

Doku Mühendisliği Yöntemi ile Hastaya Özel Ortopedik İmplant Tasarımı ve Üretimi

Program Kodu: 1003

Proje No: 213M708

Proje Yürütücüsü:
Prof.Dr. Nesrin HASIRCI

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Gamze Torun Köse
Doç. Dr. Türker Baran
Doç. Dr. Tahsin Beyzadeoğlu
Doç. Dr. Ergin Tönük
Y. Doç. Dr. Deniz Yücel
Dr. Tuğba Endoğan

Bursiyerler:

Senem Büyüksungur
Elbay Malikmammadov
Ezgi İrem Bektaş

HAZİRAN 2016
ANKARA

ÖNSÖZ

Tüm dünyada ve ülkemizde ortopedik hasarların oranının diğer organ hasarlarına göre çok yüksek olduğu bilinmektedir. Ortopedik hasarların oluşmasında, nüfusun yaşlanmasının yanı sıra, yaşamın hızlanmasının ve trafik kazalarının sayıca artmasının etkileri oldukça fazladır. Son yıllarda, ortopedik tedavilerdeki eğilim, ticari implantlardan her hangi birinin hastaya uygulanması yerine, implantın 'hastaya özel' tasarlanması yönündedir. Bu projenin amacı kemik hasarlarının hızlı ve düzgün iyileşmesine olanak verecek şekilde, biyouyumlu ve biyobozunur malzemeleri kullanarak, doku mühendisliği yöntemleri ile hastaya özgü implantlar hazırlamaktır. Bu konunun proje olarak seçilmesinin nedeni, ülkemizdeki medikal malzeme ihtiyacının %85'ini ithalatla karşılıyor olmamız ve bunun %20'sinin de ortopedik implant malzeme olmasıdır. Bu durum, Türkiye'de 2 milyar dolar civarında olan Tıbbi Cihaz Pazarında 400 milyon dolarlık maddi kayıp ortaya çıkarmaktadır. Verilerden anlaşılacağı üzere, medikal alanda yüksek katma değerli ürünlere büyük gereksinim duyulmaktadır ve bu yerel kaynaklarca karşılanamamaktadır.

TÜBİTAK tarafından yapılan çağrıda belirtilen "Ülkemizde, tıbbi cihazların geliştirilmesi ve üretilmesi için gerekli olan bilimsel ve teknolojik potansiyelin harekete geçirilmesi" ve "ulusal sağlık teknolojileri sektörünün yenilikçi ve rekabetçi yönünün geliştirilmesi" hedeflerine tamamen uygun olan 213M708 numaralı projemiz TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Projemize verdiği destekler için TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	10
3.1 Gereçler.....	10
3.2. Yöntemler	12
3.2.1. Üç Boyutlu Doku Desteklerinin Hazırlanması.....	12
3.2.1.1. Islak Eğirme Yöntemi ile Doku Desteklerinin Hazırlanması	12
3.2.1.2. Hızlı Prototipleme Yöntemi ile 3B Doku Desteklerinin Hazırlanması.....	14
3.2.2. PPF Sentezi ve Karakterizasyonu	15
3.2.3. Üç Boyutlu Kompozit Doku Desteklerinin Hazırlanması	17
3.2.4. Üç Boyutlu Kompozit Doku Desteklerinin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu	18
3.2.5. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Testi	18
3.2.6. <i>In vitro</i> Biyouyumluluk Testleri	19
3.2.6.1. Statik Koşullarda Hücre Biyouyumluluğu.....	19
3.2.6.2. Perfüzyon Biyoreaktöründe Hücre Biyouyumluluğu.....	20
3.2.7. <i>In vitro</i> Osteojenik Farklılaşma Testleri	22
3.2.7.1. Alkalen Fosfataz Aktivitesi	22
3.2.7.2. Alizarin Red Boyaması.....	23
3.2.8. <i>In vivo</i> Biyouyumluluk Testleri.....	23
3.2.8.1. Deri İçi İritasyon	24
3.2.8.2. İmplantasyon	26

3.2.8.3. MikroBT Verisinin Model Kemik Örneklerinden Eldesi ve HP'ye Aktarılması ..	28
3.3. HP ile elde edilen implantların Karakterizasyonu.....	29
3.3.1 Tavşan Kemiğinde Mekanik Test Ön Denemeleri	29
3.3.2 Geliştirilen İmplantların Mekanik Özelliklerinin Saptanması	30
3.4 Hücre izolasyonu, in vitro ve in vivo değerlendirmeler	31
3.4.1 Tavşan Kemik İliğinden Kök Hücre Elde Edilmesi.....	31
3.4.2 Tavşan Kemik İliğinden Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	31
3.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin büyüme eğrisinin oluşturulması.....	32
3.4.4 Hücre farklılaşmasını gen düzeyinde izlemek	33
3.4.4.1 RNA İzolasyonunun Optimizasyonu.....	34
3.5 <i>In vivo</i> Uygulamalar	35
3.6 <i>In vivo</i> Kemik Örneklerinin İncelenmesi.....	39
3.6.1. MikroBT Taraması	39
3.6.2. İmplantlı Kemiğin Mekanik Karakterizasyonu.....	40
3.7 <i>In vitro</i> ve <i>In vivo</i> Uygulama Sonrası İmplantların Histolojik Değerlendirmesi.....	42
3.7.1 <i>In vitro</i> Biyoreaktörde Geliştirilen Yapay Dokuda Histolojik İnceleme.....	42
3.7.2 <i>In vivo</i> 'da Tavşanlarda Histolojik İnceleme	43
4. BULGULAR.....	46
4.1 İmplant Kompozisyonunun Hazırlanması ve Optimizasyonu	46
4.1.1 Islak Eğirme Tekniği ile Hazırlanan Destekler.....	46
4.1.2 Hızlı Prototipleme Yöntemi ile 3B Doku Desteklerinin Hazırlanması	48
4.2 PPF Sentezi ve Karakterizasyonu	50
4.3 3B Kompozit Doku Desteklerinin Hazırlanması	51
4.3.1 3B Kompozit Doku Desteklerinin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu	51
4.3.2 <i>In vitro</i> Sitotoksikite Testi	54
4.4 <i>In vitro</i> Biyouyumluluk Testleri.....	54
4.4.1 Statik Koşullarda Hücre Biyouyumluluğu	54
4.4.2 Perfüzyon Biyoreaktöründe Hücre Biyouyumluluğu	57

4.5 <i>In vitro</i> Osteojenik Farklılaşma Testleri	59
4.5.1 Alkale Fosfataz Aktivitesi	59
4.5.2 Alizarin Red Boyaması	60
4.6 <i>In vivo</i> Biyouyumluluk Testleri	61
4.6.1 Deri İçi İrritasyon	62
4.6.2 İmplantasyon Testleri	64
4.7 MikroBT Verisinin Model Kemik Örneklerinden Eldesi ve HP'ye Aktarılması	65
4.8 Mekanik testler için tavşan kemiği elde edilmesi	69
4.9 Geliştirilen İmplantların Mekanik Özelliklerinin Saptanması.....	73
4.10 Tavşan Kemik İliğinden Kök Hücre Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu	76
4.11 Mezenkimal kök hücrelerin büyüme eğrisinin oluşturulması	79
4.12 RNA İzolasyonu Optimizasyonu	80
4.13 <i>In vivo</i> Kemik Örneklerinin Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) ve MikroBT Taraması..	82
4.14 İmplantlı Kemiğin Mekanik Karakterizasyonu	86
4.14.1 Dört hafta sonra iyileşme durumu	88
4.14.2 Sekiz hafta sonra iyileşme durumu	88
4.14.3 PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF Örneklerinin Kendi İçinde Değerlendirilmesi	89
4.14.3.1 Dört hafta sonunda çıkarılan örneklerin değerlendirilmesi:	90
4.14.3.2 Sekiz hafta sonunda çıkarılan örneklerin değerlendirilmesi:	90
4.15 Histolojik İncelemeler	92
5. TARTIŞMA/SONUÇ	93
6. REFERANSLAR	97

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Projede kullanılan cihazlar.	10
Tablo 2. ALP kitinde bulunan bileşenler.....	22
Tablo 3. Değerlendirme kriterleri ve puanlama.	25
Tablo 4. Hücre tipi/ cevaplar bakımından histolojik değerlendirmeler ve puanlama	27
Tablo 5. <i>In vivo</i> deneylerde kullanılan örnek tipleri ve sayıları.	36
Tablo 6. <i>In vivo</i> çalışmaları tavşan listesi.....	38
Tablo 7. 3B doku desteklerinin EDS analizi sonuçları.	52
Tablo 8. Deri içi irritasyon değerlendirme sonuçları.	62
Tablo 9. Genel ortalama skor değerleri.....	63
Tablo 10. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin implantasyon testi skorları.....	64
Tablo 11. Gama sterilizasyon öncesi ve sonrası desteklerin basma elastik modül değerleri.....	73
Tablo 12. Farklı kompozisyon ve tasarımlardaki desteklerin basma elastik modül değerleri.....	75
Tablo 13. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerine ekilen hücrelerden elde edilen RNA miktarları ve A_{260}/A_{280} oranları.....	81
Tablo 14. Sağlıklı kemiklerin basmaya ve çekmeye çalıştığı durumlar (VAR00001 ve VAR 00002).	87
Tablo 15. Örneklerin SPSS 20.0 yazılımı ile analizi sonuçları.....	89
Tablo 16. Hücreli ve hücretsiz, implantlı ile sağlıklı kemik direngenliklerinin karşılaştırılması.....	91

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Doku mühendisliği yaklaşımı. (1) Kaynak hücre izolasyonu, (2) Hücrelerin <i>in vitro</i> ortamda çoğaltılması, (3) Hücrelerin üç boyutlu taşıyıcı yapıya ekilmesi, (4) <i>In vitro</i> kültür ve üç boyutlu yapay dokunun oluşturulması, (5) Hedef bölgeye implantasyon.....	4
Şekil 2. Standart olmayan kafatası defekti.....	5
Şekil 3. Hızlı prototipleme yöntemi ile kişiye özel doku destekleri oluşturulması. (a) CT, MRI taramaların yapılması, (b) Defekt yapısının belirlenmesi, (c) Defekte tam uyum sağlayacak destek yapının bilgisayar modelinin geliştirilmesi, (d) hızlı prototipleme yöntemiyle hedef bölgeye tam uyum sağlayacak destek malzemesinin hazırlanması.....	6
Şekil 4. Islak eğirme sistemi ile doku desteği eldesi.....	13
Şekil 5. Hızlı prototipleme yöntemi ile 3B destek hazırlanması.	14
Şekil 6. Polipropilen fumarat sentez reaksiyonu.....	15
Şekil 7. Polipropilen fumarat sentez düzeneği.	16
Şekil 8. Tavşan mezenkimal kök hücreleri için Alamar Blue kalibrasyon eğrisi.	20
Şekil 9. Doku desteklerinin yerleştirildiği adaptör.	21
Şekil 10. Perfüzyon biyoreaktörü düzeneği.....	21
Şekil 11. Deney hayvanlarına enjeksiyon bölgeleri 1; deney hayvanlarının baş tarafı, 2; test bölgesi, 3; negatif kontrol bölgesi, 4; test bölgesi, 5; pozitif kontrol bölgesi, 6; deney hayvanlarının kuyruk tarafı.	24
Şekil 12. Örneğin MikroBT içerisinde görünümü.	28
Şekil 13. Defekt yaratılmış farklı kemik örneklerinde dört nokta eğilme test düzeneği.....	30
Şekil 14. Tavşan mezenkimal kök hücrelerinin sayısının belirlenmesi için geliştirilen kalibrasyon eğrisi (mavi) ve eğim çizgisi (siyah). Doğru denklemi grafik üzerinde gösterilmiştir.	32
Şekil 15. RUNX2, SPP1, COL1A1 ve GAPDH genlerine özel olarak tasarımı yapılan primerlerin 52°C, 54°C, 56°C, 58°C ve 60°C T_m sıcaklıklarında gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1, 2 ve 3 numaralı kuyucuk: moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, ABD)).....	34
Şekil 16. Cerrahi operasyon prosedürü: a,b,c)Tavşan sağ femur defekti oluşturulması, d,e)Doku desteği yerleştirilmiş defekt, f)Dokuların dikilmesi.	37
Şekil 17. Kalibrasyon çubuklarının yapılandırma görüntüsü.....	39
Şekil 18. Dört Nokta Eğilme Testi.	41

Şekil 19. <i>In vivo</i> deneyler sonrası tavşanlardan çıkartılan ve dekalsifiye edilen sağlam femur kemik dokuları. 4 hafta sonra çıkarılan A) PCL/HAp–Hücreli örnek ve B) PCL/HAp/PPF-Hücreli örnek (Ok implantın bulunduğu bölgeyi göstermektedir).....	45
Şekil 20. Islak eğrilmiş PCL doku desteklerinin SEM mikrografı.	46
Şekil 21. Islak eğrilmiş PCL/TCP doku desteklerinin SEM mikrografı.	47
Şekil 22. PCL/TCP yapıların EDX sonuçları.	47
Şekil 23. Islak eğrilmiş PCL desteklerinin gözenek boyutu dağılımı.	47
Şekil 24. x-y doğrultusunda farklı hızlar (150, 200, 250, 300 ve 350 mm/s) denenerek üretilen 5 ve 10 katmanlı PCL doku destekleri.	48
Şekil 25. Farklı miktarlarda kaymalar denenerek elde edilen PCL doku desteklerinin stereomikroskop altında çekilmiş görüntüleri.....	49
Şekil 26. Temel ve temel kaymalı (0.15 mm) PCL doku destekleri.	49
Şekil 27. PPF'in FTIR spektrumu.....	50
Şekil 28. PCL doku desteklerinin SEM mikrografları. Tasarım tipi: A) Temel; B) Temel-kaymalı.	51
Şekil 29. Temel yapıdaki doku desteklerinin SEM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp; C) PCL/HAp/PPF.....	51
Şekil 30. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin EDS spektrumları.....	52
Şekil 31. PCL doku desteklerinin mikro-BT görüntüleri A. Temel ve B. Temel kaymalı.	53
Şekil 32. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin sitotoksosite test sonuçları.	54
Şekil 33. Temel doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının zamana bağlı değişimi.	55
Şekil 34. Temel-kaymalı doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının zamana bağlı değişimi.	55
Şekil 35. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin 21. gün SEM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp.....	56
Şekil 36. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin CLSM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp (Yeşil: FITC işaretli Phalloidin ile boyanmış aktin filamentleri, Kırmızı: DRAQ5 ile boyanmış hücre çekirdeği).	57
Şekil 37. Temel-kaymalı doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının perfüzyon biyoreaktöründe zamana bağlı değişimi (Ekilen hücre sayısı: 3×10^4 /örnek).	58
Şekil 38. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin 21. gün SEM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp; C) PCL/HAp/PPF.....	59

Şekil 39. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin üzerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelerin zamana bağlı ALP aktiviteleri.	60
Şekil 40. Alizarin red ile boyanmış Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin (PCL, PCL/HAp, PCL/HAp/PPF) 1, 7 ve 14. günlerde stereo mikroskop altında çekilmiş görüntüleri.	61
Şekil 41. Defekt yaratılmış femurun fotoğrafı ve 3 boyutlu modeli.	65
Şekil 42. Kemikte matkap ile defekt yaratırken oluşan zararın MikroBT görüntüsü.	66
Şekil 43. MikroBT görüntüsüyle boşluk boyutu hesaplanması.	67
Şekil 44. Gri skala kullanılarak modelin oluşturulması.	68
Şekil 45. Modelin ekran görüntüsü.	68
Şekil 46. Modelin yazılımdaki görüntüsü.	69
Şekil 47. Defekt yaratılmış farklı kemik örnekleri ile yapılan ön denemelerden birincisine ait kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.	70
Şekil 48. İkinci deneye ait kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.	71
Şekil 49. Kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.	72
Şekil 50. Gama sterilizasyon öncesi ve sonrası A. PCL, B. PCL/HAp ve C. PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği. (Kırmızı çizgiler gama uygulanan, mavi çizgiler gama uygulanmayan örnekleri göstermektedir).	73
Şekil 51. Temel yapıdaki PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği.	74
Şekil 52. Temel kaymalı PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği.	75
Şekil 53. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin PAS-Alsiyan mavisi boyaması a) yedinci gün c) on dördüncü gün, e) yirmi birinci gün görüntüleri. (b. d ve f görüntüleri sırasıyla yedinci. on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir).	76
Şekil 54. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin Oil Red O boyası ile a) on dört gün ve c) yirmi bir gün inkübasyon sonucunda boyanmasıyla elde edilen görüntüler (b ve d görüntüleri sırasıyla on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir).	77

Şekil 55. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin von Kossa boyası ile a) yedinci gün, c) on dördüncü gün, e) yirmi birinci gün inkübasyon sonucunda boyanmasıyla elde edilen görüntüler (b, d ve f görüntüleri sırasıyla yedinci, on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir).	78
Şekil 56. Tavşan mezenkimal kök hücrelerinin büyüme eğrisi.	79
Şekil 57. Tavşandan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin histogramları ve immünofenotipik oranları.....	80
Şekil 58. PCL, PCL/HAp/PPF ve PCL/HAp üzerine ekilen hücrelerin GAPDH geni göreceli ifadesi.....	82
Şekil 59. Tavşan kemiklerinin mineral yoğunlukları. Zaman: 4 ve 8 hafta. (Kontrol: Defekt oluşturulmamış sağlam kemik).....	83
Şekil 60. Doku desteği yerleştirilmemiş tavşan kemiğini (boş defekt) ile PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş tavşan kemiklerinin 8 hafta sonundaki μ -CT görüntüleri.....	84
Şekil 61. PCL/HAp/PPF doku desteği uygulanmış kemiğin CTAn kullanılarak elde edilen katı hal modeli.....	85
Şekil 62 4 hafta sonunda çıkarılan kemiklerin Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyaması sonrası histolojik görüntüleri. FB: fibröz bağ dokusu, *: Kalın trabeküller, Ob: osteoblast hücreleri, Oc: osteoklast hücreleri, Os: osteositler.	92

ÖZET

Doku Mühendisliği, gözenekli destekler üzerinde hastanın kendi hücrelerinin kullanılmasıyla doku geliştirilmesini, hastanın defekt bölgesine bu yarı gelişmiş dokunun yerleştirilmesini, böylelikle hasarlı bölgenin etkin ve hızlı iyileşmesini hedefleyen önemli bir tedavi yöntemidir. Bu uygulamadaki önemli öge, kullanılan malzemenin biyouyumlu ve biyobozunur olmasıdır. Yeni gelişen teknolojilerin, özellikle bilgisayarlı tomografi (BT), hızlı prototipleme (HP), ya da benzeri tekniklerin implant üretiminde birlikte kullanılması ile, hastadaki defekt bölgesinin boyutlarının tam olarak tanımlanması ve ona tam uyacak üç boyutlu (3B) implant üretimi mümkün olmaktadır. Bu projede amaç, ileri teknolojilerin uygulanması ile hastanın gereksinimine cevap verebilecek ve hasar bölgesini tedavi edebilecek şekilde kişiye özel ve özgün implant üretilebilmesini sağlamaktır. Konunun özgün değeri, yeni geliştirilecek biyobozunur polimerik kompozit malzemelerin, bilgisayarlı tomografi ve hızlı prototipleme (BT+HP) teknikleri ile farklı tasarımlarda şekillendirilmesi, denek'e özgü hücreler yüklenerek doku mühendisliği ürünlerine dönüştürülmesi ve *in vivo* uygulamalar ile performansının gösterilmesi olacaktır. Projede hücre taşıyıcısı üretmek için önerilen polimerler, HP işlemesine uygun olduğu için polikaprolakton (PCL) ve polimer oluştuktan sonra çapraz bağlanma olanağı veren polipropilen fümarat (PPF) dir. Bu polimerik yapılara hidroksiapatit (HAp) katılarak farklı kompozisyonlarda kompozitler hazırlanacaktır. Dolayısıyla farklı kompozisyonlarda, BT ile tanımlanmış ve HP ile şekillenmiş, hücre tutunmasına ve büyümesine olanak sağlayan ve aynı zamanda mekanik dirence de sahip ve biyobozunur olan implantlar yapımı ve bitmiş ürün özellikleriyle özgün olacaktır. Proje sırasıyla, *in situ*, *in vitro* ve *in vivo* uygulamaları içermektedir. Bu projenin kapsamında olmamasına rağmen nihai amaç, insana özel tasarımlanmış implantların geliştirilebilmesidir. Bu proje, insan uygulamaları basamağına kadar olan çalışmaları kapsamaktadır.

Anahtar kelimeler: Ortopedik implant, doku mühendisliği, hızlı prototipleme, hastaya özel implant, bilgisayarlı tomografi.

ABSTRACT

Tissue engineering is one of the therapy methods emerging in recent years which aim effective and rapid healing by developing tissues on porous scaffolds using patient's cells and applying the partially developed tissue to the defect area. Important criteria in this application is the biocompatibility and biodegradability of the material used. Design and production of three dimensional (3D) implants that will the defect site is now possible with the combination of new technologies like computed tomography (CT), rapid prototyping (RP) or similar techniques. The aim in this project is to produce patient specific and novel implants tailored for the patient's needs to heal the damaged tissue using new advanced technologies. The novelty of the project is to design the newly developed biodegradable polymeric composite materials with the help of computed tomography and rapid prototyping (CT and RP) techniques, transform them to cell carrying tissue engineering products and show their performance in the treatment of bone diseases with *in vivo* applications. The polymers proposed to be used in the project are polycaprolactone (PCL) because of its suitability for HP processing and polypropylene fumarate (PPF) for its capability to crosslink even after the polymer is formed. Their various composites will be prepared with hydroxyapatite (HAp) in different combinations. Therefore, the implants and finished products with different compositions, defined with microCT and formed with rapid prototyping, that allow cell adhesion and growth and have appropriate mechanical properties, will be novel. The project includes sequential application of *in situ*, *in vitro* and *in vivo* tests. Although it is not a part of this project, the ultimate goal of these studies is to eventually produce implants specially designed for the patient requirements. This project covers the experimental steps including animal experiments.

Keywords: Orthopedic implant, tissue engineering, rapid prototyping, patient-specific implant, computed tomography

1. GİRİŞ

Vücudumuzun her hangi bir doku veya organında hasar oluştuğunda ve bir organımız çalışamaz hale geldiğinde mutlaka tedavi edilmesi gerekir. Ancak hasar çok büyükse, dokuyu ve organı yenilemek ve başka bir yerden alınanlar ile desteklemek gerekir. Deri ve damar gibi bir doku parçası, kişinin kendisinden ve vücudunun başka bir sağlam bölgesinden alınabilir (otogreft). Böbrek ve kornea gibi bir organ, aynı cins bir canlıdan yanı insandan ve mümkünse kişinin yakın bir akrabasından alınabilir (allogreft), veya kalpkapakçığı gibi bir organ başka tür bir canlıdan örneğin domuz gibi bir hayvandan alınabilir (ksenogreft). Ancak, bu tür canlı doku ve organ temini oldukça zordur. Kişinin kendisinde yeterli doku olmayabilir, organ bağıışı yapabilecek kişi bulunmayabilir, başkasından veya hayvanlardan elde edilen dokularda da immün sistem uyumsuzlukları yaşanabilir. Bu tür problemlere çözüm üretebilmek amacıyla uğraşan bilim insanları, 1900'lü yılların başlarında 'Doku Mühendisliği' alanını gündeme getirmişlerdir.

Doku mühendisliği, hasar görmüş veya işlevini tamamen yitirmiş doku ve organların laboratuvar koşullarında oluşturulması ve hastalarda tedavi amacıyla kullanılması ile uğraşan bir bilim dalıdır. Özellikle dokunun büyük hasar gördüğü veya fonksiyonunu tamamen yitirdiği ve de vücudun bu hasarı kendi kendine tedavi edemediği durumlarda, organı veya dokuyu desteklemek gerekir. Bu durumda kullanılan yöntem, gözenekli ve biyouyumlu bir destek içine amaca uygun hücreleri koymak ve uygun biyoajanlar ilavesi ile hücrelerin çoğalmasını sağlamaktır. Oluşturulan yapı, hastaların defektli bölgelerine implant edildiğinde biyolojik doku ile entegre olması, dokuyu veya organı tedavi etmesi beklenir.

Bu proje kapsamında amaçlanan, büyük kemik hasarlarında o bölgeyi tedavi edebilmek amacıyla doku destekleri oluşturmaktır. Gözenekli doku destekleri çok değişik teknikler ile hazırlanabilirler. Ancak, özel bir tasarım isteniyorsa, örneğin kafatası gibi belli bir yuvarlaklığı olan bir kemik dokusu oluşturulacaksa, en iyi teknik bilgisayarlı tomografi (BT) ile bölgenin görüntüsünü almak ve bu veriyi modelleyip hastadaki defekt bölgesinin boyutlarının tam olarak uyacak implantı üç boyutlu (3B) basmaktır. Bu projede, BT ile elde edilen defekt görüntüsü hızlı prototipleme (HP) tekniği ile ve biyouyumlu ve biyobozunur bir polimer olan polikaprolakton (PCL) kullanılarak 3B olarak basılmıştır. Basılan gözenekli destekler, doğal kemik yapısında bulunan ve kemiğe sağlamlığını veren hidroksiapatit (HAp) ile ve yine biyouyumlu bir polimer olan polipropilen fümarat (PPF) ile modifiye edilmiştir.

Yapılan çalışmalar bir kaç basamak halinde toplanabilir.

- İlk basamak 3B desteklerin hazırlanmasının optimizasyonunu içerir. Bu basamakta, PCL polimerinin hızlı prototipleme cihazından akış hızı ve oluşan fiberlerin organizasyonu optimize edilmiştir. Yine bu basamakta örnekler gama ışınlaması ile sterilize edilmiş ve gama ışınlamasının örneklere zarar vermediği gözlemlenmiştir.
- İkinci basamak, 3B desteklerin modifikasyonu ve karakterizasyonunu içermektedir. Bu basamakta PCL ile ve hızlı prototipleme tekniği kullanarak hazırlanan destekler, HA_p ve PPF ile kaplanmış ve her örnek taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. . Ayrıca bu örneklerde irritasyon biyouyumluluk testleri ISO kurallarına uygun olarak enjeksiyon ve implantasyon testleri ile yürütülmüştür.
- Üçüncü basamakta, 3B desteklerin *in vitro* ortamlarda biyouyumluluk testleri ISO 10993-5 standardına uygun olacak şekilde L929 insan fibroblast hücre hattı kullanılarak Alamar® hücre canlılık testi ile yapılmıştır.
- Dördüncü basamakta, 3B desteklere *in vitro* şartlarda 'tavşan iliği kök hücreleri' ekilmiş desteklerde hücrelerin farklılaşması gen düzeyinde incelenmiştir.
- Beşinci basamakta, optimize edilen destekler *in vivo* uygulamalara girmiştir. Bu amaçla, seçilen 3B destekler tavşan femurlarında belirli boyutlarda açılan defektlere yerleştirilmiştir. Dört ve sekiz hafta sonra implantlı kemikler alınmıştır.
- Son basamak, tavşanlardan alınan kemiklerin incelenmesidir ve bu basamakta kemikler hem histolojik olarak incelenmiş, hem mekanik dayanımları ölçülmüş, hem de doku rejenerasyonu mikro-BT ile analiz edilmiştir.

Projenin ana hedefi, büyük kemik hasarlarının biyouyumlu ve biyobozunur yapılar yardımı ile, hastaya özel formda hazırlanan doku destekleri ve doku mühendisliği yönteminin uygulanması ile tedavi edilmesidir. Tavşanlar üzerinde yürütülen çalışmalarda hızlı ve düzgün kemik iyileşmesinin göstermiş ve çok olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen bu veriler projenin amacına ulaştığını göstermektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Doku mühendisliği, ihtiyaç duyulan dokunun tasarımını yapar ve bu kısmın oluşturulmasında canlı hücreler ile biyouyumlu ve biyobozunur polimerik doku desteklerini kullanır (Langer ve Vacanti (2008); Kim M. ve Kim G. H. (2015); Barud vd. (2015); Yeo ve Kim (2015)). Bu yöntem genel olarak 3 ana unsuru içermektedir:

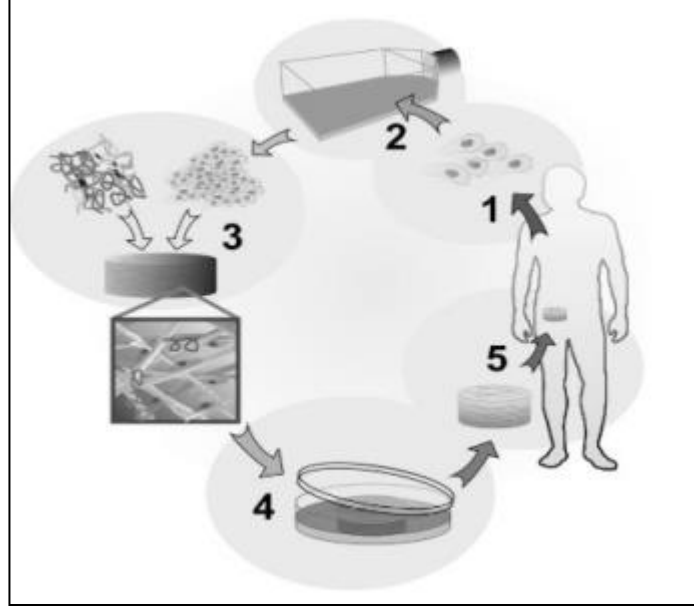
1. Hücre tutunması ve işlevselliğini koruyup destekleyen gözenekli ve biyouyumlu doku desteği,
2. Hedef dokuya uygun olarak seçilen zengin hücre kaynağı,
3. Hücrelerin büyümesi, çoğalması ve genel davranışını kontrol eden biyoaktif ajanlar ve büyüme faktörleri.

Doku mühendisliğini alt dallarından biri olan kemik doku mühendisliği ise, laboratuvar ortamında canlı ve fonksiyonel üç boyutlu kemik dokusu oluşturulmasını hedef almaktadır. Burada üzerinde durulması gereken önemli noktalar, doğal kemiğin yapısını ve rejenerasyon sürecini iyi bir şekilde taklit edebilmek ve üç boyutlu taşıyıcı üzerinde yeterli miktarda mineralize doku elde edebilmektir.

Doku mühendisliğinde izlenen basamaklar, hedef dokuya uygun olarak seçilen ve izole edilen hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılmasından sonra hedef bölgenin yapısal ve mekanik özelliklerine uygun olarak hazırlanmış biyobozunur ve gözenekli bir taşıyıcı üzerine ekilmesi, hücre kültür ortamına büyüme faktörü gibi biyolojik ajanların ekilmesi, destek üzerinde çoğalan hücreler ile laboratuvar ortamında mineralize doku elde edilmesi ve hastanın defekt bölgesine nakledilmesini içermektedir (Şekil 1).

Doku mühendisliği yönteminde, hücre kaynağı olarak primer hücreler veya kök hücreler kullanılabileceği gibi, araştırma uygulamalarında belli hücre hatları ve osteosarkom hücreleri de kullanılabilmektedir. Bunlar arasında en yoğun kullanılanlar, yüksek çoğalma ve farklılaşma yetenekleri nedeniyle, osteoprogenitör veya mezenkimal kök hücreleridir (Haynesworth vd. (1992); Yu vd. (2015)). Bu hücreler kemik iliği, adipoz doku, damar duvarı, periferik ve menstrual kan, fetal ve maternal plasenta, periodontal ligaman, periost ve trabeküler kemik gibi birçok kaynaktan izole edilebilmekle birlikte tüm bu kaynaklardan izole edilen hücreler tam olarak karakterize edilmemiştir. Kemik iliği, kök hücrelerin en yoğun bulunduğu ve en çok karakterize edilmiş kaynaktır ve uygun indüktif ajanlar varlığında yüksek osteoblasta farklılaşma özelliğine sahip hücreler kolaylıkla kemik iliğinden izole edilebilmektedir (Nefussi vd. (1997)). Bu yöntemde nihai amaç, biyobozunur malzeme belli bir hızla bozunarak ortamdaki

ayrıldıkça doğal kemik dokusunun gözenekli doku iskeleti içerisinde büyüüp gelişmesi ve doğal kemiğin implant ile yer değiştirmesidir. Doku tamamen iyileştiğinde, vücut içinde polimerik malzeme kalmayacak ve sağlam doğal doku bulunacaktır.

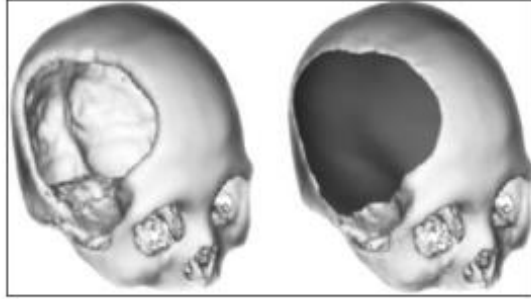


Şekil 1. Doku mühendisliği yaklaşımı. (1) Kaynak hücre izolasyonu, (2) Hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılması, (3) Hücrelerin üç boyutlu taşıyıcı yapıya ekilmesi, (4) *In vitro* kültür ve üç boyutlu yapay dokunun oluşturulması, (5) Hedef bölgeye implantasyonu.

Günümüzde ortopedik implantlar genellikle belli boyut ve şekilde üretilmekte ve üretici firma ameliyathanelere bir kaç farklı boy ve çeşidi getirmekte, doktor cerrahi operasyon sırasında hastanın defect bölgesine en uygun olanını seçmektedir. Ancak bilindiği gibi, yaş, ırk, cinsiyet gibi faktörler hasta kemiğinde değişiklikler yaratmaktadır. Doğuştan ya da travma, tümör vb. gibi nedenlerle sonradan edinilmiş kemik defektlerinin tedavisi ve bu defektlere tam uyum sağlayacak desteklerin imalatı hala çözümlenmemiş sorunlardır. Kemik dokusunda oluşan basit defektler değişik yöntemlerle kapatılabilmektedir. Ancak karmaşık durumlarda (özellikle kemik tamir kapasitesinin azaldığı durumlarda) bu uygulamalar yetersiz kalmaktadır (Basbozkurt vd. (2012); Erler vd. (2005)).

Diğer dokulardan farklı olarak, kan damarlaşmasının az olması dolayısıyla kemik dokusunun kendini tamir etmesi çok zordur. Uygulanan tedaviler ile olumlu sonuç alınsa bile, iyileşme çok uzun sürmektedir. En basit kırıkların iyileşmesi bile aylarca hatta yıllarca sürmektedir ve bu durum hastada hem sosyal hem de ekonomik olarak ciddi sorunlar yaratmaktadır. Yeni teknolojilerin uygulanması ve yeni sentezlenen ileri malzemelerin kullanımı ile ve bu

malzemelerin GMP koşullarında işlenmesi ile osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik potansiyele sahip implantlar doku mühendisliği ürünü olarak ve hastanın defekt alanına özgü hazırlanabilmektedir. Bu tür uygulamalar ile 'özel ve hastaya özgü' implantlar hazırlanabilmekte, donör morbiditesi olmadan sorunlar çözülmeye çalışılmaktadır. Femur gibi vücut ağırlığını taşıyan kemiklerde ve düzgün geometrik şekli olmayan defektlerde (örneğin kaza sonrası kafatası travması oluşması vb. gibi durumlarda) (Şekil 2) genellikle metal implantlar kullanılmaktadır ve bu implantların elektron ışınla eritimi ile hastaya özel yapıldığı bazı çalışmalar vardır (Murr vd. (2012)). Ancak, metallerin korozyona uğrama veya mekanik yük taşıma yeteneklerinin dokuya göre çok yüksek olması nedeniyle kemik erimesine yol açma gibi sorunları bulunmaktadır. Dolayısıyla, çok farklı özelliklerde hazırlanabilmeleri ve vücut ile daha uyumlu olmaları nedeni ile polimerler, 1940'lardan beri biyomedikal uygulamalarda yer almaktadır. Polimerlerin ortopedide kullanımı özellikle son yıllarda çok artmıştır. Polimer-seramik kompozitleri "yeni nesil" malzemeler olarak diş hekimliğinde kullanılmakla birlikte ortopedideki uygulamaları henüz sınırlıdır (Hao vd. (2009)).

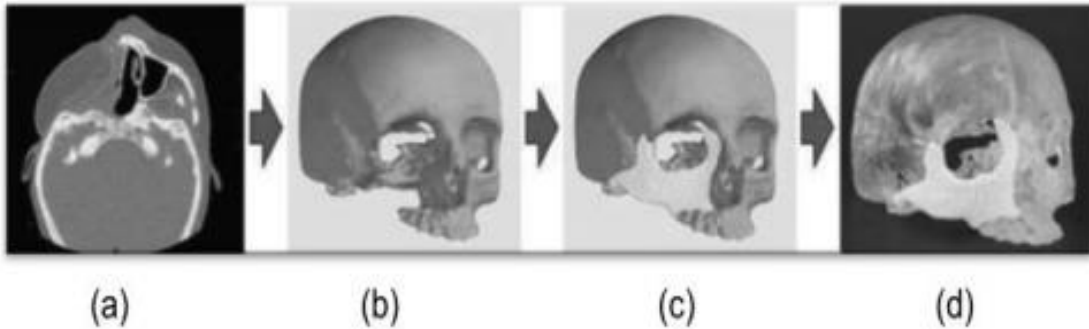


Şekil 2. Standart olmayan kafatası defekti.

Doku destek sistemlerinin sahip olması gereken bazı özellikler hücrelerin destek yüzeyine bağlanmasını sağlayacak biyoaktiflik, hücrelerin destek içinde çoğalmalarını sağlayabilecek, birbirine geçişli gözeneklerin varlığı, istenilen biyobozunma kinetiğine sahiplik ve mekanik güç uygunluğudur (Wettergreen vd. (2005); Kaji vd. (2011)). Karmaşık üç-boyutlu (3B) ve gözenekli yapıların gözenek boyut dağılımının homojenliği ve gözeneklilik düzeyleri, liyofilizasyon, tuz çıkarma ve eritip-kalıplama gibi konvansiyonel yöntemler ile kontrol edilememektedir. Bu yollarla üretilen desteklerde, gözenek düzensizliği ve gözenekler arasında bağlantısızlık sonucu hücrelerin destek içine girememesi, belli noktalarda yuvalanmalar oluşması ve destek içi ve dışı arasında besin ve atık madde difüzyonunun kısıtlı olması önemli sorunlardır. Bu olumsuzlukları engelleyebilmek ancak önceden tasarımı yapılmış ve gözenek şekli ve boyutu belli desteklerin hazırlanması ile mümkündür.

2000'li yıllarda, gözenek boyutunu kontrol edebilen, istenilen büyüklükte gözeneklere ve istenilen iç mimari yapıya sahip desteklerin 3B hazırlanmasını, önceden planlanan tasarıma göre sağlayan 'mikrofabrikasyon' yöntemleri gündeme gelmiştir (Yilgor vd. (2010); Baran vd. (2011); Malinauskas vd. (2015)). Doku desteği hazırlamakta bilgisayar destekli hızlı prototipleme teknolojisi kullanılması yukarıda belirtilen geleneksel yöntemlere göre önemli üstünlüklere sahiptir. İstenilen boyutta ve birbirine geçişli gözenekli yapının hazırlanabilmesi, besin ve metabolik atığın transferindeki kısıtlılığın kaldırılması, kontrollü ve hassas şekilde dokuya ve hastaya özel implant mimarisinin oluşturulması, hızlı prototipleme tekniğinin getirdiği avantajlardır. Bu teknik ile, bilgisayar destekli üretim (CAM) teknolojisini kullanarak, ardışık katmanlar şeklinde ayarlanabilir, mikro ve makro düzeyli ögelere sahip üç boyutlu destek mimarisi oluşturmak mümkün olmaktadır (Şekil 3).

Hızlı prototipleme tekniği, doku mühendisliği alanında, hücrelerin yüzeyini ve içini tamamen kaplayacak biçimde gelişimine olanak veren 3B gözenekli doku desteklerinin üretilmesinde kullanılmaktadır (Yeong vd. (2004); Sun vd. (2005); Wettergreen vd. (2005); Song vd. (2015); Roh vd. (2015); Kutikov vd. (2015)). İşleyebildikleri malzeme türüne ve işlem mekanizmasına bağlı olarak hızlı prototiplemenin değişik teknikleri geliştirilmiştir. Bunların içinde, kaynaşmış birikim (fused deposition), katman-katman üretim (layer-by-layer), elektron ışınıyla eritme (electron beam melting) ve seçici lazer sinterlemesi (selective laser sintering) sayılabilir. Özellikle, biyoyazıcı (bioprinter) kullanarak uygulanan baskılama tekniği, oluşturduğu kontrollü gözenekli yapılar ile doku mühendisliği alanında önemli bir potansiyele sahiptir (Utela vd. (2008)).



Şekil 3. Hızlı prototipleme yöntemi ile kişiye özel doku destekleri oluşturulması. (a) CT, MRI taramaların yapılması, (b) Defekt yapısının belirlenmesi, (c) Defekte tam uyum sağlayacak destek yapısının bilgisayar modelinin geliştirilmesi, (d) hızlı prototipleme yöntemiyle hedef bölgeye tam uyum sağlayacak destek malzemesinin hazırlanması.

3B baskı yönteminde, sayısallaştırılmış bir biyolojik doku görüntüsü veya bilgisayar yazılımı ile oluşturulmuş sanal doku modelleri kullanılarak ya toz halindeki malzemeye X-Y düzleminde bağlayıcı sıvı püskürtülmesiyle katmanlar olarak oluşturulur, ya da erimiş haldeki polimerin fiberler şeklinde çöktürülmesi ile doku desteği oluşturulur (Butscher vd. (2011)).

Tipik bir hızlı prototipleme cihazında, 3B yapı, mikron boyutta fiberlerin katmanlar halinde ve düzenli bir şekilde birbiri üzerine getirilmeleri ve belli bir tasarım çerçevesinde zemine uygulanan sıcak fiberlerin soğuyarak birbirine yapışması ve sertleşmesiyle oluşur (Melchels vd. (2010)). Diğer bir uygulama yöntemi ise, erimiş ya da çözünmüş polimerin çöktürücü ortamına aktarılması ve katılaşması ile 3B yapının oluşmasıdır (Khalil ve Sun, (2007)). Enjekte edilen malzeme, iğne ucundan çıkarken içine enjekte edildiği çöktürücü sıvı nedeniyle bir önceki katman üzerinde katlaşır. Ayrıca, çok başlıklı enjektör sistemleri ve farklı polimer karışımları ile birlikte biyoaktif ajanların ve canlı hücrelerin yapıya katılması konularında araştırmalar sürmektedir (Wust vd. (2011)).

Bilgisayarlı tomografi (BT) ve hızlı prototipleme (HP) teknolojilerindeki gelişmeler doku mühendisliğinde ve özellikle ortopedide, kemik dokusu kayıpları ve büyük boyutlu kırıklarda rastlanan komplikasyonların giderilmesinde önemli fırsatlar sunmaktadır. BT taraması ile defekt bölgesinin haritalanması hassas olarak yapılabilen ve elde edilen sanal görüntü hızlı prototipleme cihazına aktarılabilir. Hasarlı bölgeye tam uyacak boyut ve biçimde oluşturulan doku desteği, hastaya uygulandığında defekt bölgesini boşluk bırakmayacak bir biçimde kapatarak dokunun işlevine uygun fiziksel ve biyolojik destek görevini üstlenecektir. Hastaya özel kemik implantı çalışmalarında, polyesterler, biyobozunur polimerler, polimer-seramik kompozitleri ve metal (örneğin titanyum) implantlar, gerek kozmetik gerekse fiziksel destek sağlama amacıyla araştırılmıştır (Heissler vd. (1998); Brie vd. (2012); Staffa vd. (2012); Matsuo vd. (2012)). Ancak, bazı implantların canlı kemik dokusu ile tam kaynaşamadığı, zamanla yabancı cisim reaksiyonlarına yol açtıkları ve komplikasyon yarattıkları belirtilmiş ve uygulamalardan çıkartılmışlardır.

Biyobozunur polimerler içinde poli(laktik asit) (PLA) ve poli(laktik-glikolik asit) (PLGA) kemik plakalarının yapımında klinik uygulamalara giren ilk polimerler olmuştur. Son yıllarda, erime sıcaklığının düşük olması ve işlenebilme kolaylıklarından dolayı polikaprolakton (PCL) 3B destek hazırlanmasında önem kazanmıştır. Ayrıca, PCL kullanılarak üretilen bazı sistemlerin insanlarda uygulanması, Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bunlar

içinde 'Monocri' ameliyat iplikleri (Ethicon, 2007), 'capronor' doğum kontrol ilacı salımı yapan çubuklar (Maquet vd., (2008)) ve 'SynBiosys' ilaç salım kürecikleri (Hissink vd., (2005)) en yaygın bilinenleridir.

Literatürde, PCL polimeri kaprolaktondiöl monomerinden başlayarak farklı teknikler ile sentezlenmiş ve hazırlanan polimeri kullanarak ve değişik metotlar uygulayarak doku destekleri yapılmıştır. Williams vd., lazer sinterleme tekniği kullanarak PCL destekler hazırlamışlar ve bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) ile yüklenmişlerdir. Bu çalışmada, insan gingival fibroblast hücrelerinin yapı içinde çoğalıp geliştikleri ve doku oluşumunun hızlandığı, ancak, tüm desteklerin mekanik gücünün doğal dokuya göre çok düşük olduğu rapor edilmiştir (Williams vd. (2005)). Üç boyutlu ve istenilen gözeneklilikte polikaprolakton destekler programlanarak ekstrüzyon tekniği ile yapılandırılabilir (Domingos vd. (2009)).

PCL'in önemli özelliklerinden biri de, ameliyatlarda perde görevi görmesi ve abdominal uygulamalarda dokular arası yapışmayı önleyici olmasıdır (Lo vd. (2010)). Polimer-seramik kompozitlerin özellikle diş ve ortopedi hekimliğinde kullanıldığı ve doku iyileşmesini artırdığı gözlenmiş olsa da, biyouyumluluğu ve vücut iç özellikleri doğal dokuya daha yakın olacak daha mükemmel malzeme ve kompozisyon arayışları halen devam etmektedir.

Hidroksiapatit (HAp) tanecikleri üzerine PCL kaplamasının iki ayrı teknik ile (karışım ve aşılama) yapıldığı çalışmalarda, su alım ve biyobozumun dereceleri incelendiğinde, karışım yapılmış olanların mekanik güçlerinin kuru ve ıslak formlar arasında çok fark gösterdiği ve aşılama yapılmış olanlara göre daha düşük değerlerde olduğu rapor edilmiştir (Azevedo vd. (2003)). HAp taneciklerinin farklı molekül ağırlığındaki PCL'e eklenmesi ile yapılan kompozitlerin, saf PCL'e kıyasla daha hızlı bozunmaya uğradığı ve bunun da kristal yapının bozunması nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Kim (2007)). Termal başlatıcılı faz ayırımı tekniği ile oluşturulan PCL desteklerde, nano HAp taneciklerinin eklenmesi ile gözenek boyutunun ve gözenekliliğin azaldığı, mekanik özelliklerin iyileştiği (Sultana ve Hayat (2013)), PCL içine HAp eklenmesi ile, kök hücrelerin osteojenik farklılaştırma gösterdikleri ve kemik dokusu oluşturdukları (Chuenjitkuntaworn vd. (2010)) literatürde belirtilmiştir.

Biyomedikal uygulamalarda, polipropilen fümarat (PPF) kullanımı da son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır. PPF'in etilen glikol ile oluşturdukları kopolimerlerinin kemik çimentosunda kullanımı, kevlar ve hidroksiapatit ilavesi ile mekanik gücünün artırılması (Jayabalan vd. (2000)), elastin ile yaptığı kopolimerlerin vasküler graft olarak kullanımı (Scaglione vd. (2013)) bu uygulamalara örnek gösterilebilir. PPF ile yapılan destekler üzerine nano ve mikron

boyutlarda eklenen HAp taneciklerinin etkileri, ratların tibiasında oluşturulan defektler üzerinde denenmiştir. Sonuç olarak, nano-HAp içeren desteklerin kemik iyileşmesini daha hızlı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Lewandrowski vd. (2003)).

Yukarıda da belirtildiği gibi PCL ve HAp literatürde belirtilen ve biyomedikal uygulamalar için destek oluşturmak amacıyla çok çalışılan, Amerikan Gıda ve İlaç Komisyonu (FDA) tarafından onaylanmış malzemelerdir. Yukarıda belirtildiği gibi, 2000'li yılların başlarında önem kazanmış olan ve malzeme geliştirilmesi üzerine yoğunlaşan çalışmalar devam etmektedir. Malzeme kompozisyonu ve HAp taneciklerinin boyutlarının yapıya etkisi gibi parametreler halen incelenmektedir. Polimerik kompozitlerde sadece malzemenin kimyası değil, onun molekül ağırlığı, kristal yapısı, kompozisyona eklenen diğer malzemeler ile oluşturacağı bağların gücü gibi pek çok etken ürünün özelliklerini etkilemekte ve çok değişken sonuçlar oluşturabilmektedir.

Bu proje kapsamında, hızlı prototipleme yöntemi ile işlenebilecek PCL (polikaprolakton) ve PPF (polipropilenfümarat) gibi polimerler ve onların HAp (hidroksi apatit) ve TCP (trikalsiyum fosfat) ile kompozitlerinin hazırlanması ve doku mühendisliği yöntemi ile kemik dokusuna dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için, polimer sentezi yapılmış, değişik kompozisyonlarda 3B doku destekleri ıslak eğirme ve hızlı prototipleme yöntemleri ile oluşturulmuştur.

Desteklerin hazırlanmasında kullanılacak parametreler (ıslak eğirmede konsantrasyon ve akış hızı, hızlı prototiplemede polimer erime sıcaklığı, polimer eriyiğinin akış hızı ve fiber katmanlarının düzeni) optimize edilmiştir. Hazırlanan desteklerin, fiziksel ve kimyasal analizleri yapılmıştır. Yüzeyleri hidroksi apatit ve polipropilen fümarat ile modifiye edilen üç boyutlu gözenekli desteklerin hücreler ile etkileşimi in vitro ortamda hücre kültürü yapılarak incelenmiştir. In vivo biyoyumluluk ve irritasyon testleri, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM)'da deri altı enjeksiyon ve implantasyon testleri ile yürütülmüştür. Gama sterilizasyon ışımalarının örneklerin mekanik özelliklerinde etkisi incelenmiştir. In vitro koşullarda tavşan mezenkimal kök hücreleri ile muamele edilen örneklerde ayrıca kök hücrelerin farklılaşması gen düzeyinde incelenmiştir. Optimize edilen örnekler, hücreli ve hücreli olarak tavşan femurlarında açılan defektlere yerleştirilmiş, 4. ve 8. hafta sonunda kemikler alınmıştır. Bu kemik örneklerinde, mikro-bilgisayarlı tomografi ile implant-doku bağlanması ve kemik yoğunluğu ölçülmüş, mekanik deneyler ile kemiklerin sağlamlık düzeyi analiz edilmiş, ve histolojik olarak doku gelişimi incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

Bu çalışmada 3B destekler ıslak eğirme ve hızlı prototipleme yöntemleri kullanılarak hazırlanmış ve kurutma işlemlerinde liyofilizatör kullanılmıştır. Desteklerin spektroskopik, mekanik analizleri yapılmış ve mikro-bilgisayarlı tomografi cihazı ile üç boyutlu yapıları incelenmiştir.

Projede ayrıca, hem desteklerin hazırlanmasında polimerler, hem *in vitro* deneylerin yürütülmesinde hücre kültür ortamları, hem gen analizleri için gerekli kimyasallar, hem de *in vivo* operasyonları sırasında gerekli ilaçlar kullanılmıştır.

Proje kapsamında kullanılan cihazlar ve cihaz markaları Tablo 1’de, kimyasallar ve bu kimyasalların alındığı firmalar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Projede kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Marka
Bioscaffolder	SYS+ENG
Spektrofotometre	Molecular Devices
Döner buharlaştırıcı	Bibby Sterilin RE-100
Mikro-BT	Bruker
Mekanik Test Cihazı	Shimadzu
Liyofilizatör	Labconco

Tablo 2. Projede kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Firma
Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)	Sigma Aldrich
Hidroksiapatit (HAp)	Sigma Aldrich
Fumarik asit	Sigma Aldrich
Propilen glikol	Sigma Aldrich
p-toluen sulfonik asit	Sigma Aldrich
Hidrokinon	Sigma Aldrich
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich
Dietil eter	Sigma Aldrich
Aseton	Sigma Aldrich
Ethanol	Sigma Aldrich
Formaldehit	Sigma Aldrich
Gluteraldehit	Sigma Aldrich
Parafin	Sigma Aldrich
Hematoksilin	Sigma Aldrich
Eozin	Sigma Aldrich
Fosfotungstik asit	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich
ALP Kiti	Millipore
Alamar Blue	Invitrogen
DMEM	Lonza
Dimetil sülfoksit	Calbiochem
Penisilin/Streptomisin	Lonza
Ethanol	Sigma Aldrich
Formaldehit	Sigma Aldrich
Gluteraldehit	Sigma Aldrich
Parafin	Sigma Aldrich
Hematoksilin	Sigma Aldrich
Eozin	Sigma Aldrich
Fosfotungstik asit	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich
ALP Kiti	Millipore
Alamar Blue	Invitrogen
DMEM	Lonza
Dimetil sülfoksit	Calbiochem
Penisilin/Streptomisin	Lonza
Alizarin Red	Cyagen Biosciences
FITC işaretli-Phalloidin	Sigma Aldrich
DRAQ5	Sigma Aldrich

3.2. Yöntemler

Bu proje kapsamında malzeme sentezinden başlayarak doku desteklerinin hazırlanması, modifiye edilmesi, karakterizasyonu, *in vitro* hücre testleri ve tavşan femurlarında *in vivo* uygulamaları yapılmıştır. Uygulanan yöntemler aşağıda açıklanmaktadır.

3.2.1. Üç Boyutlu Doku Desteklerinin Hazırlanması

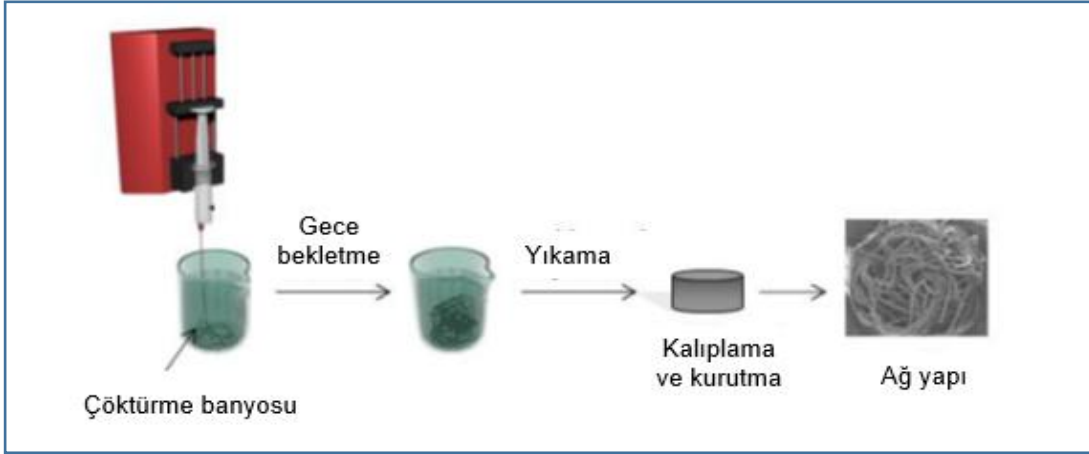
Projenin amacına uygun olarak üretilecek doku destekleri, hızlı prototipleme yöntemi ile hazırlanmadan önce, uygun kayganlık ve işlenebilme özelliklerini saptayabilmek, optimum PCL ve TCP oranlarını belirleyebilmek amacıyla ıslak eğirme yöntemiyle üretilmiştir. Farklı PCL ve TCP oranlarında hazırlanan karışımlardan ıslak eğirme yöntemiyle hazırlanan lifli doku desteklerinin mekanik özellikleri incelenmiştir. En iyi lif oluşturan ve TCP ile en homojen karışım sağlayan PCL kompozisyonunun seçilerek hızlı prototipleme cihazında kullanılması planlanmıştır.

3.2.1.1. Islak Eğirme Yöntemi ile Doku Desteklerinin Hazırlanması

Islak eğirme, yoğun ve akışkanlığı az olan polimer çözeltisinden fiber elde etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte şırıngaya doldurulan polimer çözeltisi, şırınga pompası yardımıyla daha önce belirlenen sabit hızda iğneden geçirilerek, polimeri çözmeyen çöktürme ortamına akıtılır. Polimer çözeltisi çöktürme ortamına enjekte edilirken, polimer çözeltisi ve koagülan (çöktürücü) arasındaki kimyasal reaksiyon sonucu veya çözücü ve çöktürücünün fiziksel olarak yer değiştirmesi sonucu polimer fiber şeklinde katılaşır ve çöker. Polimer fiberin katılaşması, çöktürücünün difüzyonu devam ederken dış katmandan iç katmana doğru ilerler. Bu nedenle, ıslak eğirme tekniğinde fiber oluşma hızını çöktürücü sıvının difüzyon hızı belirler. Elde edilen fiberlerin özelliklerini çöktürme ortamı, konsantrasyonu, çöktürme ortamında bekletme süresi gibi eğirme koşulları etkiler. Fiberlerin boyutu, farklı çapta iğne ucu kullanılarak ayarlanabildiği gibi pompa hızını değiştirerek de ayarlanabilmektedir. Islak eğirme yöntemiyle elde edilen fiberler genellikle 100 µm-200 µm boyutlarındadır (Demirbag vd. (2011)). Şırınga pompasının hızı düşürülerek 10 µm-30 µm çaplarında fiberlerin elde edildiği de literatürde belirtilmiştir (Zhang vd. (2014)).

Bu çalışmada, ıslak eğirme yöntemi ile PCL fiber elde etmek için öncelikle aseton içerisinde %20'lik PCL çözeltisi 50-60°C sıcaklık uygulanarak hazırlanmıştır. PCL/TCP fiber üretmek için PCL içine polimer ağırlığının %10 veya %20'si kadar TCP eklenmiştir. Islak eğirme yapmadan önce polimer çözeltisi içerisindeki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla 5-10 dakika

ultrasonik banyoda tutulmuştur. Ardından, hazırlanan polimer çözeltisi cam şırınga içine alınmıştır. Cam şırıngadan çözeltiyi belli bir hızda ve boyutta enjekte etmek için otomatik pompa (New Era Pump Systems NE-300, ABD) ve metal iğne uçları (Hamilton HAM-91023, İsviçre) kullanılmıştır. PCL/TCP çözeltisi, 4°C'de tutulmuş etanol çöktürme ortamına ince uçlu şırıngadan akıtılmıştır. Islak eğirme sistemi ile hazırlanan destekler, pompanın dikey şekilde tutularak şırıngadan çıkan polimer çözeltisinin etanole akıtılması yoluyla ve fiberlerin toplanması ile yapılmıştır (Şekil 4).



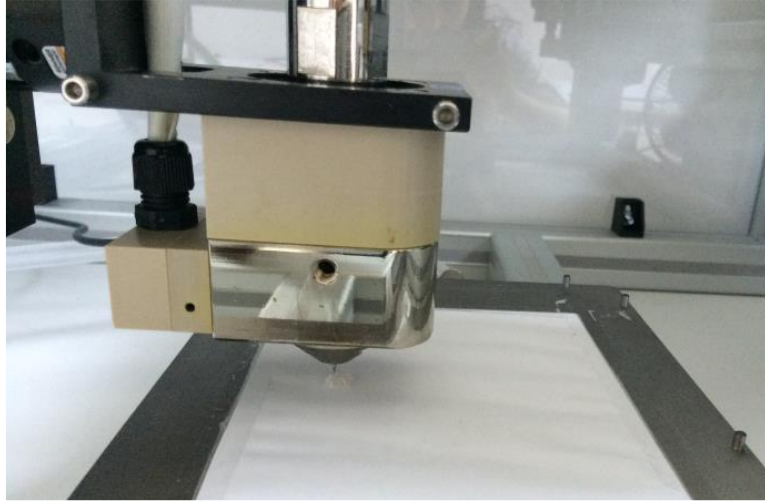
Şekil 4. Islak eğirme sistemi ile doku desteği eldesi.

Sistem, iğne ucu 3-5 mm etanol içinde olacak şekilde yerleştirilmiştir. Pompa hızı, 1 mL/saat olarak ayarlanmıştır. İğne ucundan polimer çözeltisi akmaya başladıktan itibaren, etanol içeren beher, oluşan fiberlerin üst üste gelmesini engellemek ve çözelti içinde homojen dağılımını sağlamak amacıyla devamlı olarak sabit bir hızda döndürülmüştür. Her doku desteği 750 µL polimer çözeltisi kullanılarak üretilmiştir. Oluşan ıslak eğrilmiş fiberler, polimer içinde kalmış olabilecek asetonu uzaklaştırmak ve fiberleri sertleştirmek amacıyla 24 saat saf etanol içinde 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra fiberler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından, kurumuş fiberler 5 mm yükseklikte ve 10 mm çapında silindirik şekilde hazneleri olan teflon kalıplar içine yerleştirilmiştir ve karakterizasyon analizlerinde kullanılmıştır.

Islak eğirme ile hazırlanan tüm doku destek yapılarının morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiştir. Örnekler alüminyum örnek tutuculara yerleştirilmiş ve 5 nm kalınlıkta altın/paladyum ile kaplanmıştır.

3.2.1.2. Hızlı Prototipleme Yöntemi ile 3B Doku Desteklerinin Hazırlanması

3B PCL doku destekleri Bioscaffolder® (SYS+ENG, Germany) kullanılarak üretilmiştir (Şekil 5). Bu üretim için PCL 3B yazıcının kartuşuna koyulmuş ve polimerin erimesi için sıcaklık ünitesi 170°C'ye ayarlanmıştır. Üretilen doku desteği modeline ait sayısal veriler sisteme tanımlanmıştır. Polimer tamamen eridikten sonra iç çapı 210 µm olan paslanmaz çelik iğneden çıkarılarak 3B doku desteği üretilmiştir.

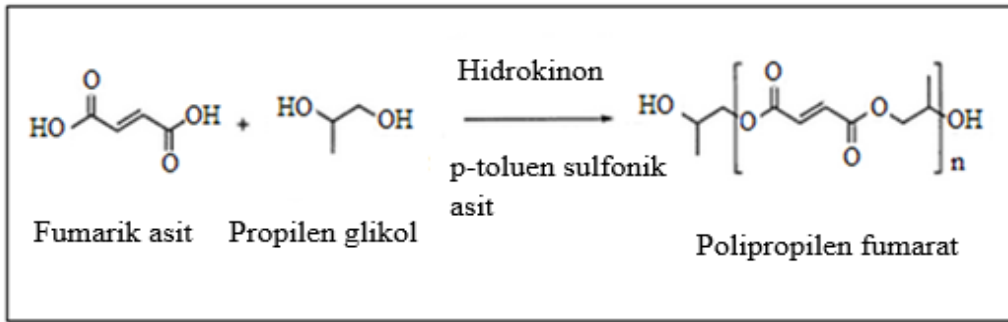


Şekil 5. Hızlı prototipleme yöntemi ile 3B destek hazırlanması.

3B desteklerin hızlı prototipleme yöntemi ile üretilmesinde ve optimizasyon çalışmalarında 'Temel' tasarımlı PCL yapıları hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları için 5 ve 10 katmanlı örnekler x-y doğrultusunda farklı hızlar (150, 200, 250, 300 ve 350 mm/s) denenerek üretilmiş ve enjektörün hareket hızının örnek yapısına etkisi incelenmiştir. 3B PCL doku destekleri, fiber katmanları arasında 90°'lik açı olacak şekilde, Temel ve Temel-kaymalı tasarımlarda üretilmiştir. Temel-kaymalı yapılarda ikinci katman birinciye göre 90° açılı, üçüncü katman birinciye göre belli bir uzaklıkta kaymalı hazırlanmıştır. Temel kaymalı yapılarda optimum kayma uzaklıklarının belirlenmesi amacıyla farklı kayma uzaklıkları (0,50; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10 mm) denenmiştir.

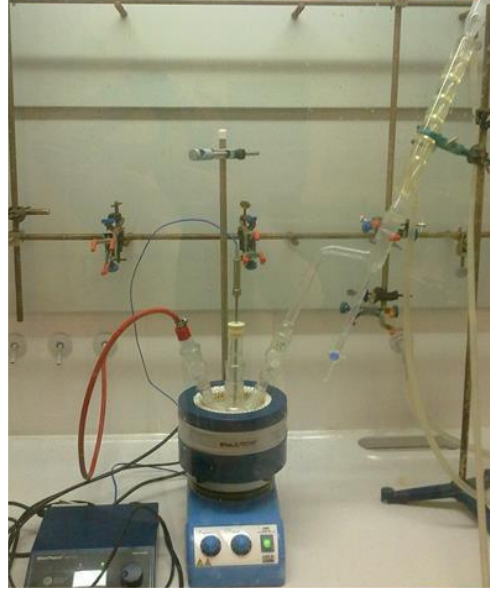
3.2.2. PPF Sentezi ve Karakterizasyonu

Elde edilen Temel ve Temel-kaymalı PCL doku desteklerine nano hidroksiapatit (HAp) ve polipropilen fumarat (PPF) eklenerek farklı kompozisyonlarda (PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF) doku destekleri üretilmiştir. Bu amaç için öncelikle PPF sentezi yapılmıştır. Polipropilen fumarat sentez reaksiyonu, fumarik asit ve propilen glikol arasında oluşan bir kondenzasyon reaksiyonudur (Şekil 6). Bu reaksiyonda kullanılan sitokiyometrik fumarik asit/propilen glikol mol oranı, 1.50:1.65 dir. Polimerizasyon reaksiyonunda, radikal inhibitör olarak ağırlıkça %0,1 oranında hidrokinon ve katalist olarak ağırlıkça %0,4 oranında p-toluen sulfonik asit kullanılmıştır.



Şekil 6. Polipropilen fumarat sentez reaksiyonu.

Polipropilen fumarat sentezi için Şekil 7’de gösterilen deney düzeneği kurulmuştur. Sentez işlemi, 3 boyunlu, yuvarlak dipli ve içinden devamlı azot geçişi olan reaksiyon kabında yürütülmüştür. Toplam hacmi 500 mL olan reaksiyon kabına 125,5 g polipropilen glikol ve 174,1 g fumarik asit konulmuş, daha sonra 0,12 g p-toluen sulfonik asit ve 0.29 g hidrokinon bu karışıma eklenmiştir. Sistem 145°C’ye ısıtılmış ve tüm reaksiyon boyunca içinden devamlı azot geçişi sağlanmıştır. Elde edilen karışım 100-150 rpm karıştırma hızı ile 3 saat karıştırılmış ve daha sonra ortam sıcaklığı 145°C’den 180°C’ye çıkarılmıştır. Yoğunlaşan çözelti aynı hızda 1 saat daha karıştırılmıştır. Bir saatin sonunda, reaksiyon kabında bulunan karışım, daha ileri polimerizasyonu önlemek amacıyla oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda yan ürün olarak su toplanmıştır. Sentezlenen polipropilen fumarat daha sonra saflaştırma işleminden geçirilmiştir.



Şekil 7. Polipropilen fümaraat sentez düzeneği.

Saflaştırma işlemi için, öncelikle oda sıcaklığında çok viskoz olan PPF, viskozitesini azaltmak amacıyla 130°C'ye ısıtılmış ve bir erlene aktarılmıştır. Polimer karışımı 150 mL diklorometan içinde çözülmüş ve reaksiyona girmemiş fumarik asit moleküllerinin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla vakum filtrasyonu uygulanmıştır. Vakum filtrasyonundan sonra elde edilen PPF karışımı, hacimca 20:80 oranında ve toplam olarak 100 mL olan metanol:su karışımı ile ayırma hunisi (separatory funnel) içinde yıkanmıştır. Faz ayırımı tamamlandığında, üstte su fazı altta PPF çözeltisi oluşmuş ve PPF bir erlene alınmıştır. Çözelti içinde kalabilecek olan suyun ortamdan uzaklaştırılması amacı ile ortama granüler kalsiyum klorür (CaCl_2) eklenmiştir. Daha sonra CaCl_2 parçacıklarını ayırmak için vakum filtrasyonu uygulanmıştır. Elde edilen PPF çözeltisi diklorometanın uzaklaştırılması için rotary evaporator cihazına konulmuştur. Bu aşamadan sonra 150 mL dietil eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) PPF çözeltisine eklenmiş ve faz ayırımından sonra dietil eter fazındaki PPF alınıp, döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) cihazı ile dietil eter ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak 150 mL aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) PPF ürününe eklenmiş ve daha sonra çözelti yine döner buharlaştırıcı içine konularak asetonun ortamdan ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen PPF içine belirli oranlara HAp eklenerek PCL doku destekleri üzerine kaplanmış ve değişik kompozit doku destekleri hazırlanmıştır.

Sentezlenen PPF'in karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. PPF'in molekül ağırlığı Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile belirlenmiştir ve molekül yapısı Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile incelenmiştir.

3.2.3. Üç Boyutlu Kompozit Doku Desteklerinin Hazırlanması

Projenin ilk basamaklarında ıslak eğirme metodu ile hazırlanan doku desteklerinde en iyi işlenebilirlik ve mekanik özellik, %20 TCP içeren PCL doku desteklerinde görülmüş ve hızlı prototiplemede bu oran kullanılarak PCL/HAp üretilmesine karar verilmiştir. Ancak, bu oranda kullanılan HAp'ın hızlı prototiplemede kullanılan iğne ucunu tıkadığı gözlemlenmiş ve kompozit yapıların hazırlanmasında HAp ilavesi ile modifikasyonu sonradan yapılmıştır. Bu amaç için, 3B hazırlanan PCL destekler HAp çözeltisine daldırılmış ve PCL üzerine HAp kaplanması sağlanmıştır. PCL/HAp kompozisyonundaki doku desteklerinin üretimi için HAp, Diklorometan:Aseton (20:80 mL/mL) karışımı içinde homojen olarak dağıtılmış, hızlı prototipleme ile hazırlanan PCL doku destekleri bu çözeltiliye daldırılmış, daldırıp-çıkarma ve çözücü uçurma yöntemi ile HAp'ın örnekler üzerine kaplanması sağlanmıştır. PCL/HAp/PPF kompozisyonunun hazırlanmasında ise PCL/HAp destekleri üzerine PPF kaplanmıştır. PPF'in doku destekleri üzerinde kararlı kalmasını sağlamak amacıyla farklı şekillerde çapraz bağlama çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla, etilenglikol dimetilakrilat (EGDMA), iki farklı başlatıcı (benzoilperoksit (BPO) ve izobisazobütiro nitril (AIBN)) ile denenmiş, ayrıca PPF'in Irgacure ile çapraz bağlanma çalışması yapılmıştır. Çapraz bağlama çalışmalarında kullanılan yöntemler ve kullanılan malzemelerin oranları aşağıda belirtilmiştir.

1. PPF/BPO/EGDMA (89/1/10, g/g)
2. PPF/AIBN/EGDMA (89/1/10, g/g)
3. PPF/Irgacure 2959 (99/1, g/g)

BPO ve AIBN termal başlatıcılardır. Bu nedenle 1 ve 2 numaralı örnekler 50°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda örnekler fırından çıkarıldığında çapraz bağlanmanın başladığı ancak PPF polimerizasyonunun tamamlanmadığı görülmüştür. Irgacure 2959 içeren örneklere 15'er dakikalık aralıklar ile toplamda 90 dakika UV (365 nm, 15 cm uzaklık, 0.120 Joule/cm²) uygulanmıştır. Örnekler her 15 dakikanın sonunda kontrol edilmiştir ve 45. dakikadan itibaren viskozitenin arttığı, çapraz bağlanmanın ilerlediği ve 90. dakikanın sonunda PPF'in oldukça sertleştiği görülmüştür. Ancak, kür süresini 90 dakikanın altına çekebilmek amacıyla, ortama farklı oranlarda (%3, 5, 7 ve 10 g/g) Irgacure 2959 eklenerek deneyler tekrarlanmıştır. Bu denemelerin sonucunda %5 Irgacure 2959 içeren örneğin çapraz bağlanmasının 30 dakikada gerçekleştiği görülmüştür.

HAp içeren ve PPF kaplı doku desteklerinin (PCL/HAp/PPF) hazırlanmasında, PPF aseton içinde çözülmüş (PPF:Aseton=50:50 g/g) çözelti içine %5 oranında HAp ve %5 oranında Irgacure 2959 eklenmiştir. Hızlı prototipleme ile üretilen PCL doku destekleri bu çözeltinin içine daldırıp çıkartılarak 30 dakika boyunca UV (365 nm, 15 cm uzaklık, 0.120 Joule/cm²) ile kür edilmiştir.

3.2.4. Üç Boyutlu Kompozit Doku Desteklerinin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

Hızlı prototipleme ile hazırlanan tüm doku destek yapılarının morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiştir. SEM analizi için bütün örnekler alüminyum örnek tutuculara yerleştirilmiş ve 5 nm kalınlıkta altın/paladyum ile kaplanmıştır. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destek yapılarının kimyasal yapıları, Taramalı Elektron Mikroskopuna bağlı Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS) (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiştir.

Temel ve temel-kaymalı PCL doku destekleri Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT) ile taranmış ve gözenekliliği hesaplanmıştır. Üretilen 3B yapılar Mikro BT cihazında 11 µ/Piksel boyutunda görüntülenmiştir. Görüntüleme sırasında alüminyum filtre kullanılmış, her görüntü 150 milisaniye pozlanarak ve her görüntü gürültüyü azaltmak amacıyla 3 kez pozlanmış ve birleştirilmiştir. Örnek 360° boyunca 0.7° çevrilerek taranmıştır. Gözenek hesaplaması CTAn programı yardımıyla yapılmıştır.

3.2.5. *In vitro* Sitotoksikite Testi

Hızlı Prototipleme Sistemi (BIOSCAFFOLDER®) kullanılarak üretilen doku desteklerinin *in vitro* biyouyumluluk testleri ISO 10993-5 standardına uygun olacak şekilde L929 insan fibroblast hücre hattı kullanılarak Alamar® hücre canlılık testi ile yapılmıştır. Alamar® hücre canlılık testi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem Alamar boyasının içerdiği resazurin indikatörünün, hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesi sonucu indirgenmesi ile saptanabilir bir renk değişimi olması ve bu değişimin spektrofotometre kullanılarak belirlenebilmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin hücrelerden geçebilen ve toksik olmayan bir indikatördür.

In vitro biyouyumluluk deneyleri ISO 10993-5 standartında belirtilen ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Doku desteklerinin her iki yüzeyine 15 dakika süreyle UV sterilizasyonu uygulanmıştır. Üretilen silindirik doku desteklerinin yüzey alanları (r =10 mm, h: 2.5 mm)

yaklaşık olarak 7.85 cm² olarak hesaplanmış ve ISO 10993-5 standartında belirtilen koşullara göre (1.25 cm²'lik yüzey alanı için 1 mL ekstraksiyon ortamı) her bir doku desteği 6.30 mL ekstraksiyon ortamında 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Doku desteklerinin ekstraksiyonu için yine aynı standarda göre uygun olan DMEM-High medium (%90 DMEM, %10 FBS, 100 IU/mL penisilin/streptomisin) kullanılmıştır. L929 hücreleri 30,000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilerek 24 saat boyunca CO₂ inkübatöründe (37°C, 5% CO₂) tutulmuştur. 24 saat sonunda, hücreler steril PBS (10 mM, pH 7.4) ile yıkanarak üzerlerine 1 mL ekstraksiyon sıvısı eklenmiş ve yine 24 saat boyunca CO₂ inkübatöründe (37°C, 5% CO₂) tutulmuştur. Kontrol grubu için hücre kültür kabına aynı sayıda hücre ekilmiş ve DMEM ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra hücrelerin üzerindeki bu sıvılar alınarak, 1 mL Alamar Blue çözeltisi (89% DMEM high modified colorless, 10% Alamar Blue and 1% penicillin/streptomycin) eklenmiş ve hücreler 1 saat boyunca CO₂ inkübatörüne bırakılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuktan alınan 200 µL Alamar çözeltisi 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına alınarak, spektrofotometrede (Molecular Devices, USA) $\lambda_1=570$ nm ve $\lambda_2=595$ nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedilmiştir.

3.2.6. *In vitro* Biyouyumluluk Testleri

In vitro biyouyumluluk testleri statik koşullarda ve perfüzyon biyoreaktöründe yapılmıştır.

3.2.6.1. Statik Koşullarda Hücre Biyouyumluluğu

In vitro biyouyumluluk testleri için tavşandan elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Öncelikle PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF kompozisyonlarındaki doku desteklerine hücre tutunmasının artırılması için oksijen plazma (50 W, 1 dakika) uygulanmıştır. Daha sonra doku desteklerinin her iki yüzeyi 15'er dakikalık süreler ile UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Temel (B) ve temel-kaymalı (BS) tasarıma sahip doku desteklerinin üzerine 50,000 mezenkimal kök hücre ekilip CO₂ inkübatörüne (37°C, 5% CO₂) koyulmuştur ve hücrelerin tutunması için 4 saat beklenmiştir. Hücrelerin tutunması tamamlandıktan sonra, doku destekleri yeni bir steril kültür kabına aktarılmıştır. Daha sonra eski kültür kabındaki hücreler Alamar Blue yöntemi ile sayılarak, her bir örnek için hücre ekim verimi hesaplanmış ve böylece t₀ anında, doku destekleri üzerindeki hücre sayıları belirlenmiştir. Doku desteklerindeki hücre sayıları daha önceden aynı hücreler kullanılarak hazırlanan hücre kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 8). Hücrelerin çoğalması 1., 7. ve 14. günlerde Alamar Blue yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 8. Tavşan mezenkimal kök hücreleri için Alamar Blue kalibrasyon eğrisi.

Doku desteklerinin hücre morfolojisine etkisi ise mikroskopik yöntemlerle incelenmiştir. Üzerine hücre ekilmiş 3B doku destekleri taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM) kullanılarak görüntülenmiştir. Her iki görüntüleme öncesi hücreler %4'lük paraformaldehit ile fikse edilmiştir. SEM analizi için örnekler %1'lik osmiyum tetroksit ile boyanmıştır. Daha sonra örnekler üzerlerindeki suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlarda hazırlanan etanol serisinden geçirilip liyofilize edilmişlerdir. CLSM analizi için hücrelerin iskeleti FITC-işaretleli falloidin ile, hücre çekirdekleri ise DRAQ5 ile boyanmıştır.

3.2.6.2. Perfüzyon Biyoreaktöründe Hücre Biyouyumluluğu

In vitro'da statik koşullarda optimizasyonu yapılan örnekler, besin ve oksijen transferinin statik ortama göre daha etkili olduğu perfüzyon biyoreaktöründe inkübe edilmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda üzerine mezenkimal kök hücre ekilmiş doku destekleri Şekil 9'da gösterilen adaptörün dairesel boşluklarına yerleştirildikten sonra biyoreaktöre konulmuştur. Bu dairesel boşlukların çapı üretilen doku desteklerinin çapı ile aynı olacak şekilde (1 cm) hazırlanmıştır. Şartları optimize etmek amacıyla, ön denemeler hücresiz doku destekleri ile yapılmıştır.



Şekil 9. Doku desteklerinin yerleştirildiği adaptör.

Biyoreaktör kullanılarak yapılan hücre deneyleri için üzerine hücre ekilmemiş doku destekleri Şekil 9'da görülen disk yapıları içine yerleştirilmiş ve Şekil 10'da görülen biyoreaktör düzeneği kurularak, 24 saat boyunca besi yeri akışı izlenmiştir. Yapılan bu ön denemenin sonucunda besi yerinin akış hızı hem hücrelerin kurummasına yol açmayacak hem de hücrelerin doku destekleri üzerindeki tutunmalarını etkilemeyecek şekilde ayarlanmış ve 1,7 mL/dk olarak belirlenmiştir. Statik koşullarda yapılan *in vitro* deneylerin sonuçlarına dayanılarak seçilen Temel-kaymalı doku destekleri üzerlerine mezenkimal kök hücreler ekilerek perfüzyon biyoreaktöründe 3 hafta boyunca inkübe edilmiş ve her hafta için hücre çoğalması Alamar Blue yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 10. Perfüzyon biyoreaktörü düzeneği.

21. gün sonunda perfüzyon biyoreaktöründen çıkan doku destekleri, farklı kimyasal kompozisyonlara sahip 3B doku desteklerinin hücre morfolojisine etkisinin araştırılması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiştir. SEM analizi için örnekler %4'lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra %1'lik osmiyum tetroksit ile boyanmıştır. Daha sonra örnekler üzerlerindeki suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlarda hazırlanan etanol serisinden geçirilip liyofilize edilmişlerdir.

3.2.7. *In vitro* Osteojenik Farklılaşma Testleri

Temel kaymalı yapıda hazırlanan 3B kompozit doku desteklerinin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik hücrelere farklılaşmasına etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda gözenekli 3B doku desteklerine mezenkimal kök hücreler ekilmiş ve 1 hafta boyunca normal DMEM ortamında çoğalmaları sağlanmıştır. Bu süre sonunda doku destekleri üzerindeki hücreler osteojenik farklılaşma ortamı içeren DMEM çözeltisinde (10 mM betagliserofosfat, 0.2 mM askorbik asit ve 100 nM deksametazon içeren) inkübe edilmiş ve hücrelerin farklılaşması 7., 14. ve 21. günlerde alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivitesi ve Alizarin Red boyama yöntemi ile saptanmıştır.

3.2.7.1. Alkalen Fosfataz Aktivitesi

Tavşan mezenkimal kök hücresi ekilmiş PCL, PCL/HAp, PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerinde ALP aktivitesi belirli zaman aralıklarında (1. hafta, 2. hafta ve 3. haftada) ALP kiti kullanılarak belirlenmiştir. ALP kitinin esası p-nitrofenilfosfatın p-nitrofenole dönüştürülmesine dayanır. Reaksiyon sonunda oluşan p-nitrofenol renkli bir ürün olup, absorbansı 405 nm'de ölçülmüştür. ALP kiti Tablo 2'de verilen bileşenlerden oluşmaktadır:

Tablo 2. ALP kitinde bulunan bileşenler.

Bileşen	Tanım
A	pNNP (substrat)
B	10x assay tamponu
C	Durdurucu çözelti (Stop solution)
D	Triton x100
E	ALP standardı, 10 ug/mL

Örnekler öncelikle fosfat tampon çözeltisi ile daha sonra 1x B bileşeni ile yıkanmıştır. 40 µL D bileşeni ile 20 mL 1x B bileşeni karıştırılarak lizis tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkanan doku destekleri steril 15 mL'lik falkonlara alınıp üstlerini kapatacak şekilde 1 mL lizis tampon çözeltisi eklenmiştir. Falkonlar -80°C'de dondurulup bunların 37°C'de buz çözülmüştür. Bu işlem 3 kere tekrarlandıktan sonra falkonların içerikleri buzun üzerinde prob 5 s içinde, 5 s dışında ve toplam 30 s olacak şekilde sonikasyona (25 watt) tabi tutulmuştur. Daha sonra 10 dk 2000 rpm santrifüj yapılmış ve 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 50 µL süpernatant, 50 µL ALP seyreltme tamponu (dilution buffer) ve 50 µL A bileşeni konularak 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. ALP seyreltme tamponu 1 mg BSA'nın 1 mL 1x B bileşeni içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bir saat sonunda 50 µL C bileşeni eklenip 405 nm'de abzorban ölçülmüştür.

3.2.7.2. Alizarin Red Boyaması

PCL, PCL/HAp, PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerine ekilen tavşan mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşması sonucunda oluşan kalsiyum, Alizarin Red boyaması ile gözlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda tavşan mezenkimal kök hücresi ekilmiş PCL, PCL/HAp, PCL/HAp/PPF doku destekleri osteojenik farklılaşma ortamı içeren DMEM çözeltisinde inkübe edilmiş ve 7., 14. ve 21. günlerde hücreler %4'lük paraformaldehit ile fikse edilmiştir. Hücrelerin fiksasyon işleminden sonra her bir doku desteği üzerine 1 mL Alizarin Red boyası eklenerek, bu destekler 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kalsiyuma bağlanmayan Alizarin Red boyası 2 kez PBS ile yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılmış ve doku desteklerinin stereomikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

3.2.8. In vivo Biyouyumluluk Testleri

Proje kapsamında geliştirilen doku desteklerinin son hedefi insanlarda güvenli olarak kullanılmasıdır ve bu doğrultuda doku desteklerinin potansiyel biyolojik risklerin tayin edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, T.C.Tıbbi Cihaz Yönetmeliğinde (93/42/EEC) belirtilen testler, TSENISO 10993-1 standartlarına uygun olarak ve optimize edilen örnekler üzerinde, hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen doku desteklerinin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde, vücutla temasın şekli (TSENISO 10993-1, Madde 4.2) ve temas süresinin 30 günü geçmesi (TS EN ISO 10993-1, Madde 4.3) nedeniyle, deri içi irritasyon ve implantasyon testleri TSE'nin onayladığı bir kurum olan TÜBİTAK, MAM tarafından hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. Bu analizler geliştirilen implantların biyolojik ortam ile olan etkileşimini ve güvenilirliğini ispat etmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

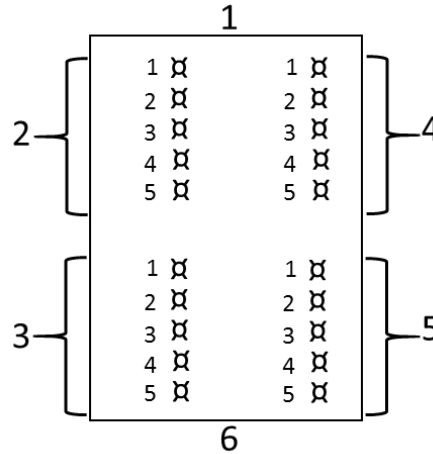
3.2.8.1. Deri İçi İrritasyon

TÜBİTAK MAM tarafından hazırlanan sonuç raporunda belirtildiği üzere deri içi irritasyon testi “ISO 10993-10: 2010 Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity” uluslararası protokolün “Annex B” kısmında açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında, “ISO 10993-2: 2006 Animal Welfare Requirements” ve ISO-10993-12: 2012 Sample Preparation and Reference Materials” standartları da dikkate alınmıştır.

Deri içi irritasyon testi için örnekler ISO-10993-12: 2012 başlıklı belgeye uygun olarak hazırlanmış, kontrol olarak PBS (polar çözücü) ve mısır yağı (non-polar çözücü) kullanılmıştır. Standart protokolde belirtildiği üzere, her bir örnek grubu için, deney hayvanı olarak 8-12 haftalık 3 adet Yeni Zelanda albino tavşanı kullanılmıştır.

Deneylerin yapılmasında, önce deney hayvanları yeterli uygulama alanı sağlanacak kadar traş edilmiştir. Daha sonra örnekler

Şekil 11’de gösterildiği gibi intradermal enjeksiyonla deri altına uygulanmıştır. Her test bölgesinde 5 farklı noktaya toplam 0,2 mL madde tatbik edilmiştir. Yine Şekil 11’de görüldüğü üzere 2 ve 4 no’lu bölgelere doğrudan olmak üzere, 3 no’lu bölgeye polar çözücü kontrol ve 5 no’lu bölgeye non-polar çözücü kontrol uygulanmıştır. Enjeksiyon alanlarının çevresi işaretlenerek belirlenmiştir. Uygulamayı takiben 24, 48 ve 72. saatlerde her enjeksiyon bölgesi gözlenerek Tablo 3’te belirtilen kriterlere göre değerlendirilerek skorlanmıştır.



Şekil 11. Deney hayvanlarına enjeksiyon bölgeleri 1; deney hayvanlarının baş tarafı, 2; test bölgesi, 3; negatif kontrol bölgesi, 4; test bölgesi, 5; pozitif kontrol bölgesi, 6; deney hayvanlarının kuyruk tarafı.

Skorlama, Tablo 3' de belirtilen değerlere göre yapılmıştır. Kızarıklık ve skar oluşumuna yönelik skorlama 0-4 arasında, dem oluşumuna yönelik skorlama aynı şekilde 0-4 arasındadır.

Skorlamalarda, sıfır '0' değeri hiç kızarıklık veya dem yok, dört '4' değeri ciddi derecede kızarıklık ve skar formasyonu veya dem var anlamındadır. Aradaki değerler ise artan reaksiyon düzeyine göre sıralanmıştır.

Test edilen örnek ve kontroller için skor değeri hesaplanırken her gözlem zamanı için elde edilen kızarıklık ve dem değerleri toplanıp 15'e (3 gözlem zamanı x 5 gözlem bölgesi) bölünür.

Test ve kontroller için genel ortalama skor, elde edilen skor değerinin hayvan sayısına yani 3'e bölünmesiyle elde edilir.

Son test rneği skoru eğer kontrol için bir değer elde edilmiş ise bu değerin test rneği için elde edilen skordan çıkarılması ile elde edilir (Tablo 3).

Tablo 3. Değerlendirme kriterleri ve puanlama.

Reaksiyon	Skor
Kızarıklık ve skar formasyonu	
Kızarıklık yok	0
Çok hafif kızarıklık (zorlukla fark edilir)	1
Fark edilir derecede kızarıklık	2
Orta derecede kızarıklık	3
Ciddi derecede kızarıklık ve skar formasyonu	4
dem	
dem yok	0
Çok hafif dem (zorlukla fark edilir)	1
Fark edilir derecede dem	2
Orta derecede dem (yaklaşık 1 mm)	3
Ciddi derecede dem (1 mm'den büyük)	4
İrritasyon için olabilecek toplam skor	8

3.2.8.2. İmplantasyon

İmplantasyon testi, "ISO 10993-6: 2007 Biological evaluation of medical device - Part 6: Tests for local effects after implantation", "ISO 10993-2: 2006 Biological evaluation of medical devices – Part 2: Animal welfare requirements" ve "ISO 10993-12: 2012 Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample Preparation" protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. İmplantasyon testi kullanılan biyomalzemelerin implantasyon sonrası lokal etkilerinin ortaya konmasını amaçlar ve bunun için makroskopik ve mikroskopik histolojik incelemeleri kapsar. Negatif kontrol olarak ISO 10993-12:2012 başlıklı dokümanda önerildiği üzere silikon kullanılmıştır. 10 adet test materyali ve 3 adet negatif kontrol 3 ratın (Sprague Dawley, 3-4 aylık) lumbodorsal bölgesine implante edilmiştir.

İmplantasyon testi uygulama süresi sonunda lokal etkiler tespit edilmiş ve değerlendirilmiştir. Bunun için, 28 gün boyunca uygulanan test protokolü sonrasında, 10 adet implantasyon bölgesi, 10 adet test-kontrol bölgesi ve 3 adet negatif kontrol bölgeleri alınarak %4 paraformaldehit ile fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyonu takiben gece boyu yıkama işlemi yapılarak ardından dehidrasyona tabi tutulmuştur.

Dehidre edilen dokular parafin bloklar halinde hazırlanmıştır. Parafin bloklardan 5 prn kalınlığında doku kesitleri alınarak hematoksilin-eozin boyamaları yapılmıştır. Doku kesitleri 30 dk ksilol ile muamele edildikten sonra rehidratasyon işlemi (%100-%70 Alkol 10'ar dakika) yapılmıştır. Hematoksilin boyasında 5 dk tutulmuş ve ardından 10 dk su ile yıkandıktan sonra eozin ile 5 dk işleme sokulmuştur. Eozin boyamasının ardından su ile yıkama yapılarak artan alkol serilerinden 5'er dk geçirilerek dehidratasyon yapılmıştır. Ksilol ile şeffaflandırılarak entellan ile kapatılmış ve inceleme yapılmıştır. İncelemeler aşağıda verilen Tablo 4'e göre yapılmıştır.

Tablo 4. Hücre tipi/ cevaplar bakımından histolojik değerlendirmeler ve puanlama

Hücre Tipi/Reaksiyon	Skor*				
	0	1	2	3	4
Polimorfonükleer hücreler	0	Nadir, 1-5/yba	5-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Lenfositler	0	Nadir, 1-5/yba	5-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Plazma hücreleri	0	Nadir, 1-5/yba	5-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Makrofajlar	0	Nadir, 1-5/yba	5-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Dev hücreler	0	Nadir, 1-5/yba	5-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Nekrozis	0	Nadir, 1-5/yba	-10/yba	Ağır infiltrasyon	Küme
Yeni Damarlanmalar	0	Az miktarda kapiller proliferyasyon, fokal 1-3 tomurcuklanma	4-7 kapiller ile birlikte fibroblastik yapı ile desteklenen gruplar	Geniş bantların olduğu kapiller ile birlikte destekleyici yapılar	Yaygın bantların olduğu kapiller ile birlikte fibroblastik yapı ile desteklenen gruplar
Fibrozis	0	Dar bantlar	Kısmen kalın bantlar	Kalın bantlar	Kapsamlı bantlar
Yağ infiltrasyonu	0	Az miktarda fibrosis ile birlikte yağlanma	Birkaç katman yağ ve fibrosis	İmplantasyon bölgesinde yağ hücrelerini birikimi ile geniş ve uzamış yapılar	İmplant bölgesinin tamamını saran yaygın yağ dokusu
* yba= yüksek büyütmedeki (400) alan başına					

Yapılan gözlemlere göre, test örnekleri aşağıdaki şekilde skorlanarak sınıflandırılmaktadır:

Irritant değil (0,0 - 2,9)

Zayıf irritant (3,0 - 8,9)

Orta irritant (9,0 - 15,0)

Ağır irritant (> 15)

3.2.8.3. MikroBT Verisinin Model Kemik Örneklerinden Eldesi ve HP'ye Aktarılması

MikroBT çalışmaları öncelikle kemik dokusunun içinden çıkan parçanın tespitinde ve modellenmesinde, daha sonra ise kemik dokusunun Kemik Mineral Yoğunluğu'nu (KMY) hesaplamak amacıyla kullanılmaktadır. KMY hesaplanmasında hücrelerin ölmemiş olması gerektiğinden içinden parça alınan kemikler MikroBT ile taranmadan önce fizyolojik tuz çözeltisi içerisinde saklanmıştır ve cihaz tarafından tarama işlemi yapılırken, ıslak kalmaları için kağıt ile sarılmış ve yine fizyolojik tuz çözeltisi ile ıslatılmıştır. Kemik Mineral Yoğunluğunun hesaplanmasında kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla 0,25 ve 0,75 g/cm³ yoğunluğuna sahip hidroksiapatitten oluşan kontrol örnekler, tavşan kemikleri ile aynı şartlarda taranmıştır. Elde edilen veriler daha sonra doku mühendisliğiyle elde edilen desteklerin KMY hesaplamasında ve karşılaştırılmalarında kullanılacaktır. MikroBT (Bruker MicroCT, 1172, Belçika) taramalarında, örnekler Şekil 12'de görüldüğü gibi dedektör ve X ışını kaynağı arasına yerleştirilmiştir. Örnekler 100 kV güç ile 12 µM/piksel boyutuyla alüminyum ve bakır filtreler kullanarak 360° boyunca her dönüşün 0,4 rotasyona sahip olduğu şartlarda taranmışlardır.



Şekil 12. Örneğin MikroBT içerisinde görünümü.

Tarama işleminden sonra matematiksel hesapların yapılabilmesi ve üç boyutlu görüntünün oluşturulması amacıyla elde edilen iki boyutlu görüntüler yapılandırılmıştır (NRecon, Bruker MicroCT, Belçika). Yapılandırma işlemi sırasında halka hatası düzeltilmesi, ışın sertleşme düzeltilmesi ve görüntü düzeltilmesi yapılmıştır. Bu düzeltmelerin değerleri bütün kemiklerde ve KMY kalibrasyon örneklerinde aynı tutulmuştur. Yapılandırma işleminden sonra CTvox (Bruker MicroCT, Belçika) kullanılarak, üzerinde defekt yaratılan ve taranan kemiğin 3 boyutlu yapısı görüntülenmiştir.

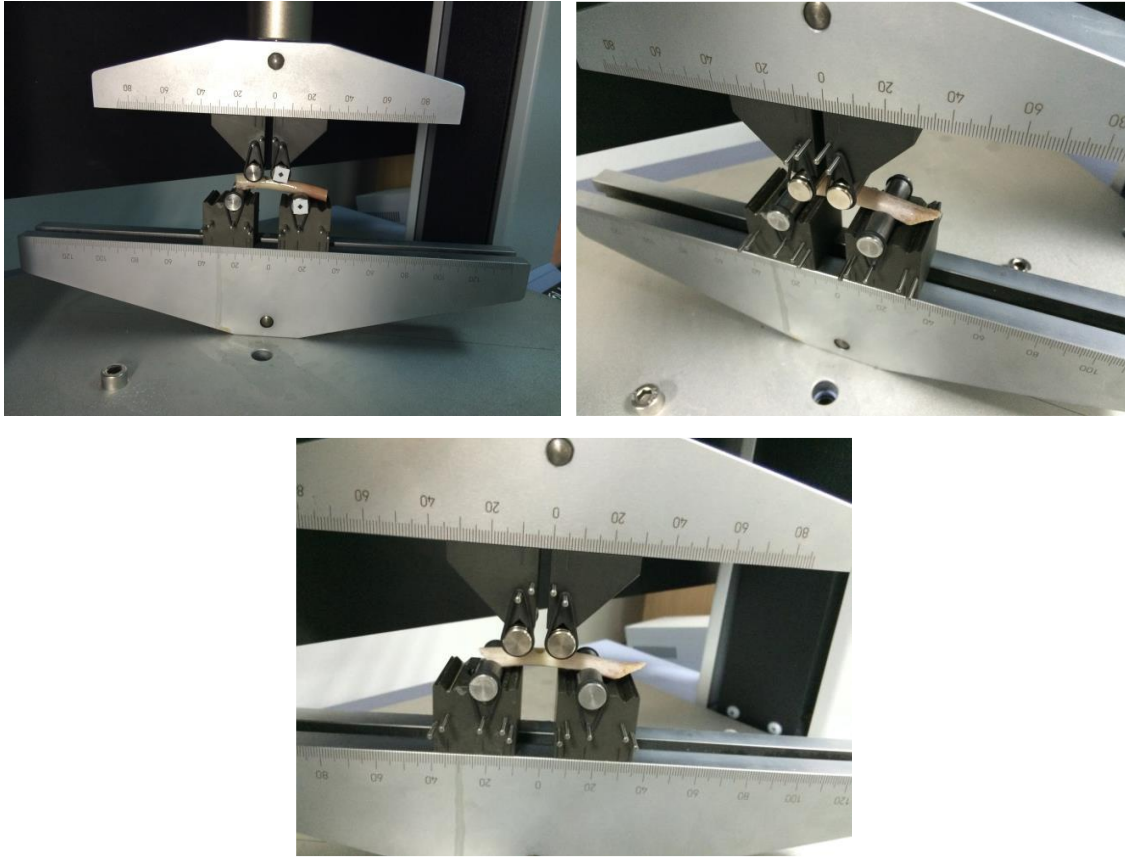
3.3. HP ile elde edilen implantların Karakterizasyonu

Hızlı prototipleme ile 3B basılan doku destekleri yerleştirilmeden önce, tavşan kemiklerinin mekanik ölçümü için ön denemeler yapılmıştır.

3.3.1 Tavşan Kemiğinde Mekanik Test Ön Denemeleri

Mekanik testlerde kullanılmak için üç adet yetişkin (6 aylık) Yeni Zelanda erkek beyaz tavşanın femural ve tibial kemikleri çıkartılmıştır. İmplant edilecek tavşan femurunun mekanik testleri ile karşılaştırılmak amacıyla tavşanlardan elde edilen sağlam kemiklerin üzerlerinde kemik matkabı ile 3 mm'lik delikler açılmıştır. Proje kapsamında geliştirilecek implantın mekanik özelliklerinin belirlenmesine yönelik olarak doku desteği implant edilmemiş kemiğin elastik mekanik özelliklerinin belirlenmesine yönelik pilot deneyler yapılmıştır.

Öncelikle biyolojik ve kemik iyileşmesi açısından seçilen implantasyon bölgesinin mekanik testler açısından uygun olmadığı görülerek ilgili grupla yapılan karşılıklı görüşmeler sonrası implantasyon bölgesi hem iyileşmeye hem de mekanik testlere uygun, kemik shaftı üzerinde, eklem daha uzak bir bölgeye kaydırılmıştır. Kemik şeklindeki düzensizlikler ve tavşan kemiğinin çok küçük olması nedeniyle oluşturulan defektin ve implantasyon bölgesinin test makinesi üzerinde her zaman tam istenilen konuma getirilememesi ve getirildiğinde bile yükleme sırasında kayması nedeniyle mekanik test cihazında bulunan standart rulolar yerine özel rulolar tasarlanıp üretilmiştir. Deney örneği de üzerinde bulunan ve deney sonucuna etki edecek yumuşak dokudan uygun biçimde arındırılmış ve dört nokta eğilme aparatında rulolar dışında temasa neden olan eklem bölgeleri kesilerek hazırlanmıştır. Anılan şekilde hazırlanan ve proje kapsamında geliştirilecek implantla tamir edilmesi planlanan, yuvarlak defektli bulunan kemiklerle kemiğin elastik özelliklerinin belirlenmesine yönelik pilot deneyler yapılmış, örnek hazırlama ve deney protokolleri geliştirilmiştir. Protokol kapsamında defektin (ve implantasyon bölgesinin) üstte (geliştirilen implant basma yönünde çalışacak biçimde) ve altta (geliştirilen implant çekme yönünde çalışacak biçimde) dört nokta eğilme deneyleri 1 mm/dk hız ile yapılmıştır (Şekil 13). Deneyde ilk devirlerden alınan veri kemikteki alışma etkisi ve örneğin dört nokta eğilme aparatına oturması nedeniyle kemik direngenliğinin hesaplanmasında kullanılmamış, tekrar edilebilir veri alındıktan sonraki devirlerden bu bilgi elde edilmiştir.



Şekil 13. Defekt yaratılmış farklı kemik örneklerinde dört nokta eğilme test düzeneği.

3.3.2 Geliştirilen İmplantların Mekanik Özelliklerinin Saptanması

Hızlı prototipleme yöntemi ile kemik defektine şekil olarak uyumlu üretilen doku desteklerinin mekanik özellikleri basma testi aracılığıyla belirlenmiştir. Gama sterilizasyonun doku desteklerinin mekanik özelliklerine etkisini incelemek amacıyla, temel yapıda üretilen PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri 25 kGy dozunda Co-60 gama ışınlarıyla sterilize edilmiştir. Bu işlem için Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'na bağlı SANAEM ışınlama merkezinden hizmet alınmıştır. Doku desteklerinin gama sterilizasyon öncesi ve sonrası mekanik özellikleri basma testi 1 mm/dk hız ile yapılmıştır.

3.4 Hücre izolasyonu, in vitro ve in vivo değerlendirmeler

Desteklere eklemek ve doku tedavisinde kullanabilmek amacıyla tavşan kemik iliğinden kök hücreler izole edilmiş, *in vitro* ve *in vivo* analizler ile hücreler değerlendirilmiştir.

3.4.1 Tavşan Kemik İliğinden Kök Hücre Elde Edilmesi

Kök hücre eldesi için, Yeni Zelanda erkek beyaz tavşanlarından kemik iliği toplanmıştır. Altı adet yetişkin (6 aylık) Yeni Zelanda beyaz tavşanının femur ve tibia kemikleri çıkartılıp penisilin/streptomisin konsantrasyonu (%10) yüksek olan besiyeri (MEM- α (1X)+GlutaMAX™, Gibco, ABD) içerisine transfer edilmiştir. Laminer hava akışlı kabinler içerisinde kemiklerin metafizyel bölgeleri kemik makasıyla kesilmiş ve kemik ilikleri 50 mL'lik test tüplerine şırıngalar yardımıyla boşaltılmıştır. Kemik iliği peleti. yağ hücrelerinden kurtarılmak amacıyla 1700 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kemik iliği süspansiyonları T-175 hücre büyütme kapları içerisine konularak çoğaltılmıştır.

3.4.2 Tavşan Kemik İliğinden Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Tavşan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren MEM- α besiyerinde büyütülmüş ve çoğaltılmıştır. Hücre besiyerleri gün aşırı değiştirilmiştir. Hücreler konfluent olduklarında, tripsin kullanılarak hücre büyütme kaplarından kaldırılıp, hemositometre ile sayılarak birinci ve ikinci pasajlarda dondurulmuştur. Dondurulma aşamasında %5 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS çözeltisi kullanılmıştır. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin mezenkimal kök hücreleri olduğunu kanıtlamak amacıyla hücre boyamaları yapılmıştır:

3.4.2.1 PAS-Asiyan mavisi boyaması

Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücreler 21 gün boyunca kondrojenik besiyerinde (%1 ITS Premix Çözeltisi (BD Biosciences, ABD), 10^{-7} M deksametazon (Sigma, ABD) 1 μ M askorbat, 10 μ g/mL sodyum piruvat (Sigma, ABD), 40 μ g/mL prolin (Sigma, ABD), 10 ng/mL TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, ABD), % 1 penisilin/streptomisin, MEM- α) büyütülmüştür. Kondrojenik farklılaşma 7., 14. ve 21. günlerde PAS-Asiyan mavisi boyaması (Molekula, FR) ile kitin protokolleri uygulanarak gözlemlenmiştir.

3.4.2.2 Oil Red O Boyaması

Oil Red O boyaması için tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücreler 21 gün boyunca adipojenik besiyeri (0.5 μ M deksametazon. 0.5 Mm 3- izobütül- 1- metilksantin (IBMX)

(Calbiohem, ABD), 50 µM indometazin (Sigma, ABD), % 1 penisilin/streptomisin, % 10 FBS, MEM α) içerisinde inkübe edilmiştir. Kök hücreler 14. ve 21. günlerde % 4 paraformaldehit çözeltisi ile 1 saat süreyle fikse edilmiştir. Bu aşamayı takiben hücreler 2 mL % 60 izopropanol çözeltisi içerisinde 5 dk inkübe edilmiştir. Son olarak hücreler 5 dk boyunca Oil Red O çalışma çözeltisine maruz bırakılmıştır.

3.4.2.3 von Kossa Boyaması

Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin von Kossa boyaması kit (Diagnostic Biosystems, ABD) protokolleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler 21 gün boyunca osteojenik besiyerinde (0.1 µM deksametazon, 10 mM β-gliserogofat (AppliChem, Almanya), 50 µg/mL askorbik asit (AppliChem, Almanya)) büyütülmüşlerdir. Boyama öncesinde kök hücreler 7., 14. ve 21. günlerde %4 paraformaldehit çözeltisi yardımıyla 1 saat süreyle fikse edilmiştir.

3.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin büyüme eğrisinin oluşturulması

Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı'ndan elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin büyüme eğrisini oluşturmak amacıyla hücreler, her bir kuyucukta 20,000 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kabına ekilmiştir. Hücre çoğalması belirli zaman aralıklarında (24., 48., 72., 96., 120., 196. ve 264. saatlerde) MTS testi yapılarak belirlenmiştir. Absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları kalibrasyon eğrisi çizilerek tayin edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Tavşan mezenkimal kök hücrelerinin sayısının belirlenmesi için geliştirilen kalibrasyon eğrisi (mavi) ve eğim çizgisi (siyah). Doğru denklemi grafik üzerinde gösterilmiştir.

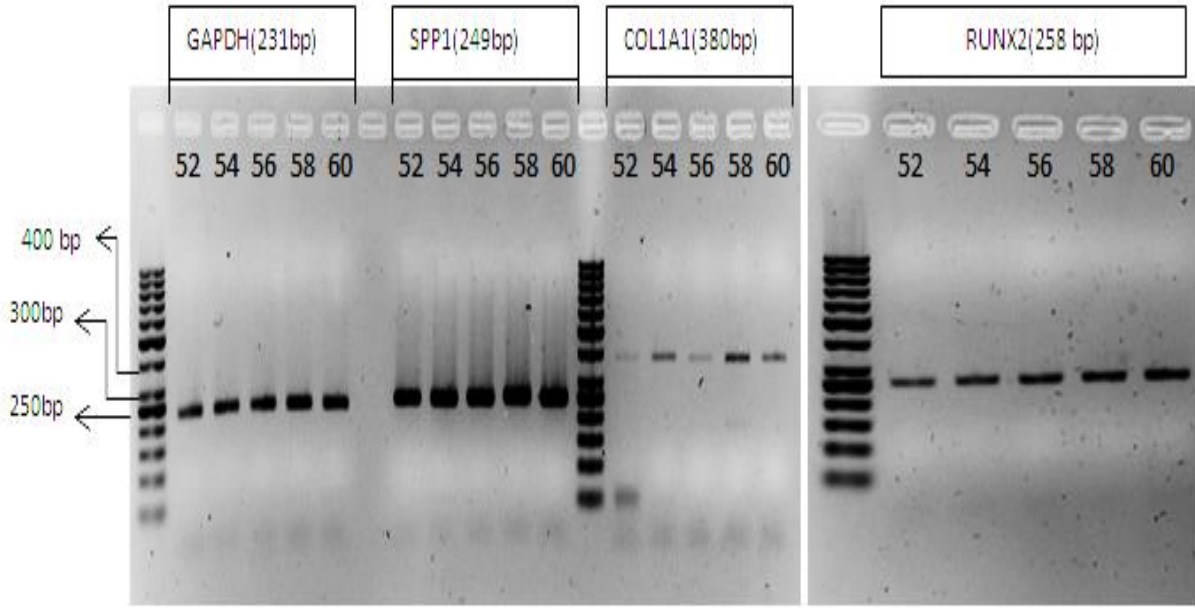
Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin (pasaj 2) mezenkimal kök hücre olduğunu kanıtlamak için akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda floresan boyaları ile bağlanmış tavşana özel monoklonal antikolar (CD 44 Mouse Anti-Rabbit CD44 (Primer Antikor), Rabbit F(ab')₂ Anti-Mouse IgG:FITC (Sekonder Antikor), PE Mouse Anti-Human CD 81, Mouse Anti-Human Integrin beta 1 fluorescein conjugated monoclonal antibody (CD29), CD14 Mouse Anti-Human Monoclonal FITC Antibody, CD45RB Mouse Anti-Human Monoclonal FITC Antibody) kullanılmıştır.

3.4.4 Hücre farklılaşmasını gen düzeyinde izlemek

Mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını gen düzeyinde izlemek için kullanılacak RUNX2, SPP1, COL1A1 ve GAPDH genleri için primerler tasarlanmıştır. Primerlerin erime sıcaklıklarını (T_m) belirlemek amacıyla tavşan mezenkimal kök hücreleri 13 gün süreyle osteojenik besiyerinde (0.1 μ M deksametazon, 10 m β -gliserogosfat (AppliChem, Almanya), 50 μ g/mL askorbik asit (AppliChem, Almanya) inkübe edilmişlerdir.

Hücrelerden 13. günün sonunda GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific, ABD) kitinin protokolleri uygulanarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu takiben RNA örnekleri Sensiscript Reverse Transcription Kiti (QIAGEN, Almanya) ile cDNA'ya dönüştürülmüştür. Erime sıcaklıklarının optimizasyonu için cDNA'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metoduyla tasarlanan primerler kullanılarak farklı sıcaklıklarda çoğaltılmış ve agaroz jelde (% 2 w/v) yürütülmüşlerdir.

Jel elektroforezi sonucunda RUNX2, SPP1, COL1A1 ve GAPDH genleri için tasarlanan primerlerin ortak optimum erime sıcaklıkları 58°C olarak belirlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. RUNX2, SPP1, COL1A1 ve GAPDH genlerine özel olarak tasarımı yapılan primerlerin 52°C, 54°C, 56°C, 58°C ve 60°C T_m sıcaklıklarında gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1, 2 ve 3 numaralı kuyucuk: moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, ABD)).

3.4.4.1 RNA İzolasyonunun Optimizasyonu

Projenin bu iş paketinde farklı biyomateryallerden üç farklı yöntemle RNA izolasyonu yapılmıştır. Öncelikle PCL, PCL/HAp/PPF ve PCL/HAp doku destekleri üzerine, insandan izole edilen 56. pasaj osteoblast hücreleri ekilerek 5 gün boyunca %10 FBS ve %1 Pen-Strep içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM;GIBCO, ABD) besiyerinde (37°C, %5 CO₂) inkübe edilmiştir. Hücre ekim aşaması öncesinde, doku desteklerinin her iki yüzeyine de birer saat olmak üzere UV uygulanarak sterilize edilmiştir. Doku destekleri 24 kuyucuklu hücre kaplarına yerleştirilmiştir. PCL doku destekleri üzerine 1x10⁶ adet hücre, PCL/HAp/PPF ve PCL doku destekleri üzerine ise 5x10⁵ adet hücre ekilmiştir. Farklı sayıda hücreler ekilerek RNA izolasyonu için ekilmesi gereken hücre sayısının karşılaştırılması yapılmıştır.

İlk aşamada, PCL üzerine ekilen hücrelerden RNA izolasyonu, TRIzol (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici talimatlarına uygun yapılmıştır. İkinci RNA izolasyonu yöntemi olarak GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific, ABD) kiti kullanılmıştır. Tercih edilen son metotda ise TRIzol kimyasalı ile GeneJET RNA Purification kitinin protokolleri birleştirilerek RNA izolasyonu yapılmıştır. PCL/HAp/PPF üzerine ekilmiş hücrelerden, TRIzol ve kit

kullanılarak RNA elde edilirken, PCL/HAp üzerindeki hücrelerden sadece kit kullanılarak RNA izole edilmiştir. Böylece farklı destekler üzerine ekilmiş hücrelerden RNA elde edilmesinde kit kullanımının etkisi araştırılmıştır. Tüm doku desteklerindeki hücrelerden farklı yöntemlerle RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, RNA konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} oranları Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile ölçülmüştür.

3.5 *In vivo* Uygulamalar

3B hazırlanan destekler tavşanlarda yaratılan kemik defektine implante edilmiştir. Bu amaç için, ortalama ağırlığı $3\pm 0,5$ kg olan 42 adet erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanılmıştır. Tavşanlar özel kafeslerinde, hareket sınırlaması olmadan, standart yem ve içme suyuyla *ad libitum* beslenerek muhafaza edilmiştir. Tüm *in vivo* tavşan çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Türkiye Cumhuriyeti Orman ve Şehircilik Bakanlığı'nın hazırladığı Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik'te belirtilen hususlara uyularak lisanslı veteriner gözetiminde yapılmıştır.

Bu çalışmada, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF olmak üzere iki farklı kombinasyona sahip biyobozunur malzemeler kullanılmıştır. Cerrahi operasyonlar tavşanların ketamin (35 mg/kg; Ketazol, Richter Pharma-AG, Wels-Avusturya) ile genel anesteziye alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Analjezik olarak ksilazin (5mg/kg; Bayer, ABD) kullanılmıştır. Tavşanların sağ femur gövdeleri üzerinde 5 mm genişliğinde, 2,5 mm derinliğinde kritik boyutta defektler oluşturulmuştur (Şekil 16 a,b,c). Bu defektlerin içerisine her tavşanda birer örnek olacak şekilde, hücreli veya hücreli olmayan üzere toplamda 36 adet doku desteği yerleştirilmiştir (Şekil 16 d ve e).

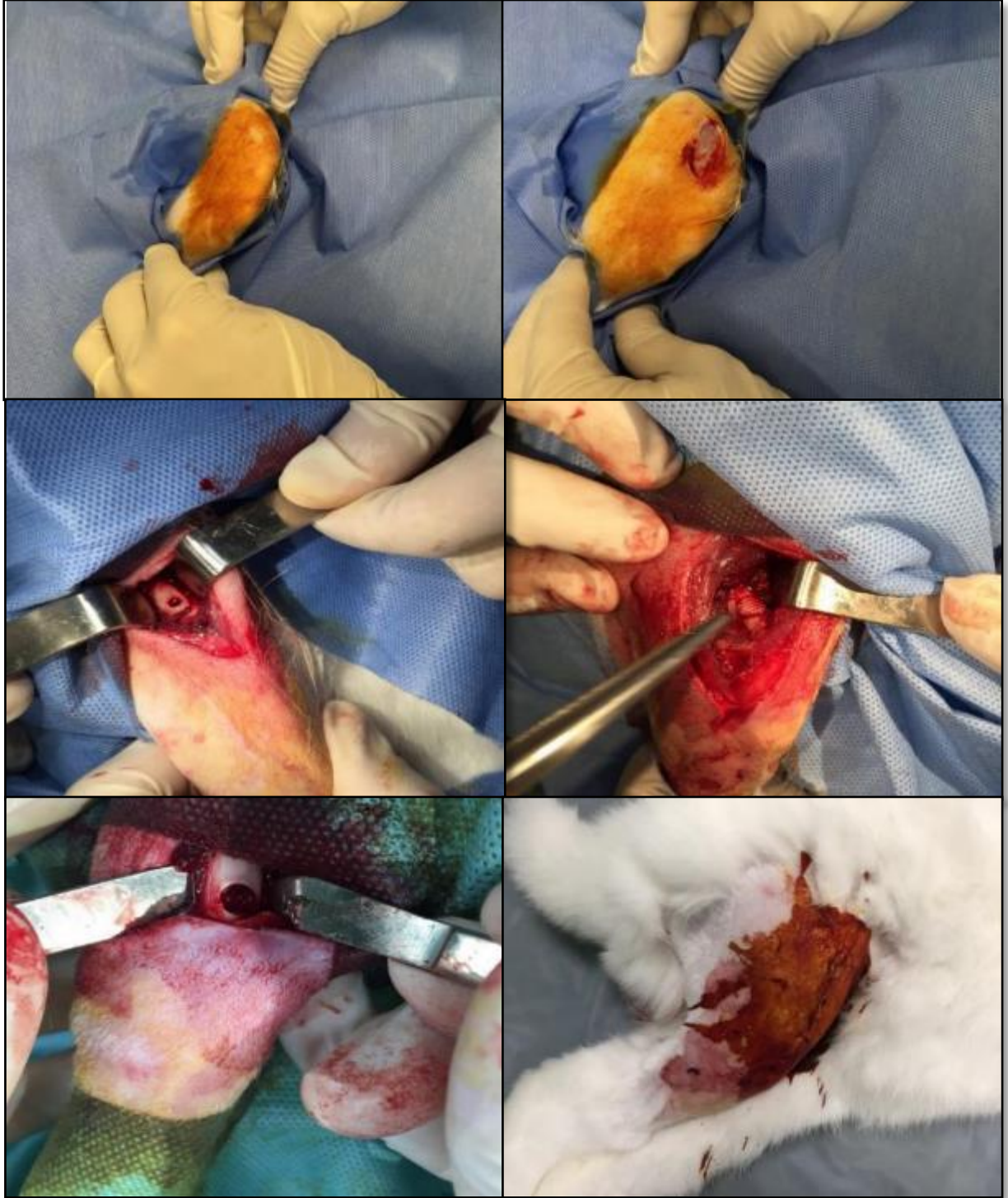
Hücre içeren doku destekleri üzerine 1×10^6 adet hücre ekilerek 10 gün boyunca osteojenik besiyerinde (0,1 μ M deksametazon, 10 mM β -gliserofosfat (AppliChem, Almanya), 50 μ g/mL askorbik asit (AppliChem, Almanya)) inkübe edildikten sonra tavşanlara implante edilmişlerdir. Operasyonların sonunda kas dokusu ve cilt altı dokular, emilebilir suture (Vicryl-2.0;Ethicon, Almanya), deri ise ipek-2.0 suture (Doğsan, Türkiye) ile kapatılmıştır (Şekil 16 f). Kontrol grubu olarak 6 adet tavşanın sağ femurlarında defekt açılmıştır. Deney grupları Tablo 5'te gösterilen biçimde oluşturulmuştur. Gruplarda yer alan tavşanlar rastgele seçilmişlerdir.

Tablo 5. *In vivo* deneylerde kullanılan örnek tipleri ve sayıları.

Örnek Tipi	Örnek Sayısı	
	4. Hafta	8. Hafta
1. PCL/HAp (-Hücre)	4	4
2. PCL/HAp (+Hücre)	4	4
3. PCL/HAp/PPF (-Hücre)	5	5
4. PCL/HAp/PPF (+Hücre)	5	5
5. Boş Defekt	3	3

Operasyonları izleyen 3 gün boyunca tavşanlara günde iki kez olmak üzere intramüsküler yolla antibiyotik (Novosef IM Flakon; 100 mg/kg, Zentiva-Sanofi, Fransa) verilmiştir. Çalışmanın 4. ve 8. haftalarında tavşanlar karbondioksit kullanılarak ötenazi edilmiştir. *In vivo* çalışmalarının ilk aşamasında 37 adet tavşan kullanılmıştır. Tablo 6'da tavşanlara implant edilen örnek tipleri, inkübasyon süreleri, ötenazi tarihleri ve cerrahi operasyon sonrası deneklerin durumları gösterilmektedir. Tavşanlar operasyona alınma sıralarına göre numaralandırılmışlardır. Hücre ekilmeyen 4. hafta PCL/HAp (13. tavşan) ve PCL/HAp/PPF (17. tavşan) implante edilen ve 8.hafta PCL/HAp (3.tavşan) içeren tavşanlar, operasyondan 2 gün sonra ölmüşlerdir. Buna ek olarak cerrahi operasyonlar sırasında bazı tavşanların femurlarında oluşan makro ve mikro düzeyde kırıkların postoperatif bakım sırasında genişlemesi sebebiyle 17 adet tavşan da deney dışı kalmıştır.

Çalışmanın 4. ve 8. haftalarında ötenazi edilen tavşanların sağ ve sol femurları çıkartılmış ve bilgisayarlı mikrotomografi ve mekanik analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.



Şekil 16. Cerrahi operasyon prosedürü: a,b,c)Tavşan sağ femur defekti oluşturulması, d,e)Doku desteği yerleştirilmiş defekt, f)Dokuların dikilmesi.

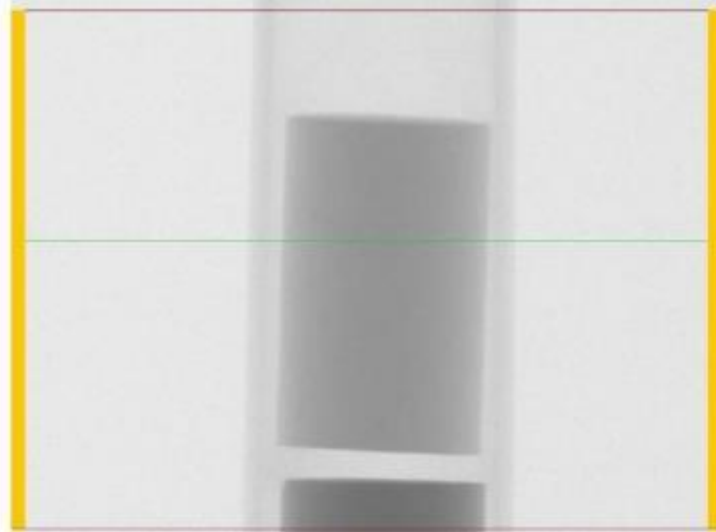
Tablo 6. *In vivo* çalışmaları tavşan listesi.

Tavşan numarası	Örnek Tipi-İnkübasyon süresi	Ötanazi tarihi	Cerrahi operasyon sonrası denek durumu
1	PCL/HAp-Hücre-siz-4 hafta	18.03.2016	Kırık
2	PCL/HAp-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Kırık
3	PCL/HAp-Hücre-siz-8 hafta		Operasyondan 2 gün sonra öldü
4	PCL/HAp-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Kırık
5	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Kırık
6	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Kırık
7	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Kırık
8	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Sağlam
9	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Sağlam
10	PCL/HAp -Hücre-siz-8 hafta	18.04.2016	Sağlam
11	PCL/HAp/PPF -Hücre-siz-4 hafta	18.03.2016	Kırık
12	PCL/HAp -Hücre-siz-4 hafta	18.03.2016	Sağlam
13	PCL/HAp-Hücre-siz-4 hafta		Operasyondan 2 gün sonra öldü
14	PCL/HAp-Hücre-siz-8 hafta	22.04.2016	Kırık
15	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-4 hafta	21.03.2016	Sağlam
16	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-4 hafta	21.03.2016	Sağlam
17	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-4 hafta		Operasyondan 2 gün sonra öldü
18	PCL/HAp/PPF-Hücre-siz-4 hafta	21.03.2016	Sağlam
19	Boş defekt 8 hafta	18.04.2016	Sağlam
20	PCL/HAp-Hücre-li-8 hafta	22.04.2016	Kırık
21	PCL/HAp -Hücre-li-8 hafta	22.04.2016	Kırık
22	PCL/HAp-Hücre-li-8 hafta	22.04.2016	Kırık
23	PCL/HAp-Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Sağlam
24	PCL/HAp -Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Sağlam
25	PCL/HAp -Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Sağlam
26	PCL/HAp -Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Kırık
27	PCL/HAp-Hücre-li-8 hafta	22.04.2016	Kırık
28	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Kırık
29	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-4 hafta	23.03.2016	Sağlam
30	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-4 hafta		Kırık (Ötanazi edildi)
31	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-4 hafta	24.03.2016	Sağlam
32	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-4 hafta	24.03.2016	Sağlam
33	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-8 hafta	25.04.2016	Kırık
34	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-8 hafta	25.04.2016	Sağlam
35	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-8 hafta	25.04.2016	Sağlam
36	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-8 hafta	25.04.2016	Sağlam
37	PCL/HAp/PPF-Hücre-li-8 hafta	25.04.2016	Kırık

3.6 In vivo Kemik Örneklerinin İncelenmesi

3.6.1. MikroBT Taraması

Kemik oluşumunun Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) açısından tespit edilmesi amacıyla MikroBT cihazının üreticisinin önerdiği boyutlardaki 0,25 ve 0,75 g/cm³ yoğunluğa sahip hidroksiapatit çubuklar tavşan kemikleriyle aynı şartlarda taranmıştır. Tarama sırasında 100 Kv 100 µA güç uygulanmış, 12 µ/Piksel boyutunda görüntüleme yapılmış, örnekler Alüminyum bakır filtre kullanılarak her görüntü 1710 ms pozlanmış ve her görüntü gürültüyü azaltmak amacıyla 3 kez pozlanmış ve görüntüler birleştirilmiştir. Örnekler 360° boyunca her adımda 0,4° çevrilerek taranmıştır. Hem örnekler hem de kalibrasyon çubukları KMY hesaplanabilmesi için ıslatılmış kağıtlarla örtülmüştür. Şekil 17'de kalibrasyon çubuklarının yapılandırma aşamasındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 17. Kalibrasyon çubuklarının yapılandırma görüntüsü.

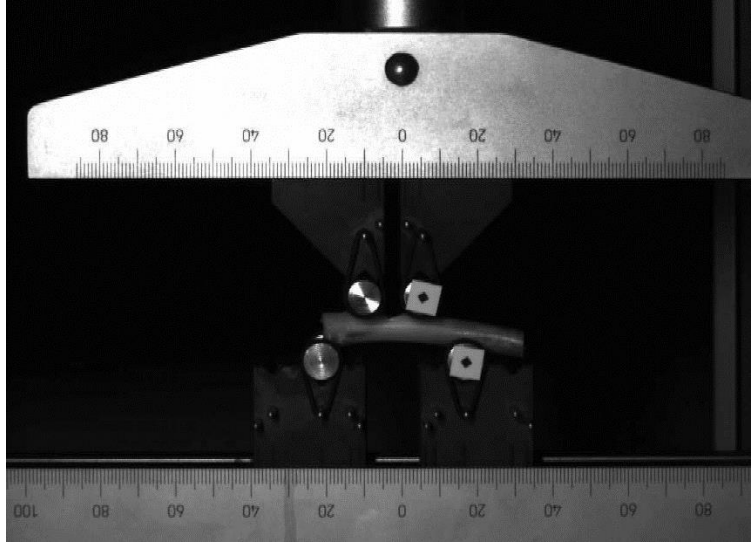
Kemik örneklerinin ve kalibrasyon çubuklarının taramalarının bitmesinin ardından ham verilerin kesitler haline dönüştürülmesi amacıyla yapılandırma işlemi uygulanmıştır. Yapılandırma işlemi NRecon (Bruker X-RAY, Belçika) yazılımı ile yapılmıştır. Yapılandırma aşamasında görüntü yumuşatma olarak 3 seçilmiş, halka hatasını düzeltmek amacıyla her örneğe halka hatası düzeltme oranı olarak 7 uygulanmış ve ışın sertleşmesi hatasını ortadan kaldırmak amacıyla %38 olarak uygulanmıştır.

Kalibrasyon çubuklarının verdikleri sönümlenme katsayısı kullanılarak CTAn (Bruker X-RAY, Belçika) yazılımı KMY sonuçları için kalibre edilmiştir. Sönümlenme katsayısı kullanılarak verilen konsantrasyonlara karşılık gelen değerler yardımıyla bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisi KMY değerleri bilinmeyen kemik dokusu örneklerinde kullanılmış ve kemik dokusunun mineral yoğunluğu hesaplanmıştır. KMY değerleri hücreli ve hücresiz PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF örnekleri için 4. ve 8. haftalarda elde edilmiş ve değerlendirilmiştir.

3.6.2. İmplantlı Kemiğin Mekanik Karakterizasyonu

Proje kapsamında tasarlanıp üretilen ve deney hayvanlarına implante edilen kemik implantlarını mekanik açıdan değerlendirmek üzere değişik tiplerde ve hücre kültürü bulunan veya bulunmayan implante edilmiş kemiklerle yine aynı deney hayvanına ait sağlıklı karşı taraf kemiklerinde kemiğin toplam direngenliğini değerlendirmek üzere tahribatsız dört nokta eğilme deneyleri yapılmıştır (Şekil 18). Deneylerde kemik implantının bulunduğu bölge üstte bulunan birbirine yakın iki rulonun arasındaki sabit eğilme momenti bulunan ve kayma yüklemesi bulunmayan bölgeye denk getirilmiştir. İmplantın bulunduğu anatomik olarak ön yüzeye basma (kısalma) uygulamak için implantlı yüzey üste, implantın bulunduğu yüzeye çekme (uzama) uygulamak içinse implantlı yüzey alta gelecek biçimde iki test yapılmıştır. “Tamir görmüş” kemiğin mekanik özelliklerinin, kendisine en yakın olacağı düşünülen aynı deney hayvanına ait diğer taraf kemiği ile karşılaştırılabilmesi için aynı konumlarda diğer taraf kemiğiyle de aynı deney tekrarlanmıştır. Tüm deneyler Shimadzu Trapezium 5 kN tek eksenli deney makinesi ve 5 kN kapasiteli yük hücresi ile, alt rulolar arası 45 mm üst rulolar arası 17 mm, 5 mm/s sabit hızda ve en büyük kuvvet 200 N olacak şekilde yapılmıştır.

Tüm deneylerde deneyin başlangıcından itibaren geçen zaman, hareketli kafanın yer değiştirmesi ve kemiğin tepki kuvveti saniyede 100 veri alınacak biçimde kaydedilmiştir. Elde edilen deney verilerinden kemiklerin dört nokta eğilmeye karşı direngenliği (yay sabiti, birim deformasyon için gereken kuvvet) elde edilmiştir. Direngenlik kemik geometrisi ile birlikte implant tarafından yapılan tamir sonucu kemiğin mekanik özelliklerinin sağlıklı karşı taraf kemiğine ne kadar yaklaştığı dolayısıyla tamirin mekanik başarısı hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 18. Dört Nokta Eğilme Testi.

Deney sonrasında, kaydedilen verilerden direngenlikler doğrusal regresyon yöntemi ile elde edilmiştir. Kemiğin yükleme durumu (implant çekmede ve basmada) ve aynı deneylerin sağlıklı tarafta yapıldığı gruplar oluşturulmuş ve elde edilen direngenlikler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı SPSS 20.0 İstatistik Yazılımı kullanılarak (*paired t-test*) belirlenmiştir. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı “farksızlık hipotezi” ile sınanmıştır; yani belirlenen anlamlılık düzeyinin altında bir sonuç çıktığında gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu söylenebilir. İstatistik çalışmalarında anlamlılık düzeyinin seçilmesi araştırmacının keyfine bağlıdır, fakat geleneksel olarak çoğu uygulamada seçilen anlamlılık seviyesi 0,05 (%5) olmaktadır. Anlamlılık seviyesi ne kadar düşük olursa, karşılaştırılacak gruplar arasındaki farkın o kadar daha güçlü olması gerekmektedir. Geleneksel kullanımdan dolayı bu çalışmada da anlamlılık düzeyi (level of significance) 0,05 olarak seçilmiştir.

Deney sonuçları öncesinde anlamlılık düzeyi ile ilgili şu örneği vermek, sonuçları anlamada daha açıklayıcı olacaktır:

Sağlıklı taraf kemiklerinin deney sonrası direngenlik değerleri bulunmuştur. Benzer şekilde tamir edilen kemiklerin de deney sonrası direngenlik değerleri bulunmuştur. İstatistiksel olarak tamir edilen taraf direngenliğinin sağlıklı taraftan farklı olup olmadığını karşılaştırmadan önce, anlamlılık düzeyi 0,05 seçilmiştir. Bu demektir ki, rastlantı olarak tamir edilen kemiklerin direngenlik değerlerinin sağlam taraf kemiklerinkine yakın (veya benzer) çıkması şansı yüzde

beştir. Bu durumda, istatistiksel modele göre (paired samples t-test), tamir edilmiş (implantlı) kemiklerin direngenlikleri, sağlam kemikler ile benzer sonuçlara sahip olduğunda gruplar arasında bir fark beklenmeyecek ve gözlemlenen örnekleme sonucu (p-değeri) anlamlılık düzeyinden yüksek olacaktır ($p>0,05$). Fakat, tamirli kemik direngenlikleri sağlam taraf kemik direngenliklerinden yeterince farklı (yüksek veya düşük) olduğunda gözlemlenecek örnekleme sonucu (p-değeri) anlamlılık düzeyinden düşük olacak ($p<0,05$) ve istatistiksel olarak bir fark olduğu söylenebilecektir. Bu farkın direngenlik açısından niteliği ise grupların ortalama direngenlik değerlerine, aynı örneğin sağlıklı ve tamirli kemik direngenlik farklarına ve p değerinin anlamlılık değerinden uzaklığına bakılarak öğrenilebilir.

3.7 In vitro ve In vivo Uygulama Sonrası İmplantların Histolojik Değerlendirmesi

In vitro biyoreaktörde geliştirilen yapay dokudaki ve *in vivo* tavşanlardan alınan kemiklerdeki doku gelişimi ile ilgili histolojik çalışmalar reaktördeki kontaminasyon ve kemiklerdeki kırıklar nedeniyle gecikmiştir. Kontaminasyon sorunu çözülmüş ve örnekler histolojik inceleme için hazırlanmaktadır. *In vivo* da tavşanlardan alınan sağlam kemikler de histolojik incelemeye gönderilmiştir. Histolojik inceleme ile ilgili aşağıda verilen yöntemler uygulanacaktır.

3.7.1 In vitro Biyoreaktörde Geliştirilen Yapay Dokuda Histolojik İnceleme

Doku iskelelerinde hücrelerin dağılımının, kemik gibi özel bağ dokusunda yaygın olarak görülen kollajen liflerinin üretim düzeyinin ve mineralizasyonun incelenmesi amacıyla sırasıyla Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson's Trichrome ve von Kossa boyamaları uygulanacaktır (Marra vd. (1999); Ma vd. (2001), Zheng vd. (2006)). *In vitro* kültür sonunda örneklerdeki yeni doku oluşumu, belirtilen boyama yöntemleri uygulanarak histolojik incelemelerle değerlendirilecektir. Histolojik incelemeler için örnekler fosfat tamponlu %10 formalin (pH 7,0) içerisinde sabitlenecek, daha sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilecek, alkolden kurtarıldıktan sonra parafin içinde bloklanacaktır. Bloklardan yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alınacak, deparafinize edilip azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson's Trichrome boyası uygulanacak ve ışık mikroskopunda incelenecektir. Mineralizasyonu değerlendirmek için von Kossa boyaması uygulanacaktır. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyası: Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra su ile yıkanan kesitler Hematoksilen çözeltisinde 8 dk bekletilip damıtık su ile yıkanacaktır. Kesitler önce %70'lik etil alkol daha sonra da %1'lik HCl çözeltisine batırılıp tekrar yıkanacak, 30 s. lityum karbonat çözeltisinde bekletilip su ile yıkanacak ve daha sonra eozin çözeltisinde 2 dk

bekletilecek ve su ile yıkanacaktır. Yükselen alkol serisinden geçirildikten sonra kapama ortamı ile kapatılacaktır.

Masson's Trichrome Boyası: Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra damıtık su ile yıkanan kesitler Bouin çözeltisinde 1 saat 56°C etüvde bekletilecektir. Etüvden alınan kesitler oda ısısında soğumaya bırakılıp sarı renk uzaklaşana dek su ile yıkanacaktır. Örneklere, Weigert Demir Hematoksilende 10 dk çekirdek boyası uygulaması yapılacaktır. Kesitler su ile 10 dk yıkandıktan sonra Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin çözeltisinde 2 dk tutulacak, su yıkamasını takiben fosfotungstik asit çözeltisinde 10 dk bekletilecek ve damıtık su ile yıkandıktan sonra Light Green çözeltisinde 5 dk süreyle tutulacaktır. Boyamanın ardından damıtık su ile yıkanan örnekler %1 asetik asit çözeltisinde 3-5 dk bekletilecek, dehidrate edilen kesitler, şeffaflaştırıldıktan sonra kapama balsamı ile kapatılacaktır.

von Kossa Boyası: Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra damıtık su ile yıkanan kesitler %1'lik gümüş nitrat çözeltisi içinde yarım saat UV ışınması altında tutulacak, daha sonra damıtık su ile yıkanacak, reaksiyona girmeyen gümüşü uzaklaştırmak için %5'lik sodyum tiyosülfat çözeltisinde oda sıcaklığında 5 dk bekletilecektir. Kesitler su ile yıkandıktan sonra %0,1'lik Nuclear Fast Red çözeltisinde 5 dk bekletilecektir. Kesitler su ile yıkayıp yükselen alkol serisinden geçirildikten sonra kapama ortamı ile kapatılacaktır.

3.7.2 *In vivo*'da Tavşanlarda Histolojik İnceleme

In vivo kemik implant çalışmalarında operasyonun 4. ve 8. haftalarında ötenazi edilen tavşanlardan çıkartılan sağ ve sol femur kemik dokuları kullanılmıştır. Tüm doku hazırlama ve histolojik incelemeleri Acıbadem Üniversitesinde yürütülmektedir. Projenin *in vivo* hayvan deneyleri kısmında da belirtildiği üzere cerrahi operasyonlar sırasında bazı tavşanların femurlarında oluşan kırıklar ya da oluşan mikro düzeyde kırıkların postoperatif bakım sırasında genişlemesi nedeniyle ve de operasyondan 2 gün sonra bazı hayvanların ölmesi nedeniyle toplamda 20 adet tavşan için *in vivo* deneyler tekrarlanmıştır. Histolojik incelemeler için gelen sağlam kemik dokuları aşağıda detaylı olarak belirtildiği yöntemle fikse edilmiş ve dekalsifiye edilmiştir (Şekil 19).

Sağlam dokuları işleme almadan önce kontrol kemik örneklerinde dekalsifikasyon süresi için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve örneklerin Shandon TBD-2 Decalcifier içerisinde 14 gün boyunca bekletilmesinin uygun olduğu görülmüştür. Kemik doku örnekleri öncelikle fosfat tamponlu %10 formalin (pH 7,0) içerisinde fikse edildi. Fiksasyonu takiben fosfat tamponu (pH

7,0) ile yıkanan örnekler Shandon TBD-2 Decalcifier içerisinde 14 gün boyunca bekletilerek kontrollü olarak dekalsifiye edilmektedir. Örnekler daha sonra, yükselen etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilip, parafin içine gömülerek bloklanmış, ve yaklaşık 5 µm kalınlığında kemiğin uzun eksenine paralel (longitudinal) ve enlemesine (transversal) kesitler alınmıştır. Elde edilen kesitler boyama öncesi deparafinize edilip azalan etil alkol serilerinden geçirilmiştir. Kesitlere kalitatif ve kantitatif analizler için Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson's Trichrome boyası uygulanarak ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Örnekler, yeni kemik oluşumu, fibröz bağ dokusu oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından histolojik incelemelerle değerlendirilmiştir.

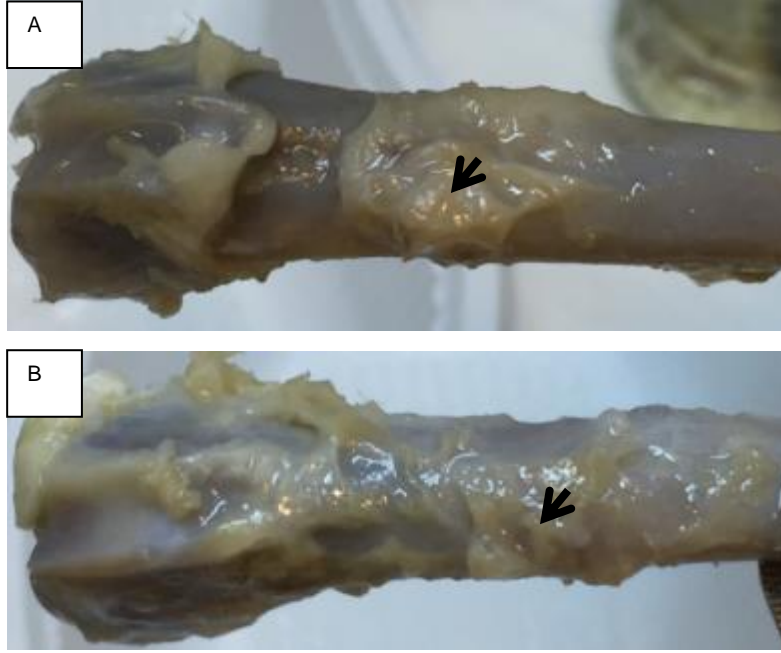
İmplant bölgesindeki doku yanıtı için fibröz bağ dokusu oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu varlığını ve düzeyini belirlemek amacıyla, doku kesitlerine histolojik skorlama yapılmıştır (Kose vd. (2004); Royals vd. (1999)).

Fibröz bağ dokusu oluşumu için skorlama kriterleri:

- 0) normal kontrol dokusu ile farklılık olmaması ya da implant bölgesinde ya da çevresinde bağ dokusu oluşmaması;
- (1) az miktarda iç biçimli hücrelerin varlığı ya da hafif fibroplazi;
- (2) orta derecede bağ dokusu oluşumu;
- (3) normal doku yapısının bozulması ve orta derecede sıkı fibröz bağ dokusu oluşumu;
- (4) implant çevresinde ciddi derecede/fazla miktarda kollajen açısından zengin sıkı fibröz bağ dokusu oluşumu

İnflamatuvar hücre infiltrasyonunu değerlendirmek için skor kriterleri:

- (0) normal kontrol dokusu ile farklılık olmaması ya da implant bölgesinde ve çevresinde makrofaj, yabancı cisim dev hücresi, lenfosit, eozinofil ya da nötrofil gibi hücrelerin bulunmaması;
- (1) az sayıda lenfosit ya da makrofaj hücrelerinin varlığı, yabancı cisim dev hücresi, eozinofil ya da nötrofillerin bulunmaması;
- (2) orta derecede lenfosit, makrofaj bulunması, az sayıda yabancı cisim dev hücresi ve küçük odak şeklinde nötrofillerin bulunması;
- (3) çok miktarda lenfosit, makrofaj, yabancı cisim dev hücrelerinin, belirgin eozinofil ve nötrofillerin varlığı;
- (4) implanta karşı ciddi derecede hücre infiltrasyonu ya da implant bölgesinde doku nekrozunun varlığı şeklindedir.



Şekil 19. *In vivo* deneyler sonrası tavşanlardan çıkartılan ve dekalsifiye edilen sağlam femur kemik dokuları. 4 hafta sonra çıkarılan A) PCL/HAp-Hücreli örnek ve B) PCL/HAp/PPF-Hücreli örnek (Ok implantın bulunduğu bölgeyi göstermektedir).

4. BULGULAR

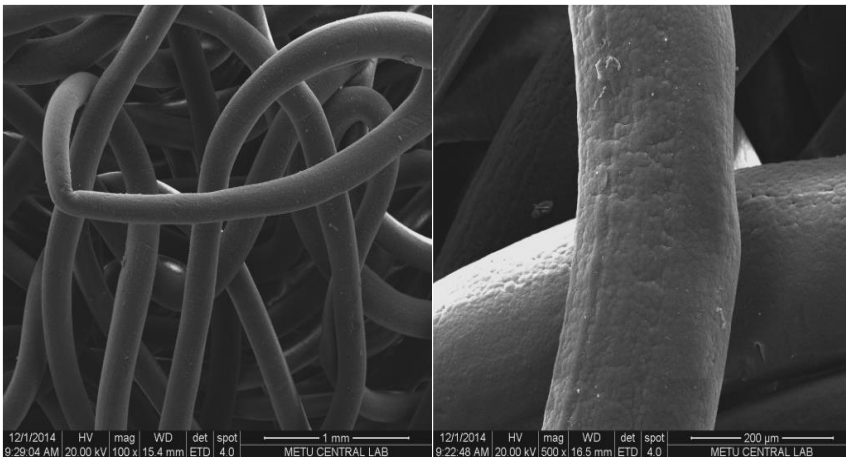
Proje kapsamında, ıslak eğirme ve hızlı prototipleme yöntemleriyle doku destekleri hazırlanmış, modifiye edilmiş, karakterizasyonu yapılmış, *in vitro* hücre ile etkileşimi incelenmiş, ve optimize edilerek seçilen destekler *in vivo* testleri ile tavşan kemiklerinde açılan defektlere yerleştirilmiştir. Dördüncü ve sekizinci haftalarda alınan kemiklerde iyileşme durumları incelenmiştir. Bulgular ve tartışmalar aşağıda açıklanmaktadır.

4.1 İmplant Kompozisyonunun Hazırlanması ve Optimizasyonu

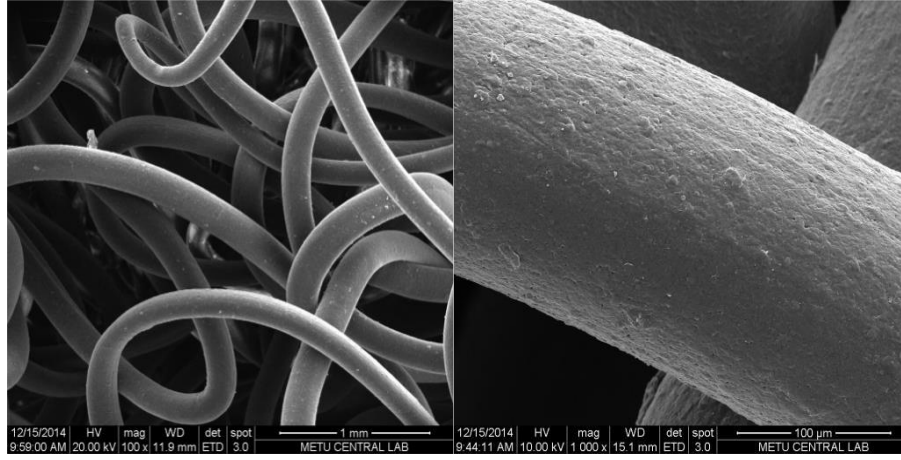
Bu proje çerçevesinde ıslak eğirme tekniği ile ve hızlı prototipleme ile basılarak iki tür doku desteği hazırlanmıştır.

4.1.1 Islak Eğirme Tekniği ile Hazırlanan Destekler

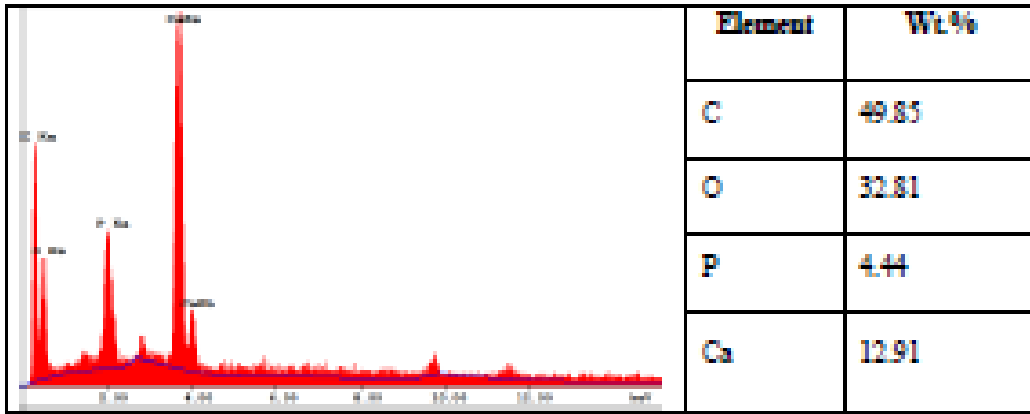
Islak eğrilmiş PCL ve PCL/TCP doku destek yapılarının SEM görüntüleri ve EDX sonuçları Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22’de verilmiştir. Fiberlerin çapı yaklaşık 200 µm - 220 µm olarak ölçülmüştür. SEM görüntülerinde, hem PCL hem de PCL/TCP yapılarına sahip olan fiberlerin düzgün ve homojen boyutta olduğu belirlenmiştir. Islak eğirme sırasında düzgün polimer akışı ve homojen kalınlıkta fiberler elde etmek için, polimer konsantrasyonu, çözücü tipi, akış hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda polimer konsantrasyonu olarak %20, çözücü olarak aseton ve akış hızı olarak 1mL/saat seçilmiştir. Islak eğrilmiş doku desteklerinin gözenek dağılımı 5 – 200 µm olarak bulunmuştur (Şekil 23).



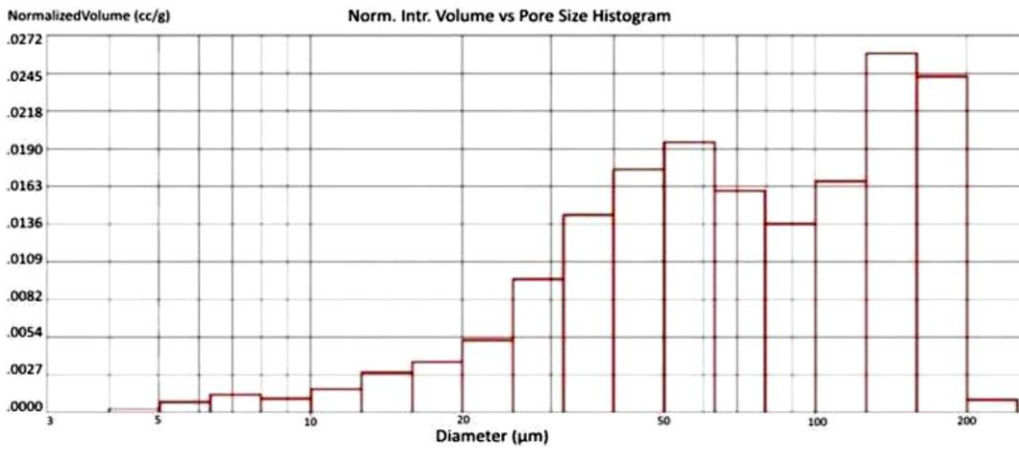
Şekil 20. Islak eğrilmiş PCL doku desteklerinin SEM mikrografı.



Şekil 21. Islak eğrilmiş PCL/TCP doku desteklerinin SEM mikrografı.



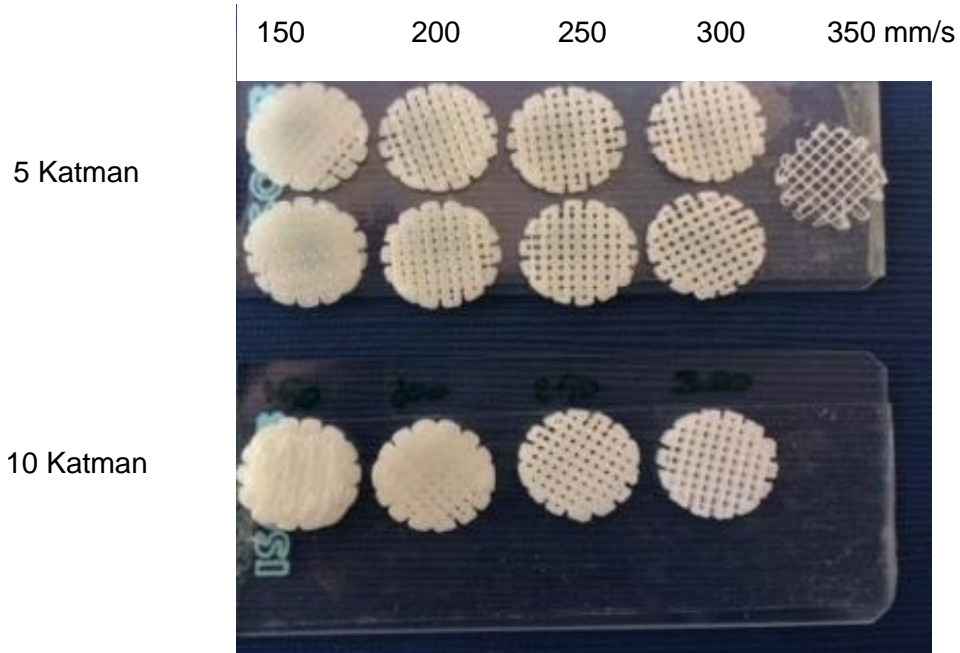
Şekil 22. PCL/TCP yapıların EDX sonuçları.






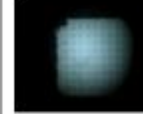
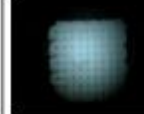





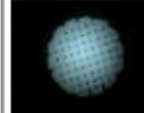

Şekil 23. Islak eğrilmiş PCL desteklerinin gözenek boyutu dağılımı.

4.1.2 Hızlı Prototipleme Yöntemi ile 3B Doku Desteklerinin Hazırlanması

Hızlı prototipleme ile üretilen 3B doku desteklerinin optimizasyon çalışmaları için 5 ve 10 katmanlı örnekler x-y doğrultusunda farklı hızlar (150, 200, 250, 300 ve 350 mm/s) denenerek üretilmiştir (Şekil 24). Hızın 150 mm/s olduğu örneklerde polimer liflerinin yayıldığı ve katmanların çöküntü yaptığı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, hız arttıkça, lifler arasında ayrılma, gözenek boyutlarında büyüme ve tüm yapıda homojenlik gözlemlenmiştir. Hızın 350 mm/s olduğu durumda ise, lif kopması nedeni ile kalın destek hazırlanması mümkün olmamıştır. Bu çalışmanın sonunda, hücre kültürü ortamında besin ve oksijen geçişini engellemeyecek ve aynı zamanda da hücrelerin tutunabileceği fiber yapıları 300 mm/s hız ile üretilen 10 katmanlı doku desteklerinde görülmüştür. 3B PCL doku destekleri, fiber katmanları arasında 90°'lik açı olacak şekilde, Temel ve Temel-kaymalı tasarımlarda üretilmiştir. Temel-kaymalı yapılarda ikinci katman birinciye göre 90° açılı, üçüncü katman birinciye göre kaymalı hazırlanmıştır. Bunun nedeni, gözenekler arasında oluşan büyük boşlukları doldurmak ancak hücre geçişini engellememektir (Şekil 25).

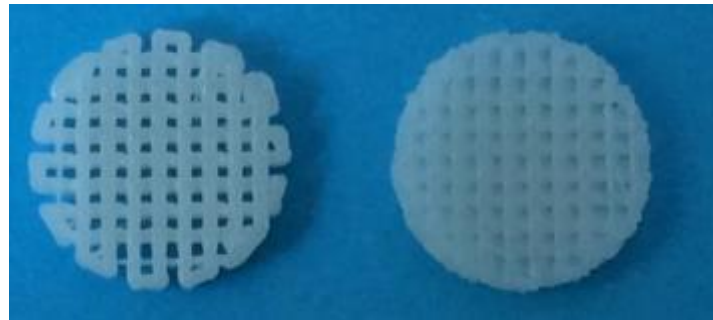


Şekil 24. x-y doğrultusunda farklı hızlar (150, 200, 250, 300 ve 350 mm/s) denenerek üretilen 5 ve 10 katmanlı PCL doku destekleri.

Kayma Miktarı (mm)	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0
Geometri						
Küp						
Silindir						

Şekil 25. Farklı miktarlarda kaymalar denenerek elde edilen PCL doku desteklerinin stereomikroskop altında çekilmiş görüntüleri.

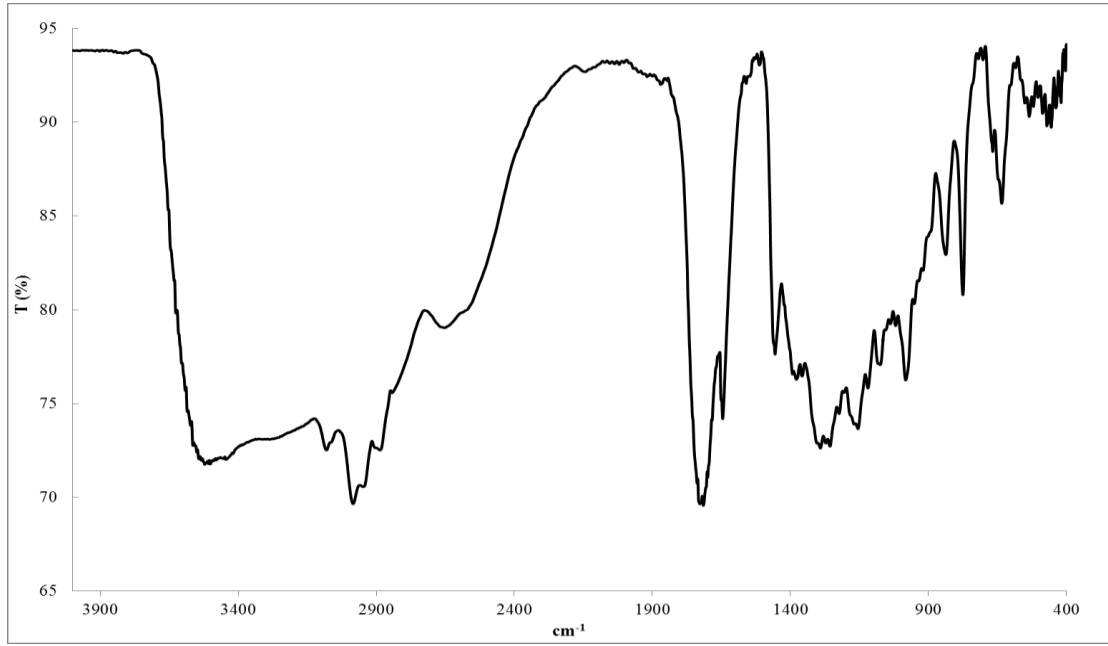
Temel yapılarda lifler arası boşlukların büyük olması, hücre kültür ortamında yeterli hücre tutunumu sağlamanın güç olabileceği öngörüsü ile temel-kaymalı doku destekleri hazırlanmıştır. Bu amaç için, kayma miktarı değiştirilerek (0.50, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10 mm), doku kültür ortamında hücre ilerleyişi, besin/oksijen geçişi ve hücrelerin birbirleriyle temaslarını engellemeyecek yapıların oluşturulması çalışılmıştır. Temel-kaymalı yapılar, küp ve silindir formlarında ve tabakalar arasındaki kayma oranı 0 ile 0.50 mm aralığında değiştirilerek farklı tasarımlarda hazırlanmıştır. Kayma oranı arttıkça gözenekler arası boşlukların dolduğu ve en fazla doluluğun 0.50 mm kaymalı geometrilerde olduğu gözlenmiştir. Silindirik yapıda hazırlanan Temel ve Temel-kaymalı (0.15 mm) örnekler daha ileri çalışmalar için seçilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Temel ve temel kaymalı (0.15 mm) PCL doku destekleri.

4.2 PPF Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu proje kapsamında sentezlenen PPF'in molekül ağırlığı Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile belirlenmiş ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Mw) 2704 g/mol ve sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) 1816 olarak bulunmuştur. Bu iki değerin birbirine oranlanmasıyla (Mw/Mn) elde edilen polidispersite indeksi (PDI) ise 1.48 olarak bulunmuştur. Sentezlenen PPF'in Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile analizi yapılmıştır (Şekil 27).



Şekil 27. PPF'in FTIR spektrumu.

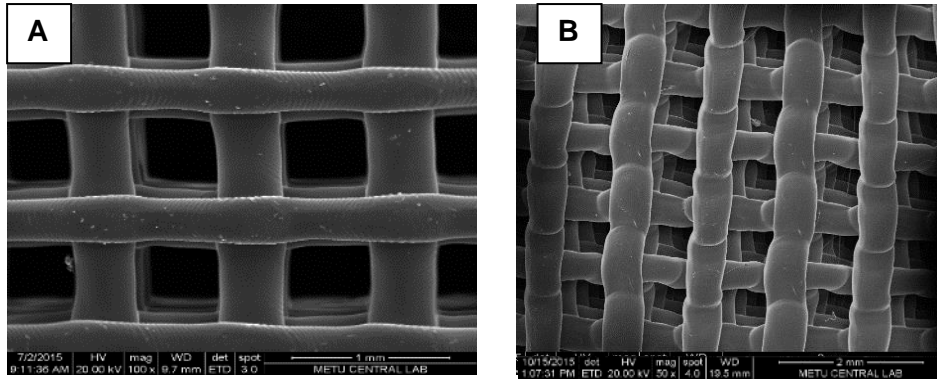
Spektrumda, 3500 cm^{-1} civarındaki pik OH gruplarından, 2960 cm^{-1} civarındaki pik CH_2 gruplarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1715 cm^{-1} ve 1646 cm^{-1} 'de görülen pikler ise sırasıyla yapıdaki ester karbonil grupları ve $\text{C}=\text{C}$ bağlarının varlığından oluşmaktadır. $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler C-O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır.

4.3 3B Kompozit Doku Desteklerinin Hazırlanması

Bioscaffolder ile hazırlanan 3B doku desteklerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu aşağıda açıklandığı şekilde SEM, EDS ve MikroBT ile yapılmıştır.

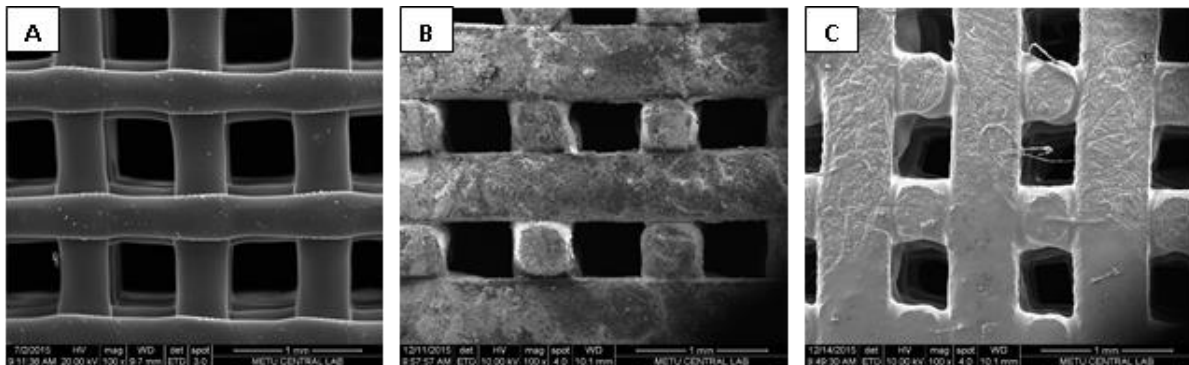
4.3.1 3B Kompozit Doku Desteklerinin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

Temel ve temel kaymalı PCL doku desteklerinin SEM mikrografları Şekil 28'de verilmiştir. Temel-kaymalı desteklerde, tabakalar arasındaki boşlukların belli oranda dolduğu ve hücre ekimi sırasında hücrelerin destek liflerine daha kolay tutunacağı öngörülmektedir.



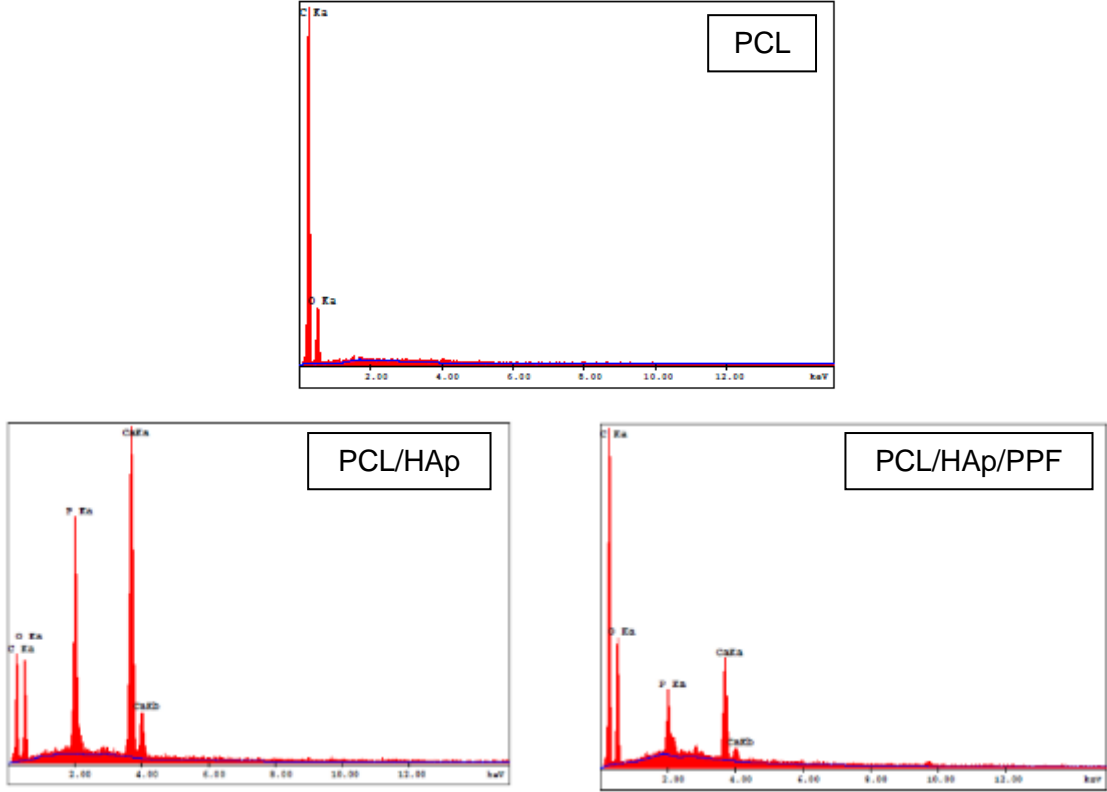
Şekil 28. PCL doku desteklerinin SEM mikrografları. Tasarım tipi: A) Temel; B) Temel-kaymalı.

Yüzeyleri hidroksiapatit (HAp) ile veya HAp ve polipropilen fumarat (PPF) ile modifiye edilerek hazırlanan PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF kompozit doku destekleri PCL doku destekleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 29).



Şekil 29. Temel yapıdaki doku desteklerinin SEM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp; C) PCL/HAp/PPF.

Desteklere HAp eklenmesi yüzey pürüzlülüğünü artırmış (Şekil 29), PPF kaplama ise lifler arasında yapışma sağlamıştır (Şekil 29). PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destek yapılarının kimyasal yapıları, Taramalı Elektron Mikroskopuna bağlı Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS) (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin EDS spektrumları.

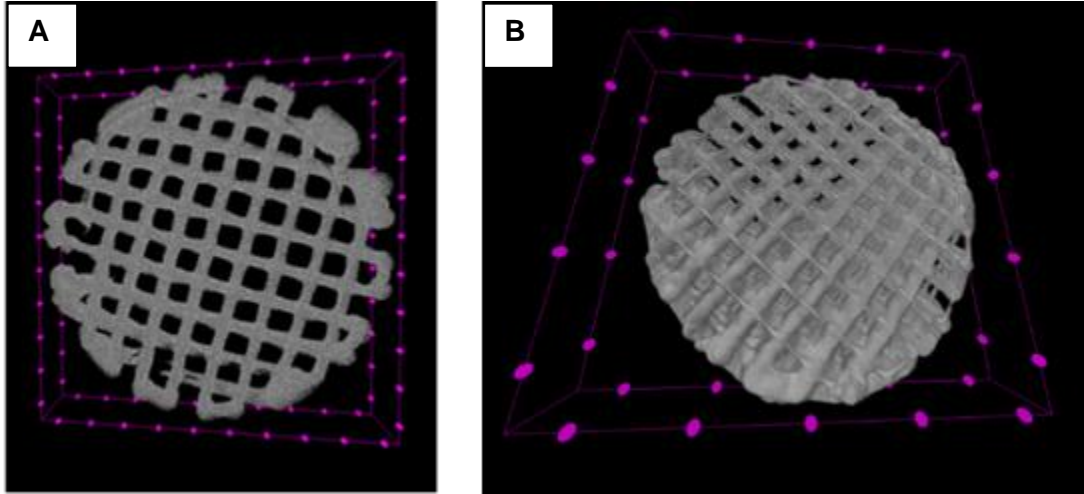
EDS analizi ile PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destek yapılarında, Ca ve P elementlerinin varlığı gösterilmiştir. PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF örneklerinde elementlerin atomik yüzdeleri ve Ca/P oranı sırasıyla 1.44 ve 1.61 olarak hesaplanmıştır ve Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. 3B doku desteklerinin EDS analizi sonuçları.

	C	O	Ca	P	Ca/P
PCL	83.50	16.50	-	-	-
PCL/HAp	59.28	29.66	4.52	6.53	1.44
PCL/HAp/PPF	74.64	23.38	0.76	1.22	1.61

EDS sonuçlarına göre, HAp kaplama ile örneklerde kalsiyum pikleri (%4.52) gözlenmiştir. PPF kaplama kalsiyum piklerinde azalmaya (%0.76 değerine) neden olmuştur. Ca/P oranı sırasıyla 1.44 ve 1.61 olarak bulunmuştur. Bu orandaki azalma, büyük ihtimalle, kristal yapıda bulunmayan ve çözünebilir olan bazı kalsiyumfosfat iyonlarının PPF kaplama işlemi sırasında yapıdan ayrılması ile açıklanabilir.

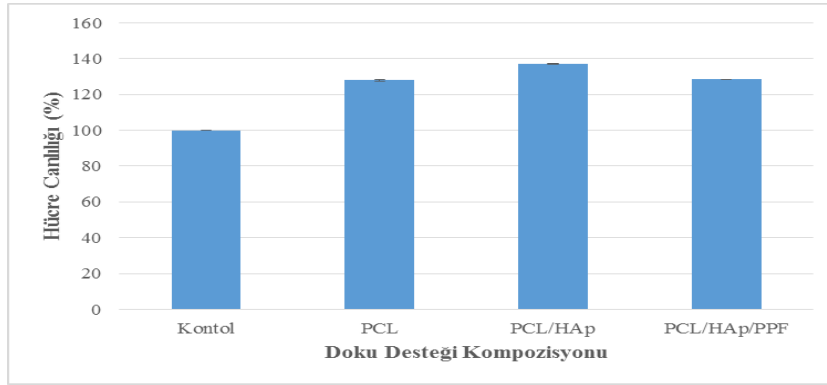
Temel ve temel-kaymalı PCL doku destekleri Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT) ile taranmış (Şekil 31) ve gözenekliliği hesaplanmıştır. Mikro-BT gözenek analiz sonuçlarına göre temel yapıdaki doku desteklerinin kapalı gözenekleri %1,5, toplam gözenekleri ise %42 olarak hesaplanmıştır. Temel kaymalı doku desteklerinin kapalı gözenekleri %1,06 bulunurken, toplam gözenekleri %17 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler doku desteklerinin, çevre dokulardan hücre geçişine ve kemik doku rejenasyonuna izin verecek kadar yüksek gözenek alanına sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte temel yapılarda gözenek büyüklüğü $527 \pm 0,05 \mu\text{m}$ bulunurken temel kaymalı yapılarda gözenek büyüklüğü $515 \pm 0,01 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Bu iki tasarım arasında gözenek büyüklüğü açısından çok büyük farklılıklar olmasa da temel kaymalı yapılarda her boşluğun altını kısmen dolduran fiber yapılarının olmasının, ilk ekleme sırasında hücre akışını engelleyeceği ve daha fazla hücre tutunmasına olanak sağlayacağı öngörülmektedir.



Şekil 31. PCL doku desteklerinin mikro-BT görüntüleri A. Temel ve B. Temel kaymalı.

4.3.2 *In vitro* Sitotoksosite Testi

PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin sitotoksosite testleri L929 hücre hattı kullanılarak Alamar Blue yöntemiyle yapılmıştır. Bu teste ait sonuçlar Şekil 32'de verilmiştir. Şekil 32'de görülebileceği gibi PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin L929 hücreleri üzerine toksik etkisi yoktur. Dolayısıyla üretilen doku destekleri ileri aşama *in vitro* deneylerinde ve *in vivo* uygulamalarda güvenle kullanılabilir.



Şekil 32. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin sitotoksosite test sonuçları.

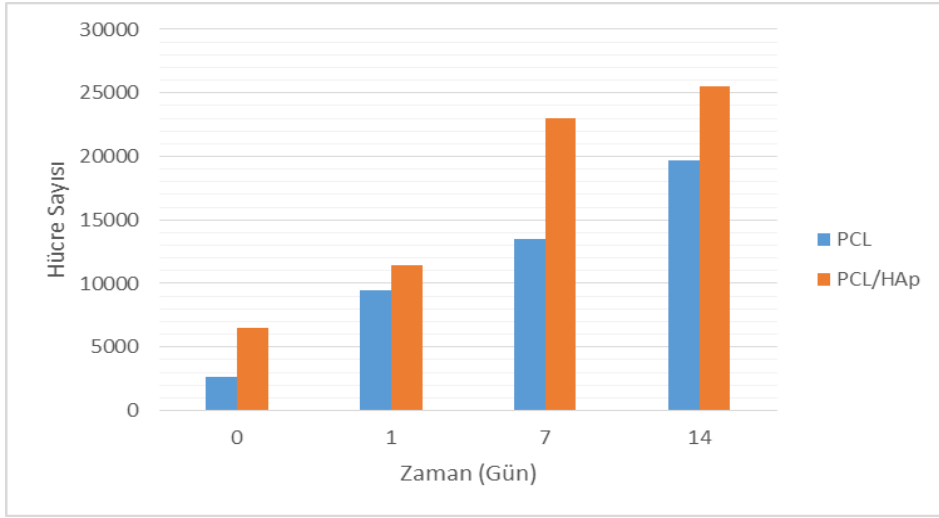
4.4 *In vitro* Biyouyumluluk Testleri

In vitro ortamda yapılan biyouyumluluk testleri statik koşullarda ve perfüzyon biyoreaktöründe yürütülmüştür.

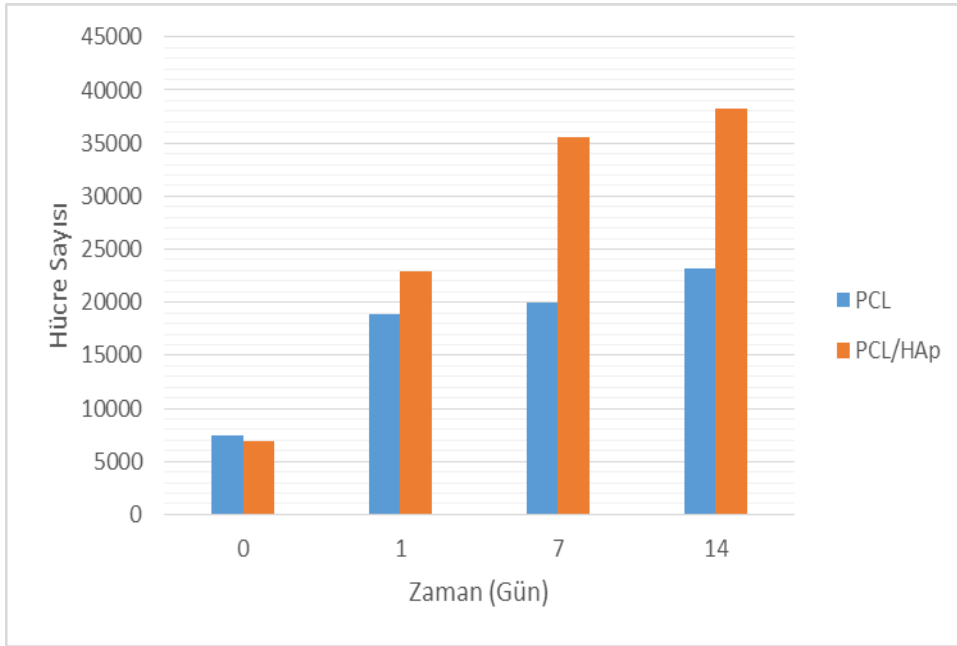
4.4.1 Statik Koşullarda Hücre Biyouyumluluğu

Mezenkimal kök hücreler, Şekil 33 ve Şekil 34'te görüldüğü üzere PCL/HAp doku destekleri üzerinde PCL doku desteğine oranla daha iyi tutunmuş ve hücre sayısı buna bağlı olarak daha fazla artmıştır.

Temel (B) ve temel kaymalı (BS) doku desteklerindeki hücre sayıları karşılaştırıldığında, beklendiği üzere gözenek büyüklüğü daha küçük olan temel kaymalı doku destekleri üzerinde (hem PCL hem de PCL/HAp) hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir.



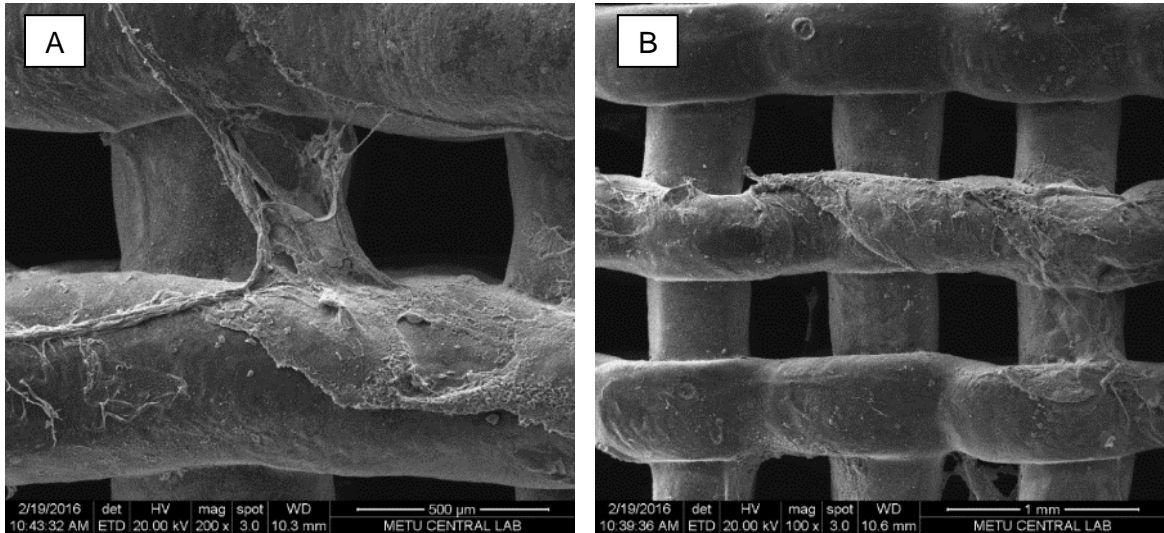
Şekil 33. Temel doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının zamana bağlı değişimi.



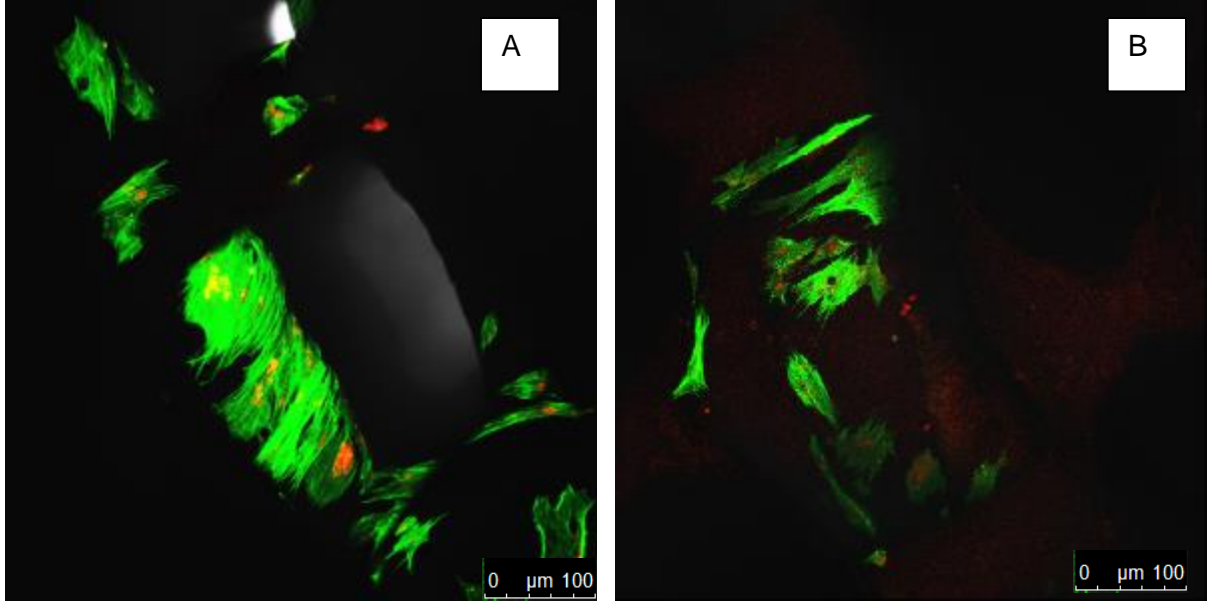
Şekil 34. Temel-kaymalı doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının zamana bağlı değişimi.

Hidroksiapatit biyouyumlu, biyoaktif ve osteokondüktif özelliklere sahip olduğundan birçok çalışmada kullanılmış ve olumlu biyolojik etkileri ispatlanmıştır. Hidroksiapatit tümör cerrahisinde kemikte oluşan boşlukta dolgu materyali olarak, kırık kemik onarımında kemikteki defekti kapatmak için köprü olarak, dişçilikte diş kökünü beslemede ve implant kaplamalarında kullanılmaktadır. Literatürde kemiğin doğal yapısında bulunan hidroksiapatitin doku destek yapılara eklenmesi veya desteklerin yüzeyinde oluşturulmasıyla hücre çoğalması ve farklılaşmasının olumlu etkilendiği gösterilmiştir (Park vd. (2014); Heo vd. (2009)). Eklenen nanohidroksiapatit yüzey alanını arttırdığı ve yüzeyi pürüzlendirdiği için hücre yapışmasını ve çoğalmasını arttırmıştır. Yüzey pürüzlülüğünün artması hidroksiapatitin başarılı ve homojen bir şekilde PCL yüzeyine kaplandığını göstermiştir.

Doku desteklerinin hücre morfolojisine etkisi ise mikroskopik yöntemlerle incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda sterilize edilen doku desteklerinin üzerine tavşan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler ekilerek taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM) kullanılmıştır. SEM analizi için örnekler %4'lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra %1'lik osmiyum tetraoksit ile boyanmıştır. Daha sonra örnekler üzerlerindeki suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlarda hazırlanan etanol serisinden geçirilip liyofilize edilmişlerdir. CLSM analizi için hücrelerin iskeleti FITC-labeled phalloidin ile, hücre çekirdekleri ise DRAQ5 ile boyanmıştır. SEM ve CLSM mikrografları Şekil 35 ve Şekil 36'da verilmiştir.



Şekil 35. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin 21. gün SEM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp.

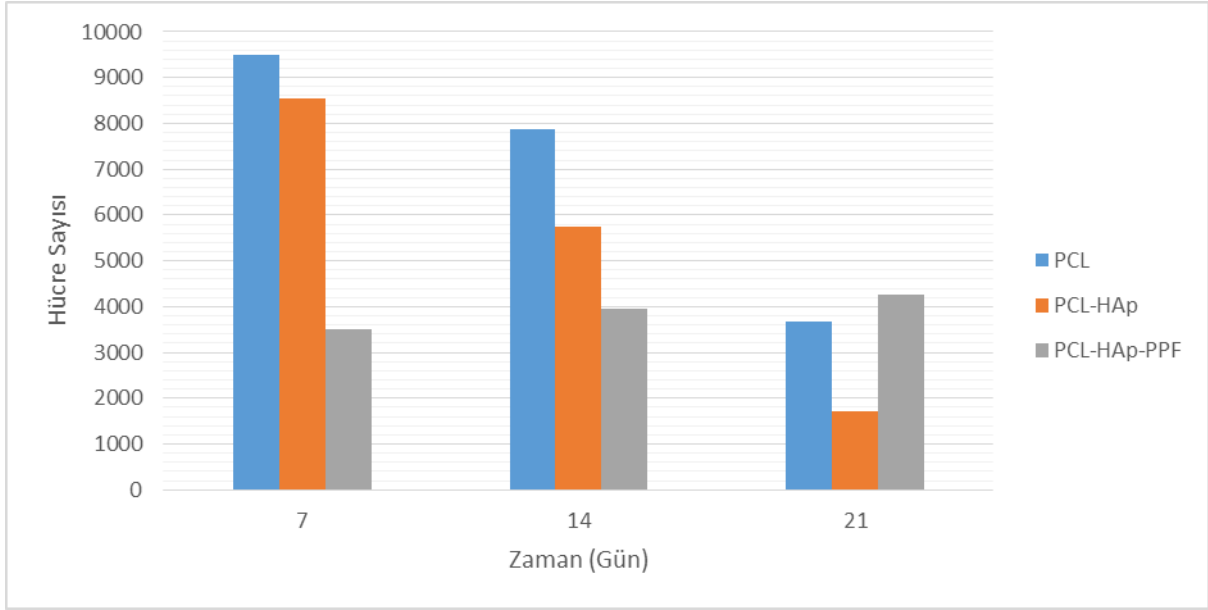


Şekil 36. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin CLSM mikrografları. A) PCL; B) PCL/HAp (Yeşil: FITC işaretli Phalloidin ile boyanmış aktin filamentleri, Kırmızı: DRAQ5 ile boyanmış hücre çekirdeği).

Statik koşullarda yapılan hücre deneylerinin 21. gün SEM mikrograflarında PCL ve PCL/HAp örneklerinin her ikisinde de hücrelerin destek üzerine yapıştığı, yayıldığı ve fiberler arasında bağlantı kurduğu görülmüştür. Konfokal mikrograflarında da hücrenin fiber üzerini kapladığı yeşil renkte görülen aktin filamentleri ve kırmızı renkte görülen çekirdekleri ile doku desteklerinin kemik doku mühendisliğine uygunluğu gösterilmiştir.

4.4.2 Perfüzyon Biyoreaktöründe Hücre Biyouyumluluğu

Temel-kaymalı doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücreler perfüzyon biyoreaktöründe 21 gün süreyle kültüre edilmiş ve bir hafta aralıklarla hücre sayıları Alamar Blue testiyle elde edilmiştir (Şekil 37).

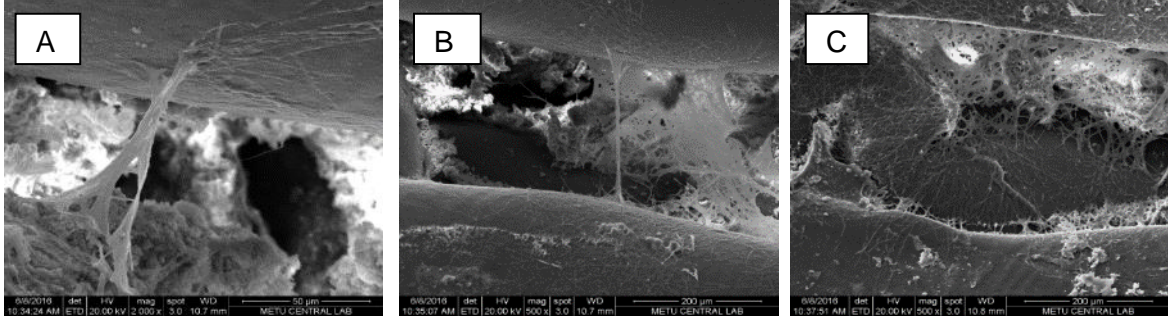


Şekil 37. Temel-kaymalı doku desteklerine ekilen mezenkimal kök hücre sayısının perfüzyon biyoreaktöründe zamana bağlı değişimi (Ekilen hücre sayısı: 3×10^4 /örnek).

Doku desteklerinde ilk haftada elde edilen hücre sayıları PCL için 9000, PCL/HAp için 8500 ve PCL/HAp/PPF için 3500 civarında bulunmuştur. Her ne kadar ilk ekilen hücre sayısına göre (30000 hücre) bu değerler çok düşükse de bu sonuç, ilk ekim sırasında hücrelerin büyük fiber aralıklı desteklerden akması ve ayrıca yapışan hücrelerin biyoreaktörde akış sonucu doku desteklerinden kalkması ile açıklanabilir. Perfüzyon reaktöründe akış hız ve yönünün değiştirilmesiyle hücre tutunmasının ve çoğalmasının artırılabilceği beklenmektedir. Literatürde de akış hızının 0,2 – 1,0 mL/dk arasında olması gerektiği belirtilmesine karşın çalışmada kullanılan peristaltik pompanın sağladığı en düşük akış hızının 1,7 mL/dk olması bu sonucu etkilemiştir.

21. gün sonunda perfüzyon biyoreaktöründen çıkan doku destekleri, farklı kimyasal kompozisyonlara sahip 3B doku desteklerinin hücre morfolojisine etkisinin araştırılması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI Quanta 400F, Hollanda) ile incelenmiştir. SEM analizi için örnekler %4'lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra %1'lik osmiyum tetroksit ile boyanmıştır. Daha sonra örnekler üzerlerindeki suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlarda hazırlanan etanol serisinden geçirilip liyofilize edilmişlerdir (Şekil 38).

SEM görüntülerinde mezenkimal kök hücrelerin doku desteklerinin yüzeyine yapıştığı, büyüdüğü ve hücrelerin polimer fiberler arasında köprü kurduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bütün doku desteklerinin hücre büyümesi için uygun koşullar sağladığını ve hücre çoğalması üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Doku desteklerine eklenen HAp ve PPF'in destek-hücre etkileşimlerine olumsuz etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 38. Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin 21. gün SEM mikroagrafları. A) PCL; B) PCL/HAp; C) PCL/HAp/PPF.

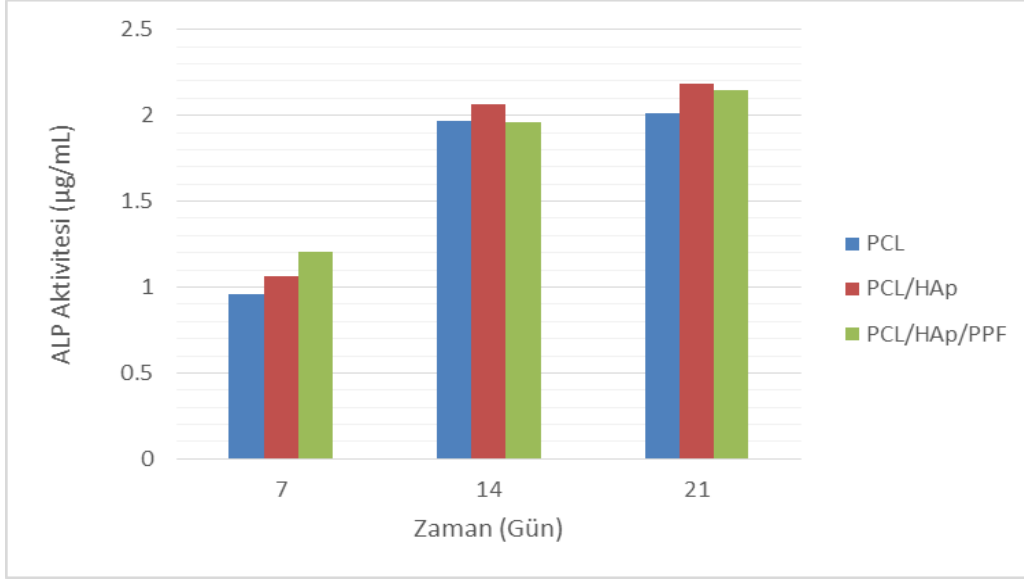
4.5 *In vitro* Osteojenik Farklılaşma Testleri

Kök hücrelerin, kemik oluşumundan sorumlu öncül hücrelere dönüşme potansiyeli moleküler mekanizmalarca kontrol edilmektedir. Alkalen fosfataz (ALP) çoğunlukla hücre yüzeyinde bulunan bir glikoprotein olup mineralizasyonda görev alan bir enzimdir ve ekspresyonu erken dönem osteojenik farklılaşma belirtisidir. Kemik oluşumunda belirteç olarak kullanılan ALP, kemik sialoproteini II, osteonektin ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) öncü olarak sentezlenirken, osteopontin ve osteokalsin sonraki basamaklarda sentezlenmektedir (Koc (2008); Golub ve Boesze-Battaglia (2007); Tsai vd. (2009)).

4.5.1 Alkalen Fosfataz Aktivitesi

Hücrelerin ALP aktiviteleri ALP aktivite kiti kullanılarak 21 gün süreyle izlenmiştir (Şekil 39). Yapılan çalışmalarda ALP aktivitelerinin 14. günde en yüksek değere ulaştığı, daha sonra ise bir miktar azaldığı gözlenmiştir (Carvalho vd. (2012); Marino vd. (2010)). Osteojenik farklılaşmanın takibi için belirli zaman aralıklarında (1, 2 ve 3 hafta) doku desteklerine ekilen hücrelerin ALP aktiviteleri ALP kiti ile ölçülmüştür. ALP ekspresyonu bütün gruplarda 7 ile 14 gün arasında artış göstermiştir. 21. günde ise ALP ekspresyon seviyesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir. ALP ekspresyonunun belli bir noktadan sonra artmaması beklenen

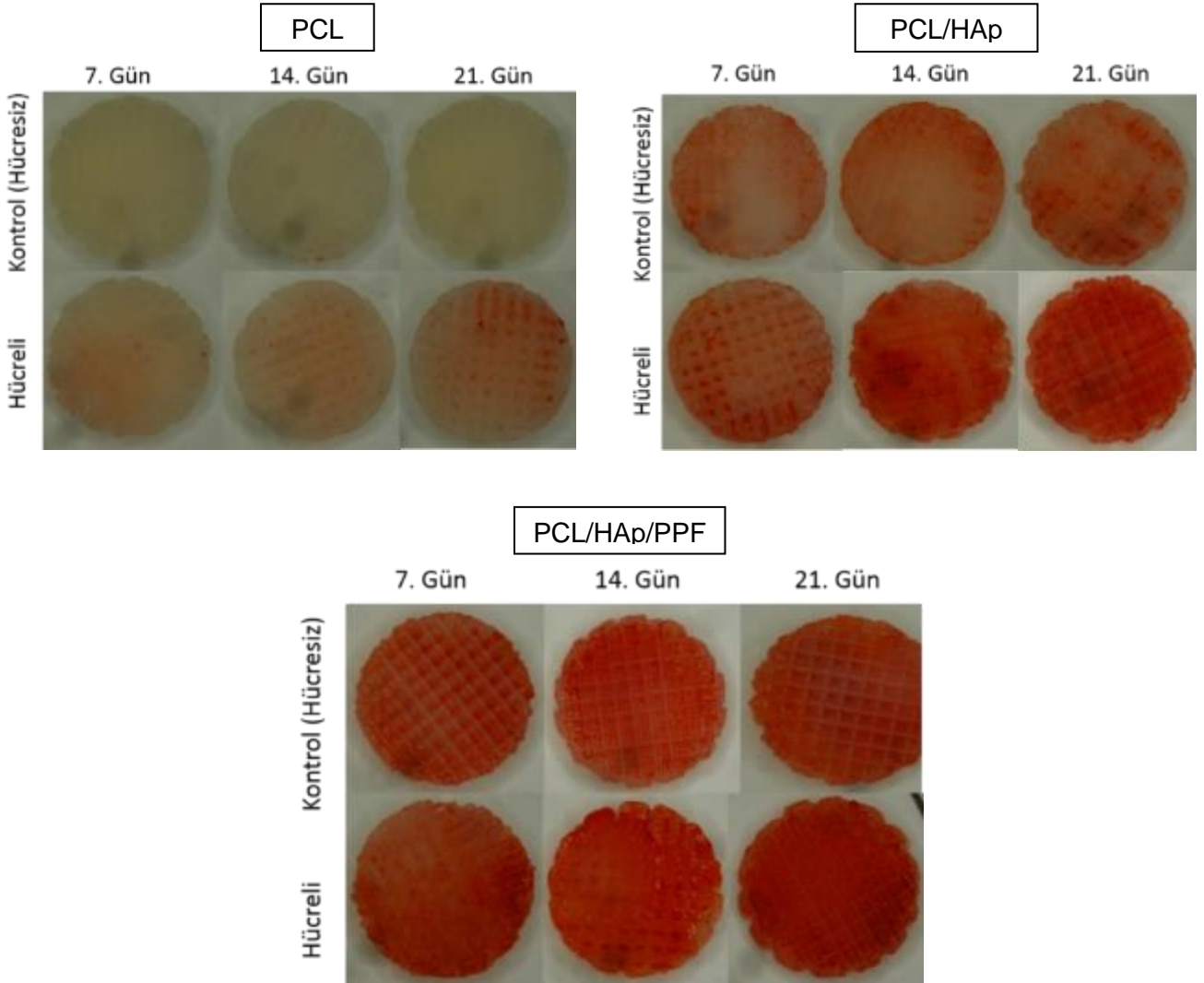
bir sonuçtur. HAp'ın varlığının ALP ekspresyonuna olumlu katkı yaptığı bilinmektedir (Ardeshirylajimi vd. (2015)) ve bu etki PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF örneklerinde düşük düzeyde de olsa gözlenmiştir.



Şekil 39. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin üzerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelerin zamana bağlı ALP aktiviteleri.

4.5.2 Alizarin Red Boyaması

Kalsiyum birikmesi osteojenezin geç dönem belirteçidir (Kim vd. (2011)). Aynı zamanda mineralizasyonun da göstergesidir (Golub ve Boesze-Battaglia (2007)). Alizarin red boyaması ALP aktivitesi ile aynı süreler içinde görülmektedir ve desteklerde 14. günde başlayan ve 21. günde de devam eden kırmızı renk kalsifikasyonun belirtisidir (Şekil 40). Hücre ekilmemiş PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF kontrol örneklerinde gözlenen pembe-kırmızı renk örneklerde bulunan HAp'tan kaynaklanmaktadır. Benzer sonuçlar literatürde de vardır (Ardeshirylajimi vd. (2015); Kim vd. (2011)).



Şekil 40. Alizarin red ile boyanmış Mezenkimal kök hücre ekilmiş doku desteklerinin (PCL, PCL/HAp, PCL/HAp/PPF) 1, 7 ve 14. günlerde stereo mikroskop altında çekilmiş görüntüleri.

4.6 *In vivo* Biyouyumluluk Testleri

Deri içi irritasyon ve implantasyon testleri Gebze TÜBİTAK MAM'dan hizmet alınarak yapılmıştır. Burada yürütülen testler ISO protokolleri uygulanarak yapılmıştır. Bu deneylerde desteklerin özütleri veya kendileri deri altına yerleştirilmiş ve doku ile uyumu incelenmiştir.

4.6.1 Deri İçi İrritasyon

PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerine ait deri içi irritasyon testi sonuçları Tablo 8. Deri içi irritasyon değerlendirme sonuçları. Tablo 8 ve Tablo 9'da verilmiştir. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri için yapılan gözlemler ve elde edilen skor değerleri doğrultusunda, ISO 10993-12: 2010 belgesinde belirtilen protokol ve değerlendirme kriterlerine göre PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin deri içi iritan (tahriş edici) özelliğe sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

Tablo 8. Deri içi irritasyon değerlendirme sonuçları.

Örnekler	Bölge	Genel ortalama Skor	Son Test Örneği Skoru
PCL (polar)	Sol Ön Bölge	0	0
PCL (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0,13	0,13
Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	-
Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	-
PCL/HAp (polar)	Sol Ön Bölge	0	0
PCL/HAp (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0,11	0,11
Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	-
Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	-
PCL/HAp/PPF (polar)	Sol Ön Bölge	0	0
PCL/HAp/PPF (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0,20	0,20
Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	-
Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	-

Tablo 9. Genel ortalama skor değerleri.

ID	Örnekler			Bölge	Skor		
					PCL	PCL/HAp	PCL/HAp/PPF
1	PCL (polar)	PCL/HAp (polar)	PCL/HAp/PPF (polar)	Sol Ön Bölge	0	0	0
	PCL (non-polar)	PCL/HAp (non-polar)	PCL/HAp/PPF (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0,13	0,13	0,33
	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	0	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	0	0
2	PCL (polar)	PCL/HAp (polar)	PCL/HAp/PPF (polar)	Sol Ön Bölge	0	0	0
	PCL(non-polar)	PCL/HAp (non-polar)	PCL/HAp/PPF (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0,27	0	0
	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	0	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	0	0
3	PCL (polar)	PCL/HAp (polar)	PCL/HAp/PPF (polar)	Sol Ön Bölge	0	0	0
	PCL(non-polar)	PCL/HAp (non-polar)	PCL/HAp/PPF (non-polar)	Sağ Ön Bölge	0	0,20	0,27
	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Polar Çözücü Kontrol	Sol Arka Bölge	0	0	0
	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Non-polar Çözücü Kontrol	Sağ Arka Bölge	0	0	0

4.6.2 İmplantasyon Testleri

TÜBİTAK MAM tarafından yapılan implantasyon deneylerinde ratlara uygulanan PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerine ait implantasyon sonuçları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin implantasyon testi skorları.

Örnek Tipi	PCL						PCL/HAp						PCL/HAp/PPF					
	Test Orneği			Kontrol Orneği			Test Orneği			Kontrol Orneği			Test Orneği			Kontrol Orneği		
Hayvan Sayısı	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Inflamasyon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polimorfonükleer hücreler	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lenfositler	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Plazma hücreleri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Makrofajlar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dev hücreler	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nekrosiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALT TOPLAM (x2)	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
Yeni Damarlanmalar	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrozis	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
Yağ İnfiltrasyonu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALT TOPLAM	1	2	1	0	1	1	2	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
TOPLAM	2	3	2	0	1	2	3	2	2	0	1	1	1	2	2	1	1	1
GRUP TOPLAMI	2,33			1,00			2,33			0,67			1,67			1,00		
ORTALAMA ^a													TEST (-) CONTROL=					
Travmatik Nekrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yabancı Döküntüler	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
İncelenen Örnek Sayısı	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4

^aSonuçta gösterilen irritant bölgeleri kullanılır. Negatif farklar 0 olmalıdır.

Gross Patoloji

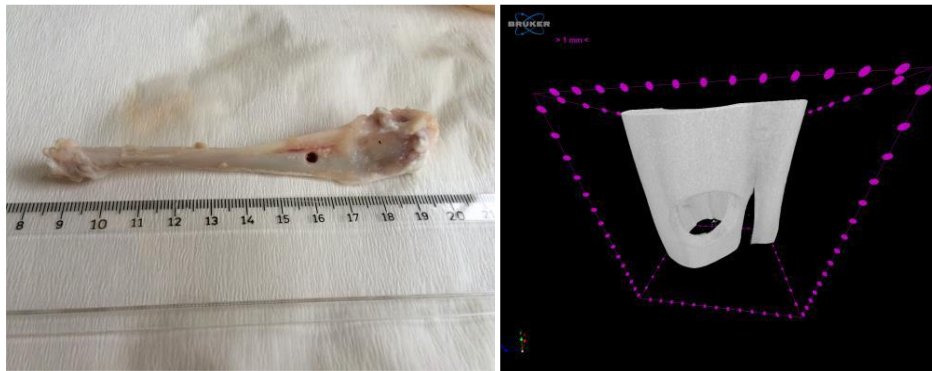
Test ve kontrol grupları, uygulama süresi sonunda servikal dislokasyon ile sakrifiye edildikten sonra batın ve toraks bölgesi inspeksiyon bölgelerinde nekrotik doku veya herhangi başka bir bulguya rastlanmamıştır.

Klinik Gözlemler

28 günlük gözlemlerde herhangi bir klinik bulguya rastlanmamış olup operasyon bölgelerindeki yara dudakları rejenerasyonu olumludur. Test bölgelerinin analizi sonucu skor değerleri PCL, PCL/HAp için 2,33 ve PCL/HAp/PPF için 1,67 olarak tespit edilmiş olup, ISO 10993-6:2007 belgesinde belirtilen protokol ve değerlendirme kriterlerine göre test edilen materyalin uygulama bölgesinde iritan özelliğe sahip olmadığı tespit edilmiştir.

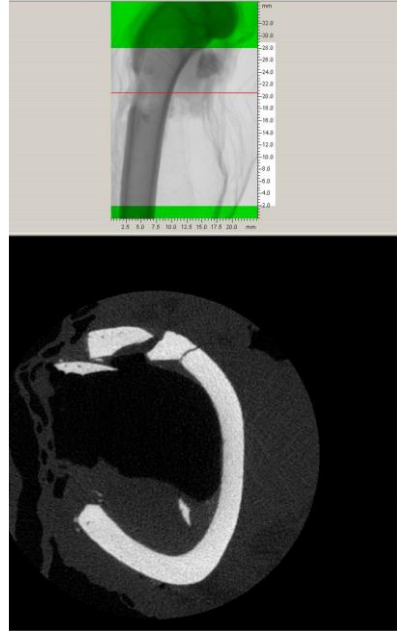
4.7 MikroBT Verisinin Model Kemik Örneklerinden Eldesi ve HP'ye Aktarılması

Tarama işleminden sonra matematiksel hesapların yapılabilmesi ve üç boyutlu görüntünün oluşturulması amacıyla elde edilen iki boyutlu görüntüler yapılandırılmışlardır (NRecon, Bruker MicroCT, Belçika). Yapılandırma işlemi sırasında halka hatası düzeltmesi, ışın sertleşme düzeltmesi ve görüntü düzeltmesi yapılmıştır. Bu düzeltmelerin değerleri bütün kemiklerde ve KMY kalibrasyon örneklerinde aynı tutulmuştur. Yapılandırma işleminden sonra CTVox (Bruker MicroCT, Belçika) kullanılarak, üzerinde defekt yaratılan ve taranan kemiğin 3 boyutlu yapısı görüntülenmiştir (Şekil 41).



Şekil 41. Defekt yaratılmış femurun fotoğrafı ve 3 boyutlu modeli.

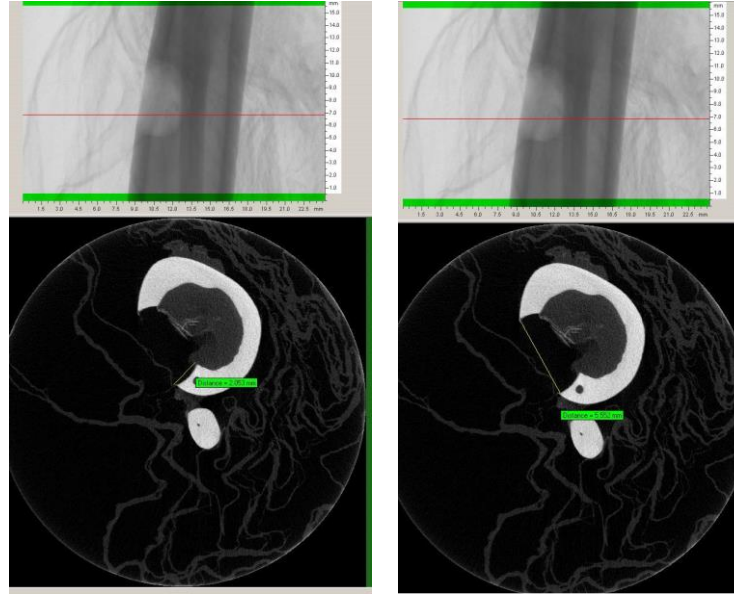
Yapılandırma işleminin ardından hesaplama aracı olarak CTan (Bruker MicroCT, Belçika) yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım ile kemik dokular üzerindeki hesaplamalar yapılmıştır. Kemikte defekt yaratmak amacıyla, öncelikle matkapla delik açma yöntemi denenmiştir. Şekil 42'de görüldüğü gibi, MikroBT incelemesi sonucu, bu yöntemin kemik içinde dışarıdan gözle görülemeyen ve tespit edilemeyen kırıklara, çatlaklara ve parçalanmalara yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 42. Kemikte matkap ile defekt yaratırken oluşan zararın MikroBT görüntüsü.

Matkap kullanımının kemikte yarattığı zararın MikroBT aracılığıyla tespit edilmesinden sonra kemikte defekt yaratma tekniği değiştirilmiştir. Matkapla örnek almak yerine kemik delgisi kullanılmasına karar verilmiştir.

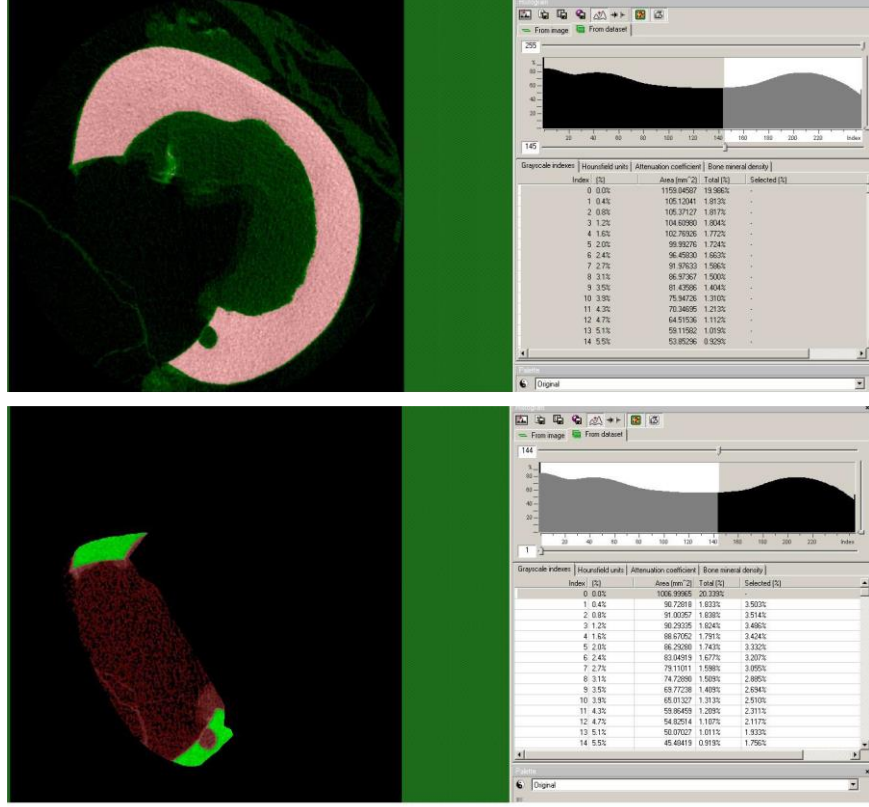
Kemik delgisiyle örnek alınan kemiklerin taramalarında (Şekil 43) kemiklerin örnek alınan bölge dışında herhangi bir hasara sahip olmadıkları belirlenmiştir.



Şekil 43. MikroBT görüntüsüyle boşluk boyutu hesaplanması.

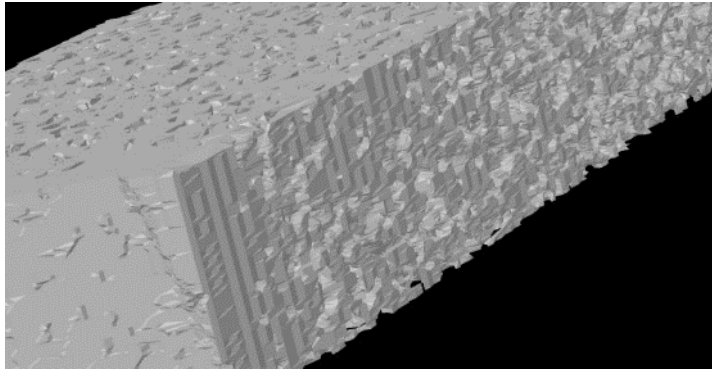
Hasarsız kemiklerin taramalarında elde edilen veriler sayesinde kemik dokusunda oluşturulan hasarlı bölgede açılan boşluğun çap olarak ortalama 5 mm, derinlik olarak ortalama 2,5 mm boyutlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada amaç kemik olmayan kısım üzerinden kemiği oluşturarak ortaya çıkan ürünün kişiye özel hale getirmek olduğundan 3 boyutlu yazıcıda üretilecek ürünün matematiksel modellemesinin kemik üzerinden değil oluşturulan boşluk üzerinden modellenmesi esastır. Şekil 44'te görüldüğü üzere CTan programı yardımıyla ilgi bölgesi ve dolayısıyla ilgi hacmi seçilmiş ve bu bölge üzerinde sadece kemik dokunun gri skaladaki yerininin 145-255 arası olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, oluşturulan boşluğun ilgi bölgesi seçildiğinde boşluğun gri skaladaki yerininin 1-144 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada boşluğun ilgi bölgesi sadece boşluğu kapsayacak şekilde oluşturulduğundan dolayı ayrıca bir yumuşak doku gri skala hesabı yapılmasına gerek duyulmamıştır.



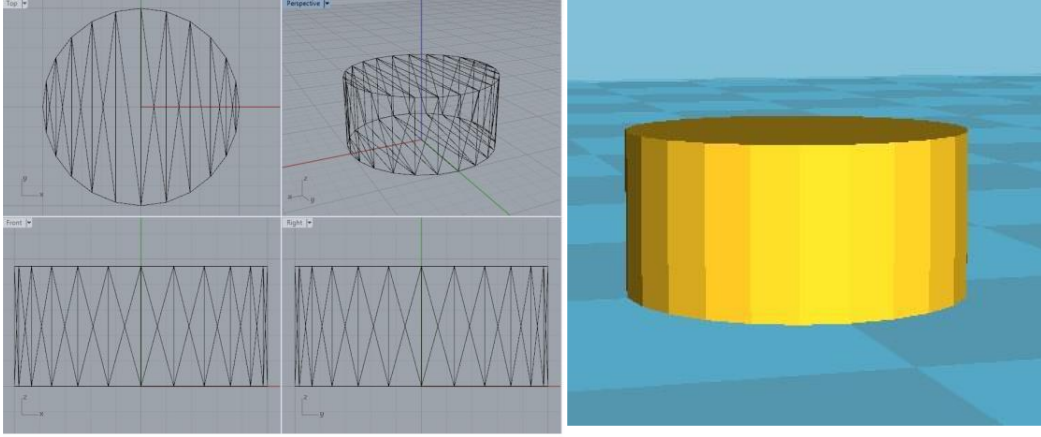
Şekil 44. Gri skala kullanılarak modelin oluşturulması.

Gri skala 1-144 arasında tutularak boşluk matematiksel model haline getirilmiştir. Bu modelde oluşturulan her noktanın uzaydaki konumu belirlenmiştir (Şekil 45). Model üç boyutlu yazıcıların kullandığı form olan STL (STereoLithography) dosya formatında oluşturulmuştur.



Şekil 45. Modelin ekran görüntüsü.

Hızlı prototipleme ile ve üç boyutlu yazıcıda hazırlanması planlanan destek modeli, *in vitro* çalışmalar için uygun gözenekliliğe sahip olmaması ve doku iç büyümesine izin vermeyecek yapıda olması nedeniyle sadece dış hatları sınır olarak kullanılarak yeni bir model geliştirilmiştir (Şekil 46).



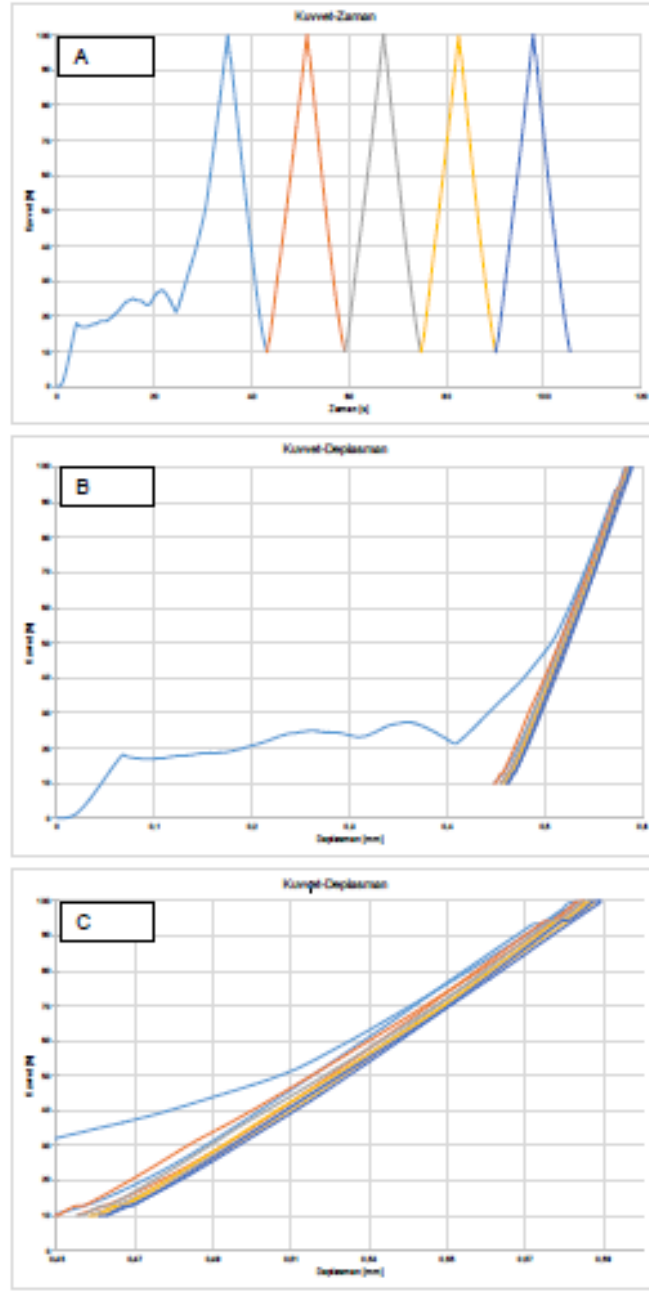
Şekil 46. Modelin yazılımdaki görüntüsü.

Şekilde aktarıldığı gibi oluşturulan model disk şeklindedir ve gözenek boyutlarını dağılımlarını ve yapının mekanik özelliklerini karşılaştırabilmek için farklı çizimlerde oluşturulmuştur.

4.8 Mekanik testler için tavşan kemiği elde edilmesi

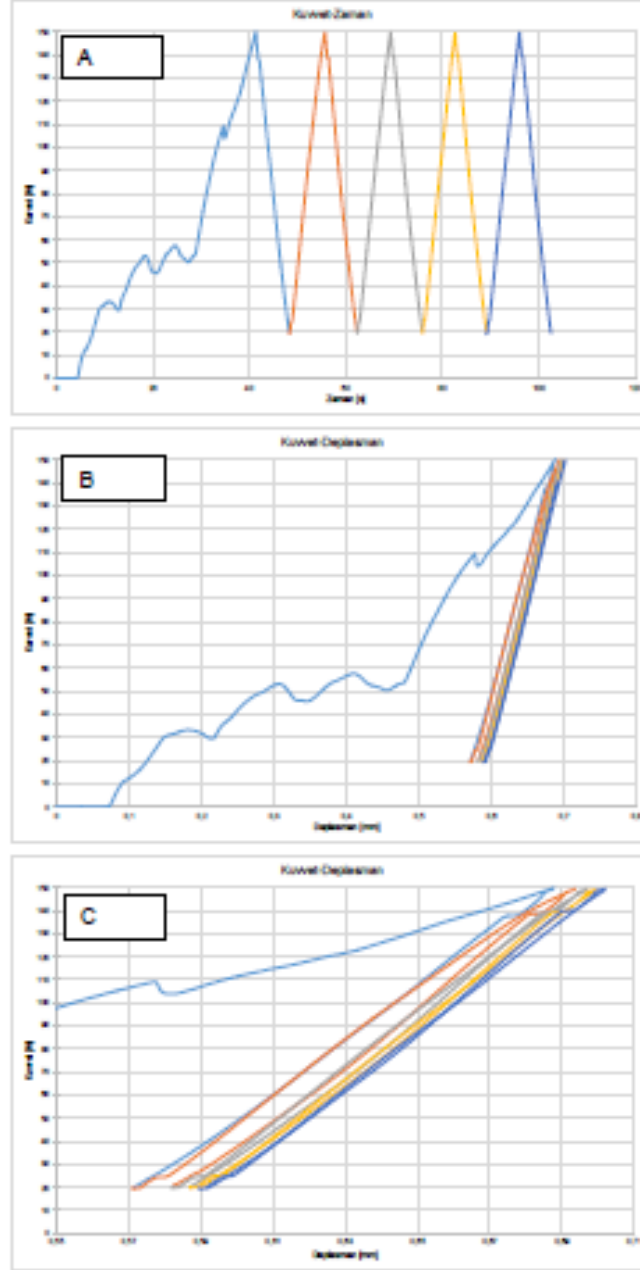
Proje dönemi içerisinde proje kapsamında geliştirilecek implantın mekanik özelliklerinin belirlenmesine yönelik olarak implante edilmiş kemiğin elastik mekanik özelliklerinin belirlenmesine yönelik pilot deneyler yapılmıştır.

Üç örnek ile pilot deneyler tekrarlanmıştır. İlk örneğe ait veriler Şekil 47’de sunulmuştur. Bu örnekte defekt üstte (basmaya çalışacak biçimde) konumlandırılmıştır. Deney 100 N kuvvete kadar yapılmıştır ve kemiğin eşdeğer direngenliği 720 N/mm bulunmuştur.



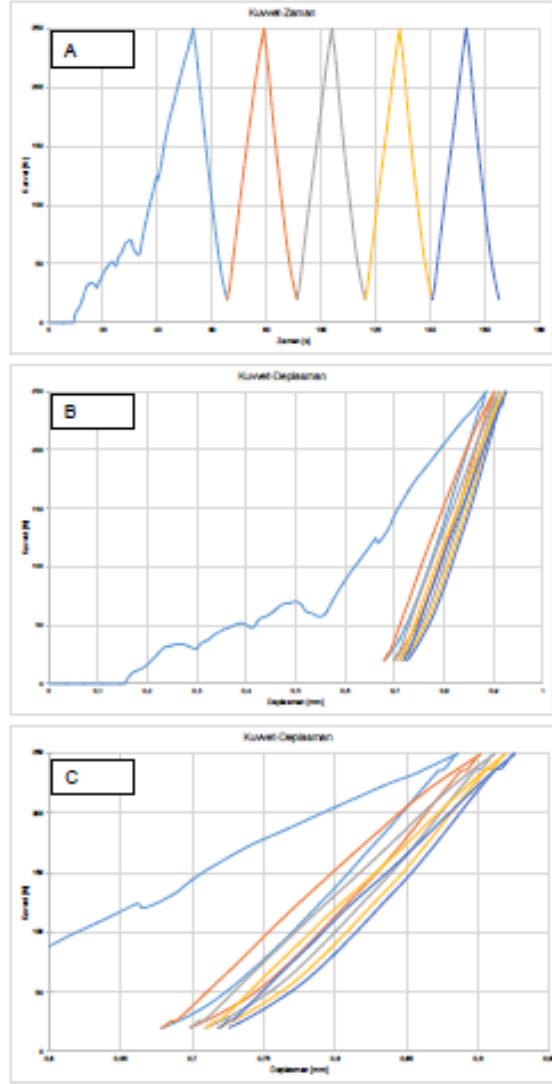
Şekil 47. Defekt yaratılmış farklı kemik örnekleri ile yapılan ön denemelerden birincisine ait kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.

Aynı örnekte kemik defekti alta alınarak geliştirilecek implant çekmede çalışacak biçimde ve maksimum 150 N kuvvete kadar deneyler yapılmıştır. Kemiğin bu durumdaki eşdeğer direngenliği 1180 N.mm^{-1} bulunmuştur. Bu deneye ait veriler Şekil 48’de sunulmuştur.



Şekil 48. İkinci deneye ait kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.

Aynı örnek makineden çıkartılıp tekrar bağlanarak ve defekt altta 250 N kuvvete kadar yüklenecek ikinci deneyin sonucunun tutarlılığı sınanmıştır. Bu deneye ait veriler Şekil 49'da sunulmuştur.

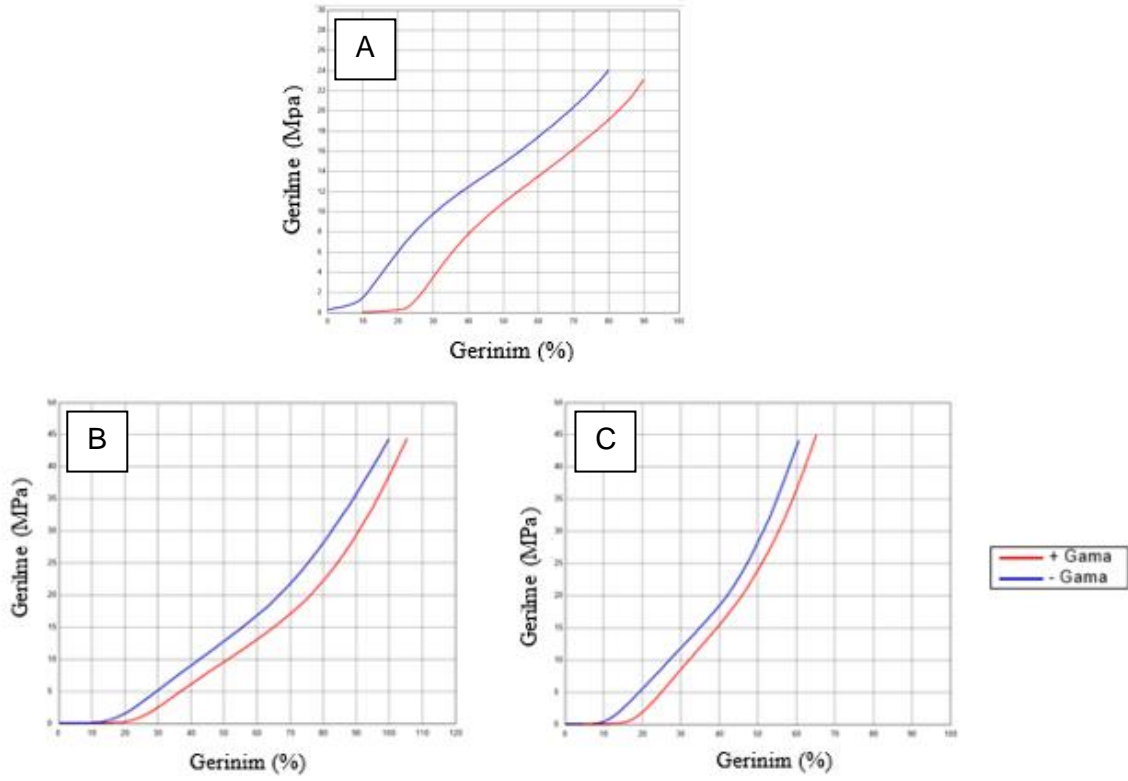


Şekil 49. Kuvvet zaman (A), kuvvet deplasman (B) ve kemik direngenliğini gösteren (C) grafikler.

Bu deney sonucu 1150 N/mm eşdeğer direngenlik (önceki örnekten % 2,6 daha az) bulunmuştur. Aradaki farkın nedenleri yerleştirme hataları, en yüksek kuvvetin büyümesi veya deney sırasında kemiğin bir miktar zarar görmüş olması olabilir ancak her durumda hata düzeyi deneysel çalışmalara kabul edilebilecek düzeydedir.

4.9 Geliştirilen İmplantların Mekanik Özelliklerinin Saptanması

Doku desteklerine ait basma testi sonunda elde edilen Gerilme-Gerinim grafikleri Şekil 50'de verilmiştir. Ayrıca her bir doku desteği için elde edilen gama ışınlama öncesi ve sonrası elastik modül değerleri Tablo 11'de verilmiştir.



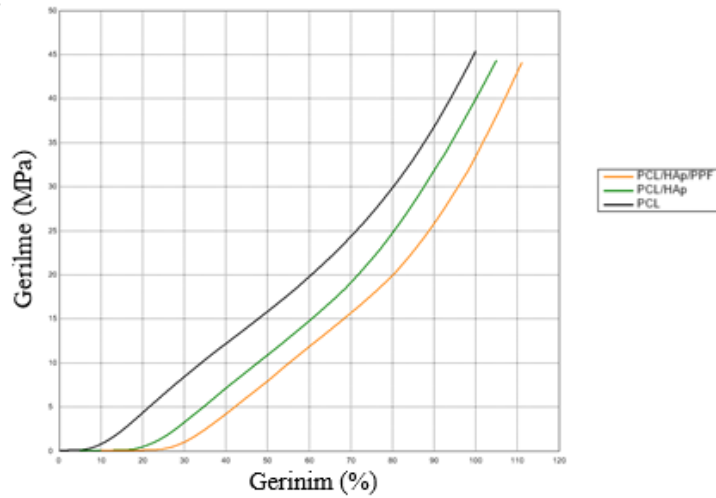
Şekil 50. Gama sterilizasyonu öncesi ve sonrası A. PCL, B. PCL/HAp ve C. PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği. (Kırmızı çizgiler gama uygulanan, mavi çizgiler gama uygulanmayan örnekleri göstermektedir).

Tablo 11. Gama sterilizasyonu öncesi ve sonrası desteklerin basma elastik modül değerleri.

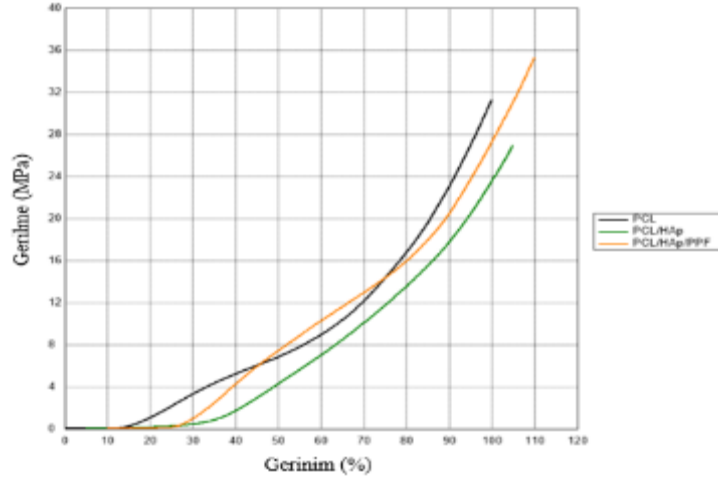
Örnek	PCL		PCL/HAp		PCL/HAp/PPF	
	- Gama	+ Gama	- Gama	+ Gama	- Gama	+ Gama
Elastik Modül (MPa)	44.63±1.31	48.58±0.02	33.85±3.22	33.12±0.96	33.59±1.45	35.70±2.11

Örneklerde üretim yöntemi nedeniyle olduğu düşünülen hafif bombe nedeniyle basma plakalarına ilk temas ile bombenin düzelmesine kadar olan bölgede görece yumuşak bir davranış gözlenmektedir. Bu bölge en fazla 45 N kuvvet ve 0,5 mm test makinesi kafa hareketinde son bulmakta ve gözenekli doku desteklerinin basma altında mekanik davranışı görülmeye başlamaktadır. Elde edilen veriler, başlangıçtaki veriler çıkartılmadan ve gözenekli doku desteği tam bir sürekli ortammış gibi varsayılarak gerilme-gerinim grafiğine çevrilmiş ve gözenekli doku desteğinin eşdeğer elastik modülü hesaplanmıştır. Şekil 50'de her üç kompozisyondan gama sterilizasyonu öncesi (mavi eğriler) ve gama sterilizasyonu sonrası (kırmızı eğriler) üçer örneğin testi sonucu elde edilen gerilme-gerinim datası sunulmuştur. Gama sterilizasyon öncesi ve sonrası elde edilen eğriler neredeyse özdeş olduğu için görünebilirlik açısından gama sterilizasyon sonrası eğriler yatay (gerinim) ekseninde %10 oranında ötelenmiştir.

Gama sterilizasyon öncesi ve sonrası elastik modül değerlerine bakıldığında PCL/HAp malzemenin elastik modül değerinde neredeyse hiç değişme olmadığı, PCL/HAp/PPF malzemede ve PCL malzemede ise gama sterilizasyon ile birlikte %10'un altında bir elastik modül artışı gözlenmiştir. Gama sterilizasyon yapılmamış örneklerde kompozisyonun ve tasarımının, doku desteklerinin mekanik özelliklerine olan etkisi ise yine basma testi (1 mm/dk hız) ile incelenmiştir. Temel doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği Şekil 51'de, temel kaymalı doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği ise Şekil 52'de verilmiştir. 3 farklı kompozisyon ve bunlara ait 2 farklı tasarım için elde edilen elastik modül değerleri Tablo 12'de verilmiştir.



Şekil 51. Temel yapıdaki PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği.



Şekil 52. Temel kaymalı PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin gerilme-gerinim grafiği.

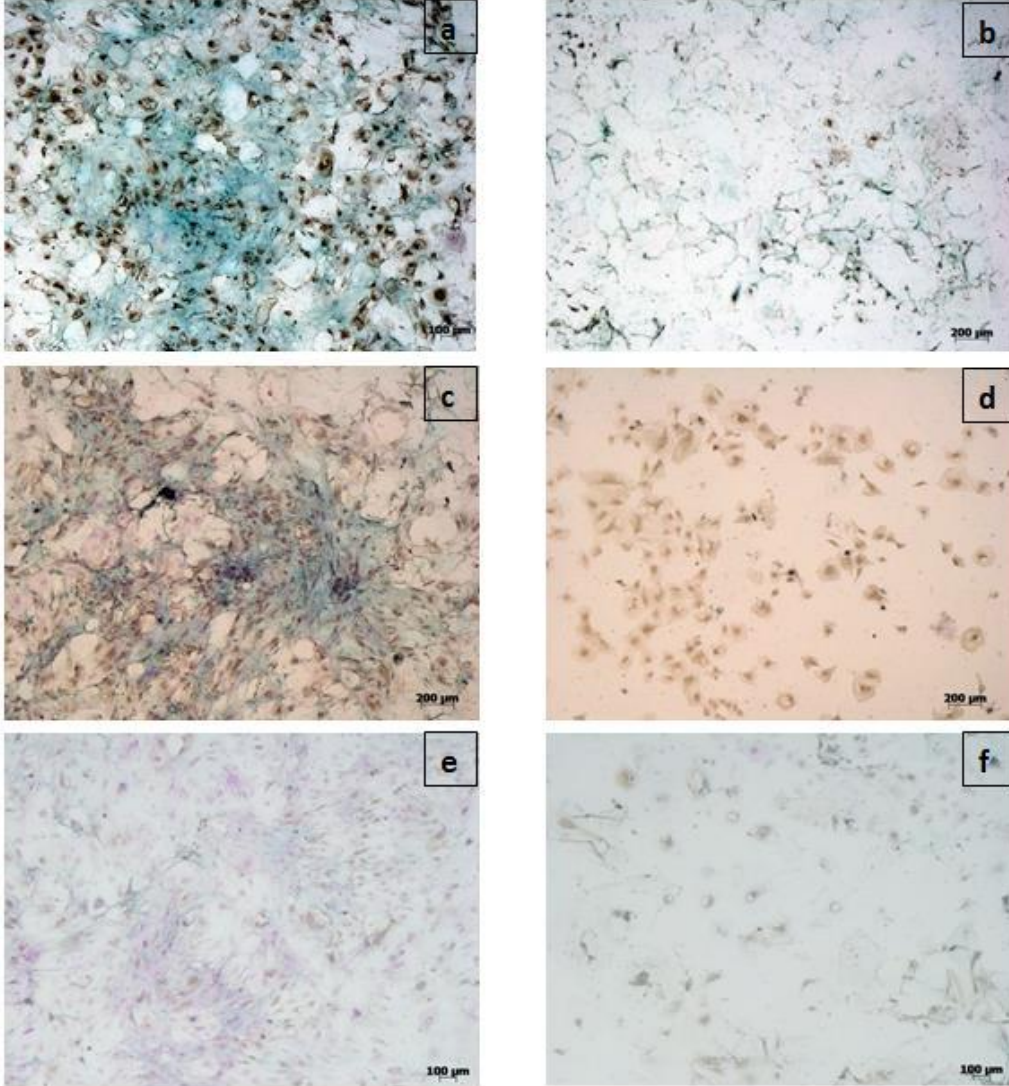
Tablo 12. Farklı kompozisyon ve tasarımlardaki desteklerin basma elastik modül değerleri.

Örnek	PCL		PCL/HAp		PCL/HAp/PPF	
	Temel (B)	Temel-kaymalı (BS)	Temel (B)	Temel-kaymalı (BS)	Temel (B)	Temel-kaymalı (BS)
Elastik Modül (MPa)	37,52±0,50	22,80±1,29	33,85±3,22	25,41±1,57	33,59±1,45	33,74±1,08

PCL ve PCL/HAp örneklerde gözlenen durum, temel tasarımlı desteklerin temel-kaymalı modele göre daha yüksek elastik modüle sahip olmasıdır. Bu durum, temel-kaymalı tasarımda, lifler arasındaki kaymalar nedeni ile tabakaların uygulanan kuvvete karşı daha yumuşak bir yapı alması ve daha kolay şekil değiştirmesinden dolayıdır. Diğer taraftan, PCL/HAp/PPF örneklerinin elastik modül değerlerinde anlamlı bir değişim olmamıştır. Bunun nedeni, PPF polimerinin, kaymalı yapıdaki lifler arasında yapışma sağlaması ve göreceli olarak gözeneklerin arasını kapaması olarak yorumlanabilir.

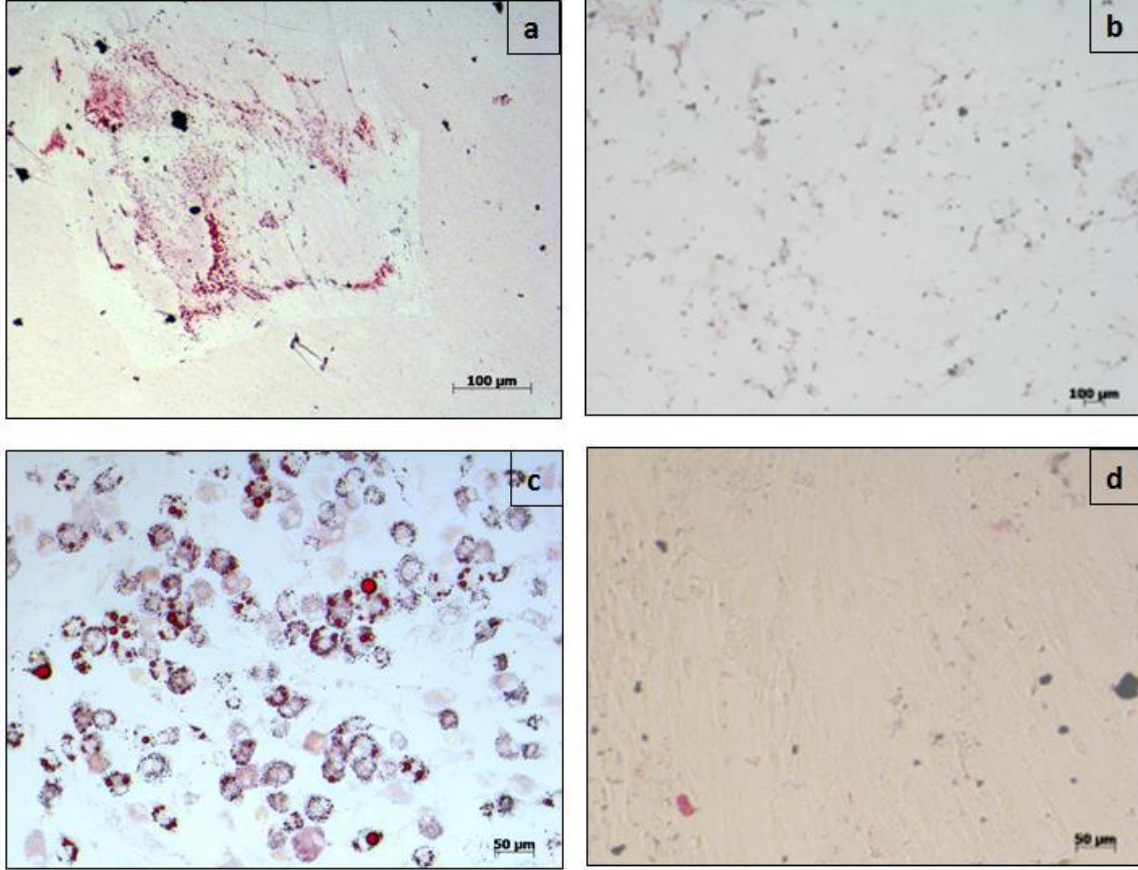
4.10 Tavşan Kemik İliğinden Kök Hücre Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücreler, fonksiyonlarının tam olduğunun gözlemlenebilmesi için değişik boyamalar ile görüntülenmiştir. PAS-Asiyan mavisi boyaması sonucunda tüm inkübasyon günlerinde asidik müninler (mavi) ve nötral müninler (mormagenta) görüntülenmiştir.



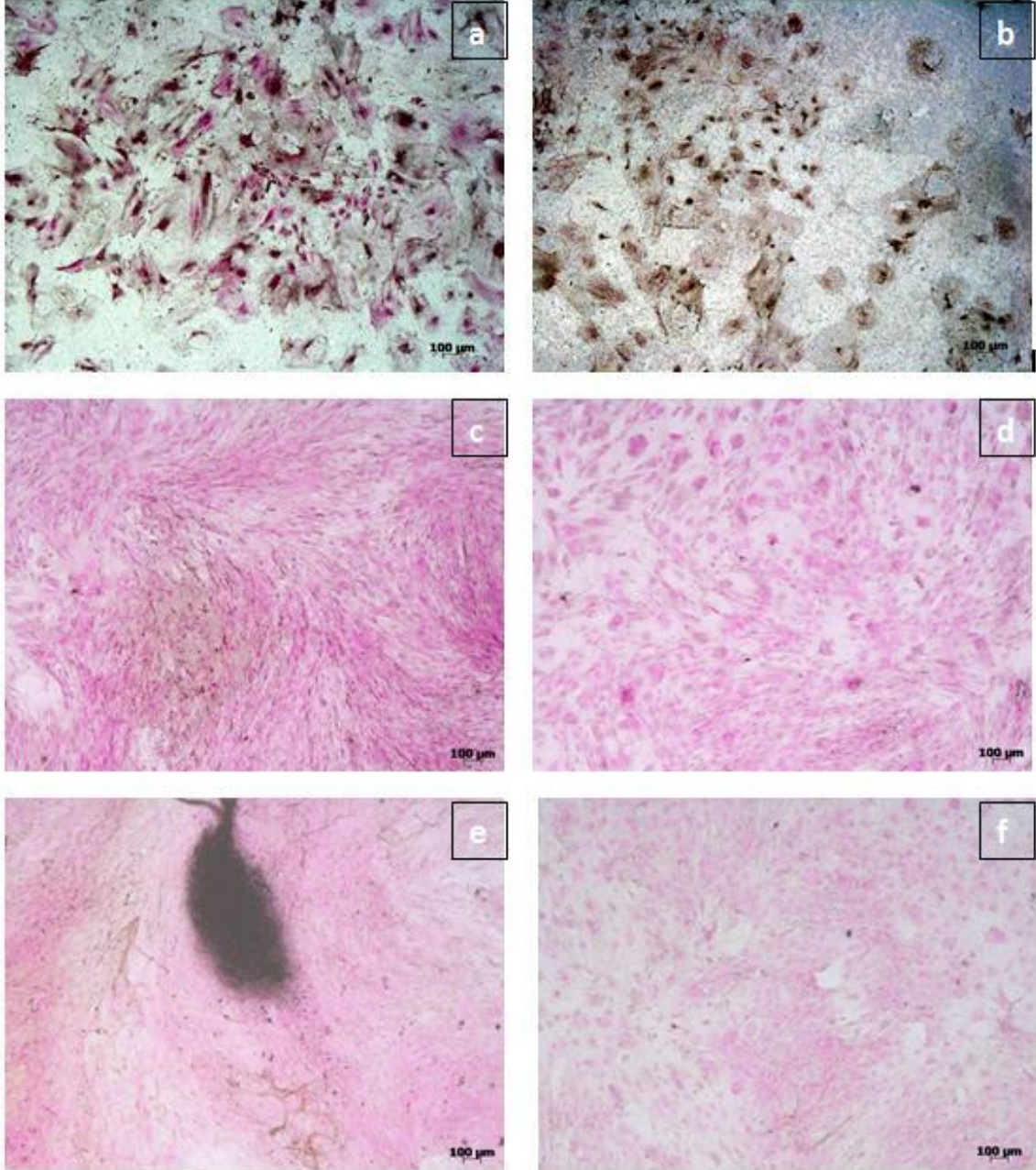
Şekil 53. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin PAS-Asiyan mavisi boyaması a) yedinci gün c) on dördüncü gün, e) yirmi birinci gün görüntüleri. (b. d ve f görüntüleri sırasıyla yedinci. on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir.

Şekil 54 tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki Oil Red O boyamasını göstermektedir. Boyama sonucunda alınan görüntülerde yağ hücrelerine farklılaşan mezankimal kök hücrelerinin ürettikleri yağ damlacıkları kırmızı renkte gözlemlenmektedir.



Şekil 54. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin Oil Red O boyası ile a) on dört gün ve c) yirmi bir gün inkübasyon sonucunda boyanmasıyla elde edilen görüntüler (b ve d görüntüleri sırasıyla on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir.

von Kossa boyaması geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir belirteci olan kalsiyum depozitlerini gözlemlemek amacıyla tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere uygulanmıştır. Bu analizin sonucunda en fazla kalsiyum depoziti beklenildiği üzere osteojenik besiyerinde yirmi bir gün inkübe edilen kök hücrelerde görülmüştür (Şekil 55).

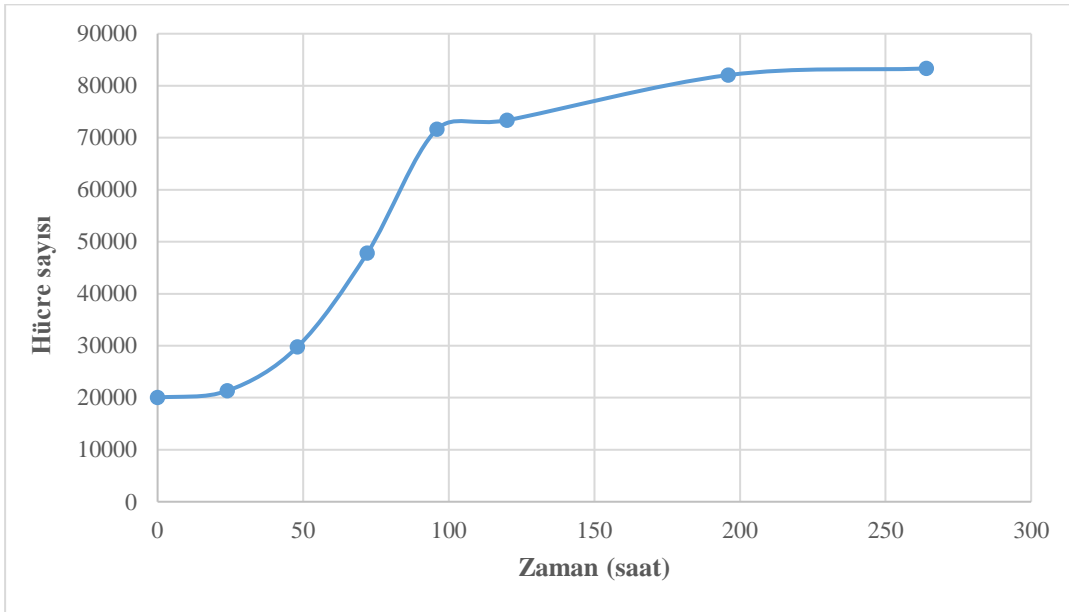


Şekil 55. Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin von Kossa boyası ile a) yedinci gün, c) on dördüncü gün, e) yirmi birinci gün inkübasyon sonucunda boyanmasıyla elde edilen görüntüler (b, d ve f görüntüleri sırasıyla yedinci, on dördüncü ve yirmi birinci günlerdeki kontrol gruplarını göstermektedir).

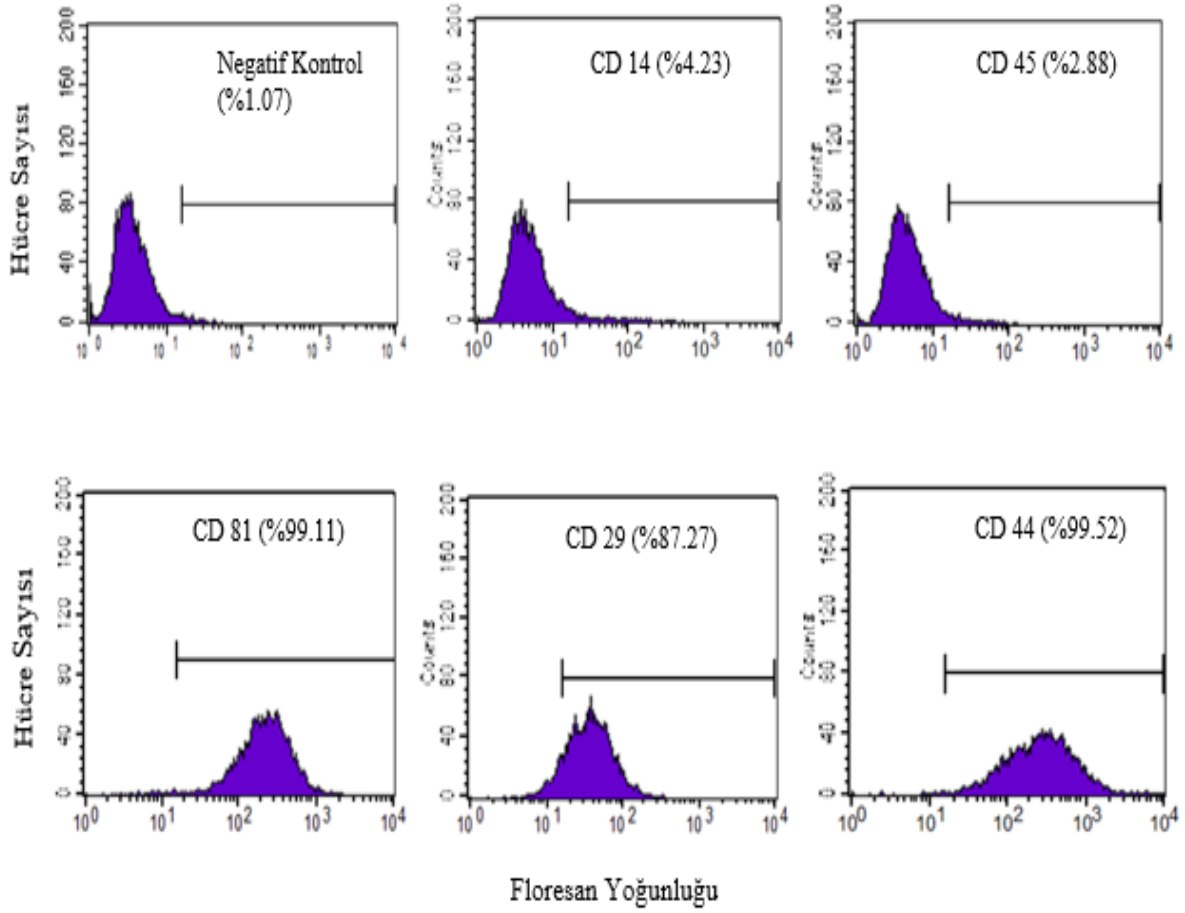
4.11 Mezenkimal kök hücrelerin büyüme eğrisinin oluşturulması

Mezenkimal kök hücre popülasyonunun tahmini ikiye katlanma süresi hücre sayısı-zaman grafiği yardımıyla 37 saat olarak bulunmuştur (Şekil 56). Yaklaşık 100 saat sonra hücreler konfluant (hücre doluluk oranı) olduğu için çoğalma bir plato davranışı göstermektedir.

Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin (pasaj 2) mezenkimal kök hücre olduğunu kanıtlamak için akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda floresan boyaları ile bağlanmış tavşana özel monoklonal antikorlar (CD 44 Mouse Anti-Rabbit CD44 (Primer Antikor), Rabbit F(ab')₂ Anti-Mouse IgG:FITC (Sekonder Antikor), PE Mouse Anti-Human CD 81, Mouse Anti-Human Integrin beta 1 fluorescein conjugated monoclonal antibody (CD29), CD14 Mouse Anti-Human Monoclonal FITC Antibody, CD45RB Mouse Anti-Human Monoclonal FITC Antibody) kullanılmıştır. Elde edilen akış sitometrisi grafiklerine göre hücreler CD 81, CD 44 ve CD 29 belirteçlerini eksprese ederken CD 14 ve CD 29 belirteçlerini eksprese etmemiştir (Şekil 57). Bu veriler doğrultusunda hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliği taşıdığı kanıtlanmıştır.



Şekil 56. Tavşan mezenkimal kök hücrelerinin büyüme eğrisi.



Şekil 57. Tavşandan elde edilen mezankimal kök hücrelerin histogramları ve immünofenotipik oranları.

4.12 RNA İzolasyonu Optimizasyonu

Hazırlanan PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerine ekilen tavşan kemiğinden izole edilen mezankimal kök hücrelerinden farklı yöntemlerle RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra RNA konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} oranları Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile ölçülmüştür (Tablo 13).

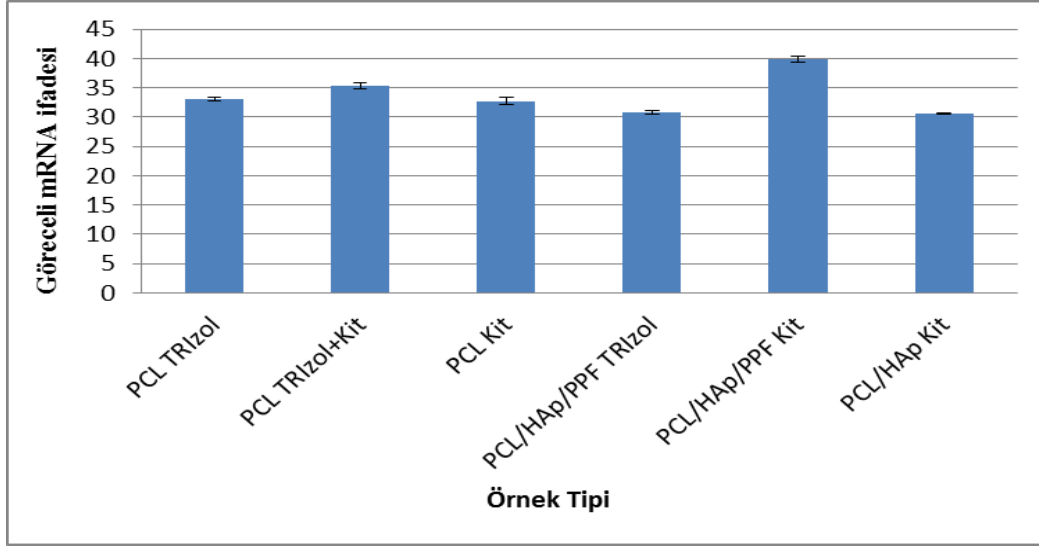
Tablo 13. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerine ekilen hücrelerden elde edilen RNA miktarları ve A_{260}/A_{280} oranları.

	TRizol		TRizol+Kit		Kit	
	A_{260}/A_{280}	Konsantrasyon	A_{260}/A_{280}	Konsantrasyon	A_{260}/A_{280}	Konsantrasyon
PCL	1.49	56.1 ng/ μ L	1.74	6.4 ng/ μ L	2.02*	5.3 ng/ μ L
PCL/HAp	X	x	x	x	2.09*	10.7 ng/ μ L
PCL/Hap/PPF	1.87	2.4 ng/ μ L	x	x	2.01*	1.5 ng/ μ L

Tablo 13'e göre elde edilen RNA miktarları materyalin türüne, ekilen hücre sayısına ve izolasyon yöntemine bağlı olarak değişim göstermektedir. En fazla RNA miktarı, PCL üzerine ekilmiş hücrelerden TRizol yöntemi ile elde edilmiştir fakat A_{260}/A_{280} oranına bakıldığında bu RNA'ların saf olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre en saf RNA'lar kitin protokolleri uygulanarak izole edilenlerdir.

İzolasyonu takiben RNA örnekleri Sensiscript Reverse Transcription Kiti (QIAGEN, Almanya) ile cDNA'ya dönüştürülmüştür. Elde edilen RNA miktarlarının gen tayininde yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla, daha önceden dizayn edilen GAPDH primeriyle ve Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific ABD) çözeltisi yardımıyla, "Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu" (Real-Time PCR) yöntemi kullanılarak GAPDH geninin ifadesine bakılmıştır (Şekil 58).

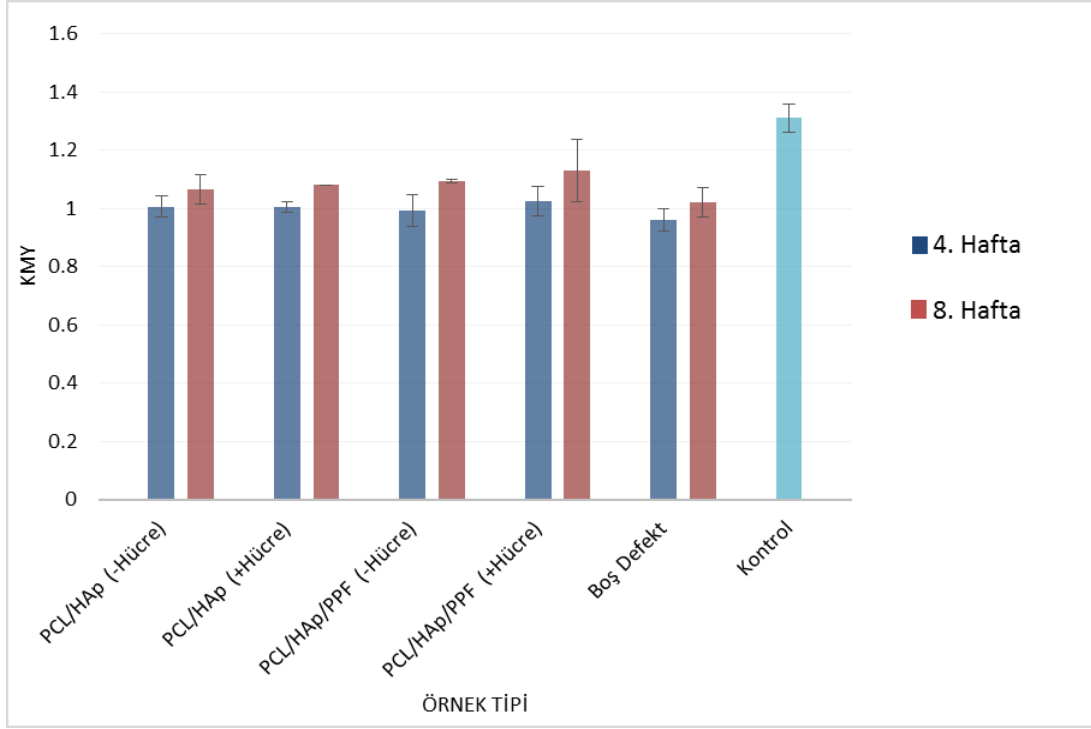
Sonuçlara göre elde edilen RNA miktarları genlerin ifadesini tayin edebilmemiz için yeterli olmuştur. RNA analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde en uygun izolasyon yönteminin GeneJET RNA Purification kiti olduğu belirlenmiştir.



Şekil 58. PCL, PCL/HAp/PPF ve PCL/HAp üzerine ekilen hücrelerin GAPDH geni göreceli ifadesi.

4.13 *In vivo* Kemik Örneklerinin Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) ve MikroBT Taraması

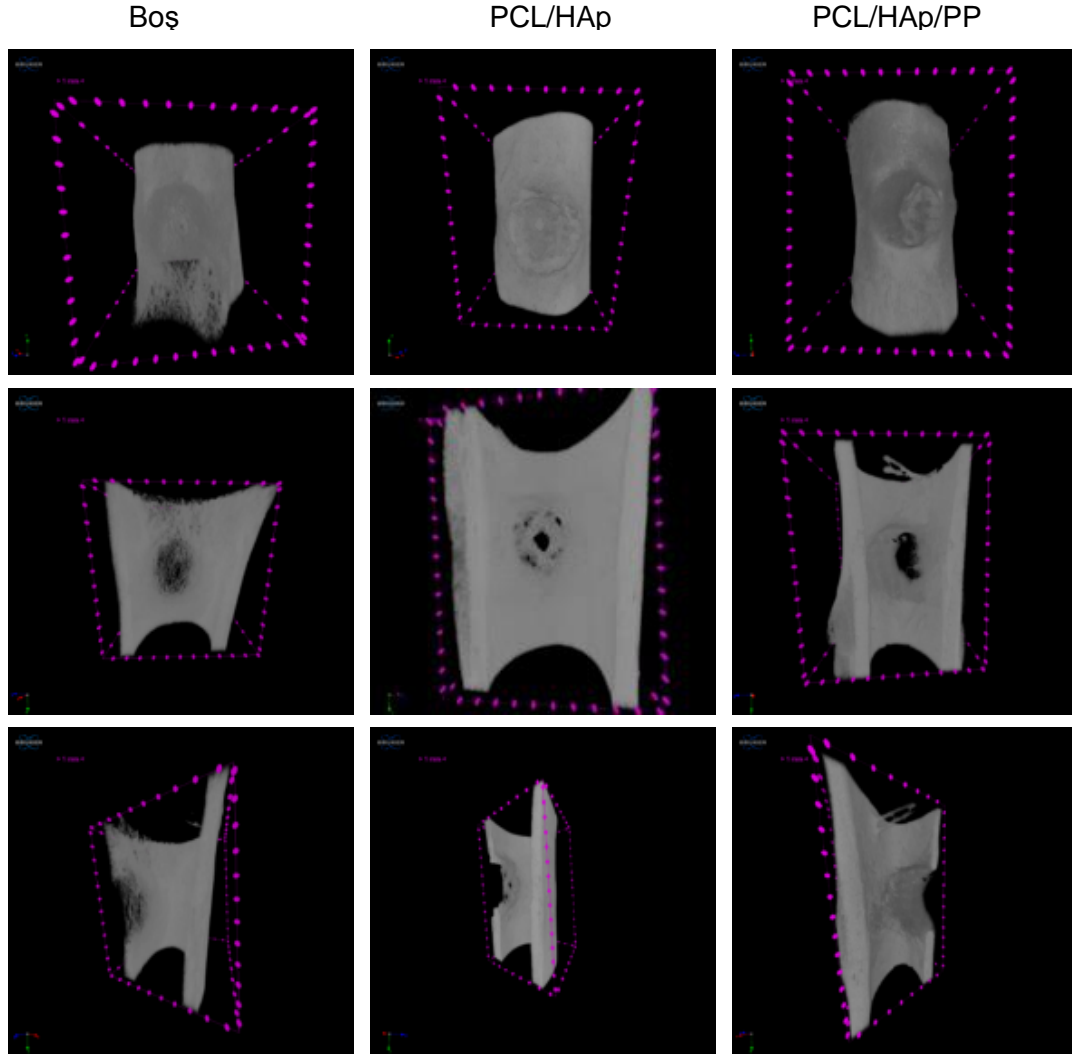
Kalibrasyon çubuklarının verdikleri sönümlenme katsayısı kullanılarak CTAn (Bruker X-RAY, Belçika) yazılımı Kemik mineral yoğunluğu (KMY) sonuçları için kalibre edilmiştir. Sönümlenme katsayısı kullanılarak verilen konsantrasyonlara karşılık gelen değerler yardımıyla bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisi KMY değerleri bilinmeyen kemik dokusu örneklerinde kullanılmış ve kemik dokusunun mineral yoğunluğu hesaplanmıştır. KMY değerleri 4 hafta ve 8 hafta olarak 2 ayrı grup içerisinde değerlendirilmiştir (Şekil 59).



Şekil 59. Tavşan kemiklerinin mineral yoğunlukları. Zaman: 4 ve 8 hafta. (Kontrol: Defekt oluşturulmamış sağlam kemik).

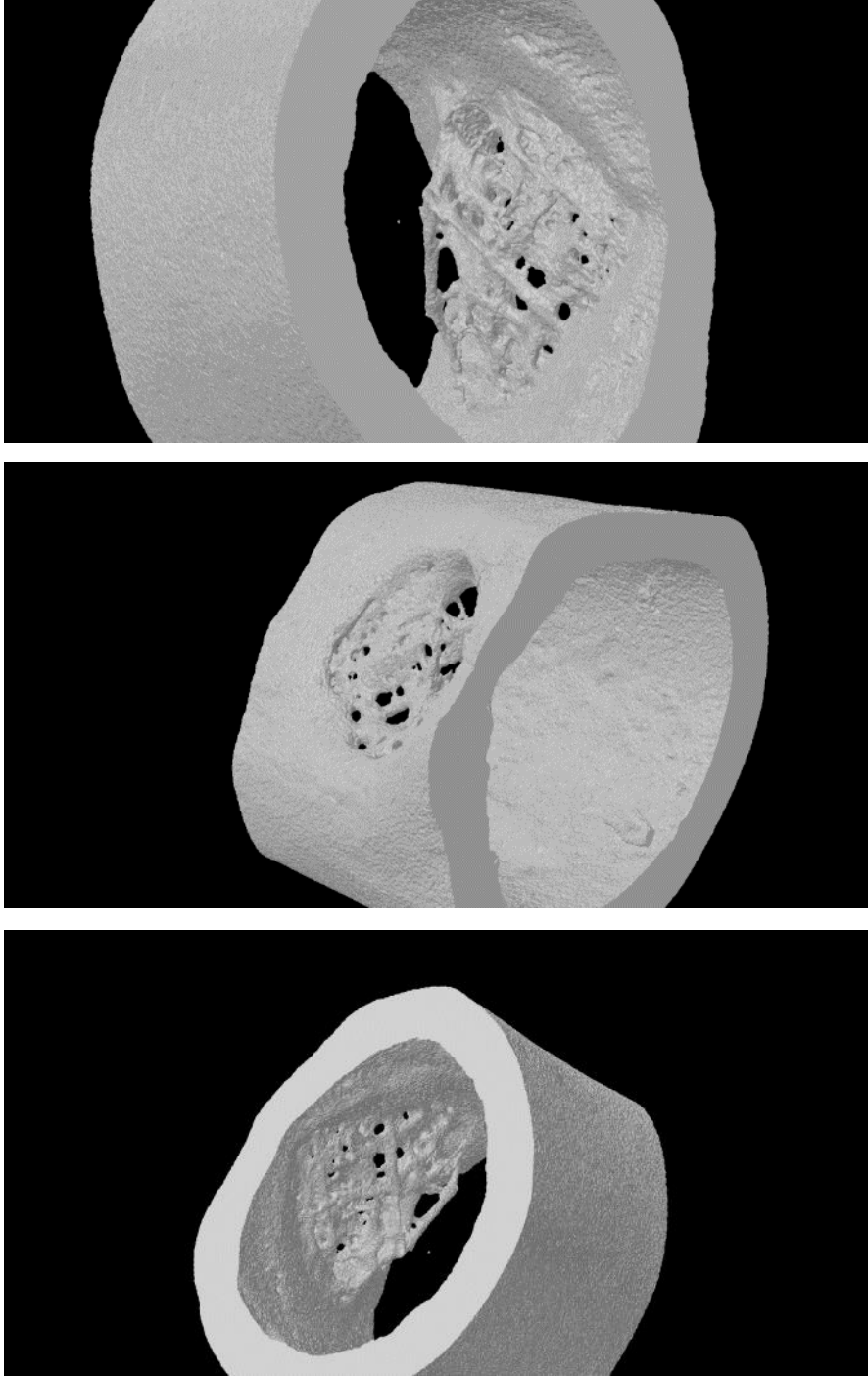
KMY değerleri incelendiğinde 4. ve 8. haftanın sonunda doku desteği uygulanmış kemiklerin boş defektlere kıyasla daha fazla mineralize olduğu ve yeni kemik oluşumu yönünde iyileştiği görülmüştür. Elde edilen bu değerlerden yola çıkarak doku desteği kullanılan örnekler ile boş örnek arasında KMY açısından %10-15 arasında bir fark olduğu söylenebilir. Kontrol grubu örneği defekt oluşturulmamış sağlam kemiği ifade etmektedir ve bu değer doku desteği uygulanmış ve uygulanmamış örnekler ile karşılaştırıldığında, özellikle hücre ekilmiş PCL/HAp/PPF doku destekli kemiğin 8 hafta sonunda sağlam kemiğin KMY değerine oldukça yaklaştığı görülmüştür.

İncelenen örneklerin görüntüleri CTvox (Bruker X-RAY, Belçika) yazılımı ile oluşturulmuştur. Doku desteği yerleştirilmemiş tavşan kemiğini (boş defekt) ile PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş tavşan kemiklerinin 8 hafta sonundaki MikroBT görüntüleri Şekil 60'de verilmiştir.



Şekil 60. Doku desteği yerleştirilmemiş tavşan kemiğini (boş defekt) ile PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş tavşan kemiklerinin 8 hafta sonundaki μ -CT görüntüleri.

Şekil 60'de görüldüğü gibi doku desteği yerleştirilmemiş tavşan kemiğinin defekt kısmının 8 hafta sonunda belirli ölçüde kapandığı fakat kemiğin boşluğa yakın kısmında kemik yoğunluğunun önemli ölçüde azaldığı (kemik rezorpsiyonu) görülmüştür. Bu durum özellikle kritik boyuttaki kemik defektlerinde implant kullanımının kemik dokusunun iyileşme sürecine katkısı açısından önemini göstermektedir. PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri uygulanmış kemikler karşılaştırıldığında her iki kemikte de önemli ölçüde yeni kemik dokusunun oluştuğu görülmektedir. Kullanılan bu örnek görüntünün çok daha net olarak görülmesi ve daha sonra sonlu elemanlar analizlerine tabi tutulması için CTAn (Bruker X-RAY, Belçika) kullanılarak katı hal modeli oluşturulmuştur (Şekil 61).



Şekil 61. PCL/HAp/PPF doku desteği uygulanmış kemiğin CTAn kullanılarak elde edilen katı hal modeli.

Şekil 61’de gösterilen PCL/HAp/PPF doku desteği uygulanmış kemiğin katı hal modeli incelendiğinde, yeni kemik oluşumunun uygulanan doku desteğinin fiberleri doğrultusunda uniform olarak gerçekleştiği ve bu bağlamda kullanılan doku desteğinin kemik dokusu iyileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmektedir.

4.14 İmplantlı Kemiğin Mekanik Karakterizasyonu

PCL bazlı tüm implantlar tek tür örnek olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanabilmiştir. Tüm sağlıklı örneklerden elde edilen veriler incelendiğinde anlamlılık düzeyi 0,00069 (yaklaşık olarak 0.001) olarak anlamlı biçimde farklıdır. Bu anlamlılık düzeyi Tablo 14’te üçüncü bölüm son kolonunda Sig (2-tailed) başlığı altında gözükmektedir.

Yine Tablo 14’ün ilk bölümünde implantın yerleştirileceği konum direngenlik değerlerinin ortalama değerleri ikinci sütunda sunulmuştur.

İmplantın yerleştirileceği bölgenin çekmeye çalıştığı durumda tüm sağlıklı kemiklere ait ortalama direngenlik 385 N/mm, basmaya çalıştığı durumdakinden, 288 N/mm, anlamlı biçimde daha yüksek çıkmıştır. Kemiğin gerek geometrik özellikleri ve şekli, gerekse eşyönsüz ve homojen olmayan, ve yaşam süresince gördüğü mekanik kuvvetlere adapte olacak biçimde değişen kemiğin mekanik özellikleri nedeniyle farklıdır.

Benzer farklılığın implantasyon yapılmış kemiklerde de görülmesi beklenmektedir. Genel olarak istatistiksel karşılaştırma sonuçlarının verildiği tablolarda ilk bölüm karşılaştırılan grupların direngenlik ortalamalarını (*mean*), karşılaştırma grupları içindeki örnek sayısını (N), standart sapma ve ortalama hatayı vermektedir. İkinci bölüm bu grupların arasındaki karşılıklı ilişki katsayısını, ve son bölüm son sütunu ise örnekleme sonucunu (p-value) vermektedir.

Tablo 14. Sağlıklı kemiklerin basmaya ve çekmeye çalıştığı durumlar (VAR00001 ve VAR00002).

Paired Samples Statistics				
	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 VAR00001	288,3600	20	54,48604	12,18345
VAR00002	385,0080	20	104,15512	23,28979

Paired Samples Correlations			
	N	Correlation	Sig.
Pair 1 VAR00001 & VAR00002	20	,210	,373

Paired Samples Test									
		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	1	-96,64800	106,90385	23,90543	-146,68265	-46,61335	-4,043	19	,001
		VAR00001- VAR00002							

Mekanik özellikleri karşılaştırılan ilk grup (Pair 1) için Tablo 14 örnek bir tablodur, bundan sonra yapılacak tüm karşılaştırmaların sonuçları tek bir tabloda verilecektir. Her bir karşılaştırma (Pair 2, Pair 3,...) sonucu bir örnekleme sonucu çıkacak ve bu değer anlamlılık düzeyi ile karşılaştırıldı.

Dört ve sekiz hafta sonra termine edilen implantlı örneklerde implantın basma ve çekmeye çalışması durumunda anlamlılık düzeyi 0,007(< 0,05) çıkmıştır ve anlamlı bir fark vardır. Zaten benzer şekilde çekme durumunun ortalama değeri basma durumuna göre daha yüksek ve aynı zamanda her iki değer de sağlıklı örneklere yakındır (Tablo 14- PAIR 2 değerleri: Çekmede 371 N/mm, Basmada 292 N/mm ortalama direngenlikler).

4.14.1 Dört hafta sonra iyileşme durumu

Dördüncü hafta sonunda termine edilen deney hayvanlarının implantlı kemikleri ile karşı taraf sağlıklı kemikleri karşılaştırılmıştır (Tablo 15: PAIR 3). İmplantın basmaya çalıştığı durumdaki direngenlik değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($0,072 > 0,05$). Öte yandan implantın çekmeye çalıştığı durumda da sağlıklı ve implantlı kemiklerin direngenlik değerleri arasında bir fark görülmüştür (Tablo 15: PAIR 4 ; $0,035 < 0,05$).

PAIR 3 ve PAIR 4 p-değerlerinin sırası ile anlamlılık düzeyinden yüksek ve düşük çıkması, ortalama direngenlik değerlerinin basma ve çekme durumundaki farkları konusunda bilgi vermektedir. Yani, PAIR 3 için (basma durumunda) ortalama direngenlikler arasında çok büyük bir fark beklenmezken, PAIR 4 için (çekme durumunda) sağlıklı kemiklerin direngenlik ortalamasının implantlı olanlardan biraz farklı olacağı beklenmektedir. Nitekim, her iki çiftte de implantlı örneklerin ortalama direngenlik değerleri sağlam sol örneklerin ortalama değerlerinden daha düşüktür, fakat çekmedeki fark basma durumundan daha fazladır (**Basmada**, Sağlıklı: 289 N/mm, İmplantlı: 246 N/mm, **Çekmede**, Sağlıklı: 423 N/mm, İmplantlı: 327 N/mm, Tablo 15, Pair 3 ve Pair 4). Basma durumunda implantın kemiğe osseointegrasyonunun fazla önemi olmadığı için kemik ve implantın bileşke direngenliği görülürken çekme durumunda implant kemiğe yeterince osseointegre olmadıysa (mikrotomografi sonuçlarında bakılabilir) kemik-implant arayüzü açılacağı için implantın direngenliğe etkisi olmayacak ve deneylerde görülen çekmede ortalama direngenlikte belirgin düşüş gözlenecektir.

4.14.2 Sekiz hafta sonra iyileşme durumu

Sekizinci hafta sonunda implantlı kemikler ile sağlıklı kemiklerin basma durumundaki direngenlik değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir (PAIR 5, $0,287 > 0,05$). Benzer şekilde sağlıklı ve implantlı örneklerin çekme konumundaki direngenlik değerleri arasında da bir fark görülmemiştir (PAIR 6, $0,247 > 0,05$). Her iki çiftte de implantlı örneklerin direngenlik ortalama değerleri sağlam örneklerin ortalama değerlerinden daha yüksek çıkmıştır. Bu da sekiz hafta sonunda implantlı kemiğin sağlıklı kemikten daha direngen duruma geldiğini göstermektedir (**Basmada**: Sağlıklı: 292 N/mm, İmplantlı: 330 N/mm, **Çekmede**: Sağlıklı: 397 N/mm, İmplantlı: 443 N/mm, Tablo 15 Pair 5 ve Pair 6).

Tablo 15. Örneklerin SPSS 20.0 yazılımı ile analizi sonuçları.

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	288,3600	20	54,48604	12,18345
	VAR00002	385,0080	20	104,15512	23,28979
Pair 2	VAR00003	292,9000	15	87,20498	22,51623
	VAR00004	371,4193	15	138,12631	35,66406
Pair 3	VAR00005	289,3413	8	54,94955	19,42760
	VAR00006	246,9489	8	86,66332	30,64011
Pair 4	VAR00007	423,5479	8	121,73257	43,03896
	VAR00008	307,9175	8	140,21651	49,57402
Pair 5	VAR00009	292,8738	8	58,64631	20,73460
	VAR00010	330,4283	8	65,76287	23,25068
Pair 6	VAR00011	397,7143	7	94,81894	35,83819
	VAR00012	443,9932	7	100,29356	37,90740

Paired Samples Correlations				
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	20	,210	,373
Pair 2	VAR00003 & VAR00004	15	,720	,002
Pair 3	VAR00005 & VAR00006	8	,768	,026
Pair 4	VAR00007 & VAR00008	8	,551	,157
Pair 5	VAR00009 & VAR00010	8	-,093	,826
Pair 6	VAR00011 & VAR00012	7	,523	,228

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-96,64800	106,90835	23,98543	-146,68265	-46,61335	-4,043	19	,001
Pair 2	VAR00003 - VAR00004	-78,51933	98,58339	24,93772	-132,00543	-25,03323	-3,149	14	,007
Pair 3	VAR00005 - VAR00006	42,39235	56,67543	20,03779	-4,88950	89,77420	2,116	7	,072
Pair 4	VAR00007 - VAR00008	115,63038	125,16447	44,25232	10,99028	220,27049	2,613	7	,036
Pair 5	VAR00009 - VAR00010	-37,55450	92,10361	32,58354	-114,55504	39,44604	-1,153	7	,287
Pair 6	VAR00011 - VAR00012	-46,27896	95,37968	36,04990	-134,48889	41,93188	-1,284	6	,247

4.14.3 PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF Örneklerinin Kendi İçinde Değerlendirilmesi

Hücreli ve hüresiz PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF implantların mekanik testleri 4. ve 8. hafta sonunda çıkartılan kemiklerde 4-nokta eğme basma ve çekme deneyleri ile yürütülmüştür. İstatistiksel karşılaştırma için yeteri sayıda örnek olmasa da elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.14.3.1 Dört hafta sonunda çıkarılan örneklerin değerlendirilmesi:

Hücretsiz PCL/HAp implant edilmiş tavşanların kemikleri kırıldığı için data elde edilememiştir. Ancak, iki hayvandan alınan kemikler ile yapılan testlerde sağlam kemiklerin basma ve çekme değerleri sırasıyla 329,65 N/mm ve 256,875 N/mm bulunmuştur (Tablo 16). Diğer taraftan hücretsiz PCL/HAp/PPF örnekleri implant edilen 3 tavşandan 4. hafta sonunda alınan kemikler ile yapılan deneylerde, sağlam kemikler için ortalama basma ve çekme değerleri 250,31 N/mm ve 380,38 N/mm olarak bulunurken, implantlı kemiklerde bu değerler düşmüştür. Basma ve çekme için sırasıyla 181,33 N/mm ve 228,58 N/mm olarak bulunmuştur. Bu değerler implant bölgesinin 4 haftada iyileşmediğini ve implantın doku ile tam olarak kaynaşmadığını göstermektedir. Hücre eklenmiş PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF implant edilmiş tavşanlardan çıkarılan kemiklerde 4. hafta sonunda basma ve çekme değerlerinin sağlam kemiklere oldukça yaklaştığı görülmüştür. Basma ve çekme değerleri PCL/HAp implant edilmiş kemik için sırasıyla 319,13 N/mm (sağlam 296,765 N/mm), 313,1 N/mm (sağlam 316,58 N/mm) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde bu değerler PCL/HAp/PPF için sırasıyla 280,26 N/mm (sağlam 288,31 N/mm) ve 453,74 N/mm (sağlam 501,46 N/mm) olarak bulunmuştur.

4.14.3.2 Sekiz hafta sonunda çıkarılan örneklerin değerlendirilmesi:

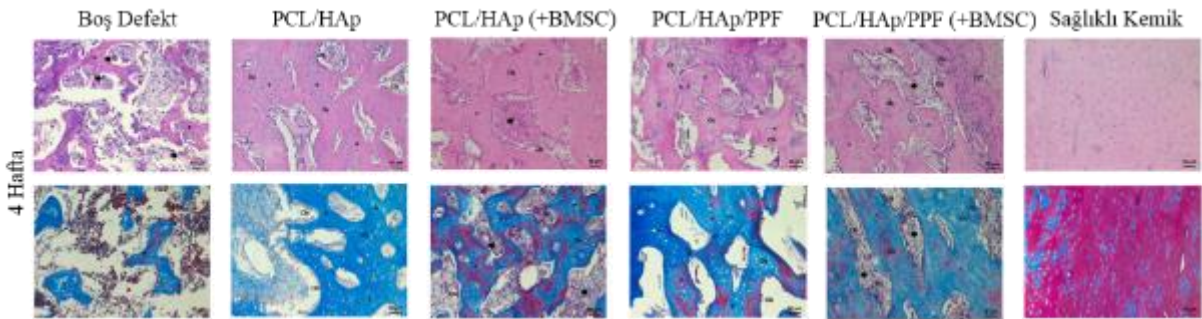
Hücretsiz PCL/HAp implant edilmiş 1 tavşanın sağlam ve implantlı kemiği karşılaştırılmıştır. Bu örnek için basma ve çekme değerleri implantlı kemiklerde sağlam kemiğe göre yaklaşık 1-1,5 kat artış göstermiştir (basma için 209,41 N/mm karşı 372,16 N/mm; çekme için 414,47 N/mm karşı 486,44 N/mm). Hücretsiz PCL/HAp/PPF örnekleri için basma değerleri bir tavşanda sağlama göre daha düşük fakat diğer tavşanda daha yüksek olmasına karşın ortalamada implantlı ve sağlam örnekler için değerler birbirine yakın bulunmuştur. Aynı örneğe ait çekme değerlerinde ise implantlı örnek sağlam kemiğe göre yaklaşık 1,3 kat artış göstermiştir (implantlı: 473,99 N/mm; sağlam:373.38 N/mm). Hücreli PCL/HAp implant edilmiş örnekler için 2 tavşandan elde edilen kemikler ile deneyler yürütülmüştür ancak basma deney sonucu 1 örnek için elde edilmiş, örnekler kırıldığı için çekme sonucu elde edilememiştir. Basma deneyinde de implantlı kemiğin değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Hücreli PCL/HAp/PPF örnekleri için 3 tavşandan alınan kemikler ile mekanik deney sonuçları elde edilmiştir. Bu örneklerin basma ve çekme değerleri sağlam kemiğe göre daha yüksek bulunmuştur (basma için 310,89 N/mm karşı 389,01 N/mm; çekme için 368,53 N/mm karşı 376,08 N/mm). Elde edilen sonuçlara göre PPF varlığının kemik iyileşmesini ve implantın kemik dokusu ile kaynaşmasını arttırdığı ve sonuç olarak ta implantlı kemiğin direngenliğinin arttığı görülmüştür.

Tablo 16. Hücreli ve hücretsiz, implantlı ile sağlıklı kemik dirençliklerinin karşılaştırılması.

4. Hafta	PCL/HAp - Hücretsiz				PCL/HAp - Hücreli			
	Basma		Çekme		Basma		Çekme	
	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı
	332,66	*	280,92	*	254,72	303,57	340,13	322,04
	326,64	*	232,83	*	338,81	334,69	293,03	304,16
Ortalama	329,65		256,875		296,765	319,13	316,58	313,1
8. Hafta	PCL/HAp - Hücretsiz				PCL/HAp - Hücreli			
	Basma		Çekme		Basma		Çekme	
	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı
	209,41	372,16	414,47	486,44	231,16	-	344,83	-
	-	-	-	-	299,73	271,62	225,52	-
Ortalama	209,41	372,16	414,47	486,44	265,445	271,62	285,175	
4. Hafta	PCL/HAp/PPF - Hücretsiz				PCL/HAp/PPF - Hücreli			
	Basma		Çekme		Basma		Çekme	
	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı
	244,92	175,24	477,78	274,98	221,32	*	328,96	*
	226,8	95,95	279,72	134,51	258,55	207,32	601,71	282,53
	279,22	272,79	383,64	276,26	385,07	353,2	573,71	624,95
Ortalama	250,31	181,33	380,38	228,58	288,31	280,26	501,46	453,74
8. Hafta	PCL/HAp/PPF - Hücretsiz				PCL/HAp/PPF - Hücreli			
	Basma		Çekme		Basma		Çekme	
	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı	İmplantsız	İmplantlı
	324,34	*	301,45	*	249,33	307,93	385,49	350,53
	375,52	255,96	528,57	448,29	369,6	423,08	459,34	512,05
Ortalama	273,01	378,04	290,12	499,68	313,75	354,94	260,76	265,66

4.15 Histolojik İncelemeler

In vivo deneylerde 4 hafta sonra çıkarılan kemik örnekleri defekt oluşturulmamış sağlam kemik örneği ile karşılaştırmalı olarak incelendi (Şekil 62). Doku desteği yerleştirilmemiş boş defekt olan kemik dokusunda yaygın olarak fibröz bağ dokusu görülmektedir. Hasar oluşturulan alanda spikül ve trabekül şeklinde küçük ve az sayıda yeni kemik oluşumları görülmektedir. Tabeküller arası boşlukta yoğun kanama alanları ve belirgin miktarda yabancı cisim dev hücreleri ve makrofaj hücreleri gözlemlenmektedir. Hücresiz ve hücreli PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş kemik örnekleri karşılaştırıldığında fibröz bağ dokusunun yer yer olduğu ve boş defekt grubuna göre çok daha az olduğu görülmektedir. Trabeküllerin bu gruplarda çok daha kalın, sayıca fazla olduğu ve bunların birleşerek yoğun bir şekilde yeni kemik oluşturdukları gözlenmektedir. Her dört grupta trabeküllerin çevresinde kemik oluşumunda öncü hücreler olan osteoblast hücrelerinin dizili oluşu ve trabekül içinde ise erişkin kemik hücreleri olan osteositlerin bulunduğu görülmektedir. Ayrıca bu gruplarda kemik remodellenmesinde önemli rolü olan osteoklast hücrelerinin de trabekül yüzeyinde bulunduğu görülmektedir. Kanama bölgelerinin bu gruplarda çok seyrek olduğu da gözlemlenmektedir. Genel olarak bakıldığında hücresiz ve hücreli PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş kemik gruplarında doku desteği yerleştirilmemiş boş defekt grubuna göre inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve fibröz bağ dokusu oluşumunun daha az olduğu, yeni kemik oluşumunun ise belirgin bir şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Farklı içerikteki iki implant PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF uygulamasının hücreli ve hücresiz örneklerde histolojik olarak belirgin bir fark oluşturmadığı görülmektedir. Hücreli ve hücresiz implant uygulanması açısından değerlendirildiğinde ise her iki implant tipinin hücreli ve hücresiz örnekleri arasında histolojik olarak belirgin bir fark görülmemekte sadece hücreli örneklerde trabeküller arası boşluklarda bağ dokusunun ve hücrelerin bir miktar daha yoğun olduğu görülmektedir.



Şekil 62 Dört hafta sonunda çıkarılan kemiklerin Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyaması sonrası histolojik görüntüleri. FB: fibröz bağ dokusu, *: Kalın trabeküller, Ob: osteoblast hücreleri, Oc: osteoklast hücreleri, Os: osteositler.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu projenin amacı kemik hasarlarının hızlı ve düzgün iyileşmesine olanak verecek şekilde, biyouyumlu ve biyobozunur malzemeleri kullanarak, ileri teknolojilerin uygulanması ile hastanın gereksinimine cevap verebilecek ve hasar bölgesini tedavi edebilecek şekilde kişiye özel ve özgün implantlar hazırlamaktır. Proje kapsamında hızlı prototipleme yöntemi ile hidroksiapatit ve polipropilen fumarat içeren temel ve temel kaymalı tasarıma sahip PCL PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri hazırlanmıştır. Yapılan in vitro sitotoksikite deneyleri sonucunda hazırlanan bütün doku desteklerinin L929 hücreleri üzerine toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca tavşandan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile statik koşullarda hücre çoğalması incelenmiş her iki tasarımda da (temel ve temel-kaymalı) hidroksiapatit içeren doku desteklerinde daha fazla hücre sayısı hesaplanmıştır. Gözenek büyüklüğü 515 µm olan temel-kaymalı tasarımlı doku desteklerinde her boşluğun altını kısmen dolduran polimer fiberlerin bulunması sebebiyle hücre ekimi sırasında hücre akışı engellendiği ve daha fazla hücre tutunmasına neden olduğu için her bir zaman aralığında temel-kaymalı doku desteklerinde hücre sayısının daha fazla olduğu bulunmuştur. Yapılan EDS analizinde PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destek yapılarında, Ca ve P elementlerinin varlığı gösterilmiştir. PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF örneklerinde elementlerin atomik yüzdeleri ve Ca/P oranı sırasıyla 1.44 ve 1.61 olarak hesaplanmıştır.

Temel ve temel-kaymalı PCL doku destekleri Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT) ile taranarak gözeneklilikleri hesaplanmıştır. Temel kaymalı doku desteklerinin kapalı gözenekleri %1.06 bulunurken, toplam gözenekleri %17 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler doku desteklerinin, çevre dokulardan hücre geçişine ve kemik doku rejenasyonuna izin verecek kadar yüksek gözenek alanına sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte temel yapılarda gözenek büyüklüğü 527 ± 0.05 µm bulunurken temel kaymalı yapılarda gözenek büyüklüğü 515 ± 0.01 µm olarak bulunmuştur. Bu iki tasarım arasında gözenek büyüklüğü açısından çok büyük farklılıklar olmasa da temel kaymalı yapılarda her boşluğun altını kısmen dolduran fiber yapılarının olması, ekim sırasında hücre akışını bir nebze engellemiş ve daha fazla sayıda hücrenin tutunmasına olanak sağlamıştır. Dolayısıyla üretilen doku destekleri ileri aşama in vitro deneylerinde ve in vivo uygulamalarda güvenle kullanılabilmiştir.

Hücre biyouyumluluğu statik ve dinamik koşullarda incelenmiştir. Statik koşullarda, zamanla her iki yapıda da hücre artışı görülmesine rağmen mezenkimal kök hücreler PCL/HAp doku destekleri üzerinde PCL doku desteğine oranla daha iyi tutunmuş ve hücre sayısı buna bağlı olarak daha fazla artmıştır. Temel ve temel kaymalı doku desteklerindeki hücre sayıları

karşılaştırıldığında ise beklendiği üzere gözenek büyüklüğü daha küçük olan temel kaymalı doku destekleri üzerinde (hem PCL hem de PCL/HAp) hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir.

In vitro osteojenik farklılaşmayı incelemek amacıyla 7., 14. ve 21. günlerde alkalen fosfotaz (ALP) enzim aktivitesi ölçülmüş ve Alizarin Red boyaması yapılmıştır. ALP aktivitesinin 7. günden 21. güne kadar arttığı belirlenmiştir. 21. günün sonunda PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri üzerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelerinin ALP aktivitelerinin birbirlerine yakın olduğu saptanmıştır. Osteojenik farklılaşma testleri sonucunda PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklılaşmayı indüklediği görülmüştür.

Potansiyel biyolojik risklerin tayin edilmesi için deri içi irritasyon ve implantasyon testleri TÜBİTAK MAM'da yapılmıştır. PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri için yapılan gözlemler ve elde edilen skor değerleri doğrultusunda, ISO 10993-12: 2010 belgesinde belirtilen protokol ve değerlendirme kriterlerine göre PCL, PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteklerinin deri içi irritan (tahriş edici) özelliğe sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Doku desteklerinin implantasyon testleri sonucunda yapılan değerlendirmeye göre materyaller 'irritant değil' (0,0-2,9) aralığında yer almaktadır. En düşük implantasyon testi skoruna sahip olan destek 1,67 ile PCL/HAp/PPF'dir. Bu çalışmalar doku destek materyallerinin canlı üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin olmadığını kanıtlar niteliktedir.

Kemik dokusundan çıkan parçanın tespiti, modellemesi ve Kemik Mineral Yoğunluğu'nun hesaplanması için MikroBT çalışmaları yapılmıştır. Kemikte defekt yaratmak için öncelikle matkapla delik açma yöntemi denenmiştir. Bu yöntem kemik içinde gözle görülemeyen ve tespit edilemeyen kırık, çatlak ve parçalanmalara yol açmıştır. Kemik bütünlüğünü korumak amacıyla defekt yaratma tekniği değiştirilerek, daha hassas olan, kemiğe zarar vermeyecek boyutta defekt açabilen kemik delgisi kullanılmıştır.

MikroBT taramalarından elde edilen veriler sayesinde kemik dokusunda oluşturulan defektin çap olarak ortalama 5 mm, derinlik olarak ortalama 2,5 mm boyutlara sahip olduğu saptanmıştır. Böylece hızlı prototipleme yöntemiyle üretilen destek dokuların boyutları belirlenmiştir. Ayrıca in vitro çalışmalar için uygun gözenekliliğe sahip olan ve doku iç büyümesine izin veren disk şeklinde yeni bir doku desteği modeli geliştirilmiştir.

Tavşan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin karakterizasyonu için akış sitometrisi ve hücre boyamaları yapılmıştır. Akış sitometrisinden elde edilen verilere göre hücreler CD 81, CD 44 ve CD 29 belirteçlerini eksprese ederken CD 14 ve CD 29 belirteçlerini eksprese etmemiştir. PAS-Alsiyan mavisi, Oil Red O, von Kossa boyamaları hücrelerin sırasıyla kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaşma özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Tüm bu bulgular, izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu kanıtlamıştır.

Hücre farklılaşmasını gen düzeyinde izlemek amacıyla kullanılacak olan metodların optimizasyonu yapılmıştır. RNA izolasyon yöntemi olarak GeneJET RNA Purification kitinin protokollerinin kullanılması uygun görülmüştür. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu çalışmasında kullanılacak GAPDH, RUNX2, SPP1 ve COL1A1 genleri için primerler tasarlanmıştır ve ortak erime sıcaklıkları 58°C olarak belirlenmiştir.

Hücre içeren ve içermeyen polimerik biyomalzemeler tavşan kemik defektinin içerisine implant edilerek, 4 ve 8 hafta inkübe edilmişlerdir. Bu süreler sonunda çıkartılan kemik örneklerinin, kemik mineral yoğunluğu (KMY) MikroBT taramasıyla tespit edilmiştir. KMY değerleri incelendiğinde 4. ve 8. haftanın sonunda doku desteği uygulanmış kemiklerin boş defektlere kıyasla daha fazla mineralize olduğu ve yeni kemik oluşumu yönünde iyileştiği görülmüştür. Elde edilen bu değerlerden yola çıkarak doku desteği kullanılan örnekler ile boş örnek arasında KMY açısından %10-15 arasında bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol grubu örneği defekt oluşturulmamış sağlam kemiği ifade etmektedir ve bu değer doku desteği uygulanmış ve uygulanmamış örnekler ile karşılaştırıldığında, özellikle hücre ekilmiş PCL/HAp/PPF doku destekli kemiğin 8 hafta sonunda sağlam kemiğin KMY değerine oldukça yaklaştığı görülmüştür. Doku desteği yerleştirilmemiş tavşan kemiğinin defekt kısmının 8 hafta sonunda belirli ölçüde kapandığı fakat kemiğin boşluğa yakın kısmında kemik yoğunluğunun önemli ölçüde azaldığı (kemik rezorpsiyonu) görülmüştür. Bu durum özellikle kritik boyuttaki kemik defektlerinde implant kullanımının kemik dokusunun iyileşme sürecine katkısı açısından önemini göstermektedir. PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku destekleri uygulanmış kemikler karşılaştırıldığında her iki kemikte de önemli ölçüde yeni kemik dokusunun oluştuğu gözlemlenmiştir. PCL/HAp/PPF doku desteği uygulanmış kemiğin katı hal modeli oluşturulup incelendiğinde, yeni kemik oluşumunun uygulanan doku desteğinin fiberleri ile benzer olarak gerçekleştiği ve bu bağlamda kullanılan doku desteğinin kemik dokusu iyileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmüştür.

Histolojik incelemeler sonucunda doku desteği yerleştirilmemiş boş defekt grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonun ve fibröz bağ dokusu oluşumunun hücreli ve hücreli PCL/HAp ve PCL/HAp/PPF doku desteği yerleştirilmiş kemik gruplarına göre belirgin şekilde daha fazla olduğu görölmüştür. Hücreli ve hücreli doku destekleri karşılaştırıldığında ise hücreli örneklere trabeküller arası boşluklarda bağ dokusunun ve hücrelerin daha az olduğu görölmüştür.

İmplantlı ve sağlam kemikler üzerinde yapılan mekanik testlere göre, dört haftalık iyileşme süreci sonucu elde edilen dirençlilik beklenildiği üzere implantlı kemikte sağlam kemiğe oranla daha düşüktür. Bu durum dört haftalık sürenin kemik iyileşmesinde mekanik açıdan yeterli olmadığını göstermiştir. Hücre içeren örneklere kemik iyileşmesinin hücre içermeyen örneklere göre daha iyi olduğu mikro-BT ve mekanik testlerle görölmüştür. Elde edilen sonuçlar inkübasyon süresinin kemik dirençliliğini olumlu yönde etkilediğini göstermiştir.

Bu aşamaya kadar yapılan çalışmalar hücreli implant yerleştirilen kemiklerin iyileşme hızının hücreli implantlı ve sadece defekt açılan kemiklere göre daha fazla olduğunu kanıtlamıştır. Tasarlanan implantlar üç boyutlu yazıcıda üretilmeye ve canlı üzerinde kullanılmaya elverişlidir. Bu bağlamda projenin amacı olan “hastanın gereksinimine cevap verebilecek ve hasar bölgesini tedavi edebilecek şekilde kişiye özel ve özđün implantların tasarlanması” başarıyla tamamlanmıştır.

6. REFERANSLAR

Ardeshiryajimi A., Mossahebi-Mohammadi M., Vakilian S., Langroudi L., Seyedjafari E., Atashi A. ve Soleimani M. 2015. "Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres", *Cell Proliferation*, 48 (1), 47–58.

Azevedo M.C., Reis R.L., Claase M.B., Grijpma D.W., Feijen J. 2003. "Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 14 (2), 103-107.

Baran E.T., Tuzlakoğlu K., Salgado A., Reis R.L. 2011. "Microchannel-patterned and heparin micro-contact-printed biodegradable composite membranes for tissue-engineering applications", *J. Tissue Eng. Regen. M.*, 5, 108-14.

Barud O.H.G., Barud, H.D.S., Cavicchioli, M., Tavares, D.C., Ribeiro, S.J.L. 2015. "Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*", 128, 9838, 41-51.

Basbozkurt M., Kurklu M., Yurttas Y., Demiralp B., Koca K., Kilic C., Yildiz C. 2012. "Ilizarov external fixation without removal of plate or screws: effect on hypertrophic and oligotrophic nonunion of the femoral shaft with plate failure", *J Orthop Trauma*, 26(8), 123-8.

Brie J., Chartier T., Chaput C., Delage C., Pradeau B., Caire F., Boncoeur M.P., Moreau J.J. 2012. "A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects", *J. Crano. Maxill Surg.*, 41, 403-407.

Butscher A., Bohner M., Hofmann S., Gauckler L., Müller R. 2011. "Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing", *Acta Biomaterialia*, 7, 907-20.

Carvalho L., Breyner N., Hell R., Valerio P., Novikoff S., Goes A. 2012. "Healing pattern in calvarial bone defects following bone regeneration in rats guided by chitosan scaffold and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells", *The Open Tissue Eng and Regen Med J*, 5, 25-34.

Chuenjitkuntaworn B., Inrung W., Damrongsri D., Mekaapiruk K., Supaphol P., Pavasant P. 2010. "Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization,

and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells”, J. Biomed. Mater. Res. A. 94(1), 241-251.

Demirbag B., Huri Y., Kose, Buyuksungur A., Hasirci V. 2011. “Advanced Cell Therapies with and without scaffolds”, Biotechnology Journal, 6, 1437-1453.

Domingos, M., Chiellini, F., Gloria, A., Ambrosio, L., Bartolo, P., Chiellini, E. 2012. “Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly (ϵ -caprolactone) scaffolds”, Rapid Prototyping Journal, 18(1), 56-67.

Erler K., Yildiz C., Baykal B., Atesalp A.S., Ozdemir M.T., Basbozkurt M. 2005. “Reconstruction of defects following bone tumor resections by distractionosteogenesis”, Arch Orthop Trauma Surg, 125(3), 177-83.

Ethicon Wound Closure Manual. 2007. Ethicon, Inc. <http://www.ethicon.com/healthcare-professionals/products/wound-closure/absorbable-sutures/monocryl-poliglecaprone-25>

Golub E.E. ve Boesze-Battaglia K. 2007. “The role of alkaline phosphatase in mineralization”, Current Opinion in Orthopaedics, 18, 444–8.

Hao L, Savalani MM, Harris RA, Zhang Y, Tanner KE. 2009. “Rapid manufacturing of bioceramic/polymer composite implants by selective laser sintering”, Journal: Int. J. of Computer Applications in Technology, 36, 25 – 31.

Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A. 1992. “Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow”, Bone, 13, 81–88.

Heissler E., Fischer F.S., Bolour S., Lehmann L.T., Mathar W., Gebhardt A., Lanksch W., Bier J. 1998. “Custom-made cast titanium implants produced with CAD/ CAM for the reconstruction of cranium defects”, Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 27, 334-8.

Heo S.J., Kim S.E., Wei J., Hyun Y.T., Yun H.S., Kim D.H., Shin J.W., Shin J.W. 2009. “Fabrication and characterization of novel nano- and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process”, J Biomed Mater Res A., 89, 108-116.

Hissink E.C., Steendam R., Meyboom R., Flipsen T.A.C., Biodegradable Multi-Block co-Polymers, CA 2553619 C 2005, . US 20070155906 A1, 2005

Jayabalan, M., Thomas, V., Sreelatha, P. K. 2000. "Studies on poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) based bone cement", *Bio-medical materials and engineering*, 10(2), 57-71.

Jung S., Kleinheinz J. 2014. "Adult Mesenchymal Stem Cells in Current Tissue Engineering Concepts", *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*, 5(1): 32–45.

Kaji H., Unal G.C., Langer R., Khademhosseini A. 2011. "Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions", *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 239-50.

Khalil S., Sun W. 2007. "Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs", *Mat. Sci. Eng. C*, 27, 469-78.

Kim M., Kim G.H. 2015. "Electrohydrodynamic direct printing of PCL/collagen fibrous scaffolds with a core/shell structure for tissue engineering applications", *Chemical Engineering Journal*, 279, 317-326.

Kim M.S., Kim G.H. 2014. "Highly porous electrospun 3D polycaprolactone/ β -TCP biocomposites for tissue regeneration", *Materials Letters*, 120, 246–250.

Kim, H. W. 2007. "Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83(1).

Kim K., Dean D., Lu A., Mikos A.G., Fisher J.P. 2011. "Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds", *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1249-64.

Koc A. 2008. "Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Kompozit İskelelerin Kullanımıyla Kemik Doku Mühendisliği", (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kose G.T., Korkusuz F., Korkusuz P., Hasırcı V. 2004. "In vivo tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds", *Tissue Eng.*, 10, 7/8, 1234-50.

Kutikov A.B., Gurijala A., Song J. 2015. "Rapid prototyping amphiphilic polymer/hydroxyapatite composite scaffolds with hydration-induced self-fixation behavior", *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 21, 229-241.

Langer R., Vacanti J. P. 1993. "Tissue engineering", *Science*, 260, 920–926.

Lewandrowski, K. U., Bondre, S. P., Wise, D. L., & Trantolo, D. J. 2002. "Enhanced bioactivity of a poly (propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite", *Bio-medical materials and engineering*, 13(2), 115-124.

Lo, H. Y., Kuo, H. T., Huang, Y. Y. 2010. "Application of Polycaprolactone as an Anti-Adhesion Biomaterial Film", *Artificial organs*, 34(8), 648-653.

Ma P.X., Zhang R., Xiao G., Franceschi R. 2001. "Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds", *J. Biomed. Mater. Res.*, 54, 284-93.

Malinauskas M., Lukoševičius L., Butkus S., Paipulas D. 2015. "Femtosecond pulse light filament-assisted microfabrication of biodegradable polylactic acid (PLA) material", *Journal of Laser Micro Nanoengineering*, 10 (2), 222-228.

Maquet V., Pagnouelle C., Evrard B., Jerome R., Foidart J.-M., Franken F., Active Substance Delivery System Comprising A Hydrogel Atrix And Microcarriers, WO 2006053836 A1, 2005; US 20080095822 A1, 2008.

Marino G., Rosso F., Cafiero G., Tortora C., Barbarisi M., Barbarisi A. 2010. " β -Tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in-vitro study", *J Mater Science: Mater in Med*, 21, 353-363.

Marra K.G., Szem J.W., Kumta P.N., DiMilla P.A., Weiss L.E. 1999. "In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering", *J. Biomed. Mater. Res.*, 47, 324-35.

Matsuo A., Takahashi H., Abukawa H., Chikazu D. 2012. "Application of custom-made bioresorbable raw particulate hydroxyapatite/ poly-L-lactide mesh tray with particulate cellular bone and marrow and platelet-rich plasma for a mandibular defect: Evaluation of tray fit and bone quality in a dog model", *J. Crano. Maxill Surg.*, 40, 453-60.

Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. 2010. "A review on stereolithography and its applications on biomedical engineering", *Biomaterials*, 31, 6121-30.

Murr Le, Gaytan SM, Martinez E, Medina F, Wicker RB 2012. "Next Generation Orthopaedic Implants by Additive Manufacturing Using Electron Beam Melting", *International Journal of Biomaterials*, Article ID 245727, 14 pages.

Nefussi JR, Brami G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N. 1997. "Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro", *J Histochem Cytochem*, 45, 493–503.

Park S.A., Lee J.B., Kim Y.E., Kim J.E., Lee J.H., Shin J.W., Kwon K. 2014. "Fabrication of biomimetic PCL scaffold using rapid prototyping for bone tissue engineering", *Macromolecular Research*, 22, 882-887.

Roh H.S., Myung S.W., Jung S.C., Kim B.H. 2015. "Fabrication of 3D scaffolds with nano-hydroxyapatite for improving the preosteoblast cell-biological performance", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15, 5585-5588.

Royals M.A., Fujita S.M., Yevey G.L., Rodriguez J., Schultheiss P.C., Dunn, R.L. 1999. "Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant system in rhesus monkeys", *J. Biomed. Mater. Res.*, 45, 3, 231-9.

Scaglione, S., Barengi, R., Beke, S., Ceseracciu, L., Romano, I., Sbrana, F., Vassalli, M. 2013. "Characterization of a bioinspired elastin-polypropylene fumarate material for vascular prostheses applications", In *SPIE Optical Metrology International Society for Optics and Photonics*, 8792.

Song B.R., Yang S.S., Jin H., Lee S.H., Park D.Y., Lee J.H., Park S.R., Park S.H., Min B.H. 2015. "Three dimensional plotted extracellular matrix scaffolds using a rapid prototyping for tissue engineering application", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, , 12, 172-180.

Staffa G., Barbanera A., Faiola A., Fricia M., Limoni P., Mottaran R., Zanotti B., Stefini R., 2012. "Custom made bioceramic implants in complex and large cranial reconstruction: A two-year follow-up", *J. Crano. Maxill Surg.*, 40, 465-70.

Sultana N., Hayat K. T. 2013. "Polycaprolactone Scaffolds and Hydroxyapatite/Polycaprolactone Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Journal of Bionanoscience*, 7 (2), 169-173(5).

Sun W., Starly B., Nam J., Darling A. 2005. "Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering", *Comput. Aid. Design* 37, 1097-14.

Tsai M.T., Li W.J., Tuan R.S., Chang W.H. 2009. "Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation", *Journal of Orthopaedic Research*, 27(9), 169-74.

Utela B., Storti D., Anderson R., Ganter M. 2008. "A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP)", *J. Manufac. Proc.*, 10, 96-04.

Wettergreen M.A., Bucklen B.S., Starly B., Yuksel E., Sun W., Liebschner M.A.K. 2005. "Creation of a unit block library of architectures for use in assembled scaffold engineering", *Comp. Aid. Design*, 37, 1141-49.

Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P. H., Feinberg, S. E., Das, S. 2005. "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering", *Biomaterials*, 26(23), 4817-4827.

Wust S., Müller R., Hofmann S. 2011. "Controlled positioning of cells in biomaterials-approaches towards 3D tissue printing", *J. Funct. Biomater.*, 2, 119-54.

Yeo M., Kim G. 2015. "Fabrication of cell-laden electrospun hybrid scaffolds of alginate-based bioink and PCL microstructures for tissue regeneration", *Chemical Engineering Journal*, 275, 27-35.

Yeong W.Y., Chua C.K., Leong K.F., Chandrasekaran M. 2004. "Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential", *TRENDS Biotech.*, 22, 1-11.

Yilgor P., Sousa R.A., Reis R.L., Hasirci N., Hasirci V. 2010. "Effect of scaffold architecture and BMP-2/BMP-7 delivery on in vitro bone regeneration", *J. Mat. Sci-Mater. M.* 21, 11, 2999-08.

Yu H., Adesida A.B., Jomha N.M. 2015. "Meniscus repair using mesenchymal stem cells - A comprehensive review", *Stem Cell Research and Therapy*, 6 (1), 86.

Zhang J., Wang L., Zhu M., Wang L., Xiao N., Kong D. 2014. "Wet-spun poly-(ε-caprolactone) microfiber scaffolds for oriented growth and infiltration of smooth muscle cells", *Materials Letters*, 132, 59-62.

Zheng Y.X., Ringe J., Liang Z., Loch A., Chen L., Sittinger M. 2006. "Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneic serum", *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 7, 10, 817-24.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. NESRİN HASIRCI
Proje No:	213M708
Proje Başlığı:	Doku Mühendisliği Yöntemi İle Hastaya Özel Ortopedik İmplant Tasarımı Ve Üretimi
Proje Türü:	1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama)
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	TUĞBA ENDOĞAN, DENİZ YÜCEL, GAMZE KÖSE, ERKAN TÜRKER BORAN, TAHSİN BEYZA BEYZADEOĞLU, ERGİN TÖNÜK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/07/2014 - 15/07/2016
Onaylanan Bütçe:	638100.0
Harcanan Bütçe:	457385.53
Öz:	<p>Doku Mühendisliği, gözenekli destekler üzerinde hastanın kendi hücrelerinin kullanılmasıyla doku geliştirilmesini, hastanın defekt bölgesine bu yarı gelişmiş dokunun yerleştirilmesini, böylelikle hasarlı bölgenin etkin ve hızlı iyileşmesini hedefleyen önemli bir tedavi yöntemidir. Bu uygulamadaki önemli öge, kullanılan malzemenin biyouyumlu ve biyobozunur olmasıdır. Yeni gelişen teknolojilerin, özellikle bilgisayarlı tomografi (BT), hızlı prototipleme (HP), ya da benzeri tekniklerin implant üretiminde birlikte kullanılması ile, hastadaki defekt bölgesinin boyutlarının tam olarak tanımlanması ve ona tam uyacak üç boyutlu (3B) implant üretimi mümkün olmaktadır. Bu projede amaç, İleri teknolojilerin uygulanması ile hastanın gereksinimine cevap verebilecek ve hasar bölgesini tedavi edebilecek şekilde kişiye özel ve özgün implant üretilebilmesini sağlamaktır. Konunun özgün değeri, yeni geliştirilecek biyobozunur polimerik kompozit malzemelerin, bilgisayarlı tomografi ve hızlı prototipleme (BT+HP) teknikleri ile farklı tasarımlarda şekillendirilmesi, denek'e özgü hücreler yüklenerek doku mühendisliği ürünlerine dönüştürülmesi ve in vivo uygulamalar ile performansının gösterilmesi olacaktır. Projede hücre taşıyıcısı üretmek için önerilen polimerler, HP işlemesine uygun olduğu için polikaprolakton (PCL) ve polimer oluştuktan sonra çapraz bağlanma olanağı veren polipropilen fümarat (PPF) dir. Bu polimerik yapıları hidroksiapatit (HAp) katılarak farklı kompozisyonlarda kompozitler hazırlanacaktır. Dolayısıyla farklı kompozisyonlarda, BT ile tanımlanmış ve HP ile şekillenmiş, hücre tutunmasına ve büyümesine olanak sağlayan ve aynı zamanda mekanik dirence de sahip ve biyobozunur olan implantlar yapımı ve bitmiş ürün özellikleriyle özgün olacaktır. Proje sırasıyla, in situ, in vitro ve in vivo uygulamaları içermektedir. Bu projenin kapsamında olmamasına rağmen nihai amaç, insana özel tasarımılanmış implantların geliştirilebilmesidir. Bu proje, insan uygulamaları basamağına kadar olan çalışmalarını kapsamaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Ortopedik implant, doku mühendisliği, hızlı prototipleme, hastaya özel implant.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projenin Yapılan Yayınlar:	<p>1- Surface Modifications of Polymeric Materials and Composites (Bildiri - Uluslararası Konferans - Davetli Konuşmacı),</p> <p>2- Surface Modifications of Polymeric Composites to Have Bioactive, Biocompatible, Antithrombogenic and Antibacterial Properties (Bildiri - Uluslararası Konferans - Davetli Konuşmacı),</p> <p>3- PCL Wet Spun Scaffolds for Antibiotic Delivery (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>4- Patient-Specific Orthopedic Implant Design and Production with Tissue Engineering Method (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>5- Modelling of 3D Scaffolds for Patient Specific Implants (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>6- 3D Printed, Tissue Engineered Femoral Implant Design and Production (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>7- Guided Tissue Regeneration by Micro and Nanofabricated Scaffolds (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>8- Functional PCL Scaffolds: Local Antibiotic Delivery in Bone Tissue Engineering Applications (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p>
----------------------------	---

TÜBİTAK