorganik fosfat ihtiyacı gelişmektedir. Alkalen Fosfataz (ALP) inorganik fosfat salımı için gerekli olan bir seri enzimatik tepkimede rol almaktadır ve ALP aktivitesinin hücrelerde mineralizasyon ve kalsifikasyonu ile ilişkilidir. Çalışmada her bir yapıya 10^6 hücre ekimi yapılmıştır. Belirli zamanlarda (3, 7, 14 gün), -20° C’de dondurulan örnek yüzeylerindeki hücrelerin ALP aktivitesi ölçülmüştür.

4.12.7. MALZEME-HÜCRE ETKİLEŞİMİ VE MORFOLFOLJİK DEĞERLENDİRMESİ

Hücre - PLA etkileşimleri ve temel hücre morfolojiler SEM ile gözlemlenmiştir. Burada 10^5 hücre PLA yapılarına ekilmiştir ve 3 ve 7 gün boyunca “temel kültür ortamı” içinde inkübe edilmiştir. Numuneler daha sonra birkaç kez D-PBS ile yıkanmıştır ve ardından %3 glutaraldehit ile 20dk’da fikse edildi. Analizden önce numuneler, bir etanol serisinden %30

%50 %70 %90 ve %100 her iki dk içerisinde geçirildi sonra kurutuldu. Tüm örnekler SEM analizleri öncesinde vakum altında 3 nm AuPd kaplanmıştır.

4.12.8. KANTİTATİF GEN İFADESİ

4.12.8.1 RNA İzolasyonu

Hücre PLA grupları ile inkübasyon sürelerinin dolmasıyla, “High Pure RNA Isolation Kit” kullanılarak, hücrelerden RNA izolasyonu, ekteki protokole göre gerçekleştirildi. Buna göre; hücrelerin üzerine 200 µL soğuk PBS ve 400 µL Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi. Tüm karışım toplama tüpüne yerleştirilmiş olan filtre üstüne aktarıldı. Tüp 9000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde toplanan sıvı atıldı ve aynı tüpe tekrar filtre yerleştirildi. Her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu steril tüpe alındı. Bunların üzerinde 10µL DNaz I eklenerek, pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 500 µL’lik 1. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve tekrar 9000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi. 500 µL’lik 2. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 9000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi. 200 µL’lik 3. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 13500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak, filtreli tüp, steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirildi. Filtre üzerine 20-40 µL seyreltme çözeltisi eklendi ve 9000 rpm’de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen RNA’ların miktarları ve saflığı “NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre” cihazında ölçüldü.

4.12.8.2 cDNA Sentezi

Hücreden RNA izolasyon protokolü ile elde edilen RNA’lar spektrofotometre’de (NanoDrop, ND-1000, ThermoScientific, ABD) 260/280 nanometre (nm) dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendikten sonra, primer olarak Random Hekzamerler

kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları çizelge 4. 2.'te verilmiştir. cDNA sentezi için Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) karışımı ince çeperli 0,2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA üzerlerinde eklendi.

Çizelge 4. 2. cDNA senteze bağlı RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz Enzimi	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

RT-PCR için Otomatik Isı Döngüsü Programı

Otomatik ısı döngü cihazı, çizelge 4.2.'de belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi elde edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 4. 3. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

4.12.8.3 qPCR Analizi

RUNX2, COL1A1, OSP ve OSC genlerinin mRNA ifadesinin kantitatif değerlendirmesi Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı ve çizelge 4.3. kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler , UPL Taqman probu ve LC TaqMan Master karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. RUNX2, COL1A1, OSP ve OSC gen ifadenme miktarlarını normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanıldı ve GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi çizelge 4. 4.'de verilmiştir. Kullanılan problemler Roche Diagnostic'ten temin edilmiştir. Tüm cDNA örnekleri her bir gen için en az üçer kez çalışılmıştır.

Çizelge 4. 4. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları

Gene	Sequence	UPL Prob Numarası
COL1A1	Forward: 5'- GACCTCCTGAATCCCCAGA -3' Reverse: 5'- CACGATGGTTCCCCAGAC -3'	23
OSC	Forward: 5'- ACCTCCCAGCCCTATGGA -3' Reverse: 5'- ATTCTCTTCTGAGTTTATTTGG -3'	33
OSN	Forward: 5'- CTCTGTGATGGGCCCTGT -3' Reverse: 5'- AGGTTCCGCAACTCCTTGT -3'	14
RUNX2	Forward: 5'- CACCATGTCAGCAAACTTCTT -3' Reverse: 5'- TCACGTCGCTCATTTTGC -3'	41
GAPDH	Forward: 5'- CGTAGCTCAGGCCTCAAGAC -3' Reverse: 5'- GCTGCGGGCTCAATTTATAG -3'	23

UPL: Evrensel Prob Kütüphanesi

RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı

RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH genlerine uygun verilen primer ve probalar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenler çizelge 4. 5.'da verilmiştir.

Çizelge 4. 5. RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH Real-time PCR karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µL
Primer F (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
Primer R (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µL
LC TaqMan karışımı (10x)	1x	1 µL
cDNA	-	1 µL

Light-Cycler (LC) Deney Programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra LC cihazında ekteki belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı ektedir.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00 dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)

Program Verisi	Değer
Döngüler	50
Analiz Modu	Çoğalma

Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10 sn	20 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait RUNX2, COL1A1, OSP, OSC ve GAPDH_genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri kullanılarak Pfaffl matematiksel metodu ile gruplar arasında mRNA ifade düzeylerindeki değişimler belirlendi. mRNA düzeyi RUNX2, COL1A1, OSP ve OSC gen ifade düzeylerini normalize etmek amacı ile GAPDH kullanıldı.

İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Gruplar arasında x ve y hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak değişen RUNX2, COL1A1, OSP ve OSC mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “Relative Expression Software Tool (REST; Qiagen, 2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı ref:1. 0.05’den küçük olan p değerleri ($p < 0.05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4.13. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler GraphPadPrism yazılımı (GraphPad Yazılımı) kullanılarak yapılır. Veriler, en az 3 bağımsız kopyanın ortalaması ($\pm$ SEM) olarak ifade edilir. Gruplar arası karşılaştırma için İki Yönlü ANOVA testi kullanılır.

Hesaplama ile bulunan değer, grupların p hatası riski ile farklı olduğunu teyit eder.

-Fark $P < 0,05$ (*) için anlamlıdır.

-Fark $P < 0.01$ (**) için oldukça anlamlıdır.

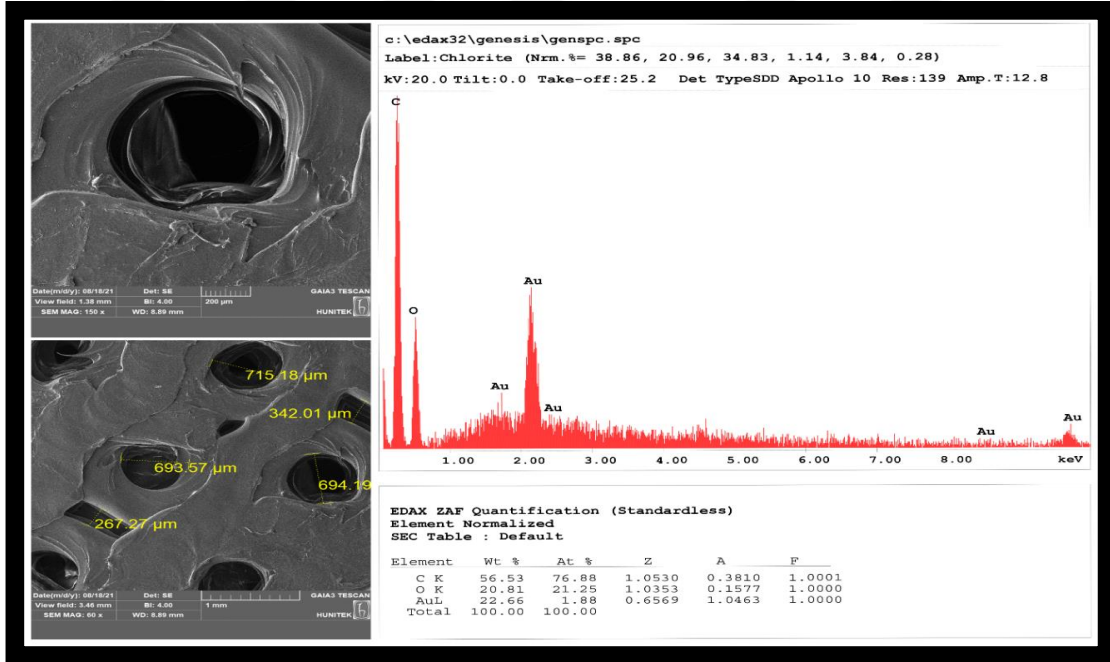
-Fark $P < 0,001$ (***) için çok yüksek derecede anlamlıdır.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

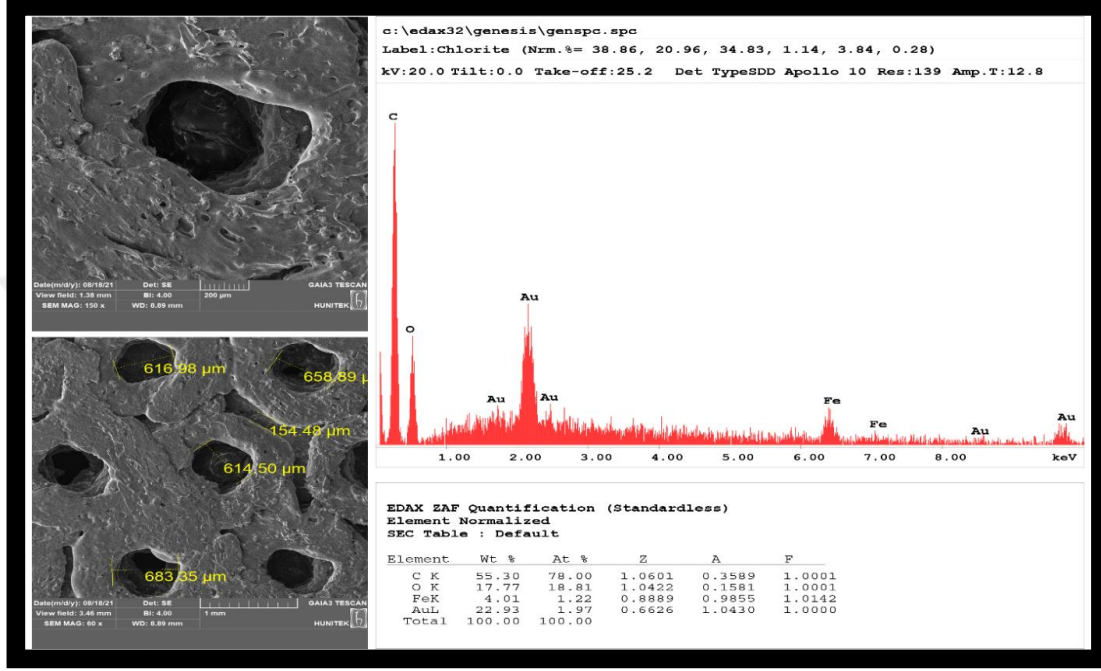
5.1. SEM SONUÇLARININ ANALİZİ

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi, bu tez için sentezlenen PLA yapı iskelelerinin morfolojisini incelemek veya tahmin etmek için kullanıldı. Bu tez için basılı düz PLA ve mg.PLA'nın yüzey morfolojisinin sonuçları aşağıdaki şekilde SEM analizi ile gösterilmektedir. SEM görüntülerine ek olarak, EDX spektrumları da sunulmaktadır. 3D baskılı normal PLA'nın (Şekil 5.1.) tüm yüzey topolojisinin düzgün bir yüzeyden yapıldığı, homojen ve literatürde verilen morfolojilere benzer olduğu görülmektedir (27). PLA örneklerinin, 3D baskılı PLA'nın yüzeyinin minimum pürüze sahip düz bir yüzeyden yapıldığını, mikropartiküller şeklinde sarsıntı ve düzensiz bozukluk içerdiğini göstermektedir. Ayrıca görüntüler 693µm ve 715µm arasında değişen gözenek boyutunu göstermektedir. Aralık boyutları ise 267µm ile 342µm arasında değişmektedir. Bu değişiklikler, 3B baskı sürecinden kaynaklanan kusurlara bağlanabilir (27, 90).



Şekil 5. 1. Düz PLA yapılarının SEM görüntüleri, boyutları ve EDX spekturum

Basılı mg.PLA yüzeyi, düz PLA'ya kıyasla düz olmayan bir yapı göstermektedir (Şekil 5.2.). Ancak, gözenek boyutu düz PLA'ninkinden daha küçüktür ve 614µm ile 680µm arasında değiştirmektedir. Aralık boyutu ise yaklaşık 154µm'e yakındır.



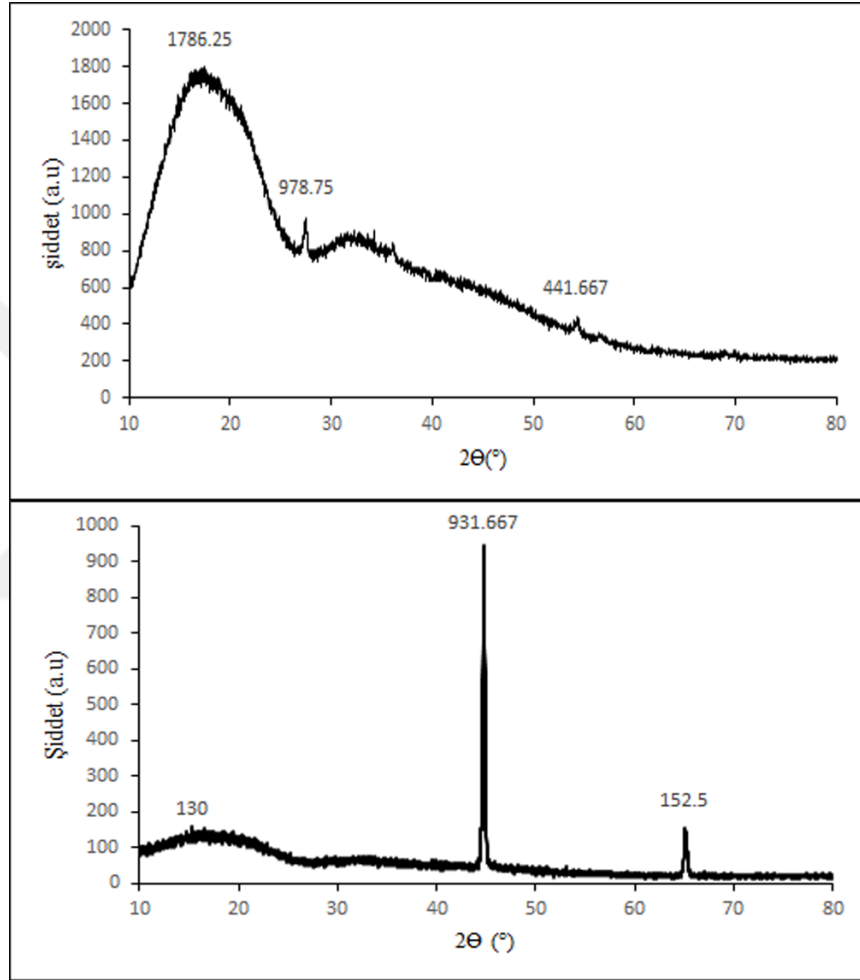
Şekil 5. 2. Manyetik PLA yapılarının SEM görüntüleri boyutları ve EDX spekturumu

3D baskılı mg.PLA'nın yüzeyi, 3D baskı işleminden kaynaklanan kusurlar olarak mikropartiküller şeklinde düzensiz kusurlar içeren kısmen pürüzlü bir yüzeyden yapılmıştır. EDX analiz sonuçlarına göre mg.PLA örneklerinde PLA örneklerine göre ayırt edici şekilde elementer Fe piklerine rastlanmıştır. Ayrıca mg.PLA'nın yüzeyinde büyük kümeler oluşturma eğiliminde olan parçacık şeklinde bazı aglomerasyonlar gözlenir. Ayrıca, nanopartiküllerin katmanlar arasında kalmasına rağmen, bir kısmının her katmanın yüzeyinde biriktiği gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız Fe₂O₃ ile modifiye edilmiş poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA) literatür araştırması ile uyumludur (91).

5.2. XRD SONUÇLARININ ANALİZİ

Nano partiküllerin kristal yapısını tanımlamak için X-Işını kristalografisi kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan düz PLA'nın XRD grafiği, $2\theta \approx 17^\circ$ merkezli geniş bir kırınım pik

1786.25 değere sahip ile yoğunluk göstermektedir. Bu pik, PLA'nın polimorfik kristal olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, PLA herhangi bir karakteristik pik göstermemiştir, bu da yapının amorf olduğunu kanıtlamaktadır (92). Bu sonuçlar, 16°, 16.25° ve 16.66° arasında bir pik noktası gösteren diğer PLA çalışmalarla uyumludur (93).



Şekil 5. 3. PLA ve mg.PLA XRD spektrumu

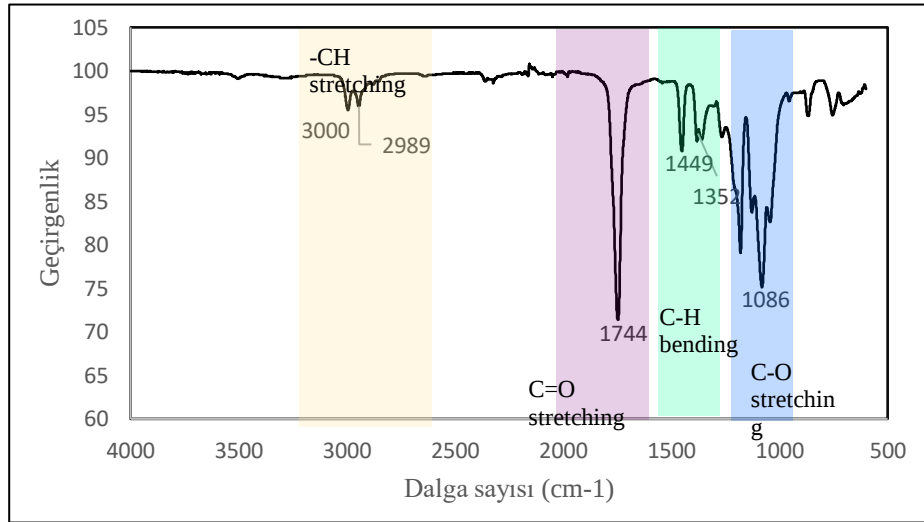
Mg.PLA'nın XRD desenleri, $2\theta \approx 44.78^\circ$ 'de ortalanmış geniş bir kırınım tepe noktası 931.66 şiddet değere sahip ve $2\theta \approx 65^\circ$ 'de 152,5 şiddet değere sahip küçük bir çekme ile yoğunluk gösterdi. Sonuçlarımız bir şekilde, ana zirvelerin XRD eğrisinden 35.4° , 43.1° 2θ değerlerinde manyetik partiküllerin varlığını gösterildiği diğer literatür araştırmalarına benzer (94, 95). Özellikle plaka benzeri ve küresel demir partiküllerinin manyetik alana bağlı özelliklerinin

oluşturulmasına dayanan bir çalışma aynı sonuçları göstermiştir. (110) ve (200) düzlemlerinde sırasıyla 45 ve 65 derecelik bir dizi karakteristik pik gözlemlendi ve bu bizim sonuçlarımızla uyumludur (96).

5.3. FTIR SONUÇLARININ ANALİZİ

Basılı PLA'daki kimyasal grupları doğrulamak ve araştırmak için Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanıldı. Spektrum, PLA için tipik örnekleri gösterdi. Sonuçlar sırasıyla PLA ve mg.PLA için şekil 5.4. ve 5.5.'de gösterilmektedir.

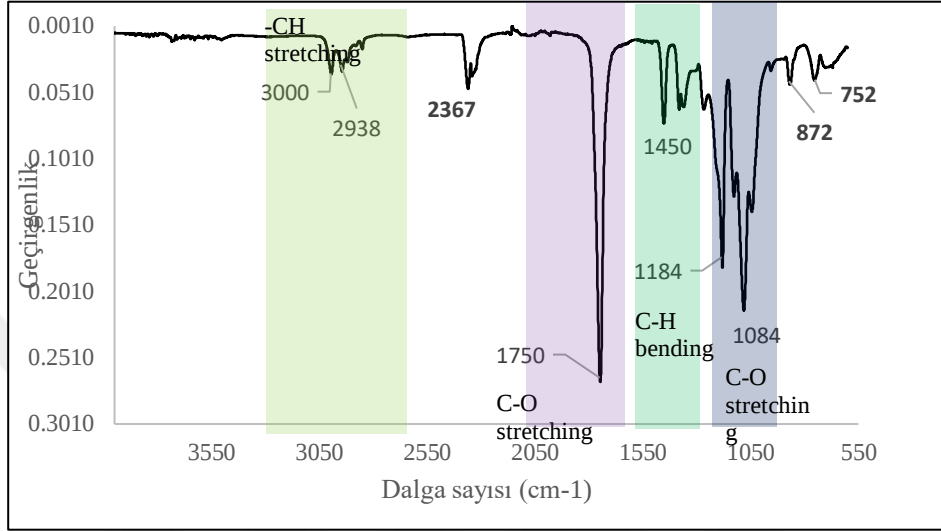
Şekil 5.4., düz PLA yapısını temsil etmektedir. C=O için gerilme frekanslarının anlam bantları 1744 cm^{-1} 'de, $-\text{CH}_3$ asimetrik, $-\text{CH}_3$ simetrik grupları sırasıyla 3000 cm^{-1} ve 2989 cm^{-1} 'de ve C-O grubu için 1086 cm^{-1} 'da saptandı. Karboksil grubunun bükülme frekansı ise 1352 cm^{-1} ve 1449 cm^{-1} 'de tespit edildi. Bu sonuçlar, Chieng ve arkadaşlarının (2014) PLA yapısını onaylayan, 1746, 2995, 2946 ve 1080 cm^{-1} 'de sırasıyla C=O, $-\text{CH}_3$ asimetrik, $-\text{CH}_3$ simetrik, C-O için gerilme frekansları olan çalışmasına uygundur (97). Bu sonuçların benzerliğini PLA yapı tespiti ile ilgili diğer literatür çalışmalarında da gözlemlenmektedir (90, 98-100).



Şekil 5. 4. PLA yapılarının FTIR spektrumları

Şekil 4.5., mg.PLA'nın kimyasal yapısını temsil etmektedir. C=O için gerilme frekanslarının anlam pikleri 1750 cm^{-1} 'de, $-\text{CH}_3$ asimetrik, $-\text{CH}_3$ simetrik grupları sırasıyla 3000 ve 2938 cm^{-1}

^{13}C 'de ve C–O grubu için 1084 cm^{-1} olarak saptanmıştır. Karboksil grubunun bükülme frekansı ise 1450 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, kimyasal bileşimi yanı sıra mg.PLA'da PLA yapısının varlığını belirlemekte ve onaylamaktadır.



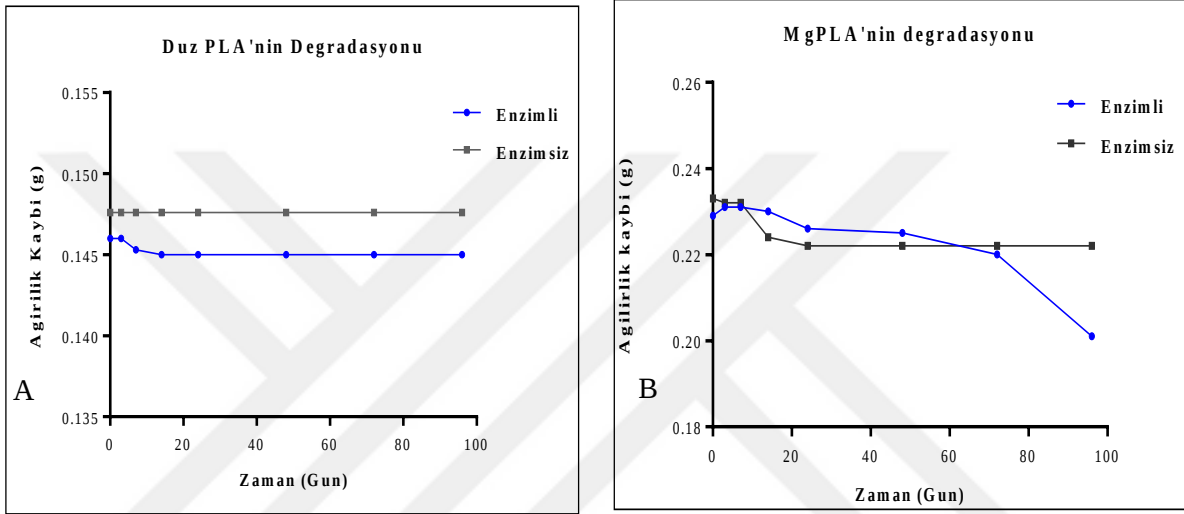
Şekil 5. 5. mg.PLA yapılarının FTIR spektrumları

Literatürde, Fe-O gruplarının manyetik partikül ve titreşim spektrumlarının, 1050 cm^{-1} ile 550 cm^{-1} arasındaki düşük frekans bölgesinde bantlar sergilediğini göstermektedir (101, 102). Bu, literatüre göre Fe-O'nun absorpsiyon bandına karşılık gelmektedir. Cihazın sınırlılığı nedeniyle bu bantları tespit edemedik. 2367 cm^{-1} 'de dikkat çekici bir pik de tespit edilmektedir. Bunun, düz PLA yapısında sunulmadığına göre, manyetik partikül titreşimi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Genellikle 2000 cm^{-1} ve 2400 cm^{-1} civarındaki titreşim, NiCo_2O_4 ferrimagnet ile ilişkili olan C=N=O asimetrik gerilme titreşim grubuna karşılık gelmektedir (103).

5.4. BİYOBOZUNMA ÇALIŞMASI

PLA yapılarının enzimatik biyobozunma çalışması, materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı gibi üç ay boyunca sürdürüldü ve her 48 saat içerisinde bir lizozim enzimi değiştirilerek kütlelerindeki değişimler belirli günlerde izlendi. PLA, mg.PLA ve kontrol numunelerinin ($n=3$) enzimatik biyobozunma profilleri Şekil 5.6.'da sunulmaktadır.

Biyolojik bozunma sonrası PLA ağırlık kaybı ölçümü, biyobozunuma uğrayan düz PLA oranının çok umut verici olmadığını gösterirken, ilk azalma %0.46'lık bir değerle 7. günde, ikinci azalma ise %0,68 değeri ile 14. günde gözlemlendi. Sürenin geri kalanı için sabit bir ağırlık oranı belirtilebilmektedir. Enzim olmadan, PLA grupları herhangi bir ağırlık değişikliğine uğramamıştır.

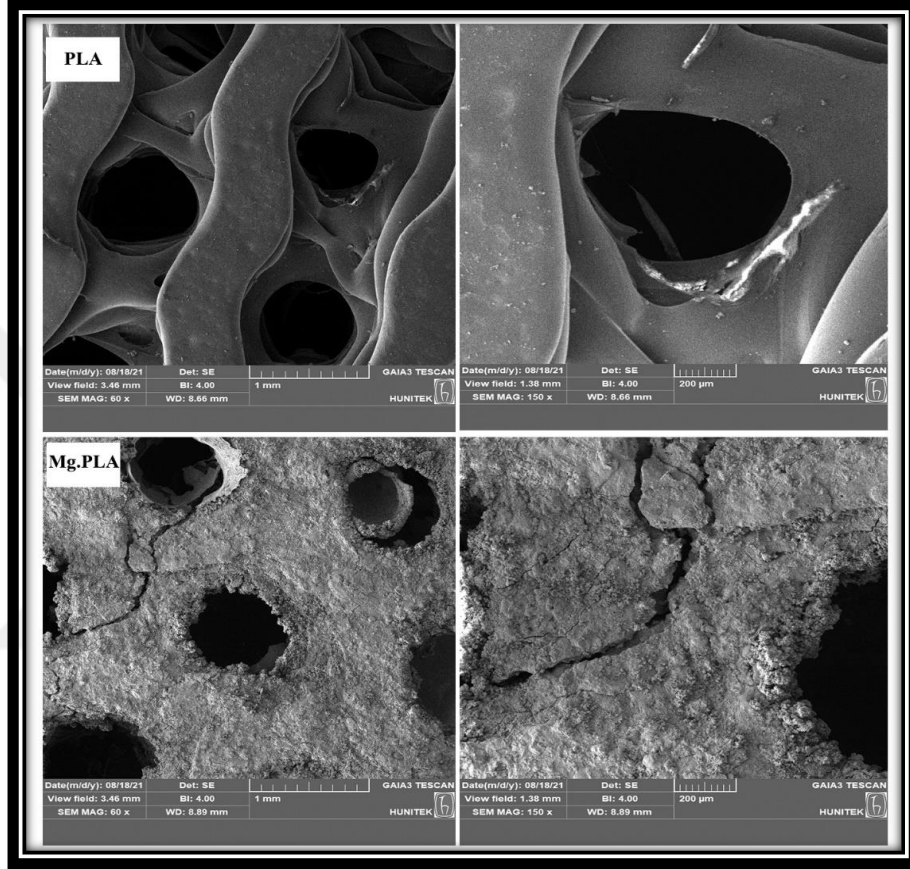


Şekil 5. 6. Düz PLA ve mg.PLA'nin degradasyon oranları

mg.PLA ile ilişkili bozunma çalışmaları, şekil 5.6.'in B grafiğinde temsil edilmektedir. mg.PLA bozunması, %0.86 değerinde 9. günden itibaren gözlemlenmiştir. İkinci düşüş %0.49 ile 24. günde ve üçüncü düşüş %3.95 ile 49. günde tespit edilmiştir. 61. günden itibaren %12,22 oranında daha yüksek bir bozunma oranı gözlemlenmiştir. Ayrıca enzimatik degradasyona uğramayan mg.PLA grubu %5,57'lik bir kayıp göstermiştir.

Literatürde de buna benzer çalışmalara rastlamak mümkündür. Bu tezde 30 gün sonunda daha fazla biyobozunma gözlenmesinin sebebinin 3B basım tekniği kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Enzimin, basılan PLA yapısındaki katmanlara etki edebildiği düşünülmüştür. Hidrolitik biyobozunma çalışması PLAVE mg.PLA örneklerinde test edilmiş olup 3 ay süren bu değerlendirme aşamasında pla yapılarında bir kütle kaybına rastlanmamıştır.

3 ay süren enzimatik biyobozunma çalışmaları sonundaki örneklerin yüzey morfolojilerindeki değişim SEM ile incelenmiştir. Şekil 5.7.'de enzimatik biyobozunma çalışmaları sonundaki örnek yüzeylerinden alınan SEM görüntüleri sunulmuştur.



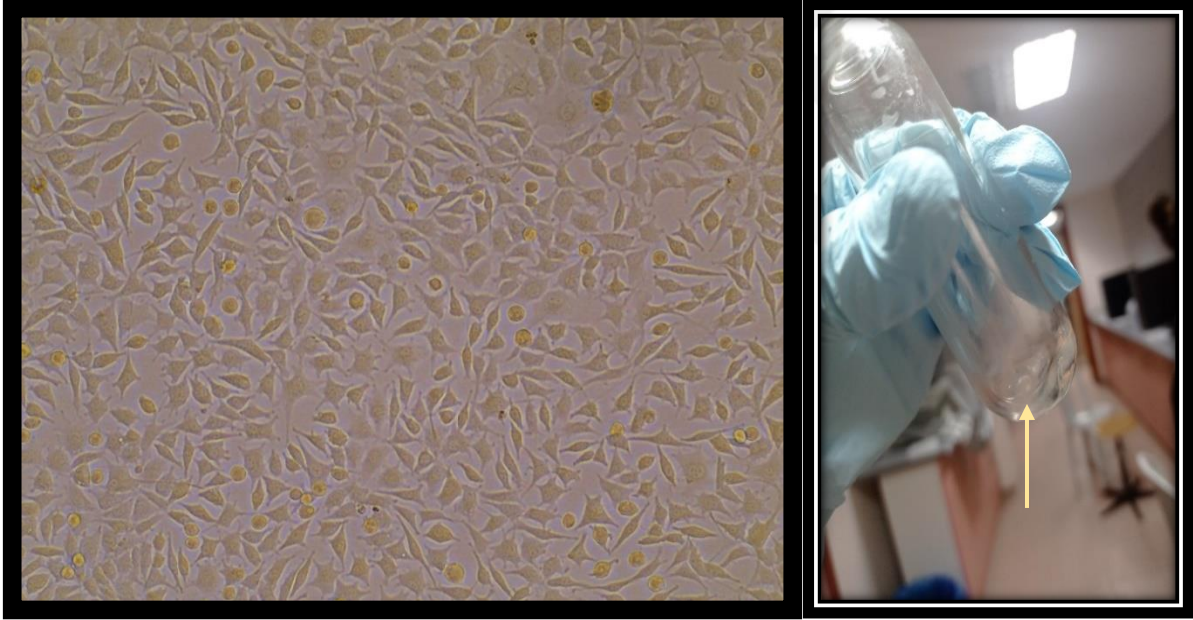
Şekil 5. 7. Biyobozulmadan sonra PLA ve mg.PLA'nın SEM görüntüleri

PLA'nın yüzeyi, bozunmadan sonra, bir miktar kırılma dışında kayda değer bir deformasyon göstermemiştir. Bu, yukarıdaki kütle kaybı sonuçlarıyla uyumludur. Bununla birlikte, mg.PLA'nın yüzey morfolojisi, yüksek bozulma oranını doğrulayan dikkate değer kırıklarla genel bir deformasyon göstermiştir. Mg.PLA, saf PLA ile karşılaştırıldığında yüzey pürüzlülüğü sergilemiştir ve bu kompozitlerin yüzeyinde bazı çıkıntılara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu, manyetik nanopartiküllerin PLA'da mevcut olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, bozunmadan sonra değiştirilmiş PLA'nın değişen formunu gösteren, ham formda veya hidroksiapatit, grafen oksit gibi kompozitler ve nanopartiküller ile modifiye edilmiş PLA çalışmalarında bulunmuştur (104).

Sonuçlar, polilaktik asitin biyolojik olarak parçalanabilen bir alifatik polyester olduğ. PLA, biyobozunulabilen bir yapı olduğ halde, bu tezdeki PLAnin zayıf bozunması 3B basıma ait PLA filamentlerin yüksek moleküler ağırlığından kaynaklandığında düşünülmektedir ve mg.PLA'nın düz PLA'dan daha iyi bir bozunma oranına sahip olduğunu göstermektedir.

5.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE EKSOZOM İZOLASYONU

Hücreler, daha önce belirtildiği gibi ek eksozom izolasyonu için 2 hafta boyunca kültürlenmiştir. %2 serum ile Saos-2 hücre morfolojisi aşağıda şekil 5.8.'de belirtilmiştir. Bağlı bolluğa ulaştıktan sonra atık vasatı toplandı ve eksozom izolasyonu yapıldı. Şekil 5.8., eksozomların peletini temsil etmektedir.



Şekil 5. 8. Bağlı bolluğa ulaşan Saos-2 hücreleri ve eksozomların peleti

5.6. BCA TESTİ İLE PROTEİN MİKTARININ TAYİNİ

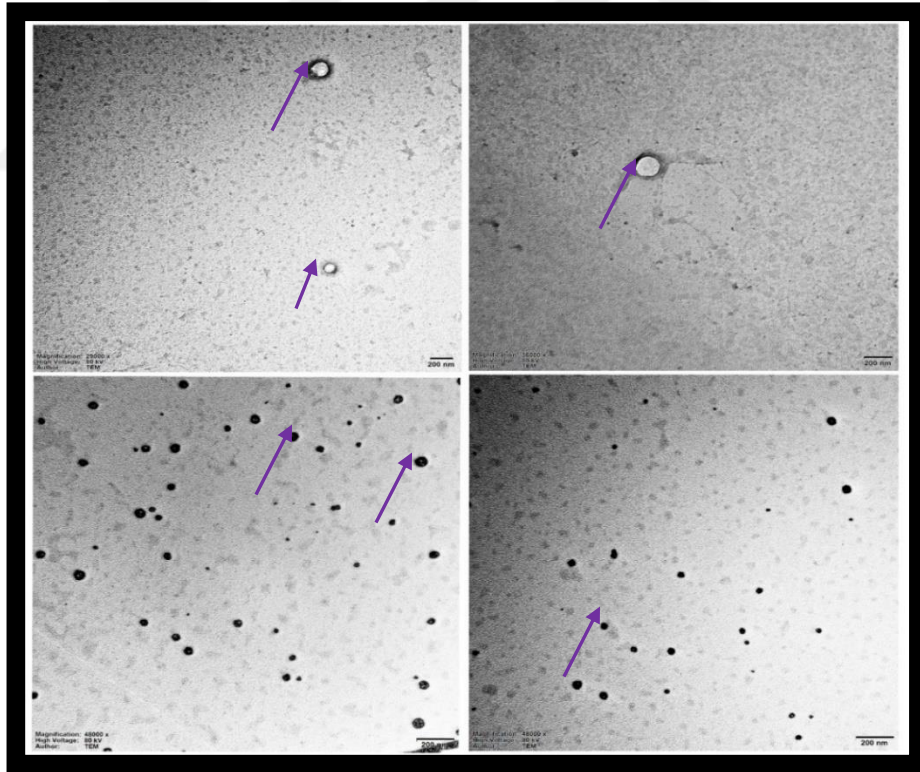
Eksozomdaki protein miktarını ölçmek için BCA testi yapıldı. BCA protein testi, bir numunedeki toplam protein miktarını belirlemek için kullanılır. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin alkali bir çözeltide (biüre reaksiyonu) Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgemesi ve bisinkoninik asit ile mor bir renk oluşumuna yol açmasıdır.

Uygulanan kit Protokolünden sonra, 2804.62µg/ml'lik bir karşılaştırma elde etmek için standart formülüne göre protein konsantrasyonu hesaplandı (Ekler kısmında gösterilmektedir). Osteojenik farklılaşma çalışmaları için örnek başına 50 µg 'lik bir konsantrasyon uygulandı .

5.7. TEM İLE EKSOZOMLARIN TESPİTİ

Optik yöntemlerde, 300 nm'den küçük parçacıklar görünmez olduğundan, morfolojilerini karakterize etmek için elektron mikroskobu (EM) gereklidir. TEM, eksozomların morfolojisini karakterize etmek için standart bir araç olarak kabul edilmektedir.

TEM görüntüleri, eksozomlarda karakteristik bir merkezi çöküntü göstermiştir. TEM görselleştirmesi, gridin karbon kaplı tarafında izole edilmiş hücre dışı veziküllerin sabitlenmesinden sonra daha önce tarif edildiği gibi yapılmıştır.



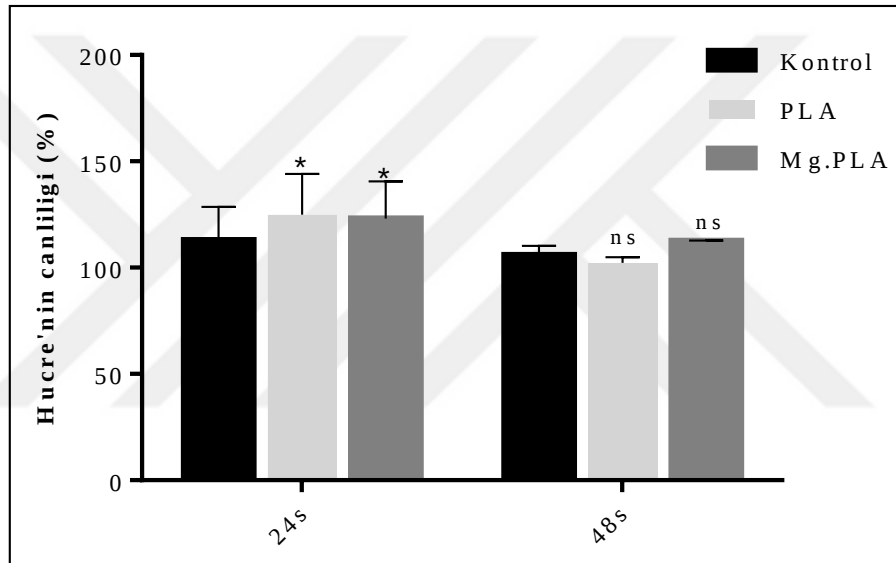
Şekil 5. 9. TEM mikroskobu ile eksozomların tespiti

Resim iki katmanlı ve 50-250nm boyutunda olan vezikül yapılarını göstermektedir. Aslında, eksozomlar, morfolojileri ve boyut dağılımlarına göre ayırt edilebilen, hücreler tarafından

salınan bir dizi farklı mikro ve nano ölçekli vezikülden biridir. Ve burada, TEM sonucu bu özellikleri onaylamaktadır.

5.8. SİTOTOKSİTİTE TEST SONUÇLARI

hAdMSC hücre hattı, sitotoksiste testi çalışmasında kullanılmıştır. 24 ve 48 saat süren bu testte kontrol grubu da dahil olmak üzere 3 farklı tip grup kullanılmıştır. Bu testin verileri şekilde sunulmuştur.



Şekil 5. 10. Malzemelerin hücre canlılığına etkisinin 24. ve 48. saatte incelenmesi

Hücreler ve doku iskelesi arasındaki temas, herhangi bir sitotoksik etki veya hücre ölümü göstermemiştir. Buna karşılık, kontrole kıyasla PLA ve mg.PLA'nın varlığında hücre proliferasyonunun önemli ölçüde indüklendiği gösterilmiştir. Ancak 48 saat sonra proliferasyonun sabit olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kontrol ve tedavi edilen grup arasındaki karşılaştırma anlamlı değildir. Bu sonuçlar, basılı iskelelerin biyouyumluluğunu doğrulamaktadır.

5.9. HÜCRELERDE KALSİYUM BİRKİMİNİ DEĞERLENDİRMESİ SONUÇLARI

Tüm numunelerde Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikintileri ve hücre dışı matris (ECM) mineralizasyonu 14 gün boyunca değerlendirildi. Veriler, bir osteojenik indüksiyon ortamında 14 günlük kültürden sonra spektrometrik analiz kullanılarak nicelendirilmiştir. hAdMSC'leri (n = 3) osteojenik indüksiyon ortamında büyütüldüğünde, osteojenik soyda farklılaştılar ve mineralizasyon gösterdiler. Bu şekil (5.11.), alizarin kırmızı temasından sonra hAdMSC ile kültürlenmiş PLA ve mg.PLA'nın morfolojik yapısını temsil eder. Diğer taraftan, Hücresiz ortamda ve yıkamadan sonraki görüntüyü, hücre varlığında karşıladığımızda önemli bir ölçüde fark göstermektedir.

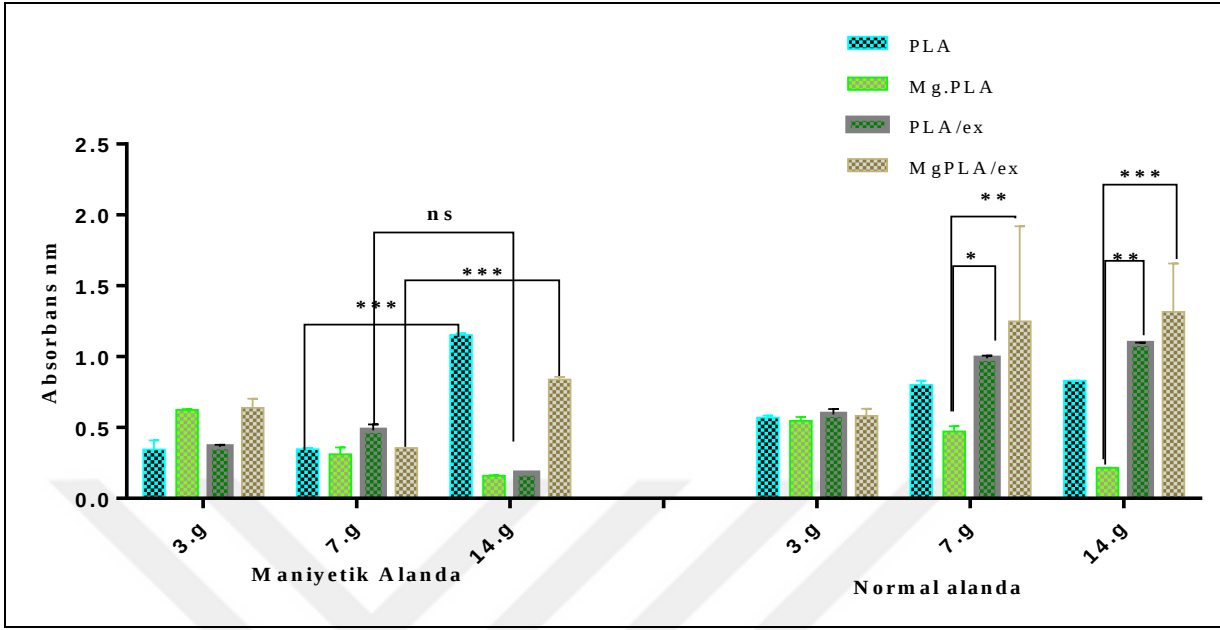


Şekil 5. 11. Alizarin kırmızısı kalitatif test sonucu

14 gün boyunca hücreler tarafından kalsiyum birikiminin sonucu ve mineralize kemik nodüllerinin oluşumu kantitatif bir şekilde ölçüldü aşağıdaki şekil 5.12.'de sunulmuştur.

Manyetik olmayan alanda 14 günlük kalsifikasyon 3. günden 14. güne kadar hafif artmıştı. Eksozom yüklü PLA ise 3. günden 14. güne önemli bir artış gözlemlenmiştir. Eksozom yüklü mg.PLA grubu, istatistiksel olarak oldukça önemli artışı nedeniyle en umut verici sonuçları göstermiştir (p <0.01). Bu, kalsifikasyonun eksozom ve manyetik PLA varlığından etkilendiğini göstermiştir.

Literatür araştırmalarında PLA mineralizasyonundan sonra benzer sonuçları görebilmektedir (105), ancak sonuçlarımız eksozomların, kalsiyum biriktirme indüksiyonunda rolünü de kanıtlayabilir.



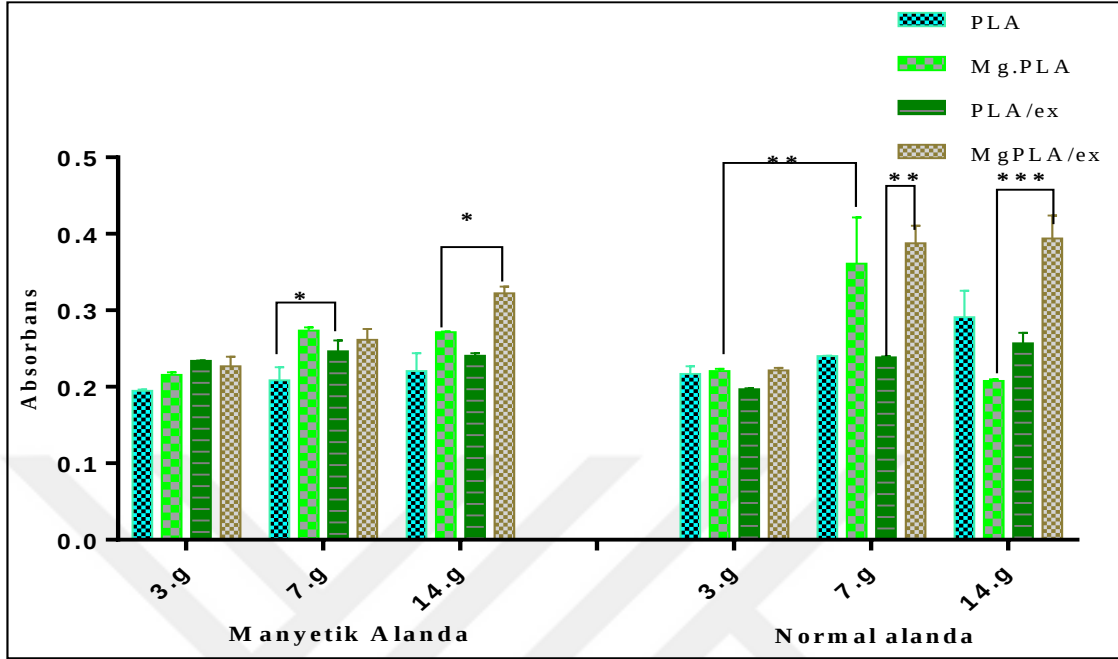
Şekil 5. 12. Doku iskelerinin Alizarin Kırmızısı kantitatif test sonuçları

Aynı şekilde manyetik alanda da kalsifikasyondaki artış en çok tek başına PLA'da gözlemlendi ve bu oldukça önemliydi. 7. günden 14. güne geçiş, eksozomlarla tedavi edilen mg.PLA grubunda kalsifikasyonda oldukça önemli bir artış ile işaretlenmiştir. Ancak PLA/ex grubundaki varyasyon, 7. günden 14. güne anlamlı olmayan bir düşüş göstermiştir. Bu azalma, farklılaşma sırasında mezenkimal hücreler tarafından belirli bir düzeyde kalsiyum üretiminin kesilmesi ile açıklanabilir. Bu sonuçlar, poliüretan/PLA süngerleri ile demir oksit varlığında umut verici bir mineralizasyon gösteren Marycz ve arkadaşlarının (2019) çalışmasına uygundur (106).

5.10. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ

Osteoblastlar, kemik oluşumundan sorumlu ana hücrelerdir. Bu hücreler, tip I kollajen, osteopontin, osteokalsin ve alkalen fosfataz gibi hücre dışı matris proteinlerini salgılar.

Alkalen fosfataz aktivitesi, 14 gün boyunca doku iskelelerle temas halinde olan hAdMSC hücrelerinde ölçülmüştür. Aşağıdaki şekil, normal alandaki ve manyetik alandaki ALP aktivitesinin değişimini sunulmaktadır.



Şekil 5. 13. Hücre-Malzeme etkileşimde Alkalen fosfatazın aktivitesi

Manyetik olmayan alanda; ALP aktivitesi PLA grubunda 3. ve 14. gün arasında hafifçe yükseldi. mg.PLA grubunda, 14. günde azalırken 7. günde oldukça anlamlı bir yükselme göstermiştir. Öte yandan, ALP aktivitesi, 7. ve 14. günlerde eksozom ve PLA varlığında uyarıldı ve 14. günlerde mg.PLA ve eksozom varlığında oldukça anlamlıdır.

Manyetik alanda ise, özellikle 7. ve 14. günlerde, mg.PLA, PLA/ex ve mg.PLA/ex varlığında alkalen fosfataz aktivitesinde belirgin bir artış göstermiştir. Alkalen fosfataz aktivitesi, nanopartiküllerin hücresel aktivite için faydalı olduğunu göstermiştir.

5.11. HÜCRE PROLİFERASYONU

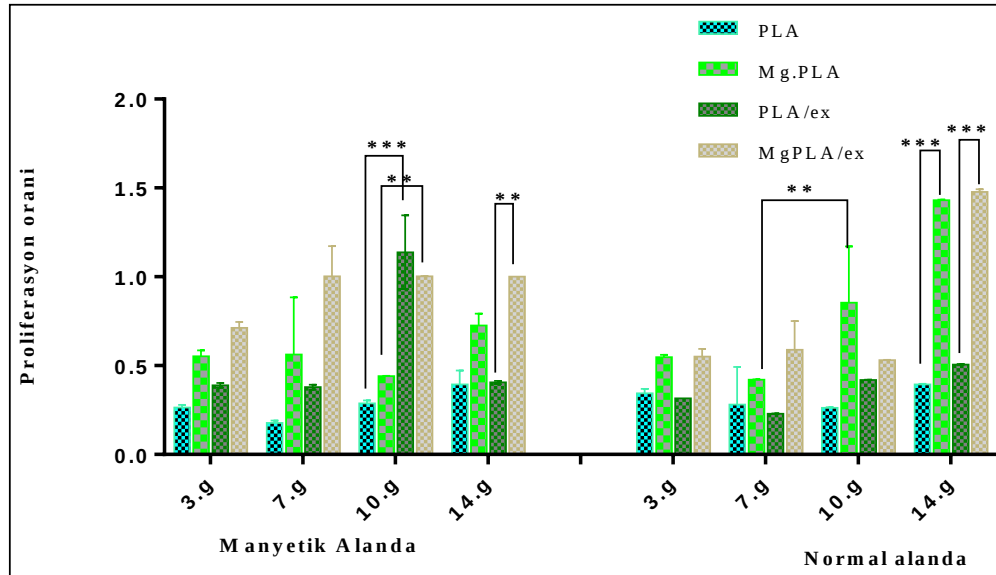
hAdMSC proliferasyonu, manyetik ve manyetik olmayan alanda farklı gruplarla Alamar mavisi testine göre 14 gün boyunca ölçüm yapılmıştır. Aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi çoğalma hızı 3, 7, 10 ve 14. günlerde ölçülmüştür.

Manyetik alan olmadan ve düz PLA varlığında proliferasyon sabitti ve anlamlı bir değişiklik kaydedilmemiştir, ancak mg.PLA varlığında poliferasyon 3. günden 14. güne kadar oldukça

anlamli sonuç vermiştir.($p<0.001$). 10. günden 14. güne kadar anlamli olduğu görölmüştür ($p<0.01$).

PLA ile eksozomun varlığı, hücre proliferasyonunu indüklemekle birlikte bunun anlamli bir oranda olmadığı görölmüştür. Ancak mg.PLA ile eksozomun varlığı, 14. günde yaklaşık %60 artan hücre proliferasyonu üzerinde oldukça etkiliydi, bu da eksozom ve mg.PLA etkileşiminin bu aktiviteyi arttırdığını düşündürdü.

Manyetik alanda da benzer sonuçlardan söz edilmektedir. PLA ve mg.PLA varlığında 14 gün boyunca gözlemlendi. Eksozomun varlığında düz PLA, 3. ve 7. günlerinde hücre proliferasyonunda oldukça anlamli bir artış ($p<0.001$) göstermiştir. Ancak bu çoğalma 14. gün içinde sınırlı kalmıştır. Bu durumda hücreler normal seviyeyi aştığı ve hücrelerin çoğalmak yüksek bir seviyeye ulaştığını düşünölmektedir. mg.PLA ve eksozom varlığında proliferasyonun sonuçları da 3. günden 14 güne kadar anlamli bir proliferasyon oranı ($p<0.01$) göstererek umut vericiydi. Ayrıca, hücre proliferasyonunun uyarılmasında manyetik alan ve mg.PLA varlığında eksozomun rolünü doğrulamaktadır.

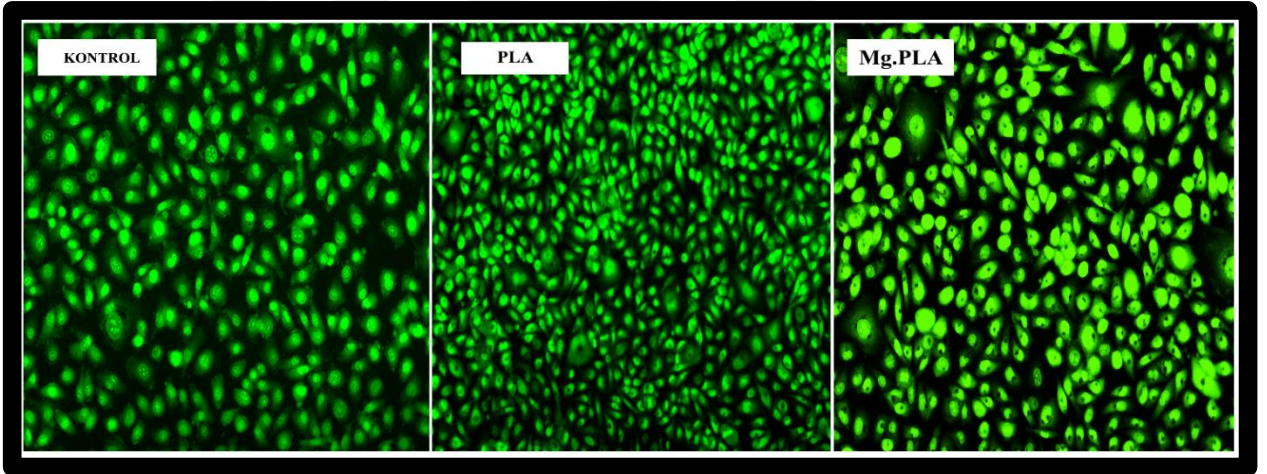


şekil 5. 14. Hücrelerin malzemeler üzerindeki proliferasyonun değerlendirilmesi

Diğer taraftan, mg.PLA'nın tek başına veya eksozom varlığında gözlenen etkisi, manyetizmanın hücre proliferasyonunu artıran kademeli sinyal transdüksiyonlarını tetikleyen hücresel membran potansiyelleri üzerindeki etkisiyle açıklanabilir (107).

5.12. HÜCRE-MALZEME ETKİLİŞİMİ

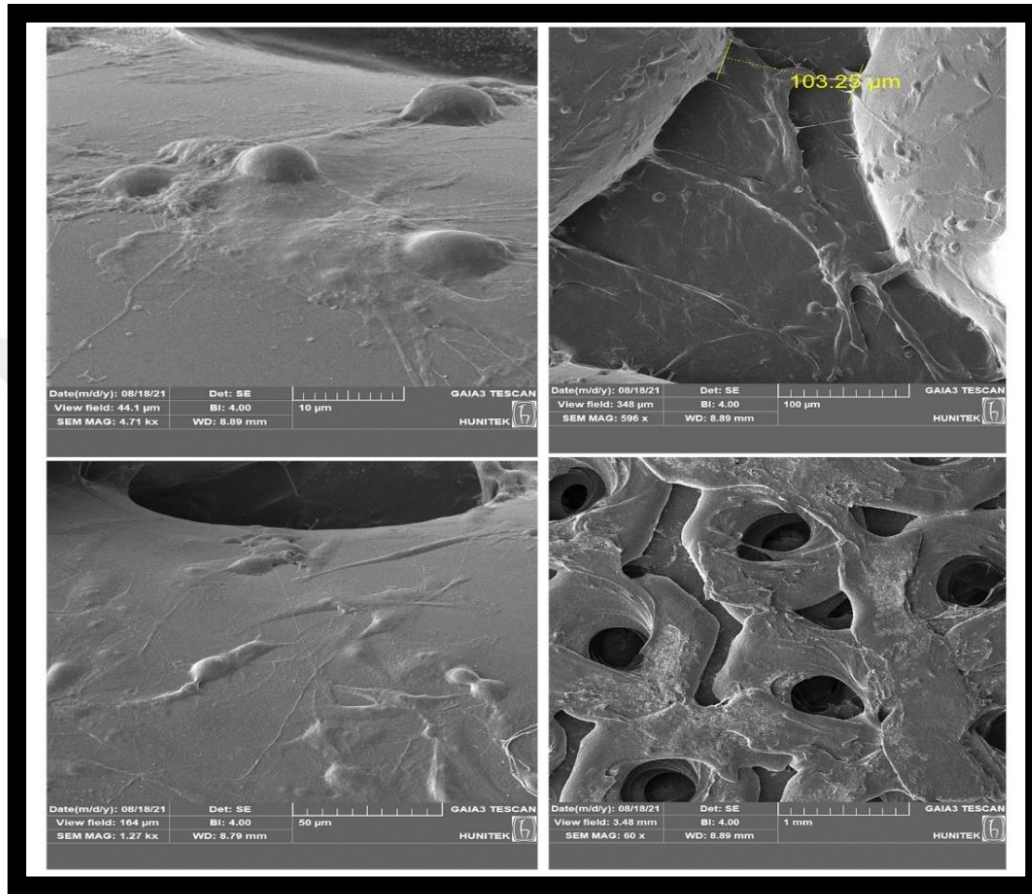
Akridin turuncusu tüm hücrelere nüfuz eder ve çekirdeklerin yeşil görünmesini sağlar. Boyama, kontrol, düz PLA ve mg.PLA grubuna uygulandı. Aşağıdaki şekil 5.15.te, PLA veya mg.PLA ile 7 gün temastan sonra hücrelerin morfolojisini temsil etmektedir. Yedi günlük kültürden sonra, hücrelerde floresan dikkat çekiciydi. PLA ve mg.PLA ile uygulanan grup, herhangi bir toksisite veya hücre ölümü olmaksızın kontrolden daha fazla izdiham ve çoğalma göstermektedir. Hücreler, ince, uzun iğ şeklinde hücreler göstermektedir.



Şekil 5. 15. Hücre-Malzeme etkileşimde Akridin Boyaması görüntüleri

Ekilmiş yapı iskelesi daha sonra 3 gün boyunca kültürlendi ve SEM kullanılarak incelendi. İskele, dehidre edildi ve önceki bölümde anlatıldığı gibi altınla kaplandı. Şekil 5.16.'teki SEM görüntüleri, altın kaplamadan sonra PLA iskele malzemesinin hücre tutunması için iyi bir yüzey sağlayabildiğini göstermektedir. PLA ve mg.PLA'nın yüzeyine bağlı hücreler çoğalmaya devam etti ve 3 gün sonra iyi bir yüzey kaplaması ile iskelenin farklı katmanlarına genişledi. hAdMSC hücresi ekildikten sonraki SEM görüntüleri farklı büyütme ölçeklerinde verilmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde hücrelerin PLA yüzeyine tutunduğu elipsoid

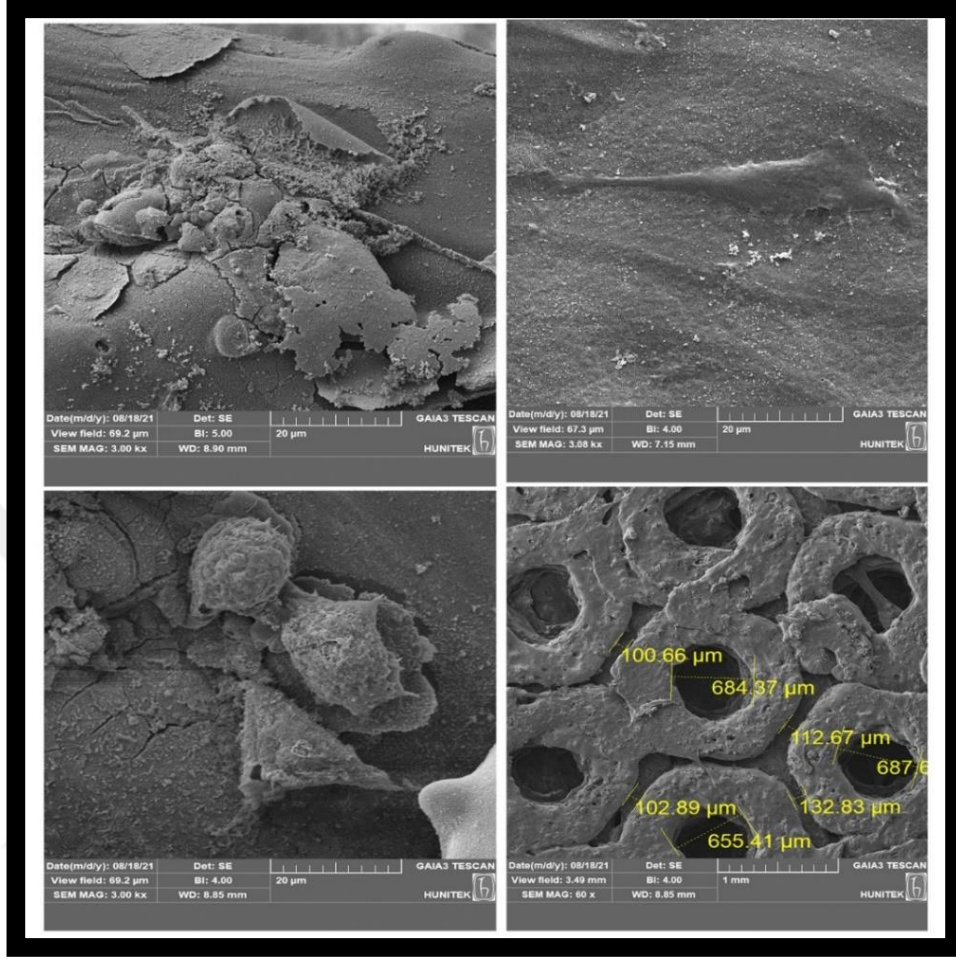
morfolojiye sahip, sitoplazmik uzantıları uzamış ve genişlemiş bir morfolojiye evrildikleri görülmektedir.



Şekil 5. 16. PLA 3. gün hücre morfolojisi SEM görüntüsü

Ayrıca, basılan PLA ve mg.PLA'daki boşlukta bir miktar uzama tespit edilebilmektedir ve bunun hücre ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

5.17. şekilden bakıldığında, hücreler birleştirilmiş nanopartiküller ile mg.PLA yüzeyinde de oldukça iyi bir büyüme göstermektedir. Her iki sonuç da PLA örneğinin hAdMSC için yüksek canlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Bu, nanopartiküllerin yapışma bölgeleri benzeri etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca, PLA yüzeyindeki ve FDM metodundan kaynaklanan pürüzlülüğü, hücre tutunmasını olumlu şekilde etkilediği düşünülmektedir.



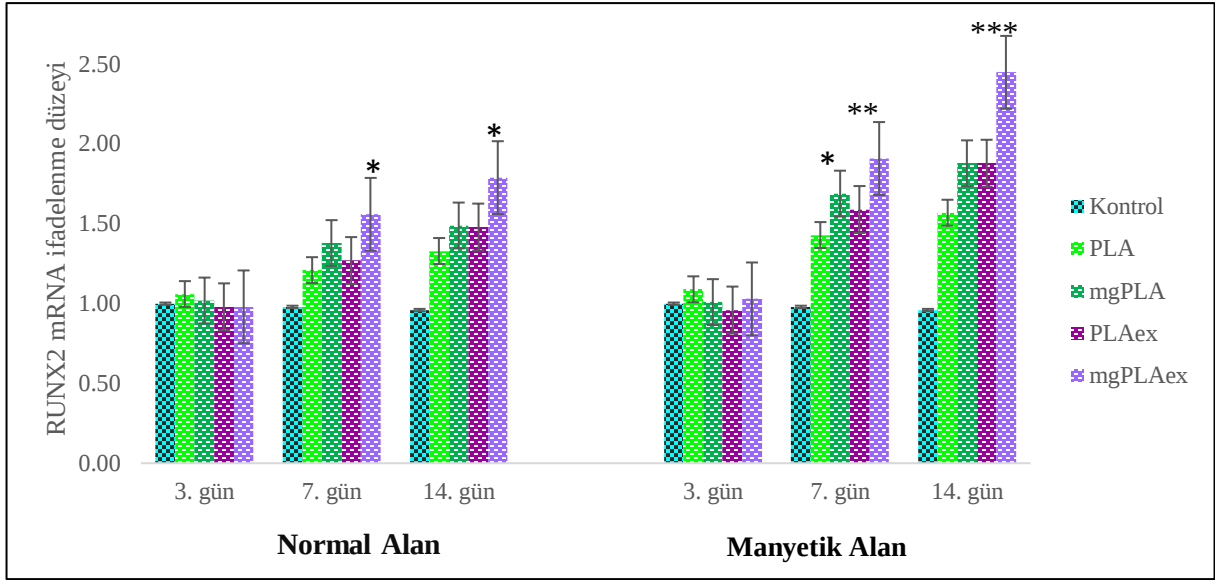
Şekil 5. 17. mg PLA 3. gün hücre morfolojisi SEM görüntüsü

5.13. GEN İFADESİNİN ANALİZİ

Bu çalışma sırasında hücre farklılaşma tespitinin kilit faktörünü temsil eden gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. Bu nedenle mezenkimal hücrenin osteoblasta farklılaşmasında dört gen anahtarının ekspresyonu araştırılmıştır. Buna yönelik, 14 gün boyunca farklı koşullarda kültürlenmiş hücrelerden RNA özütlendi ve osteojenik belirteçlerin, esas olarak RUNX2, COL1A1, OSN ve OSP'nin ekspresyonunu değerlendirmek için qRT-PCR'ye tabi tutuldu.

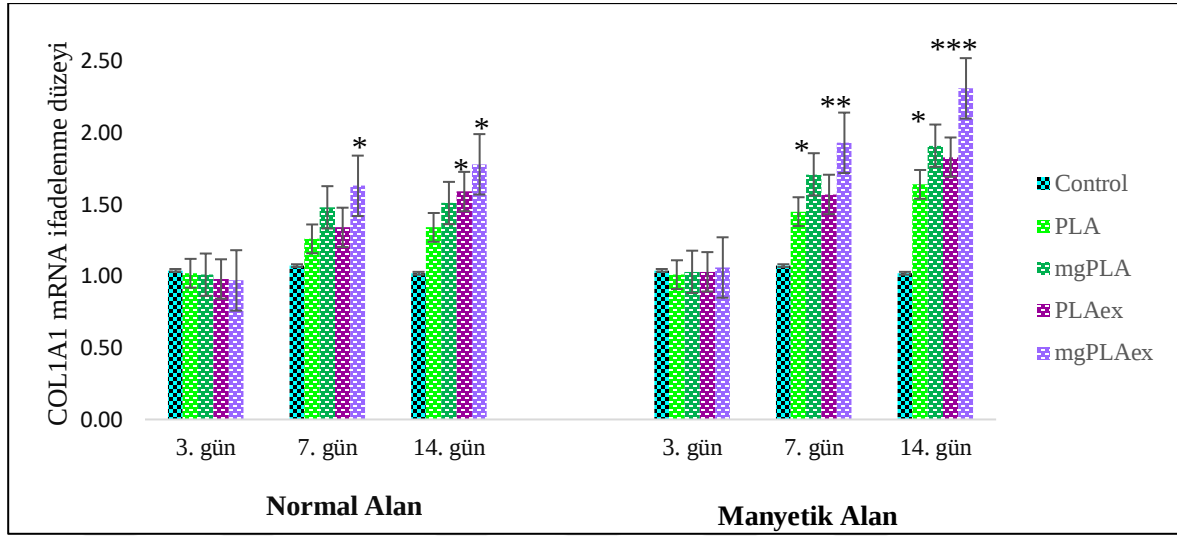
RUNX2, kemik oluşumunda merkezi bir role sahiptir ve osteoblast farklılaşması için gereklidir ve farklılaşmanın erken aşamasında ifade edilir. RUNX2 ifade seviyesi şekil 5.18.'te belirtilmiştir. Normal alanda 3. günde önemli bir ifadeden bahsedilmedi. Ancak bu ekspresyon özellikle mg.PLA/ex grubunda 7. ve 14. günde önemli ölçüde indüklenmiştir.

Diğer taraftan, manyetik alanda RUNX2 ekspresyonu yüksek oranda indüklenmiştir, mg.PLA'nın varlığı ile 7. günde ilk önemli artışı gözlemlenmektedir. Aynı şekilde yüksek derecede anlamlı artış mg.PLA/ex grubunda gözlenmektedir. 14. günde aynı sonuçlardan gözlemlendi ve RUNX2 ifadesinde mg.PLA/ex varlığında oldukça anlamlı bir artıştan görülmektedir.



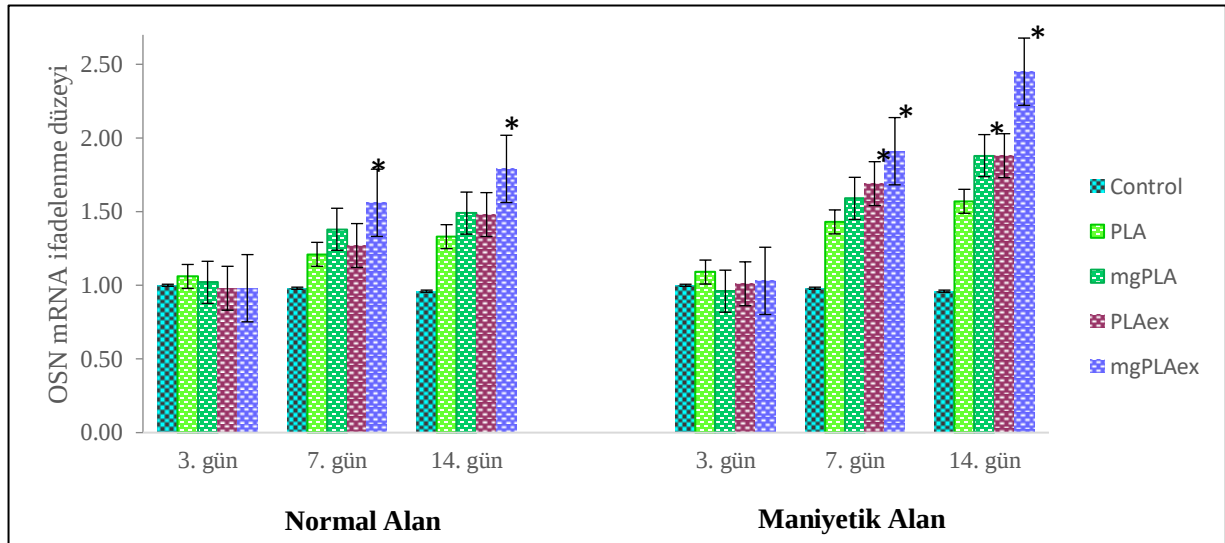
Şekil 5. 18. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda RUNX2 ifadeleme düzeyi

Figür 5.18.'de görüldüğü gibi, COL1A1'in ifadesi 14 gün boyunca değerlendirilmiştir, Normal alanda mg.PLA/ex varlığında 7. ve 14. günde COL1A1 ekspresyonu anlamlıydı. Diğer taraftan, manyetik alanda, COL1A1 ekspresyonu 7. günde özellikle mg.PLA ve mg.PLA/ex gruplarında anlamlı bir şekilde indüklendi. Öte yandan, mg.PLA/ex ile tedavi edilen grubunda 14. günde oldukça önemli bir indüksiyon gözlenmektedir, tek başına mg.+ ve PLA/ex grubunda önemli bir artış tespit edilmiştir ve eksozomun manyetik alanla bağlantılı etkisini kanıtlamaktadır.



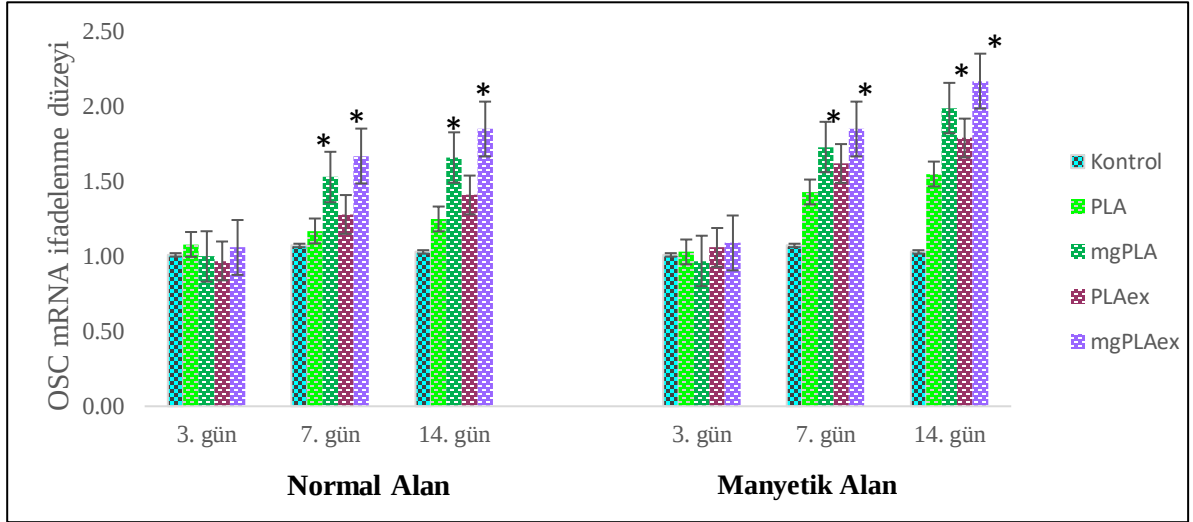
Şekil 5. 19. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda COL1A1 ifadeleme düzeyi

Osteojenik farklılaşmanın diğer belirleyicileri üzerinde çalışıldı. Şekil 5.20.'de OSN ifadeleri 14 gün boyunca araştırıldı. Özellikle mg.PLA ve mg.PLA/ex grubunda 7. günde ekspresyon anlamlıydı. Ancak en yüksek artış 14. günde kaydedildi. Diğer taraftan manyetik varlığın PLA, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mg.PLA, PLA/ex ve mg.PLA/ex dahil tüm gruplarda anlamlı olan OSN ekspresyonunu, 7. günde ve 14. günde indüklediğini ve anlamlı olduğu görülmektedir.



Şekil 5. 20. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda OSN ifadeleme düzeyi

OSC ifadesi, osteojenik farklılaşmanın başka bir belirteçidir. Bu ifade, özellikle manyetik parçacıkların ve eksozomların mevcudiyeti ile 7. günde hafifçe arttırıldı ve 14. günde önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, tek başına PLA ile uygulanan grup, önemli bir değişiklikten söz konusu olmamıştır. Manyetik alanda, ekspresyon mg.PLA grubu ve PLA/ex grubunda ayrıca önemli bir oranda arttı ve mg.PLA/ex grubunda oldukça önemli bir şekilde 7. ve 14. günlerde yükselmiştir.



Şekil 5. 21. Manyetik ve Manyetik olmayan alanda OSC ifadeleme düzeyi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Kemik dokusu mühendisliği alanında, malzemelerin hücresel büyüme ve doku onarımı üzerindeki düzenleyici etkisi kritik bir konudur. Burada iskele, hücre ve biyoaktif arayüzü üç temel faktördür. 3D baskı, son zamanlarda kemik dokusu mühendisliği için özelleştirilmiş, uygulanabilir ve ekonomik olarak avantajlı yapı iskeleleri üretmek için çekici bir teknik olmuştur. İskele performansı, gözenek boyutu, gözenek hacmi ve mekanik gücü ile ilgilidir, ayrıca yüzey topografyası hücre davranışının önemli bir etkenidir. Topolojik boyut, nano ölçeğe ne kadar yaklaşırsa o kadar iyi bir etkiden bahsedilir. İskelet dokusu mühendisliğinde sıklıkla kullanılan emilebilir bir polimer olan PLA'nın manyetik parçacıklarla kombinasyonu yeterli hücresel göç dışında mekanik stabilite sunabilir ve in vivo implantasyondan sonra besin sağlayabilir.

Bu çalışmada, eksozom içeren manyetik doku iskelelerinde hem eksozomdan gelebilecek hem de mekanik iletim yolu ile ortaya çıkabilecek ikili etkinin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik yönlü farklılaşmasına etkisinin araştırılmasıdır. Bu tezde, manyetik parçacıkların etkisi ve eksozomun osteojenik farklılaşmadan bağımsız olarak etkisidir. BCA testi ve TEM mikroskobu ile eksozomların morfolojisini ve varlığını değerlendirdik. Çalışmanın ikinci kısmında, osteojenik farklılaşmayı, ALP aktivitesi, Alizarin kırmızı boyama, MTT ve proliferasyon oranı ile değerlendirdik. Son olarak, osteojenik farklılaşma ile ilgili geni değerlendirmek için Runx2, Col1A1, OSN ve OSC'nin ifadesini saptandık.

Bu çalışmada, SEM görüntüsü PLA'nın pürüzsüz ve düzgün yüzey morfolojisi ve mg.PLA'da pürüzlü ve granüllü bir yüzey gösterdi. Bu pürüzlülük, hücre aktivitesi ve yapışma için tercih edilir. Hazırlanan iskele üzerine Hücre ekimi sonrası SEM görüntüleme sonuçları 3 günde iyi bir büyüme, hücre göçü ve tutunma göstermiştir. Bu aynı zamanda, düz PLA'ya göre mg.PLA'nın büyüme ve hayatta kalmaya etkisi, hücre canlılığını gösteren MTT testi ile de doğrulandı. Bu, literatür çalışmalarında onaylanan nanopartiküllerin adezyon bölgesi ile ilgili benzeri etkisine bağlı düşünülmektedir (108).

Basılı PLA ve mg.PLA'nın atomik ve moleküler yapılarını içeren kristalleri doğrulamak için XRD analizi yapıldı. Burada, sonuçlar PLA'nın amorf yapısını ve kırınım pikleri tarafından onaylanan mg.PLA'da manyetik parçacıkların varlığını doğrulamaktadır (96). Ayrıca FTIR spektroskopisi, basılı PLA ve mg.PLA'nın kimyasal bileşiminin, XRD ve SEM analizine uygun olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, osteojenik farklılaşma sırasında farklı hücre aktivitesini görselleştirmek için *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, Alizarin Red S kullanılarak *in vitro* kalsiyum birikimi ve Ecm mineralizasyonunun analizi yapıldı. Mineralizasyon genellikle PLA, mg.PLA/ex dahil tüm gruplarda hem normal hem de manyetik alanlarda indüklenmektedir. Düz PLA ile karşılaştırıldığında eksozom ve mg.PLA varlığında kültürlenmiş hAdMSC'lerin daha iyi osteojenik performans göstermiştir. Bu sonuçlar, yüksek başarıların, manyetik parçacıklarla birleştirilmiş eksozom uyarısından kaynaklandığını gösterebilmektedir.

Aslında hücrel aktivite hücre zarının içindeki ve dışındaki iyon konsantrasyonları arasındaki farkla korunur. Bununla birlikte, membran aktivitesi ve hücrelerin fizyolojik fonksiyonlarının kontrolünü belirlemek için kritik bir faktör olmaya devam etmektedir. Bu nedenle hücrel membran potansiyeli manyetik alandan etkilenebilmelidir. Sebebi, hareketli yükler bir manyeto statik alan altında Lorentz kuvvetine maruz kalır. Yukarıda bahsedildiği gibi, sıralı manyetik momentler, bazı iyonların, özellikle Ca^{2+} 'nın transmembran akışını daha fazla etkileyebilen ve lokalize bir manyetik alan verebilir (109). Ca^{2+} önemli bir fizyolojik transmitterdir ve Ca elementi aynı zamanda doğrudan kemik oluşumuna bağlıdır. Böylece manyetizma veya manyetik bileşenin varlığı osteoblastların büyümesini (hücrelerin canlılığı dahil) artırabilir. Bazen hücre alımı sırasında manyetik partiküller ve demir miktarının ayarlanabilmesi için manyetik davranış değişikliğine uğrar (110, 111). Bu fenomen bulunan manyetik miktarını ayarlamak için normal ve manyetik alan altında, mg.PLA grubunda 7. günden 14. güne kadar kalsiyum birikiminin azalmasını açıklayabilir.

hAdMSC'lerin farklılaşması Alkalen Fosfataz boyama ile ölçüldü. ALP osteoblasta farklılaşmanın yaygın bir göstergesidir ve kemik mineralizasyonunun ana düzenleyicisidir.

Doğal olarak oluşan bir mineralizasyon inhibitörü olan inorganik pirofosfatı hidrolize eder. Burada, ALP aktivitesi, manyetik alanda ve mg.PLA ve eksozom ile muamele edilen grupta, gün geçtikçe dikkate değer bir şekilde arttırıldı, Bu nedenle hAdMSC'lerin farklılaşmasını arttırma konusundaki daha güçlü yeteneklerini kanıtlamaktadır.

Hücre proliferasyonu 14 günlük kültürler sırasında geliştirilmiştir. Manyetik nanoparçacıkların büyümeyi artırıcı etkisi ve manyetizmanın hücrel membran potansiyelleri üzerindeki etkisiyle açıklanabilmektedir. Bu da çalışmamızda bahsedildiği gibi hücre çoğalmasını artıran çoğalma faktörlerini etkileyen kademeli sinyal iletimlerini tetikler (107). Manyetik parçacık ve eksozom varlığında çoğalma hızı indüklenmiştir. Diğer taraftan, eksozom varlığının, hücrel mekanizmayı ve hücre büyümesine yol açan transdüksiyon yollarını etkilemek için manyetik parçacıklarla birlikte etkilerini daha fazla teyit ettiği açıktır (112).

Sonuçlarımızın son kısmı, eksozomla ilişkili nanoparçacıkların varlığının hücrel farklılaşma için faydalı olduğunu göstermektedir. Bu, OSC, OSP, RUNX2 ve COL1A1 dahil olmak üzere hücrel farklılaşma ile ilgili bazı genlerin q-PCR ile doğrulandı. Osteokalsin ve osteopontin, osteoblasta doğru farklılaşmanın ve kemiğin mineralizasyonu göstergeleridir, RUNX2 ise osteojenik farklılaşma için yukarı akış genidir (112). Artan genlerin ifadesi, manyetizasyonun bu etkiyi daha da artırabildiği bulunmuştur, bu da manyetik etkinin çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Birçok çalışma, manyetik nanopartiküllerin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin osteoblastlara doğru farklılaşmasını destekleyebileceğini bildirmiştir (105, 113, 114).

Gözlenen iyileştirmelerin çoğu ve manyetik parçacıklarla bağlantılı olarak eksozom uyarısına bağlı görünmektedir. Burada osteogenez taahhüdü sırasında eksozomların ne kadar önemli bir rol oynadığını vurgulayarak osteojenik farklılaşma sürecinin düzenlenmesi ile ilişkili mekanizmalardan birinin ilgili eksozom aracılığıyla olduğu açıklanmaktadır. Bu senaryoya dayanarak hAdMSC'ler ve manyetik parçacıklarla zenginleştirilmiş 3B baskılı PLA gözenekli iskelelerin kombinasyonunun osteogenezi teşvik etmek için etkili bir araç olduğuna dair inançları artırmaktadır.

Bu, her iki grubun ortak etkinliği ile açıklanabilir. Aslında manyetik partiküllerle kombin edilmiş eksozomun hücre aktivitesini indükleyen bir faktör olduğu gösterilmiştir. Manyetik partiküllerinin endositozu başlatan perisellüler matriks ile etkileştiği gösterilmiştir. Endozomlar ve lizozomlar gibi farklı hücre içi veziküllerin hücre tarafından alınmabilmektedir. Bununla birlikte manyetik partikülleri açıkça endozomların içinde yoğun bir şekilde paketlenebilmekte ve sonunda endolizozomların asidik ortamında bozunabilmektedir (115).

Bu çalışma kanser hücrelerinden türetilen eksozomların güçlü bir osteojenik farklılaşma araçları olduğunu doğrulamaktadır. Manyetik parçacıkla ilişkili termoplastik polimer olan mg. PLA'nın eksozom ile ilişkisi, kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için iyi bir kombinasyon olarak değerlendirilebilir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışma, hAdMSC 'nin osteojenik farklılaşmasında kanser hücrelerinden türetilen eksozomla yüklü mg. PLA'nın rolünü araştırmayı hedeflemekteyiz. İlk olarak basılan PLA ve mg.PLA'nın yapısını XRD, FTIR ve SEM analizlerini kullanarak yapıları ve kimyasal kompozisyonu değerlendirdik. Sonuçlarımız PLA'nın yapısını ve kimyasal bileşimi vurgulayarak mg.PLA'da manyetik parçacığın varlığını doğrulamaktadır. Kalsifikasyon oranı, alkalen fosfataz aktivitesi, hücre proliferasyonu ve gen ekspresyonu değerlendirdik. Genel olarak, manyetik parçacıkların Ca^{2+} birikimini, hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eden hücre aktivite kontrolü için iyi bir uyarıcı olduğu gösterilmiştir. Hücreler tarafından salgılanan bir nanovezikül olarak eksozomun tek başına mg.PLA veya PLA'nın aktivitesini geliştirdiğinden bahsedildi. Bu düşüncelerin ışığında, eksozomlarla zenginleştirilmiş yapı iskelesinden oluşan hücresiz bir sistem, elde eden doku iskeleleri işlevselleştirmek için eksozomların kullanımını, iskeletlerin/ doku iskelelerin immünojenik etki olmadan osteojenik yeteneğini geliştirmek için önerdik. Bu çalışmanın ortaya koyduğu ana hatlar üzerine kurgulanacak hücre farklılaşması ve aktivitesi üzerinde etki ettiği mekanizmanın aydınlatılması çalışması, kemik yenilenme mekanizması ile ilgili bazı spesifik miRNA'ların farklılaşma üzerindeki rolünü belirlemeyi yönelik ileri ek çalışmalar ile, manyetik parçacıkların eksozom

ifadesi üzerindeki rollerinin ortaya koyulmasına yönelik çalışmalar mekanik iletim ve kemik yenilenmesi arasındaki ilişkiye yeni bir yol kazandıracaktır.



KAYNAKLAR

1. Langer R. Tissue Engineering: A New Field and Its Challenges. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(7):840-1. doi: 10.1023/A:1012131329148.
2. Langer; R, Vacanti; JP. Tissue Engineering. *Science*. 1993;260:920-6. PubMed Central PMCID: PMC8493529.
3. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.
4. Marew T, Birhanu G. Three dimensional printed nanostructure biomaterials for bone tissue engineering. *Regenerative Therapy*. 2021;18:102-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.05.001>.
5. Wang L, Yang P. Chapter 8 - Nanostructured scaffold and its bioactive potentials in bone tissue engineering. In: Grumezescu AM, editor. *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering*: William Andrew Publishing; 2016. p. 241-70.
6. Tan Z, Parisi C, Di Silvio L, Dini D, Forte AE. Cryogenic 3D Printing of Super Soft Hydrogels. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16293. doi: 10.1038/s41598-017-16668-9.
7. Lopes MS, Jardini AL, Filho RM. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*. 2012;42:1402-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.534>.
8. Goranov V, Shelyakova T, De Santis R, Haranava Y, Makhaniok A, Gloria A, et al. 3D Patterning of cells in Magnetic Scaffolds for Tissue Engineering. *Sci Rep*. 2020;10(1):2289. doi: 10.1038/s41598-020-58738-5.
9. Li J, Li Z, Chu D, Jin L, Zhang X. Fabrication and Biocompatibility of Core-Shell Structured Magnetic Fibrous Scaffold. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2019;15(3):500-6. Epub 2019/06/06. doi: 10.1166/jbn.2019.2701. PubMed PMID: 31165695.
10. Abd Elmageed ZY, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, et al. Neoplastic Reprogramming of Patient-Derived Adipose Stem Cells by Prostate Cancer Cell-Associated Exosomes. 2014;32(4):983-97. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.1619>.

11. Roura S, Vives J. Extracellular vesicles: Squeezing every drop of regenerative potential of umbilical cord blood. *Metabolism: clinical and experimental*. 2019;95:102-4. Epub 2019/03/05. doi: 10.1016/j.metabol.2019.02.006. PubMed PMID: 30831143.
12. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):4142-57. Epub 2014/03/13. doi: 10.3390/ijms15034142. PubMed PMID: 24608926; PubMed Central PMCID: PMC3975389.
13. Shahabipour F, Banach M, Sahebkar A. Exosomes as nanocarriers for siRNA delivery: paradigms and challenges. *Archives of medical science : AMS*. 2016;12(6):1324-6. Epub 2016/12/03. doi: 10.5114/aoms.2016.62911. PubMed PMID: 27904525; PubMed Central PMCID: PMC3975389.
14. Pensak MJ, Lieberman JR. Gene therapy for bone regeneration. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(19):3466-73. Epub 2013/02/26. doi: 10.2174/1381612811319190012. PubMed PMID: 23432674.
15. Ballyns JJ, Bonassar LJ. Image-guided tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8a):1428-36. Epub 2009/07/09. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00836.x. PubMed PMID: 19583811; PubMed Central PMCID: PMC2935622.
16. Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PY, Duan B, Malone E, et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*. 2012;4(3):035005. Epub 2012/08/24. doi: 10.1088/1758-5082/4/3/035005. PubMed PMID: 22914604; PubMed Central PMCID: PMC3676672.
17. Jeffrey J. Ballyns DLC, Evan Malone, Suzanne A. Maher, Hollis G. Potter, Timothy Wright, Hod Lipson, and Lawrence J. Bonassar. An Optical Method for Evaluation of Geometric Fidelity for Anatomically Shaped Tissue-Engineered Constructs. 2010;16(4):693-703. doi: 10.1089/ten.tec.2009.0441. PubMed PMID: 19788346.
18. Reddy BV, Reddy NV, Ghosh A. Fused deposition modelling using direct extrusion. *Virtual and Physical Prototyping*. 2007;2(1):51-60. doi: 10.1080/17452750701336486.
19. Chen H, Yang X, Chen L, Wang Y, Sun Y. Application of FDM three-dimensional printing technology in the digital manufacture of custom edentulous mandible trays. *Scientific Reports*. 2016;6(1):19207. doi: 10.1038/srep19207.

20. Pennington RC, Hoekstra NL, Newcomer JL. Significant factors in the dimensional accuracy of fused deposition modelling. 2005;219(1):89-92. doi: 10.1243/095440805x6964.
21. Song Z, Xiao H, Zhao Y. Hydrophobic-modified nano-cellulose fiber/PLA biodegradable composites for lowering water vapor transmission rate (WVTR) of paper. Carbohydrate Polymers. 2014;111:442-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.049>.
22. Tanase CE, Spiridon I. PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications. Materials Science and Engineering: C. 2014;40:242-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.054>.
23. Liu C, Chan KW, Shen J, Wong HM, Kwok Yeung KW, Tjong SC. Melt-compounded polylactic acid composite hybrids with hydroxyapatite nanorods and silver nanoparticles: biodegradation, antibacterial ability, bioactivity and cytotoxicity. RSC Advances. 2015;5(88):72288-99. doi: 10.1039/C5RA14155A.
24. Masaeli R, Zandsalimi K, Rasoulianboroujeni M, Tayebi L. Challenges in Three-Dimensional Printing of Bone Substitutes. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2019;25(5):387-97. doi: 10.1089/ten.teb.2018.0381. PubMed PMID: 31144596.
25. Fu Y, Liu L, Cheng R, Cui W. ECM Decorated Electrospun Nanofiber for Improving Bone Tissue Regeneration. Polymers (Basel). 2018;10(3):272. doi: 10.3390/polym10030272. PubMed PMID: 30966307.
26. Kim HW, Lee HH, Knowles JC. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. Journal of biomedical materials research Part A. 2006;79(3):643-9. Epub 2006/07/11. doi: 10.1002/jbm.a.30866. PubMed PMID: 16826596.
27. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. Journal of Biological Engineering. 2017;11(1):31. doi: 10.1186/s13036-017-0074-3.
28. Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, Laurencin CT. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. Advanced drug delivery reviews. 2016;107:247-76. Epub 2016/04/25. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.015. PubMed PMID: 27125191.

29. Zhang B, Wang L, Song P, Pei X, Sun H, Wu L, et al. 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Materials & Design*. 2021;201:109490. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109490>.
30. Li X, Wei Z, Lv H, Wu L, Cui Y, Yao H, et al. Iron oxide nanoparticles promote the migration of mesenchymal stem cells to injury sites. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:573-89. Epub 2019/01/23. doi: 10.2147/ijn.S184920. PubMed PMID: 30666115; PubMed Central PMCID: PMC6336032.
31. Luo C, Yang X, Li M, Huang H, Kang Q, Zhang X, et al. A novel strategy for in vivo angiogenesis and osteogenesis: magnetic micro-movement in a bone scaffold. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup2):636-45. Epub 2018/07/24. doi: 10.1080/21691401.2018.1465947. PubMed PMID: 30033765.
32. Spangenberg J, Kilian D, Czichy C, Ahlfeld T, Lode A, Günther S, et al. Bioprinting of Magnetically Deformable Scaffolds. *ACS biomaterials science & engineering*. 2021;7(2):648-62. Epub 2021/01/29. doi: 10.1021/acsbomaterials.0c01371. PubMed PMID: 33507748.
33. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7(1):144. doi: 10.1186/1556-276X-7-144.
34. Fan D, Wang Q, Zhu T, Wang H, Liu B, Wang Y, et al. Recent Advances of Magnetic Nanomaterials in Bone Tissue Repair. 2020;8(745). doi: 10.3389/fchem.2020.00745.
35. Majidi S, Sehrig FZ, Farkhani SM, Goloujeh MS, Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(2):722-34. Epub 2014/12/02. doi: 10.3109/21691401.2014.982802. PubMed PMID: 25435409.
36. Xia Y, Sun J, Zhao L, Zhang F, Liang XJ, Guo Y, et al. Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*. 2018;183:151-70. Epub 2018/09/01. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.040. PubMed PMID: 30170257.
37. Theruvath AJ, Nejadnik H, Muehe AM, Gassert F, Lacayo NJ, Goodman SB, et al. Tracking Cell Transplants in Femoral Osteonecrosis with Magnetic Resonance Imaging: A Proof-of-Concept Study in Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(24):6223-9. Epub 2018/09/19. doi:

10.1158/1078-0432.Ccr-18-1687. PubMed PMID: 30224340; PubMed Central PMCID: PMCPMC6295241.

38. Rotherham M, Henstock JR, Qutachi O, El Haj AJ. Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2018;14(1):173-84. Epub 2017/10/03. doi: 10.1016/j.nano.2017.09.008. PubMed PMID: 28965980.

39. Shuai C, Yang W, He C, Peng S, Gao C, Yang Y, et al. A magnetic micro-environment in scaffolds for stimulating bone regeneration. *Materials & Design*. 2020;185:108275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108275>.

40. Zhang N, Lock J, Sallee A, Liu H. Magnetic Nanocomposite Hydrogel for Potential Cartilage Tissue Engineering: Synthesis, Characterization, and Cytocompatibility with Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7(37):20987-98. doi: 10.1021/acsami.5b06939.

41. Matos AM, Gonçalves AI, El Haj AJ, Gomes ME. Magnetic biomaterials and nano-instructive tools as mediators of tendon mechanotransduction. *Nanoscale Advances*. 2020;2(1):140-8. doi: 10.1039/C9NA00615J.

42. Tognato R, Armiento AR, Bonfrate V, Levato R, Malda J, Alini M, et al. A Stimuli-Responsive Nanocomposite for 3D Anisotropic Cell-Guidance and Magnetic Soft Robotics. 2019;29(9):1804647. doi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201804647>.

43. Bock N, Riminucci A, Dionigi C, Russo A, Tampieri A, Landi E, et al. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(3):786-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.017>.

44. Han Y, Wei Q, Chang P, Hu K, Okoro OV, Shavandi A, et al. Three-Dimensional Printing of Hydroxyapatite Composites for Biomedical Application. 2021;11(4):353. PubMed PMID: doi:10.3390/cryst11040353.

45. Spangenberg J, Kilian D, Czichy C, Ahlfeld T, Lode A, Günther S, et al. Bioprinting of Magnetically Deformable Scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021;7(2):648-62. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01371.

46. Bradley EW, Carpio LR, van Wijnen AJ, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiological reviews*.

- 2015;95(4):1359-81. Epub 2015/09/18. doi: 10.1152/physrev.00004.2015. PubMed PMID: 26378079; PubMed Central PMCID: PMC4600951.
47. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(1):45-54. doi: 10.1038/nrrheum.2014.164.
 48. Infante A, Rodríguez CI. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):244. doi: 10.1186/s13287-018-0995-x.
 49. Inci I, Odaba_ S, Vargel I, Guzel EE, Korkusuz P, Çavus'og lu Tk, et al. Gelatin-Hydroxyapatite Cryogels with Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor Beta-1 for Calvarial Defects. 2014;4:624-31.
 50. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism*. 2007;5(6):464-75. Epub 2007/06/07. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.001. PubMed PMID: 17550781.
 51. Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(11):696-711. doi: 10.1038/s41580-020-00279-w.
 52. Oh SKW, Choo ABH. 1.23 - Stem Cells. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*. Oxford: Pergamon; 2011. p. 331-54.
 53. Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell and tissue research*. 2014;355(1):23-33. Epub 2013/12/03. doi: 10.1007/s00441-013-1750-3. PubMed PMID: 24292720.
 54. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*. 2013;2013:684736. doi: 10.1155/2013/684736.
 55. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Bigham-Sadegh A. Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *BioFactors (Oxford, England)*. 2014;40(5):459-81. Epub 2014/10/07. doi: 10.1002/biof.1177. PubMed PMID: 25283434.
 56. Yuan Z, Li Q, Luo S, Liu Z, Luo D, Zhang B, et al. PPAR γ and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Current stem cell*

- research & therapy. 2016;11(3):216-25. Epub 2015/05/20. doi: 10.2174/1574888x10666150519093429. PubMed PMID: 25986621.
57. Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, Rizzo P, Caliceti C, Massari L, et al. Characterization of Notch Signaling During Osteogenic Differentiation in Human Osteosarcoma Cell Line MG63. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(12):2652-63. Epub 2016/03/08. doi: 10.1002/jcp.25366. PubMed PMID: 26946465.
 58. Chen YJ, Yao CC, Huang CH, Chang HH, Young TH. Hexosamine-Induced TGF- β Signaling and Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Are Dependent on N-Acetylglucosaminyltransferase V. *BioMed research international*. 2015;2015:924397. Epub 2015/11/20. doi: 10.1155/2015/924397. PubMed PMID: 26583147; PubMed Central PMCID: PMC4637074.
 59. Vural AC, Odabas S, Korkusuz P, Yar Sağlam AS, Bilgiç E, Çavuşoğlu T, et al. Cranial bone regeneration via BMP-2 encoding mesenchymal stem cells. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2017;45(3):544-50. Epub 2016/03/24. doi: 10.3109/21691401.2016.1160918. PubMed PMID: 27002739.
 60. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(4):212-27. Epub 2012/02/01. doi: 10.1038/nrendo.2011.234. PubMed PMID: 22290358; PubMed Central PMCID: PMC3589914.
 61. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*. 2019;9(1):19. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
 62. Qasim M, Chae DS, Lee NY. Bioengineering strategies for bone and cartilage tissue regeneration using growth factors and stem cells. 2020;108(3):394-411. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36817>.
 63. Xu J, Liao K, Zhou W. Exosomes Regulate the Transformation of Cancer Cells in Cancer Stem Cell Homeostasis. *Stem cells international*. 2018;2018:4837370. Epub 2018/10/23. doi: 10.1155/2018/4837370. PubMed PMID: 30344611; PubMed Central PMCID: PMC6174755.
 64. Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*.

2005;106(1):216-23. Epub 2005/03/26. doi: 10.1182/blood-2005-01-0220. PubMed PMID: 15790784.

65. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;219:278-94. Epub 2015/07/06. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.06.029. PubMed PMID: 26143224.

66. Wu Y, Deng W, Klinke DJ, 2nd. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst*. 2015;140(19):6631-42. Epub 2015/09/04. doi: 10.1039/c5an00688k. PubMed PMID: 26332016; PubMed Central PMCID: PMC4986832.

67. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019;8(4). Epub 2019/04/17. doi: 10.3390/cells8040307. PubMed PMID: 30987213; PubMed Central PMCID: PMC6523673.

68. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804. Epub 2017/03/04. doi: 10.7150/thno.18133. PubMed PMID: 28255367; PubMed Central PMCID: PMC5327650.

69. Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23:519-47. Epub 2007/05/18. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319. PubMed PMID: 17506697; PubMed Central PMCID: PMC2911632.

70. Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of molecular cell biology*. 2013;5(4):214-26. Epub 2013/08/07. doi: 10.1093/jmcb/mjt022. PubMed PMID: 23918283.

71. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*. 2014;29:116-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>.

72. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. 2011;12(12):1659-68. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>.

73. Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nature cell biology*. 2012;14(7):654-5. Epub 2012/06/30. doi: 10.1038/ncb2530. PubMed PMID: 22743708.
74. Ni Z, Zhou S, Li S, Kuang L, Chen H, Luo X, et al. Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Research*. 2020;8(1):25. doi: 10.1038/s41413-020-0100-9.
75. Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(10):617-38. doi: 10.1038/s41571-018-0036-9.
76. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 24):5553-65. Epub 2013/10/10. doi: 10.1242/jcs.128868. PubMed PMID: 24105262.
77. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2018;75(2):193-208. Epub 2017/07/25. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9. PubMed PMID: 28733901; PubMed Central PMCID: PMC5756260.
78. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 2009;458(7237):445-52. Epub 2009/03/28. doi: 10.1038/nature07961. PubMed PMID: 19325624.
79. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478). Epub 2020/02/08. doi: 10.1126/science.aau6977. PubMed PMID: 32029601; PubMed Central PMCID: PMC7717626.
80. Li Y, Fan L, Liu S, Liu W, Zhang H, Zhou T, et al. The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials*. 2013;34(21):5048-58. Epub 2013/04/13. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.052. PubMed PMID: 23578559.
81. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*. 2015;17(6):816-26. Epub 2015/05/20. doi: 10.1038/ncb3169. PubMed PMID: 25985394; PubMed Central PMCID: PMC5769922.

82. Inder KL, Ruelcke JE, Petelin L, Moon H, Choi E, Rae J, et al. Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3. Epub 2014/07/16. doi: 10.3402/jev.v3.23784. PubMed PMID: 25018864; PubMed Central PMCID: PMC4072912.
83. Li FXZ, Liu JJ, Xu F, Lin X, Zhong JY, Wu F, et al. Role of tumor-derived exosomes in bone metastasis (Review). *Oncol Lett*. 2019;18(4):3935-45. doi: 10.3892/ol.2019.10776.
84. Jerez S, Araya H, Thaler R, Charlesworth MC, López-Solís R, Kalergis AM, et al. Proteomic Analysis of Exosomes and Exosome-Free Conditioned Media From Human Osteosarcoma Cell Lines Reveals Secretion of Proteins Related to Tumor Progression. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(2):351-60. Epub 2016/07/01. doi: 10.1002/jcb.25642. PubMed PMID: 27356893.
85. Garimella R, Washington L, Isaacson J, Vallejo J, Spence M, Tawfik O, et al. Extracellular Membrane Vesicles Derived from 143B Osteosarcoma Cells Contain Pro-Osteoclastogenic Cargo: A Novel Communication Mechanism in Osteosarcoma Bone Microenvironment. *Translational oncology*. 2014;7(3):331-40. Epub 2014/09/03. doi: 10.1016/j.tranon.2014.04.011. PubMed PMID: 25180057; PubMed Central PMCID: PMC4145399.
86. Raimondi L, De Luca A, Gallo A, Costa V, Russelli G, Cuscino N, et al. Osteosarcoma cell-derived exosomes affect tumor microenvironment by specific packaging of microRNAs. *Carcinogenesis*. 2020;41(5):666-77. Epub 2019/07/12. doi: 10.1093/carcin/bgz130. PubMed PMID: 31294446.
87. Gong L, Bao Q, Hu C, Wang J, Zhou Q, Wei L, et al. Exosomal miR-675 from metastatic osteosarcoma promotes cell migration and invasion by targeting CALN1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;500(2):170-6. Epub 2018/04/08. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.016. PubMed PMID: 29626470.
88. Grover CN, Cameron RE, Best SM. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2012;10:62-74. Epub 2012/04/24. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.028. PubMed PMID: 22520419.

89. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2001;19(3):180-92. Epub 2001/05/22. doi: 10.1634/stemcells.19-3-180. PubMed PMID: 11359943.
90. Gkartzou E, Koumoulos EP, Charitidis CAJMR. Production and 3D printing processing of bio-based thermoplastic filament. 2017;4:1.
91. Domingo-Roca R, Jackson JC, Windmill JFC. 3D-printing polymer-based permanent magnets. *Materials & Design*. 2018;153:120-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.05.005>.
92. Ren Z, Dong L, Yang Y. Dynamic mechanical and thermal properties of plasticized poly(lactic acid). 2006;101(3):1583-90. doi: <https://doi.org/10.1002/app.23549>.
93. Shameli K, Ahmad MB, Yunus WM, Ibrahim NA, Rahman RA, Jokar M, et al. Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity. *International journal of nanomedicine*. 2010;5:573-9. Epub 2010/09/22. doi: 10.2147/ijn.s12007. PubMed PMID: 20856832; PubMed Central PMCID: PMC2939702.
94. Yu B, Wang M, Sun H, Zhu F, Han J, Bhat G. Preparation and properties of poly (lactic acid)/magnetic Fe₃O₄ composites and nonwovens. *RSC Advances*. 2017;7(66):41929-35. doi: 10.1039/C7RA06427F.
95. Koneracká M, Múčková M, Závishová V, Tomašovičová N, Kopčanský P, Timko M, et al. Encapsulation of anticancer drug and magnetic particles in biodegradable polymer nanospheres. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008;20(20):204151. doi: 10.1088/0953-8984/20/20/204151.
96. N. Mohamad U, S. A. Mazlan ,F. Imaduddin ,Seung-Bok Choi ,I. I. M. Yazid A comparative work on the magnetic field-dependent properties of plate-like and spherical iron particle-based magnetorheological grease. *plosone*. 2017.
97. Chieng BW, Ibrahim NA, Yunus WMZW, Hussein MZ. Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets. 2014;6(1):93-104. PubMed PMID: doi:10.3390/polym6010093.
98. El-hadi AM. Increase the elongation at break of poly (lactic acid) composites for use in food packaging films. *Scientific Reports*. 2017;7(1):46767. doi: 10.1038/srep46767.

99. Moliner C, Finocchio E, Arato E, Ramis G, Lagazzo A. Influence of the Degradation Medium on Water Uptake, Morphology, and Chemical Structure of Poly(Lactic Acid)-Sisal Bio-Composites. *Materials (Basel)*. 2020;13(18):3974. doi: 10.3390/ma13183974. PubMed PMID: 32911756.
100. Leroy A, Ribeiro S, Grossiord C, Alves A, Vestberg RH, Salles V, et al. FTIR microscopy contribution for comprehension of degradation mechanisms in PLA-based implantable medical devices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017;28(6):87. doi: 10.1007/s10856-017-5894-7.
101. Sun H, Peng S, Wang M, Zhu F, Bhat G, Yu B. Preparation and Characterization of magnetic PLA/Fe₃O₄-g-PLLA composite melt blown nonwoven fabric for air filtration. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2020;15:1558925020968222. doi: 10.1177/1558925020968222.
102. Frounchi M, Shamshiri S. Magnetic nanoparticles-loaded PLA/PEG microspheres as drug carriers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2015;103(5):1893-8. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35317>.
103. Bitla Y, Chin Y-Y, Lin J-C, Van CN, Liu R, Zhu Y, et al. Origin of metallic behavior in NiCo₂O₄ ferrimagnet. *Scientific Reports*. 2015;5(1):15201. doi: 10.1038/srep15201.
104. Gong M, Zhao Q, Dai L, Li Y, Jiang T. Fabrication of polylactic acid/hydroxyapatite/graphene oxide composite and their thermal stability, hydrophobic and mechanical properties. *Journal of Asian Ceramic Societies*. 2017;5(2):160-8. doi: 10.1016/j.jascer.2017.04.001.
105. Huan Z, Chu HK, Liu H, Yang J, Sun D. Engineered bone scaffolds with Dielectrophoresis-based patterning using 3D printing. *Biomedical Microdevices*. 2017;19(4):102. doi: 10.1007/s10544-017-0245-5.
106. Marycz K, Alicka M, Kornicka-Garbowska K, Polnar J, Lis-Bartos A, Wiglusz RJ, et al. Promotion through external magnetic field of osteogenic differentiation potential in adipose-derived mesenchymal stem cells: Design of polyurethane/poly(lactic) acid sponges doped with iron oxide nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2020;108(4):1398-411. Epub 2019/09/13. doi: 10.1002/jbm.b.34488. PubMed PMID: 31513334.

107. Trock DH. Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2000;26(1):51-62, viii. Epub 2000/02/19. doi: 10.1016/s0889-857x(05)70119-8. PubMed PMID: 10680193.
108. Arno MC, Inam M, Weems AC, Li Z, Binch ALA, Platt CI, et al. Exploiting the role of nanoparticle shape in enhancing hydrogel adhesive and mechanical properties. *Nature Communications*. 2020;11(1):1420. doi: 10.1038/s41467-020-15206-y.
109. Baraclough M, Seetharaman SS, Hooper IR, Barnes WL. Metamaterial Analogues of Molecular Aggregates. *ACS Photonics*. 2019;6(11):3003-9. Epub 2019/10/25. doi: 10.1021/acsphotonics.9b01208. PubMed PMID: 31788501.
110. Poller WC, Löwa N, Wiekhorst F, Taupitz M, Wagner S, Möller K, et al. Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2016;12(2):337-46. Epub 2016/06/17. doi: 10.1166/jbn.2016.2204. PubMed PMID: 27305767.
111. Barnes FS. Some engineering models for interactions of electric and magnetic fields with biological systems. *Bioelectromagnetics*. 1992;13(S1):67-85. doi: <https://doi.org/10.1002/bem.2250130708>.
112. Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13551. doi: 10.1038/s41598-018-31853-0.
113. Cromer Berman SM, Walczak P, Bulte JW. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2011;3(4):343-55. Epub 2011/04/08. doi: 10.1002/wnan.140. PubMed PMID: 21472999; PubMed Central PMCID: PMC3193153.
114. Fayol D, Frasca G, Le Visage C, Gazeau F, Luciani N, Wilhelm C. Use of Magnetic Forces to Promote Stem Cell Aggregation During Differentiation, and Cartilage Tissue Modeling. *Advanced Materials*. 2013;25(18):2611-6. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201300342>.
115. Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK, Frank JA. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles:

implications for cellular magnetic resonance imaging. NMR in biomedicine. 2005;18(6):383-9. Epub 2005/07/14. doi: 10.1002/nbm.970. PubMed PMID: 16013087.

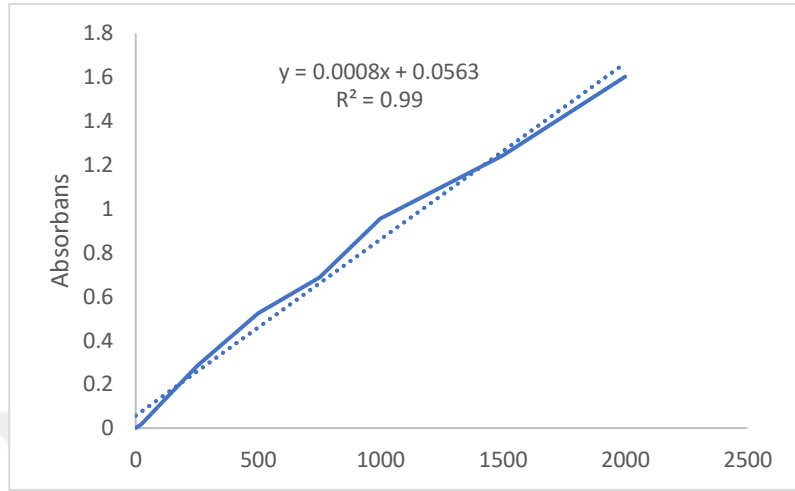


EKLER

Ek 1. Teçhizat listesi

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
TEM görüntüleme için JEOL/JEM100CX II	Eksozomların tespiti ve görselleştirilmesi
Leica/DMIL LED Fluo-459487 microscopy	Hücre görüntülemeleri
Tehtnica/Centric-322A centrifuge	Hücre çöktürmek için
Himac CP100WX, Hitachi, USA ultracentrifuge	Eksozomları çöktürmek için
GeneLab laboratory oven	PLA degradasyon çalışmaları sırasında kurutmak için
Hettich Zentrifugen universal 320	Ultrasantrifüjden önce hücre atık örneğinin kademeli santrifüjü için
Oil bath one 7 memmert	PLA ve mg.PLA nin degradasyon çalışması
Themofisher multiscan	Protein taayını
NanoDrop, ND-1000, Thermoscientific, ABD	RNA kantifikasyonu

Ek2. BCA'nin standart grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Rihab Ksouri

Yabancı Dili: Arapça, İngilizce, Fransızca, (İtalyanca ve Rusca: Başlangıç seviyesinde.)

Eğitim Durumu:

Lise: Russia sk Lisesi (2011-2015)

Lisans: Tunus El Manar Üniversitesi , Medikal Teknolojileri Yüksek Enstitüsü (2015-2018)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2019-2021)

Yayınlar ve Bildiriler

1. Rihab Ksouri, Food components and diet habits: chief factors of cancer development, Oxford academic Food Quality and Safety, Volume 3, Issue 4, December 2019, Pages 227–231, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyz021>. Available at: <https://urlz.fr/btYQ>.
2. Rihab Ksouri, Therapeutic Strategies used Against Glioblastoma: The Intervention of Gene Therapy and Medicinal Plants, 5. ULUSLARARASI ÖĞRENCİLİK SEMPOZYUMU BİLDİRİLER KİTABI YEDİNCİ KİTAP, FEN BİLİMLERİ-ZİRAAT-SAĞLIK, 2019. v. 7, p. 278, Available at: <http://www.internationalstudentsymposium.com/5-uluslararasi-ogrenci-sempozyumu-bildiriler-kitaplari/>
3. KSOURI RIHAB, RABAH SOUHA, MEZGHANI SANA, HANLAOUİ SONIA. The Protective Effect of Grape Seed and Skin Extract and Ulva rigida Against Oxidative Stress Induced by Cisplatin on The Testis of Rats. Dergi park, Sakarya University Journal of Science. 2020; 24(2): 323-312. Available at: <http://www.saujs.sakarya.edu.tr/tr/issue/52471/638725>
4. KSOURI, Rihab. BREAST CANCER AND NON-CONVENTIONAL TREATMENTS: A MINI REVIEW. *Archives of Ecotoxicology*, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 24-26,

july 2019. ISSN 2644-4747, <https://doi.org/10.36547/ae.2019.1.3.24-26>. Available at:
<https://office.scicell.org/index.php/AE/article/view/90>.



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



Sakarya University Journal of Science

ISSN 1301-4048 | e-ISSN 2147-835X | Period Bimonthly | Founded: 1997 | Publisher Sakarya University |
<http://www.saujs.sakarya.edu.tr/>

Title: The Protective Effect of Grape Seed and Skin Extract and *Ulva rigida* Against Oxidative Stress Induced by Cisplatin on The Testis of Rats

Authors: Rihab Ksouri, Souha Rabah, Sana Mezghani, Sonia Hamlaoui

Received: 2019-10-27 12:08:25

Accepted: 2020-01-07 15:04:25

Article Type: Research Article

Volume: 24

Issue: 2

Month: April

Year: 2020

Pages: 312-323

How to cite

Rihab Ksouri, Souha Rabah, Sana Mezghani, Sonia Hamlaoui; (2020), The Protective Effect of Grape Seed and Skin Extract and *Ulva rigida* Against Oxidative Stress Induced by Cisplatin on The Testis of Rats. Sakarya University Journal of Science, 24(2), 312-323, DOI: 10.16984/saufenbilder.638725

Access link

<http://www.saujs.sakarya.edu.tr/tr/issue/52471/638725>

Review

Food components and diet habits: chief factors of cancer development

Rihab Ksouri*

Department of Biotechnology, Biotechnology Institute, Ankara University, Turkey

Correspondence to: Rihab Ksouri, Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey. E-mail: Ksrhb99@gmail.com

Received 1 August 2019; Revised 17 August 2019; Editorial decision 29 August 2019.

Abstract

Food is a vital need for everyone. Today, there is food for all, but the world still suffers from under- and over-nutrition and risk of cancer development and chronic diseases can follow both cases. Worldwide, cancer is a leading cause of mortality after cardiovascular disease; it is considered the second reason for death globally. Role of nutritional habits, the quality of food, the consumption of canned foods, genetically modified fruits and vegetables and exposed food to certain pesticides and carcinogens agents, and unhealthy lifestyle behaviours such as smoking, alcohol, obesity, and fast-foods consumption may be at risk to the development of some cancers. In recent decades, researchers have carried out attention in this field to improve the quality of life and to limit nutrition problems. Thus, this study aims to summarize current evidence on the relationship between nutritional factors and cancer expansion, how nutrition can be a heal and a source of fatal illness leading to death. In detail, this review will highlight the influence of specific foodstuffs on the threat of cancer incidence and recurrence by providing some examples of most carcinogenic compounds.

Key words: cancer; carcinogens; food; nutritional habits.

Introduction

or through membrane receptors by causing the alteration of the

Therapeutic Strategies used Against Glioblastoma: The Intervention of Gene Therapy and Medicinal Plants

Rihab Ksouri

Abstract: Glioblastoma known as glioblastoma multiforme (GBM) is a tumour of the central nervous system. It is a type of malignant brain tumour has as sources the astrocytes which are star-shaped glial cells, and according to World health organization, its degree of differentiation is IV; the finale stade. The causes of glioblastomas are still unknown and unclear until nowadays, the thing that made this type of brain cancer considered as one of the most aggressive and rare cancer, furthermore, because it can develop and spread quickly which made its treatment limited. The prognosis of patients with malignant glioma stays ominous despite advances in the treatment of brain tumours.

Typically, chemotherapy and radiotherapy which are used after surgery represent the first forms of treatment of glioblastoma. Hence, given the side effects presented by these conventional treatments, medicine and research or novel treatments sustained by progressions in molecular biology and treatment with natural extracts persists. The use of medicinal plants, advances in herbal medicine and gene manipulation has evolved over the last decades as they have progressed, the effectiveness of their use in various fields has improved. Thus, it was highlighted that these extracts are mostly devoid of any side effects, the thing that encouraged the search for their benign effects in cancer. In particular, various tests were highlighted, but this treatment remains restricted because data about the use of herbal remedies in the treatment of glioblastoma are limited. This study highlights the therapeutic strategies developed for glioblastoma brain cancer such as gene therapy and some examples of medicinal plants such as an extract from *Artemisia L.*, Ellagic Acid and other extracts, and their effects on tumour cells derived from the brain based on a few studies in Turkey and some other international studies.

Keywords: Cancer, Glioblastoma, Strategies, Medicinal Plants, Herbal Remedies