2023

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semiha YALÇINKAYA



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-HEPTİL-D-GALAKTONAMİD (GALC7) TABANLI HİDROJELLERİN SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELESİ OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN *in vitro* OLARAK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semiha YALÇINKAYA

TRANSLASYONEL TIP PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-HEPTİL-D-GALAKTONAMİD (GALC7) TABANLI HİDROJELLERİN SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELESİ OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN *in vitro* OLARAK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semiha YALÇINKAYA

TRANSLASYONEL TIP PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-Heptil-D-Galaktonamid (GALC7) Tabanlı Hidrojellerin Sert Doku Mühendisliğinde Doku İskelesi Olarak Kullanım Potansiyellerinin *İn Vitro* Olarak İncelenmesi

Semiha YALÇINKAYA

Yüksek Lisans Tezi

06/07/2023

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ

Jüri Üyeleri
Doç.Dr.Aydın ÖZKAN
Doç.Dr.Sedat ÇETİN
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ

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

Adı SOYADI
Prof. Dr. Sena KAPLAN
Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. (06/07/2023)

Semiha YALÇINKAYA

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışma tez sürecim boyunca bana destek veren, emeğini esirgemeyen, fikirleriyle, engin akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama yol gösteren danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ' e en derin minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Keziban KORKMAZ BAYRAM'a da çok teşekkür ediyorum.

Deneylerim sırasında her daim yanımda olan ve bana her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşım Ayşe DEMİRAL 'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Deney çalışmalarımı gerçekleştirmeme imkân sağlayan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na ve çalışanlarına çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca her konuda başarılı olabileceğime inanan, büyük bir sabırla bana destek veren, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, fikirleriyle yol gösteren, yol arkadaşım, canım eşim Osman YALÇINKAYA 'ya çok ama çok teşekkür ediyorum.

Bana her zaman güvenen, her zaman yanımda olan ve destekleyen aileme ve eşimin ailesine, beni bugünlere getiren varlığıyla bana güç veren canım babam Bayram GÜLER 'e, kardeşim Hanne GÜLER'e ve en çok da bu süreçte oğlumdan ilgisini sevgisini esirgemeyen annem Hanife GÜLER 'e ve kayınvalidem Selvinaz YALÇINKAYA' a çok teşekkür ediyorum.

Son olarak beni evde sabırla bekleyen, yaşam kaynağım, biricik oğlum Aziz sana çok ama çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **v**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Doku Mühendisliği 4

2.2. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri 5

2.3. Doku Mühendisliğinde Kullanılan İskele Malzemeleri 6

2.3.1. Biyoseramikler 7

2.3.2. Biyobozunur Polimerler 8

2.3.3. Kompozitler 9

2.3.4. Metalik Biyomalzemeler 9

2.3.5. Yapı İskelesi Üretim Teknikleri 10

2.4. Büyüme Faktörleri 11

2.5. Hücreler 12

2.6. Sert Doku Mühendisliği 13

2.7. N-Heptil-D-Galaktonamid (GalC7) 16

2.8. Üç Boyutlu Hücre Kültürü 17

3. MATERYAL VE YÖNTEM **20**

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücrelerin Hazırlanması 20

3.2. İndükleyici Besiyeri Hazırlanması 22

3.3. GalC7 Hidrojelin Hazırlanması 22

3.4. XTT Yöntemiyle Hücre Canlılığının Belirlenmesi 24

3.5. Floresan Mikroskopi Analizi 25

3.6. GalC7 ile Kültürlenen Hücrelerden RNA İzolasyonu 27
3.7. cDNA Sentezi 29
3.8. RT-qPCR Sentezi 29
3.9. Agaroz Jel Elektroforezi 30
3.10. Alkalin Fosfataz (ALP) Tayini 32
4. BULGULAR 35
4.1. Hücrelerin Büyütülmesi 35
4.2. GALC7 Jelin Optimizasyon Bulguları 36
4.3. Hücre Canlılığı Tayinine İlişkin Bulgular 37
4.4. Floresan Mikroskopi Bulguları 38
4.5. Rt-qPCR Sentezine İlişkin Bulgular 39
4.6. Agaroz Jel Elektroforezine İlişkin Bulgular 40
4.7. Alkalin Fosfataz Tayinine İlişkin Bulgular 41
5. TARTIŞMA 43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 47
7. KAYNAKLAR 48
8. EKLER 58
EK-1. Özgeçmiş 58
EK-2. Tezden Üretilmiş Sözlü Sunum, Poster Sunumu ve Yayınlar 59

ÖZET

N-Heptil-D-Galaktonamid (GALC7) Tabanlı Hidrojellerin Sert Doku Mühendisliğinde Doku İskelesi Olarak Kullanım Potansiyellerinin *İn Vitro* Olarak İncelenmesi

Sert doku mühendisliği, kemik, kıkırdak ve diş gibi sert dokuların onarımı ve restorasyonu üzerinde çalışan multidisipliner bir alandır. Bu dokuların temel özelliklerinden biri, hücre dışı matrislerinin mineralizasyonuyla basınca ve ağırlığa dayanmalarını sağlamalarıdır. Sert doku mühendisliği, bu dokuların mineralizasyon sürecini yönlendirebilmek için yeni yöntemler geliştirmeyi hedefler. Ayrıca, doku rejenerasyonuna yardımcı olmak için üç boyutlu gözenekli bir yapı iskelesi geliştirme konusu da önemlidir. Bu iskeletlerin uygun geometri, gözenek boyutları ve yüksek gözeneklilik gibi özelliklerinin optimize edilmesi, doku oluşumunu teşvik etmek ve hücre proliferasyonuna uyum sağlamak için önemlidir.

Tez çalışmamızın amacı GALC7 tabanlı hidrojellerin sert doku iskelesi olarak kullanım potansiyellerinin in vitro olarak incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak uygun gözenek boyutu ve kendini taşıyabilme özellikleri bakımından hidrojelin optimizasyonu gerçekleştirildi. SaOS-2 hücre hattı ve insan kaynaklı dental pulpa kök hücreleri kullanılarak sitotoksisite, hücre morfolojisi ve alkalin fosfataz üretimi açısından incelendi.

Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonucuna daha az gözenek boyutu ve yoğun fibril yapısı nedeniyle %3'lük konsantrasyonda olan jellerde çalışmalar gerçekleştirildi. GALC7 hidrojeli içerisinde büyütülen hücrelerin sitotoksik bir etki yaratmadığını gösterildi. Hücrelerin hidrojel liflerine göre yönelim gösterdikleri ve belirgin bir sitoiskelet yapısı oluşturdukları tespit edildi. Kolorimetrik ALP tahlilinde her iki hücre grubunda benzer şekilde hem indüklenmiş hem de indüklenmemiş jel ortamında ekstraselüler ALP miktarının, petri kabında büyütülen hücrelere göre daha yüksek olduğu gösterildi.

Sonuçta bu bulgular, GALC7 tabanlı hidrojellerin biyolojik uyumluluğu hücre büyümesini ve mineralizasyonu teşvik etme yetenekleri, sert doku mühendisliğinde kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir. GALC7 hidrojellerinin hedeflenen doku rejenerasyonunda kullanılabilmesi, gelecekteki doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için umut verici bir alan olabilir.

Anahtar Kelimeler: Doku iskelesi, doku mühendisliği, GalC7, hücre kültürü.

ABSTRACT

In vitro Investigation of N-Heptyl-D-Galactonamide (GALC7) - Based Hydrojels as Potentials as Tissue Scaffold in Hard Tissue Engineering

Hard tissue engineering is a multidisciplinary field that focuses on the repair and restoration of hard tissues such as bone, cartilage, and teeth. One fundamental characteristic of these tissues is their ability to withstand pressure and weight through the mineralization of their extracellular matrices. The goal of tissue engineering is to develop novel methods to guide the mineralization process of these tissues. Additionally, the development of a three-dimensional porous scaffold to assist in tissue regeneration is of great importance. Optimizing the scaffold's geometry, pore size, and high porosity are crucial for promoting tissue formation and accommodating cell proliferation.

The aim of our thesis work is to investigate the in vitro potential use of GALC7-based hydrogels as scaffolds for hard tissues. In line with this objective, the optimization of the hydrogel was initially performed considering suitable pore size and self-supporting properties. Cytotoxicity, cell morphology, and alkaline phosphatase production were examined using SaOS-2 cell line and human dental pulp stem cells.

Based on our optimization studies, investigations were conducted on hydrogels with a concentration of 3% due to their smaller pore size and dense fibril structure. It was demonstrated that the cells grown within GALC7 hydrogel did not exhibit cytotoxic effects. The cells showed alignment with the hydrogel fibers and formed a distinct cytoskeletal structure. In the colorimetric ALP assay, it was shown that both cell groups exhibited higher extracellular ALP levels in both induced and non-induced gel environments compared to cells grown in petri dishes.

In conclusion, these findings demonstrate the biological compatibility of GALC7-based hydrogels and their ability to promote cell growth and mineralization, indicating their potential for use in hard tissue engineering. The ability to utilize GALC7 hydrogels in targeted tissue regeneration may offer a promising avenue for future applications in tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: Cell culture, GalC7, tissue engineering, tissue scaffold.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP : Alkalin fosfataz

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

BMP : Kemik morfojenik protein

CaO : Kalsiyum oksit

CB-MS : Göbek kordonu kanı mezenkimal kök hücre

ECM : Ekstraselüler matriks

ESC : Embriyonik kök hücre.

FBS : Fetal bovine serum.

GALC7 : N-Heptil-D-Galaktonamid

GALC7 : N-Heptil-D-Galaktonamid

HA : Hidroksiapatit

iPSC : Pluripotent kök hücre.

PBS : Phosphate Buffer Saline

PGA : Poliglikolikasit

PLGA : poli(laktik-ko-glikolik asit)

PLLA : Polilaktik asit

pNPP : p-nitrofenil fosfat

PU : Poliüretan

qPCR : Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

SiO_2 : Silisyum dioksit.

TBE : Tris-borate-EDTA

TCP : Trikalsiyum fosfat

TCP : Trikalsiyum fosfat

TGF-β : Dönüştürücü büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doku mühendisliği bileşenleri. 4

Şekil 2.2. Farklı şekillerde oluşturulmuş iskeleler. İskeleler, gözenekli (A), lifli (B), hidrojeller (C), mikroküreler (D), kompozitler (F) ve biyolojik yapı iskeleleri (G) gibi farklı formlarda sınıflandırılabilir. 5

Şekil 2.3. Doku iskelesi üretim teknikleri. 11

Şekil 2.4. Sert doku mühendisliği ile ilgili iskele malzemelerinin biyolojik, mekanik ve fiziko-kimyasal faktörlerinin gösterilmesi. (39) (A) Ortam, büyüme faktörleri vb. dokuya özgü hücre kolonizasyonu ve yapay yapı iskelelerinde farklılaşma için gereklidir. (B) Malzemeler/yapı iskeleleri, hücreler, faktörler ve mineraller için bağlanma yerleri sağlamalıdır. (C) Biyomineralizasyon, benimsenen mekanik özelliklere (sertlik vb.) sahip kompozit malzemeler elde etmek için gereklidir. 14

Şekil 2.5. GALC7 fibriler yapı oluşumu gösterimi. 17

Şekil 2.6. Çeşitli 3B hücre kültürü yaklaşımlarının şematik gösterimi. 19

Şekil 3.1. Çalışma süresince kullanılan su banyosu ve ışık mikroskobu. 21

Şekil 3.2. Çalışma süresince kullanılan CO2 inkübatör (A) ve biyogüvenlik kabini (B)..... 22

Şekil 3.3. Jel dökümü deney düzeneği. 22

Şekil 3.4. GalC7 hidrojelin hazırlanması (a) GALC7 toz hali ,(b) suda çözünmüş GALC7 (c) jelleşme ortamında GALC/ (d) Jelleşmiş GALC7. 23

Şekil 3.5. Jelleşme sonrası hücre ekimi. 24

Şekil 3.6. Deney grubu ve kontrol grubu şematik gösterimi. 25

Şekil 3.7. İmmunfloresans boyama çalışmalarında kullanılan ışık mikroskobu. 26

Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan FAK100 floresan mikroskopi analiz kiti. 27

Şekil 3.9. Çalışmada kullanılan mikro santrifüj cihazı. 28

Şekil 3.10. cDNA sentezi için kullanılan Biorad T100 pcr cihazı. 29

Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan real time PCR cihazı. 30

Şekil 3.12. Jel elektroforezi hazırlık aşamaları (a) Agaroz jelin kaynatılması, (b) Agaroz jel tankı (c) Agaroz jel toz hali (d) Donmaya bırakılmış Agaroz jel. 31

Şekil 3.13. Çalışmada kullanılan elektroforez cihazı. 32

Şekil 3.14. ALP analizi plaka görüntüsü. 33

Şekil 4.1. Saos-2 hücrelerin ters optik mikroskop görüntüleri. 35

Şekil 4.2. Diş pulpa kökenli mezenkimal kök hücre ters optik mikroskop görüntüleri. 35

Şekil 4.3. GalC7 A) %3 w/v ve B) %4,5 w/v luk jellerin optik mikroskop görüntüleri. 36

Şekil 4.4. %1 (a), %3 w/v (b), %4,5 (c) GalC7 jellerin şişe içeresindeki görünümü. 37

Şekil 4.5. Saos-2 ve dental pulpa kökenli mezenkimak kök hücreleri XTT tahlil sonuçları. 37

Şekil 4.6. GalC7 jel içerisinde büyütülmüş Saos-2 hücre hattı immünofloresan boyama görüntüsü (kırmızı: aktin (TRITC-falloidin), mavi: çekirdek (DAPI)) 38

Şekil 4.7. GalC7 içerisinde büyütülmüş diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre immünofloresan boyama görüntüsü (kırmızı: aktin (TRITC-falloidin), S 39

Şekil 4.8. Diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre tüm grup elektroforez jel görüntüleri. 40

Şekil 4.9. Saos-2 hücre hattı tüm grup elektroforez jel görüntüleri. 41

Şekil 4.10. Saos-2 osteosarkoma hücre hattı için tespit edilen ALP miktarları. 42

Şekil 4.11. Diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler için tespit edilen ALP miktarları. 42

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Biyomalzeme örnekleri ve uygulama alanları. 7

Tablo 2.2. İskele üretim teknikleri avantajları ve dezavantajları. 10

1. GİRİŞ

Hücre kültürü çalışmalarının çoğu genellikle iki boyutlu (2B) yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Ancak, yeni ve geliştirilmiş üç boyutlu (3B) hücre kültürü teknikleri, ileri düzey deneyler yaparak daha geçerli bilgilere ulaşmayı mümkün kılan ikna edici kanıtlar sunmaktadır (1). Geleneksel 2B hücre kültürünün hücre temelli çalışmalarda değerli bir yöntem olduğu kanıtlanmış olsa da, hücrelerin doğal üç boyutlu ortamı olan in vivo ortamdaki neredeyse tüm hücrelerin diğer hücreler ve hücre dışı matris (ECM) ile üç boyutlu bir şekilde çevrili olması göz önüne alındığında, bu ortamın yeterince yansıtılamadığı söylenebilir. Araştırmalar ayrıca, 3B hücre kültüründe hücre davranışının in vivo hücresel tepkileri daha doğru bir şekilde yansıttığını ortaya koymaktadır (2). Üç boyutlu hücre kültürünün temel amacı, dokunun ECM yapısını taklit etmektir. ECM, hücrelere yapısal ve biyokimyasal destek sağlayan bir iskele olarak işlev gören hücresel olmayan fibriler proteinler, çeşitli yapısal makromoleküller ve yapışkan moleküllerden oluşur. Ayrıca, hücre adhezyonunu ve göçünü kontrol eden hücre bağlayıcı bölgeler oluşturur. Bu özellikler, 3B hücre kültüründe iskele içermeyen yapılar (örneğin sferoidler) veya iskele tabanlı yapılar (örneğin hidrojel veya sert polimer malzeme bazlı destekler) kullanılarak elde edilebilir (3).

Hidrojellerin çeşitli yeteneklere sahip birçok türü bulunmaktadır. Genel olarak, bu sistemlerin hepsi, önemli miktarda su tutabilen çapraz bağlı makromoleküler ağlardan oluşan malzemeler olarak tanımlanabilir. Bir hidrojel, ağırlığının %99'unu su oluşturabilir, bu da bu malzemeleri su açısından zengin biyolojik ortamlar gibi uyumlu hale getirir (4). Hidrojeller aynı zamanda, yumuşak dokulara benzer kauçuksu yapıları, ayarlanabilir özellikleri ve mükemmel biyouyumlulukları nedeniyle önemli bir biyomalzeme sınıfıdır. Özellikle, hücreleri etkili bir şekilde kapsülleyebilme yetenekleri nedeniyle, enjekte edilebilir hidrojeller, hücre kapsülleme ve doku mühendisliği uygulamaları için umut verici biyomalzemeler olarak kabul edilmektedir (5). Son zamanlarda, hücre kültürü için yeni sentetik hidrojel türleri ortaya çıkmıştır, özellikle düşük moleküler ağırlıklı supramoleküler jelleştiriciler alanında. Bu yumuşak

malzemeler, küçük moleküllerin kendi kendine birleşmesi prensibine dayanarak suyu hapsedebilen ve jel oluşturabilen fibriler yapılar sağlamıştır. Bazılarının hücre kültürü için uygun olduğu gösterilmiştir. Bu tür hidrojeller genellikle kolajen dizilerinden esinlenen peptitlere dayanmaktadır, ancak diğer düşük ağırlıklı supramoleküler jelleştirici türleri de umut vericidir. Karbonhidrat bazlı düşük moleküler ağırlıklı jelleştiricilerle yapılan çalışmalar, enjekte edilebilir bir sakkarit-nükleosit moleküler hidrojelin kök hücre büyümesini başarıyla desteklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, bu tür hidrojellerin doku iskelesi olarak potansiyelleri henüz tam olarak keşfedilmemiştir (6).

Uygun biyolojik doku iskelesi alternatiflerini bulmak, sert doku mühendisliğinin başlıca zorluklarından biridir (7). Dental ve ortopedik cerrahide kemik kusurlarını doldurmak ve implantların kemikle entegrasyonunu iyileştirmek amacıyla çeşitli seramik malzemeler kullanılmıştır. Ancak, bu malzemelerin kırılganlıkları, şekillendirme güçlüğü ve oluşturulan yeni keminin gereken mekanik dayanıma sahip olamaması gibi nedenlerle, doku mühendisliği alanında klinik uygulamaları sınırlı kalmıştır. Polistiren, poli-l-laktik asit (PLLA), poliglikolik asit (PGA) ve poli-dl-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) gibi birçok sentetik polimer, doku iskelesi üretimi çalışmalarında kullanılmıştır. Bu malzemeler, özelleştirilebilir bir mimariyle üretilebildikleri ve polimerin kendisi veya bileşimi değiştirilerek kontrol edilebilen bozunum özelliklerine sahip oldukları için büyük başarı göstermiştir. Ancak, düşük biyoaktivite ve reddedilme riski gibi dezavantajları vardır. Ayrıca, hidroliz yoluyla bozunurken karbondioksit üretimiyle pH düşüşüne neden olarak hücre ve doku nekrozu potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle, bu tür sentetik polimerlerin kullanımıyla ilgili endişeler devam etmektedir. Doku mühendisliği iskelesi üretiminde kolajen, çeşitli proteoglikanlar, aljinat ve kitosan gibi biyolojik materyaller de kullanılmıştır. Doğal polimerler, sentetik polimer bazlı iskelelerin aksine biyolojik olarak aktiftir ve hücre tutunması ve büyümesini destekler. Ayrıca biyolojik olarak parçalanabilirler, böylece konak hücrelerin doku iskelesini doğal hücre dışı matris ile değiştirmelerine olanak sağlarlar. Ancak, homojen ve tekrarlanabilir yapıya sahip biyolojik malzemelerden iskeleler üretmek zorluklarla doludur. Ayrıca, biyolojik malzemelerin zayıf mekanik özellikleri kullanımlarını sınırlar (8).

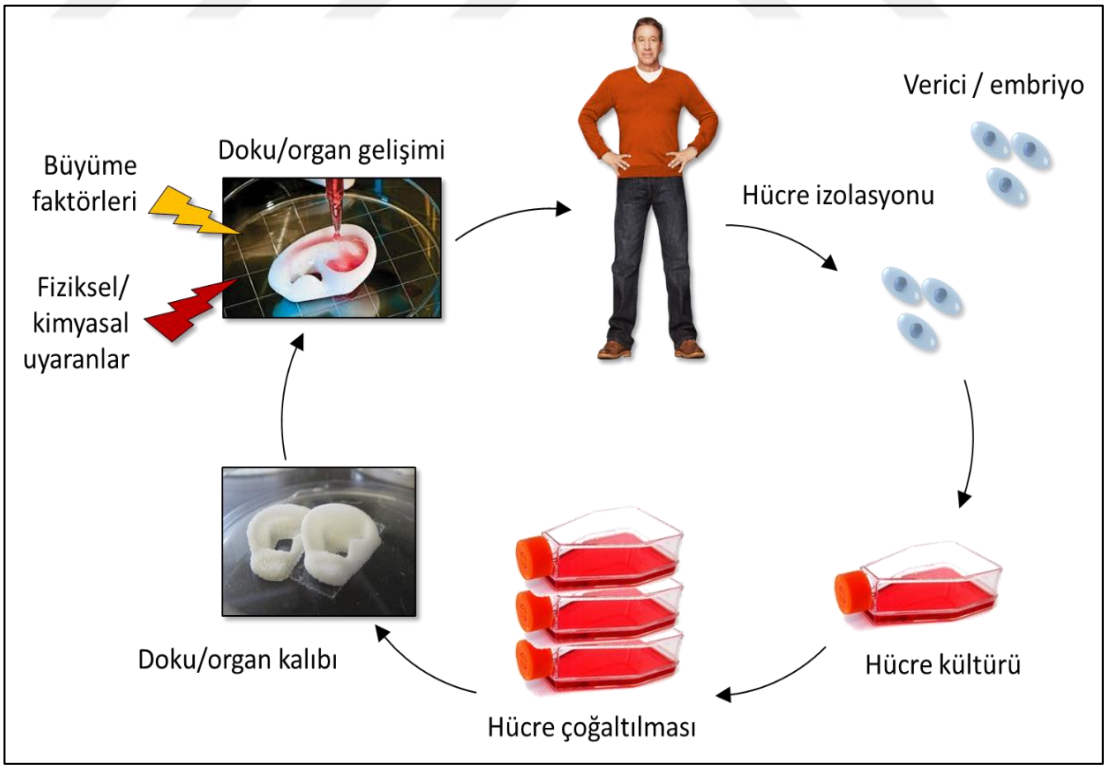
Yakın zamanda literatüre bildirilmiş olan N-heptil-D-galaktonamid (GalC7), düşük moleküler ağırlıklı bir karbonhidrat türevidir ve biyouyumlu supramoleküler hidrojeller oluşturur. GalC7, kendi kendine birleşen ve geniş fibrillerden oluşan supramoleküler hidrojel yapısı oluşturma yeteneğine sahiptir. Düşük moleküler ağırlığı, kolay çözünebilirliği, ayarlanabilir gözenek büyüklüğü ve yüksek mekanik dayanımıyla sert doku mühendisliği uygulamaları için umut vaat eden bir malzemedir (6).

Bu tez çalışmasının amacı, GalC7 tabanlı hidrojellerin sert doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanım potansiyellerini incelemektir. Eğer olumlu sonuçlar elde edilirse, ucuz, kolay üretilebilen ve biyouyumlu bir doku iskelesi malzemesi adayı olarak GalC7'yi ortaya koymak ve bu malzemenin sert doku mühendisliği alanında hayvan deneyleri ve potansiyel klinik çalışmalar için ön veriler sağlamak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği

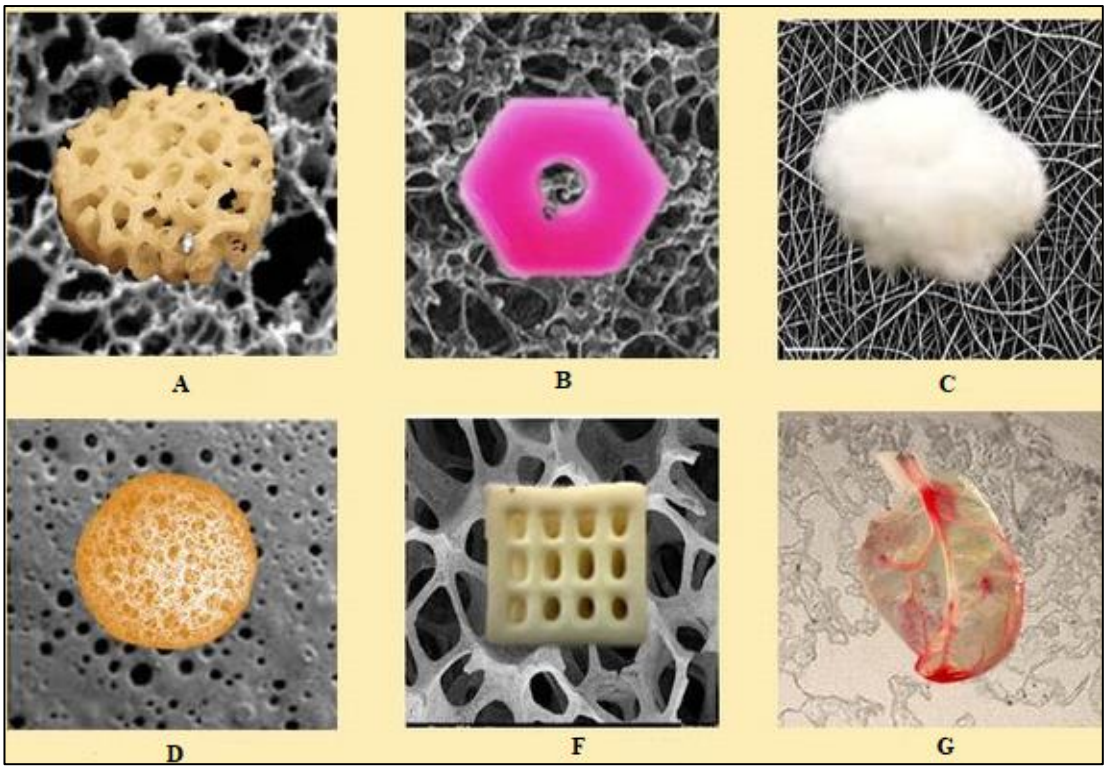
Doku mühendisliği, hücre biyolojisi teknolojilerini, mühendislik malzemelerini ve uygun biyokimyasal faktörleri birleştirerek yapay organlar ve dokular oluşturmayı veya hasarlı dokuları yeniden oluşturmayı amaçlayan disiplinler arası bir alandır (9) (Şekil 2.1). Doku mühendisliğinin üç temel bileşeni, yapı iskeleleri, hücreler ve büyüme faktörleri olarak gruplandırılabilir (11). İdeal yapı iskeleleri, hücrelerin bağlanmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre dışı bir matris oluşturmasını sağlayacak bir iskele ve başlangıç desteği sunar. Doku mühendisliği uygulamaları organ/doku, doku iskelesi üzerinde vücut dışında büyütülüp vücuda implante edilerek, hücre ekilmiş doku iskelesi vücuda implante edilerek veya büyüme faktörleri eklenmiş doku iskelesi hücre ekilmeden vücuda implante edilerek gerçekleştirilebilir. Doku mühendisliği amaçlarına yönelik olarak, hücrelerin 3B iskeleler üzerindeki davranışını ve tepkilerini anlamak, en uygun biyoaktif doku iskelelerinin tasarımı açısından elzemdir (10).



Şekil 2.1. Doku mühendisliği bileşenleri (12).

2.2. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri

Doku iskeleleri, hücrenin hayatta kalması, göçü, çoğalması ve farklılaşması için gerekli olan ortamı sağlamalı ve organizmadan gelen doğal kimyasal ve biyofiziksel ipuçlarını taklit edebilmelidir (13).



Şekil 2.2. Farklı şekillerde oluşturulmuş iskeleler. İskeleler, gözenekli (A), lifli (B), hidrojeller (C), mikroküreler (D), kompozitler (F) ve biyolojik yapı iskeleleri (G) gibi farklı formlarda sınıflandırılabilir (15).

Üç boyutlu doku iskelesinin gözenekliliği, dokunun matris içine büyümesini etkileyen temel faktörlerden biridir. Ayrıca, iskele yüzeyi de önemli bir faktördür çünkü hücrelerin ilk bağlanması burada başlar ve sonraki doku oluşumu, hücre-malzeme etkileşimine bağlıdır. Bu nedenle, iskele yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar, hücre yapışmasını artırabilir veya azaltabilir. Doku mühendisliğinde üretilen iskelelerin, dokuyla uyumlu özelliklere sahip olması ve herhangi bir toksik veya alerjik reaksiyona neden olmaması önemlidir. İdeal bir yapı iskelesinin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Hücrelerin göç edebilmesi, çoğalabilmesi ve iskele içinde tutunabilmesi için bağlantılı gözeneklerden oluşan kapsamlı bir ağ;

- İskele içinde besinlerin ve atık ürünlerin kolayca taşınabileceği kanallar;
- Hücrelerin yüksek afiniteli ve spesifik olarak bağlanmasına ve çoğalmasına izin veren yüzey özellikleri;
- Doğru şekil,
- Uygun mekanik dayanım ve
- Biyo-bozunum profili (14).

Yüzey alanı/hacim oranı, iskele-hücre etkileşimini etkileyen başka bir önemli faktördür. Daha büyük bir yüzey alanı/hacim oranı, daha fazla su alımı ve hücrelerle daha fazla etkileşim anlamına gelir. Bu nedenle, iskeleye tutunan hücre miktarı artar. Aynı şekilde, yüksek gözeneklilik, hücre büyümesini artıran metabolitlerin daha kolay taşınmasını sağlar. Biyo-bozunur malzemeler için, gözenekli iskelelerin bozunumu, gözeneksiz yapılara kıyasla daha kısa bir sürede gerçekleşir (16).

Doku mühendisliğinde iskele malzemesinin seçimi, doku iskeleleri için belirtilen tüm temel kriterlere bağımlıdır (8).

2.3. Doku Mühendisliğinde Kullanılan İskele Malzemeleri

Tıbbi terminolojide biyomalzeme, özellikle tıbbi bir cihazın veya implantın parçası olarak canlı doku veya vücut sıvılarıyla etkileşime girmesi amaçlanan doğal veya sentetik herhangi bir malzemeyi ifade eder. Ayrıca biyomalzemelerin herhangi bir olumsuz bağışıklık reddi reaksiyonuna yol açmamaları gerekmektedir (17). Dolayısıyla doku iskelesi olarak kullanılan malzemelerin tamamı doğal olarak bir biyomalzeme tanımı kapsamına girmektedir.

Doku iskelelerinde kullanılan biyomalzemelerin tasarımı ve seçimi, geliştirilen dokuların başarısı açısından kritik öneme sahiptir. İdeal bir biyomalzeme, biyouyumlu olmalı, hücresel etkileşimi ve doku gelişimini desteklemeli ve uygun mekanik ve fiziksel özelliklere sahip olmalıdır (18). İskeleler, çeşitli doğal ve sentetik biyomalzemelerden üretilir. İskele malzemesinin biyouyumluluğu, kullanılan malzemeye bağlıdır. Doğal biyomalzemeler bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilir ve protein, polisakkarit veya seramik tabanlı olabilir (19). Sentetik biyomalzemeler ise polimerler, seramikler, kompozitler ve

metaller gibi farklı malzemelerden üretilebilirler. İnsan vücudunda kullanılan biyomalzemelere örnekler ve uygulama alanları Tablo 2.1'de gösterilmiştir (21).

Tablo 2.1. Biyomalzeme örnekleri ve uygulama alanları.

Malzemeler	**Doğal**	**Sentetik**	**Uygulama Alanları**
Seramikler	Kalsiyum fosfat Kalsiyum karbonat Kalsiyum sülfat	Kalsiyum alüminat Alümina Zinkonya	Ortopedik / dental implantlar ve protezler, Kemik greftleri vs.
Polimerler	Kolajen Kitosan İpek Jelatin Fibroin	PMMA, PLGA, PCL, PLLA Poliamidler, Polietilen, Poliüretanlar, Silikon	İmplantlar, Doku ikameleri, Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri, Biyosensörler, Dikiş malzemeleri, Oküler cihazlar, vs.
Metaller		Titanyum alaşımları, Soy metaller ve alaşımları, Kobalt alaşımları, Paslanmaz çelik, vs.	Sert doku replasmanları, Kardiyak ve kardiyovasküler stentler, vs.
Kompozitler	protein-protein, protein-seramik, protein-polisakkarit, polisakkarit-seramik, metal-seramik		Kemik kırığı onarımı, Total eklem değişimi (kalça, diz vb.), Tendon ve ligaman gibi bağ dokularının onarımı, Diş dolgusu, vs.

2.3.1. Biyoseramikler

Seramik malzemeler, biyomedikal mühendisliğindeki uygulamalar için önemli biyomalzeme kaynaklarıdır. Canlı dokularla temas etmesi amaçlanan seramiklere de biyoseramik denir. Özellikle ortopedi ve diş hekimliği alanlarında belirli klinik uygulamalar için biyoseramikler kilit bir rol oynamaktadır (22).

İdeal 3B biyoseramik doku iskelesi özelliklerini şu şekilde sıralanabilir:

- Düzenli gözenekli yapı ve kontrol edilebilir, gözenek boyutu, boyut dağılımı, yönlendirme, birbirine bağlanabilirlik vb.
- Çeşitli ihtiyaçlara cevap verebilmek için hassas bir şekilde kontrol edilen yeterli mekanik dayanım.
- Biyouyumluluk

- Biyoçözünürlük
- Biyoaktivite.

Bu özellikler iskeleye besinlerin taşınması ve hücrelerin yapı iskelelerine göçü için fayda sağlar. İskelelerin toksik olmayan ürünlere indirgenmesini ve minimum inflamatuar yanıtları indüklemesine yardımcı olur. Malzemeler ve biyolojik dokular arasındaki arayüzde özel biyolojik ve kimyasal reaksiyonları indükleyerek, malzemeler ve biyolojik dokular arasında kimyasal bağların oluşumuna yol açar (23).

Seramik iskeleler temel olarak üç alt gruba ayrılabilir: (a) Biyoinert: Alümina, Zirkonya (b) Biyoaktif: Sinterlenmiş hidroksiapatit (HA), Biyocam (kalsiyum fosfosilikat) ve (c) Düşük sıcaklıkta biyolojik olarak emilebilir-sinterlenmiş hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) (24).

2.3.2. Biyobozunur Polimerler

Biyobozunur polimerler, sentetik polimerler (PU ve PLGA) ve doğal polimerler (jelatin ve kolajen) olarak ikiye ayrılabilir. Sentetik ve doğal polimerlerin arasındaki fark, doğal polimerlerin biyoaktivitelerle doğmasıdır. Doğal polimerlerin aksine, sentetik polimerler genellikle inerttir. Sonuç olarak sentetik polimerler, immünojenik tepkiler ve mekanik dayanımlar açısından doğal polimerlerden üstündür (25).

Biyobozunur polimerlerin ana avantajı, bozunum ürünlerinin toksik olmaması veya minimum yan etkiyle doğal metabolik yollarla vücuttan tamamen atılmasıdır. Bu bozunum ürünleri, bir polimerin biyouyumluluğunu ifade eder. Çünkü bu malzemelerin bozunum ürünleri karbondioksit ve su şeklinde vücuttan atılabilir. Bununla birlikte, bu polimerler, mikro çevrelerindeki hücrelerin bütünlüğünü etkileyerek yerel pH'ı azaltabilir ve böylece doku iskelelerindeki uygulamalarını da sınırlayabilir. Biyobozunur polimerler, elektriksel iletkenlik, optik özellikler, kimyasal reaktivite ve mekanik dayanıklılık gibi spesifik fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip yeni tıbbi cihazların bir parçası olma potansiyeline sahiptir. Ek olarak, bu polimerik malzemeler, kemikleri veya kan damarlarını ve cerrahi sütürleri değiştirmek için ortopedik araçlar olarak kullanılmıştır. Biyobozunur polimerik malzemeler, üzerinde nano ölçekli yapıların geliştirilebileceği bir platform sağlar (26).

2.3.3. Kompozitler

Kompozitler, atomikten daha büyük bir ölçekte iki veya daha fazla farklı bileşen içeren malzemelerdir. Biyokompozit terimi, en az biri doğal bir malzeme olmak üzere iki veya daha fazla farklı bileşen içeren malzemelerdir. Burada bileşenler kimliklerini kaybetmezler, yani uyum içinde hareket etmelerine rağmen, çözülmezler veya tamamen birbirleriyle kaynaşmazlar. Sentetik kompozitler, esasen iki kurucu fazın, lif veya parçacık gibi bir takviye fazının ve matris adı verilen sürekli bir fazın bir araya gelmesiyle oluşur. Biyokompozitlerin geliştirilmesindeki en önemli sebep, kompozitlerdeki takviye fazlarının tipini ve dağılımını değiştirerek çok çeşitli mekanik ve biyolojik özellikler elde etmenin ve dolayısıyla biyomedikal araçların yapısını ve performansını optimize etmenin mümkün olmasıdır.

Kompozit malzemeler, metal alaşımları ve seramiklere göre, korozyon olmaması ve Nikel veya Krom gibi alerjen metal iyonlarının salınmaması, yüksek kırılma tokluğu ve yorulma kırılmasına karşı daha yüksek direnç gibi birçok başka önemli avantaj sunar. Ayrıca polimer kompozit malzemeler, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi modern teşhis yöntemleriyle oldukça uyumludur (27).

2.3.4. Metalik Biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler, biyolojik dokulara iç destek sağlamak için tasarlanmış malzemelerdir ve büyük ölçüde eklem replasmanlarında, diş implantlarında, ortopedik fiksasyonlarda ve stentlerde kullanılmaktadır (28). Metalik biyomalzemeler, mükemmel mekanik özellikleri ve dayanıklılıkları nedeniyle genellikle yapay kalça eklemleri gibi sert doku değiştirme implantlarında kullanılır. Paslanmaz çelikler, Co alaşımları ve Ti ve alaşımları metalik biyomalzemelerin imalatında kullanılır. Metalik biyomateryaller ile canlı doku arasındaki arayüz özelliklerinin, özellikle uzun süreli implantasyon için tatmin edici olmadığı durumlar vardır. Bu gibi durumlarda metalleri biyoaktif hale getirmek için biyoaktif seramik yüzey modifikasyonu yapılır. Ayrıca, biyo işlevselleştirme sürecini geliştirmek için polimer yüzey modifikasyonu gereklidir, yani metallerin, seramiklerin ve polimerlerin uyumlaştırılmasıyla biyomalzemelerin yaratılması arzu edilir. Bu tür bir biyomalzeme oluşturulduğunda,

metalik biyomalzemeler hem sert doku rekonstrüksiyonu için hem de yumuşak doku rekonstrüksiyonu ve biyosensörler ide içinde kullanışlı bir malzeme olacaktır (29).

2.3.5. Yapı İskelesi Üretim Teknikleri

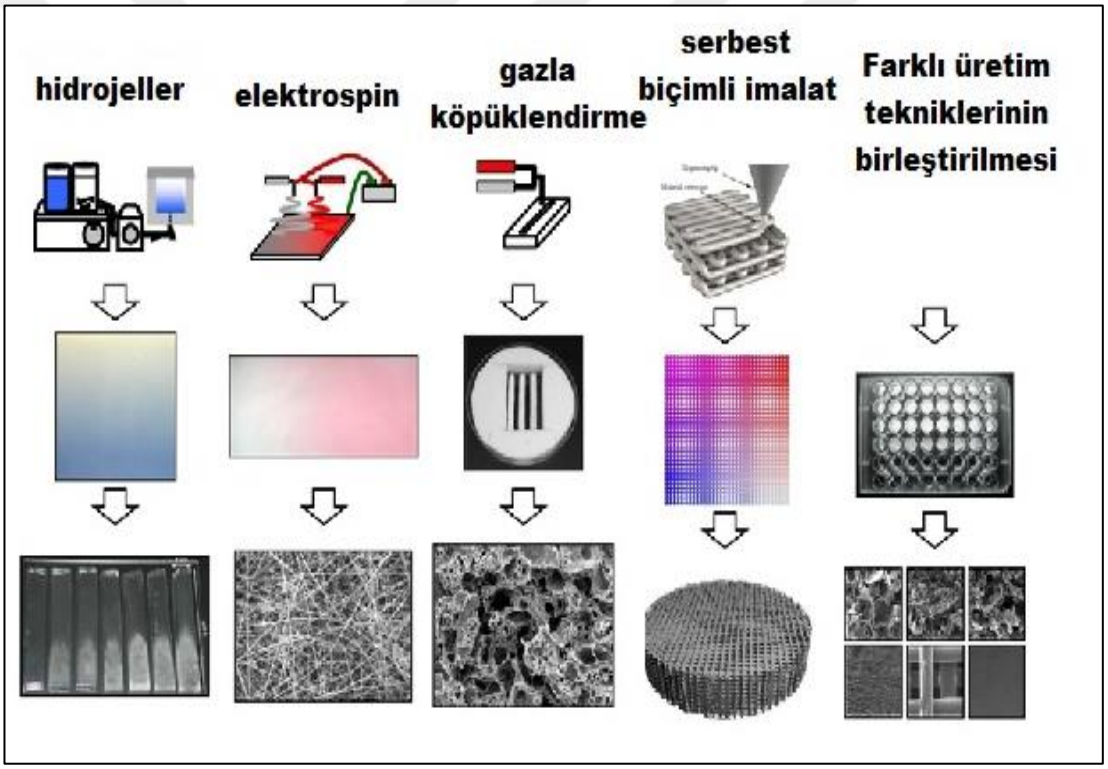
Vücutta, hücreler ve dokular üç boyutlu mimaride bulunurlar. Bu fonksiyonel doku ve organları tasarlamak, hücre dağılımını kolaylaştırmak ve büyümelerini üç boyutlu olacak şekilde yönlendirmek için yapı iskelelerinin farklı metodolojilerle üretilmesi gerekir. Hızlı besin difüzyonu ve hücre bağlanması için uygun düzenli gözenek boyutu ve bağlantısı, gözeneklilik ve gözenek karakterizasyonlarını kontrol ederek mevcut iskele tasarımını iyileştirmek için farklı teknikler geliştirilmiştir. Tablo 2.2, potansiyel doku mühendisliği uygulamaları için en sık kullanılan yapı iskelesi üretim teknolojilerini, her bir tekniğin avantajlarını ve dezavantajlarını göstermektedir (30).

Tablo 2.2. İskele üretim teknikleri avantajları ve dezavantajları.

Üretim Tekniği	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma	Gözeneklilik, gözenek boyutu ve kristallik kontrolü	Sınırlı mekanik özellik, çözücü ve porojen malzeme artıkları
Porojen uzaklaştırma	Gözeneklilik ve gözenek geometrisi kontrolü	Yetersiz gözenek boyutu ve gözenek bağlantısı
Gazla köpüklendirme	Sert organik çözücü içermeme Gözeneklilik ve gözenek boyutu kontrolü	Sınırlı mekanik özellik ve yetersiz gözenek bağlantısı
Kendiliğinden kurulma	Gözeneklilik, gözenek boyutu ve lif çapı kontrolü	Maliyet Karmaşık tasarım parametreleri
Elektroeğirme	Gözeneklilik, gözenek boyutu ve lif çapı kontrolü	Lif kalınlığı ile gözenek boyutunun azalması Sınırlı mekanik özellik
Faz ayırımı	Aktivitesi olmayan molekülde azalma yok	İskele morfolojisini kontrol edememe
Ani prototip oluşturma	Gözeneklilik, geometri kontrolü Destek malzemesi ihtiyacı olmaması	Sınırlı polimer malzeme Pahalı ekipman
Fiber ağ	Hücre tutunumu için geniş yüzey alanı Hızlı besin difüzyonu	Yapısal kararlılık yokluğu

Tablo 2.2. (devam) İskele üretim teknikleri avantajları ve dezavantajları.

Üretim Tekniği	Avantaj	Dezavantaj
Fiber bağlama	Gözeneklilik ve yüzey hacim oranı büyüklüğü	Zayıf mekanik özellik Sınırlı malzemede uygulanabilme
Eriyik halde döküm	Gözeneklilik ve gözenek boyutu kontrolü	Amorf polimerde yüksek sıcaklık gerekliliği
Membran Laminasyonu	3B matris sağlama	Mekanik mukavemet eksikliği Yetersiz gözenek bağlantısı
Dondurarak kurutma	Yüksek sıcaklığa gerek olmaması	Uzun işlem süresi Küçük gözenek boyutu



Şekil 2.3. Doku iskelesi üretim teknikleri (31).

2.4. Büyüme Faktörleri

Doku mühendisliğinin temel gereksinimi, belirli bir dokuyu kendi özel konfigürasyonunda ve işlevinde yeniden oluşturmak için en uygun hücre tiplerini ve iskele özelliklerini seçmekken, hücrelerin ve dokunun büyüdüğü hücresel mikro ortam da aynı derecede önemlidir (32). Hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında önemli bir

rol oynayan bir dizi protein bulunmaktadır. Bu proteinler, hücrelerin kendileri tarafından (otokrin) veya çevre hücrelerle iletişim sonucunda (parakrin) vücutta endojen olarak salgılanır. Bu proteinlere hücre büyüme faktörü veya basitçe büyüme faktörü denir. Doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan büyüme faktörleri arasında kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler epitelyal büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) yer alır.

Büyüme faktörlerinin doku mühendisliğine uygulanmasında en önemli nokta, büyüme faktörlerinin etkilerinin nasıl iletileceğidir. Büyüme faktörü iletimi için üç yöntem denenmiştir. İlk yöntem, istenen büyüme faktörünü kodlayan geni içeren DNA plazmitlerinin kullanılmasıdır. Bu plazmidler vücuda enjekte edildiğinde, büyüme faktörünü biyosentezleyecek ve plazmit aktif olduğu sürece salınımını sürdürecektir. İkinci yöntem, genetik teknolojiden faydalanır. Büyüme faktörünü kodlayan bir gen, bir vektör aracılığıyla belirli bir hücre tipine aktarılır ve işlenen hücreler, hedef dokunun oluşturulacağı vücuda nakledilir. Aktarılan genin kodladığı büyüme faktörü, gen aktif olduğu sürece vücutta salınır. Üçüncü yöntemde ise, büyüme faktörü proteini doğrudan bir taşıyıcı aracılığıyla uygulanır.

Doku iskelesi yapısına uygun büyüme faktörlerinin eklenmesinin, doku rejenerasyonunu artırıcı etkiler göstermesi beklenmektedir. Ayrıca doku rejenerasyonunu desteklemek için tek bir büyüme faktörü yerine çoklu büyüme faktörlerinin kullanılması daha iyidir (33).

2.5. Hücreler

Doku mühendisliğinde başarıya ulaşmak için önemli kriterlerden biri de rejenerasyon yeteneği yüksek hücrelerdir. Her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahip çeşitli hücre kaynakları bulunmaktadır. Hücre elde etmek için en iyi yöntemlerden biri, otolog hücrelerin doğrudan hastadan alınması ve ardından *in vitro* ortamda büyütülmesidir. Bu seçenekte transplantasyon sonrası her ne kadar immün yanıta sebep olmasa da nispeten az sayıda hücre olması, donör bölgesi morbiditesine neden olabilmesi ya da hastalıklı durumlarda veya yaşlı hastalarda otolog hücrelerin transplantasyon için uygun olmaması gibi sınırlamaları vardır. Diğer bir seçenek kişinin kendisi dışında başka bir insandan ya da hayvandan alınan hücrelerin kullanılmasıdır. Bu noktada da virüsler gibi bulaşıcı ajanların olması ve

etik, ahlaki ve sosyal sonuçlar ile mücadele bu yaklaşıma duyulan ilgiyi azaltmıştır. Doku mühendisliği uygulamalarında umut verici bir diğer bir seçenek ise kök ve/veya progenitör hücrelerin kullanılmasıdır. Vücudun tamamında olmasa da pek çok dokusunda bulunan kök hücreler, kendilerini yenilemekle kalmayıp birçok fenotipe de farklılaşabilmektedir (34).

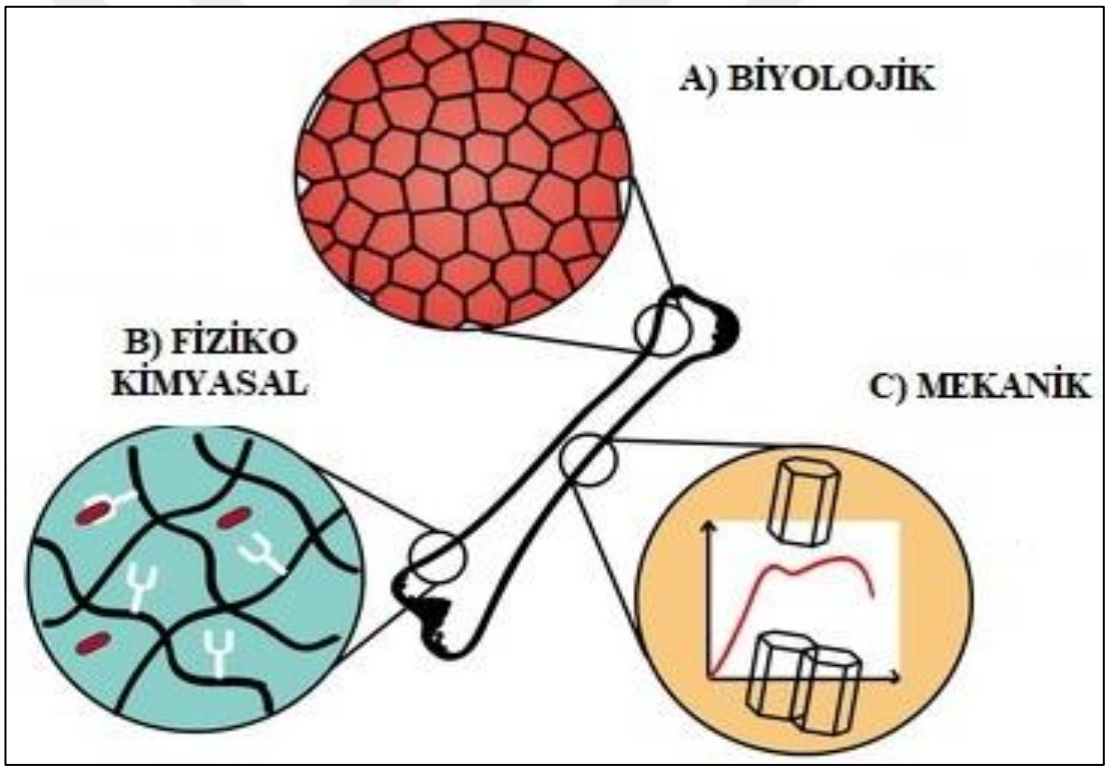
Hücre biyolojisi ve biyoteknolojideki büyük ilerlemelerin bir sonucu olarak her dokunun yetişkin kök hücresi, doku mühendisliği araştırmacıları için hazır hale gelirse, doku mühendisliğinin klinik uygulaması önemli ölçüde hızlanacaktır. Ancak çoğu durumda toplanan kök hücre sayısı klinik uygulamalar için yeterli olmamaktadır. Hücrelerin çoğaltılması gerekmektedir ve kök hücreler, iki boyutlu bir hücre kültürü tabağında yetiştirildiğinde, hücre çoğalması makul bir oranda ilerler ancak farklılaşarak bozulma da buna eşlik eder. Aksine, kök hücreler üç boyutlu substratlar üzerinde kültürlendiğinde farklılaşma hemen gerçekleşmez, ancak hücre çoğalma hızı çok düşük seviyelere düşürülür. En arzu edilen yaklaşım, kök hücreleri farklılaşmamış orijinal durumunu koruyarak yüksek oranda çoğaltabilmektir (33).

2.6. Sert Doku Mühendisliği

İnsan vücudunda sert dokunun gelişimi, biyomineralizasyon olarak adlandırılan ve iskeletin destek yapılarını ve tendon ve kıkırdak gibi komşu dokuları veya diş gibi fonksiyonel dokuları ortaya çıkaran hücresel metabolizma yoluyla mineral oluşum sürecidir (35).

Sert dokular, vücudun hareket kabiliyetini destekleyen ana unsurlardandır. İnsan vücudu yaşlandıkça, dokularda veya işlevlerinde aksiliklere veya hasarlara yol açan birtakım değişiklikler yaşar. Vücut dokularının kendilerini onarma yetenekleri sınırlıdır, bu nedenle hasarla ilgili sorunlar cerrahi müdahalelerle çözülürler. Cerrahi tedavi, doku ikamesini içerir, ancak doku donörü bulma ve donör bölgesi morbiditesi gibi sınırlamalara sahiptir (36). Bu nokta da sert doku mühendisliği doku kusurları için alternatif olabilecek tedavi seçeneklerine odaklanmıştır. Bu mühendislik araştırmalarında başlıca strateji, implant sonrası fonksiyonel ve estetik bir doku oluşumunu sağlamak için doğal dokuyu taklit eden 3 boyutlu yapılar üretmektir (37).

Bir doku mühendisliği süreci, canlı hücreleri bağlanmaları, çoğalmaları ve farklılaşmaları için destekleyecek ve böylece hem *in vitro* hem de in-vivo olarak doku rejenerasyonuna yardımcı olabilecek biyolojik olarak uyumlu bir iskelenin üretilmesiyle başlar. İdeal olarak bir kemik doku iskelesi konak kemiğin iskeleye yapışmasını ve büyümesini teşvik edebilmeli, fizyolojik olarak uygun bir hızda bozunabilir olmalıdır. Doku rejenerasyonu için uygun mekanik güvenilirliği sağlamalıdır. Hücrelerin nüfuz etmesine izin vermek ve yeni kemik oluşumunun yanı sıra damarlanmayı teşvik etmek için 300 ila 500 μm arasında gözenek çapları ile oldukça gözenekli (> %90) ve birbirine bağlı olmalıdır. Besin maddelerini iskele içine iletebilmeli ve istenmeyen metabolitleri iskele dışına taşıyabilmelidir. İstenilen özelliklerde düzenli ya da düzensiz şekillerde ve kabul edilebilir bir maaliyetle üretilebilir olmalıdır (38).



Şekil 2.4. Sert doku mühendisliği ile ilgili iskele malzemelerinin biyolojik, mekanik ve fiziko-kimyasal faktörlerinin gösterilmesi. (39) (A) Ortam, büyüme faktörleri vb. dokuya özgü hücre kolonizasyonu ve yapay yapı iskelelerinde farklılaşma için gereklidir. (B) Malzemeler/yapı iskeleleri, hücreler, faktörler ve mineraller için bağlanma yerleri sağlamalıdır. (C) Biyomineralizasyon, benimsenen mekanik özelliklere (sertlik vb.) sahip kompozit malzemeler elde etmek için gereklidir.

Kemiğin hücre dışı matrisi, temel olarak bir kolajen matrisini ve suya gömülü hidroksiapatit içeren bir bileşimdir. Kemik dokusu mühendisliğinde uygulanan iskele biyomalzemeleri de temel olarak doğal veya sentetik polimerlerden, seramiklerden veya doğal kemiğin bileşimini ve yapısını taklit etmeyi amaçlayan kompozitlerinden yapılır (40). Doğal polimerlerin kemik doku mühendisliği için yapı iskelesi olarak kullanılmasıyla ilgili çeşitli endişeler vardır. Bunlar, osteoblastlar için yeterli yapısal destek ve koruma sağlamaya yönelik zayıf mekanik güçleri ve hayvan ve kadavra kaynaklarından gelen doğal malzemelerle ilişkili patojen bulaşma ve immün rejeksiyon risklerini içerir (41). Kitin ve kolajen kemik doku mühendisliği çalışmalarında en yaygın kullanılan biyopolimerlerdir. Kitin bazlı iskelelerin fizyolojik inertliği ve düşük toksik etkileri, çok sayıda *in vitro* ve in vivo çalışma ile gösterilmiştir ancak, kitosanın yapı iskelesi olarak kullanımı, eksik biyoaktivitelere ve mekanik özelliklere sahip olması nedeniyle kısıtlıdır (42). Biyoaktif camın çeşitli formları kemik replasman kompozitleri için umut verici adaylar olarak gösterilmiştir; örneğin, jelatin ve SiO2 ve CaO'nun amorf bir karışımının oluşturması, kök hücrelerin dahili kültürlenmesi için uygun olan 100-200 μm aralığında gözenek boyutuna sahip üç boyutlu yapılarla sonuçlanmıştır. Nanotüpler, sert doku mühendisliği için kompozitlerde uygulama için düşünülen başka bir malzeme sınıfıdır. Titanyum içeren kompozit malzemeler, biyouyumlulukları, seramiklere göre üstün elastik özellikleri ve yaygın olarak kullanılan diğer metallere kıyasla nispeten yüksek toklukları kanıtlanmıştır ancak biyolojik olarak parçalanamayan doğalarından ve son derece düşük biyoaktivite seviyeleri kullanımı kısıtlamaktadır. Polimer/ kalsiyum fosfat kompozitleri, özellikle kemiğin yumuşak/sert kompozit yapısını taklit etme yetenekleri açısından çok çeşitli benzersiz özellikleri nedeniyle kemik mühendislerinin özel bir ilgisini çeken bir yapay kompozit malzeme sınıfı sunmaktadır (43).

Sert doku mühendisliğinde hücreler, hem organik, proteinler ve kolajenik lifler hem de inorganik, hidroksiapatit kristalleri gibi kemik matrisi bileşenlerine benzeyen bir hücre dışı matris üretme yeteneğini göstermelidir. Sert doku mineralizasyonu normal büyüme ve gelişmede dramatik bir öneme sahiptir. Son zamanlarda, sert doku oluşumundaki kök hücre rolü, kemik oluşumunu indükleyebilen ve hidroksiapatit kristal büyümesini kontrol edebilen stabil farklılaşmış hücrelerin büyüleyici bir kaynağı olarak araştırmacıların dikkatini önemli ölçüde çekmiştir (44). Mezenkimal

kök hücrelerin (MSC) farklılaşması üzerindeki kontrol, onları kemik dokusu mühendisliği için çekici hücre kaynakları haline getiririr. Yetişkin kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC'ler), embriyonik kök hücreler (ESC'ler) ve göbek kordonu kanı mezenkimal kök hücreleri (CB-MSC'ler) kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için adaylar arasındadır. Özellikle, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (BM-MSC'ler), yüksek osteojenik kapasiteleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkmaktadırlar (45).

Kemik dokusu mühendisliği çalışmalarında kullanılan en bilinen hücre dizilerinden biri, osteosarkom hücre dizisi SaOs-2 hücreleridir. İyi karakterize edilmiş bir osteosarkom insan hücre dizisi olan SaOS-2 hücreleri, çoğunlukla osteoblastik hücrelerin tüm farklılaşma sekansını sergilemeleri nedeniyle osteoblastik hücreler için bir model olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (46).

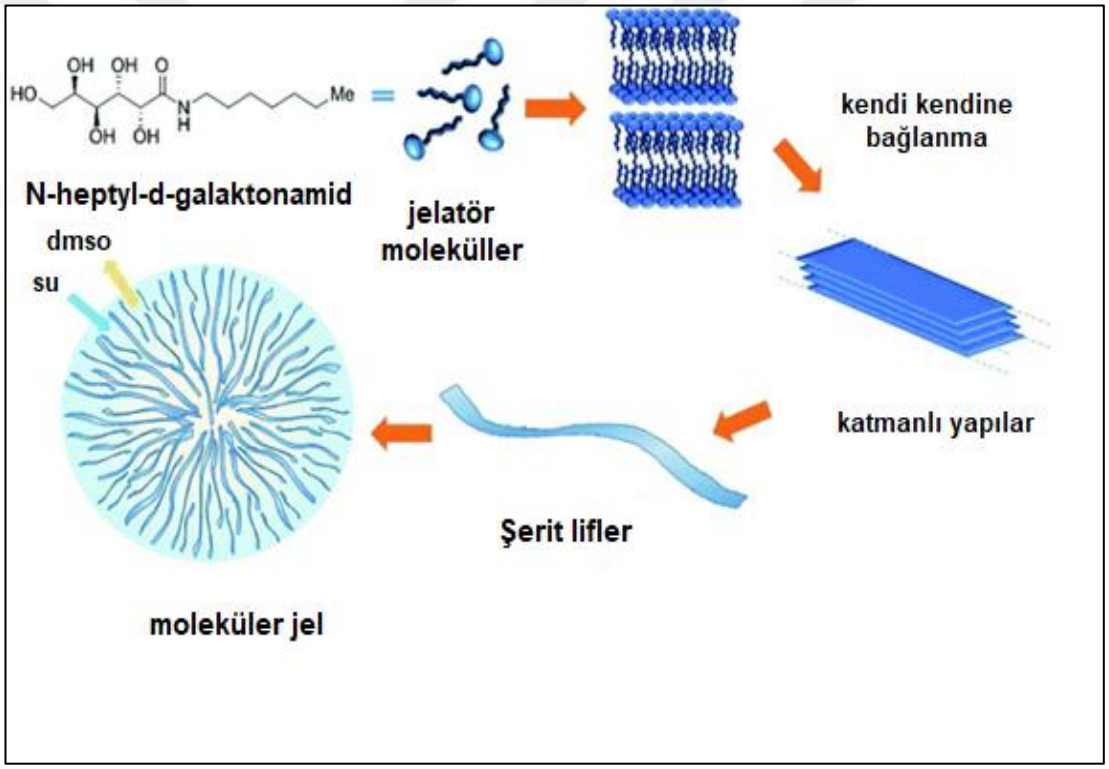
2.7. N-Heptil-D-Galaktonamid (GalC7)

N-Heptil-D-galaktonamid (GalC7), galaktoz şekerinden türetilen ve azot atomuna bağlı bir heptil grubu içeren bir kimyasal bileşiktir. Biyolojik uyumluluğu ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle biyoaktif hidrojel oluşturma potansiyeline sahiptir. Düşük moleküler ağırlıklı hidrojeller, hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmaları için görece yeni alternatif malzemelerdir ve bu alanda yenilikçi yaklaşımların önünü açmaktadır. Bu yumuşak malzemeler, polimerlere değil, küçük moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesine dayanır. Kendinden bir araya gelme durumu, suyu hapseden ve jel oluşumuyla sonuçlanan fibriler yapılar sağlamaktadır (Şekil 2.5).

Kendinden bir araya gelme düşük enerji etkileşimlerinden kaynaklanır. Bu sebeple polimerlerden farklı olarak, çok çeşitli fibriler organizasyonlara yol açar. Kararlılık, mekanik özellikler, salınan moleküllerin miktarı ve boşluklar polimerlerinkinden farklıdır. N-Heptil-D-Galaktonamid molekülü polar uç kısıma ve oldukça kısa bir alkil zincirine rağmen suda çok kolay çözülür (47).

GalC7 hidrojel ile yapılan bir çalışmada nöronal hücrelerin üç boyutlu olarak jel içinde yedi gün boyunca kültüre edilebildiği ve hücre büyümesi için uygun bir iskele olduğu kanıtlanmıştır. Hücrelerin iskele ile etkileşiminin çok iyi olduğu ve büyüme esnasında jel içerisinde penetre oldukları da vurgulanmıştır. Jelleşme sonrası oluşan

ağ organizasyonunun hücre dışı matris mimarisini taklit edebildiğini gösterilmiştir. Bahsedilen jel ile yapılan doku iskelesinin hem glial hücrelere hem de nöronal hücrelere farklılaşma için uygun olduğunu ve bu hidrojelin nöral doku rejenerasyonunu destekleme potansiyelini göstererek, bir iç içe geçmiş nöronal ağın gelişmesine de izin verdiği gösterilmiştir (6). Fare embriyolarından elde edilen hipokampal hücrelerinin GALC7 jel üzerinde büyütüldüğü başka bir çalışmada da GalC7 kültürlü hücrelerden yüksek kaliteli RNA izolasyonu gerçekleştirmek mümkün olduğu ifade edilmiştir. GalC7 hidrojelinin, nöron büyümesi için de ilgi çekici olduğu, bir nöronal farklılaşma belirteci olan Neurod1'in ekspresyon seviyesinin, GalC7'de yedi gün boyunca büyütülen hücreler için ilginç bir seviye de gözlemlendiği ve nöronal farklılaşmayı vurguladığı gösterilmiştir (48).



Şekil 2.5. GALC7 fibriler yapı oluşumu gösterimi.

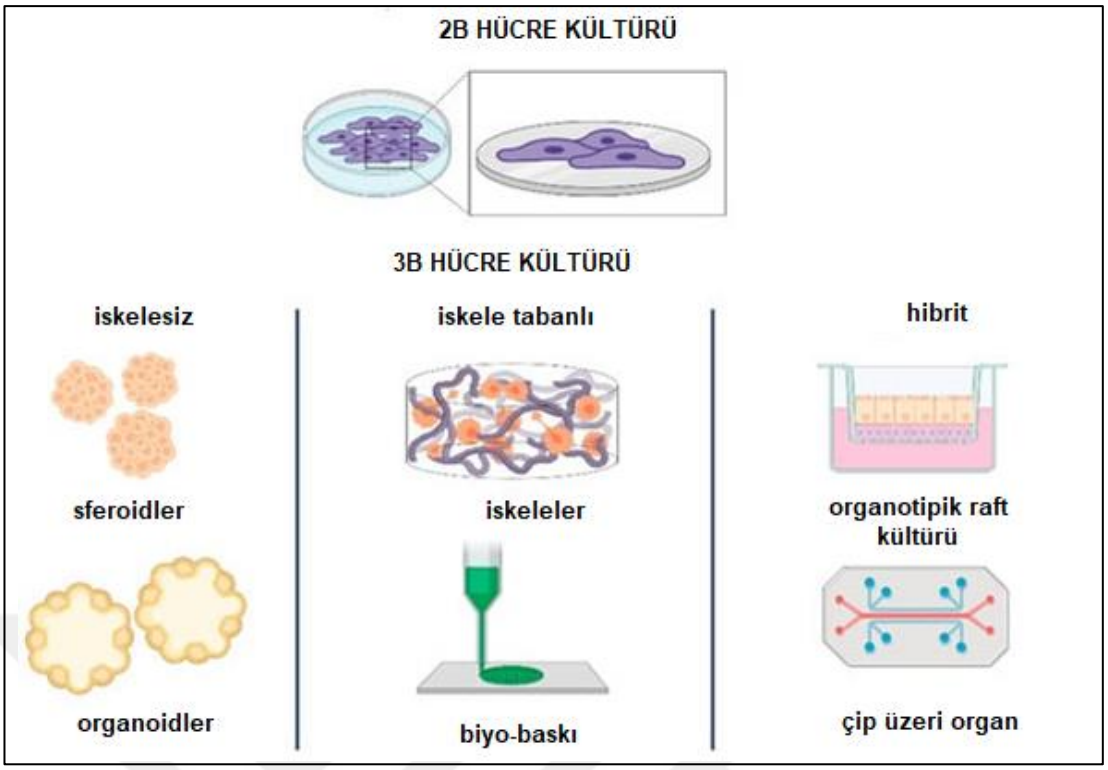
2.8. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Yaşam bilimleri alanında uzun süredir kullanılan bir teknoloji olan iki boyutlu hücre kültürü hücrelerin düz bir yüzey üzerinde büyümesini ifade eder. Bu teknolojinin uygulanması, hücrelerin *in vitro* olarak fizyolojik ve patolojik aktivitelerini incelemesini sağlar. Bununla birlikte, hücre mikro ortamı kavramının kademeli olarak

anlaşılmasıyla birlikte bilim adamları, iki boyutlu hücre kültüründe büyüme ortamındaki hücrelerin fizyolojik durumu ve aktivitesinin in vivo hücrelerle tamamen tutarlı olmadığını keşfettiler. Bu nedenle, son on yılda bilim adamları, hücrelere in vivo ortama daha çok benzeyen bir kültür ortamı sağlamak için kendilerini çeşitli 3B kültür tekniklerinin geliştirilmesine adadılar (49).

3 boyutlu hücre kültürü geniş anlamda, doku ve organa özgü mikro mimariyi taklit eden 3 boyutlu yapılara sahip mikrofabrike tasarımlar içindeki canlı hücrelerin kültürü olarak tanımlanır. 3 boyutlu matris jellerdeki hücre kültürlerine "3B ECM jel kültürleri", "3B jel kültürleri" veya "geleneksel 3B kültürleri" denir (50).

Üç boyutlu hücre kültürü, dokuların uzamsal organizasyonunu taklit etmeye çalışır. 3 boyutlu hücre kültür sistemleri iskele tabanlı, iskelesiz ve hibrit olarak 3 gruba ayrılabilir. İskele tabanlı sistemler, hücresel mikro ortamı simüle etmek için hücre dışı matris bileşimini taklit eden yapıları kullanır. Yapı iskelesi olmayan sistemlerde, doğal organogenez süreçlerinde olduğu gibi hücreler kümelenir ve kendi kendine birleşir. Hibrit sistemler, hücreler ve ECM hücreleri arasında daha karmaşık etkileşimler sağlayan sentetik matris ve harici fiziksel destekler gibi iskele tabanlı özellikleri içerir (Şekil 2.6). Tüm 3 boyutlu hücre kültürü sistemlerindeki hücreler, yalnızca izole edilmiş bir varlık olarak değil, fenotiplerini ve işlevlerini düzenleyen bir bağlamda büyürler. Bu da boyutlu hücre kültürü sistemlerini tek katmanlı kültürlere kıyasla in-vivo olanları daha iyi temsil eder hale getirir (51).



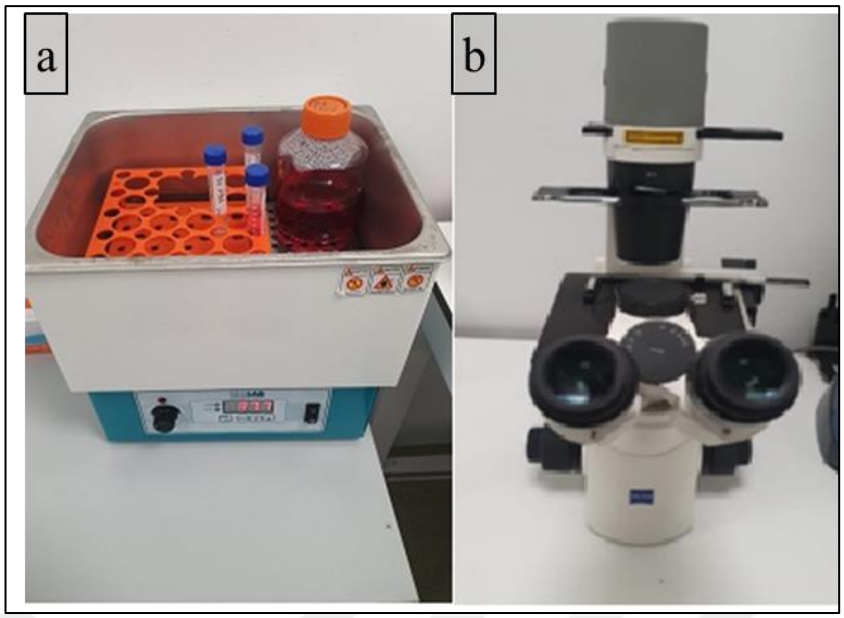
Şekil 2.6. Çeşitli 3B hücre kültürü yaklaşımlarının şematik gösterimi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücrelerin Hazırlanması

Bu çalışmada SaOS-2 osteosarkom hücre hattı ve insan pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanılarak *in vitro* incelemeler gerçekleştirilmiştir. SaOS-2 osteosarkom hücreleri (Saos-2 / An1 Human bone osteosarcoma (İnsan)) ŞAP enstitüsünden temin edildi (HÜKÜK Kayıt No.: 02111901). İnsan pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde izole edilen primer hücrelerden çoğaltıldı.

- Öncelikle, sıvı azot tankı içinde bekleyen hücreler çıkarılarak 37 °C derecede su banyosu içerisinde çözüldü.
- Çözülen hücrelerin üzerine 3 ml PBS (Phosphate Buffer Saline, Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) eklendi ve 15ml'lik santrifüj tüpünde 200x g hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj bittikten sonra süpernatant atıldı.
- Daha öncesinde %10 fetal sığır serum (FBS) Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) ve %1 penisilin-streptomisin eklenerek hazırlanan besi yerinden 2 ml alınıp pellet üzerine eklenerek çözünmesi sağlandı.
- Çözünen pellet üzerine 3 ml daha besi yeri ilave edilerek pipetaj yapıldı.
- Elde edilen hücreler 25 cm2'lik polisitiren hücre kültürü flask tabanına pipetlendi. Hazırlanan flasklar CO_2 inkübatöre yerleştirildi.



Şekil 3.1. Çalışma süresince kullanılan su banyosu ve ışık mikroskobu.

Bu aşamadan sonra ışık mikroskobu ile izlenip kontrollü olarak besiyerileri değiştirilerek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Büyüdükten sonra;

- Besi yeri uzaklaştırılıp 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaları için üzerlerine tripsin ilave edildi ve 37 °C derecelik CO2 inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi.
- Mikroskopla, kalktıkları teyit edilen hücrelerin üzerine tripsinin 2 katı kadar besi yeri eklendi ve hücreler 15 ml falkon tüpe alınarak 200x g hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi.
- Elde edilen pellet 1 ml besi yeri içerisinde çözdürülüp hücre sayım cihazında sayım yapıldı.
- 96 kuyucuklu kültür kabında her kuyucuk için 50 bin hücre olarak şekilde ayarlama yapıldı. Her hücre için ayrı ayrı olmak üzere normal besiyeri indükleyici besi yeri ve kontrol grubu olmak üzere 3 çalışma grubu oluşturuldu..



Şekil 3.2. Çalışma süresince kullanılan CO2 inkübatör (A) ve biyogüvenlik kabini (B).

3.2. İndükleyici Besiyeri Hazırlanması

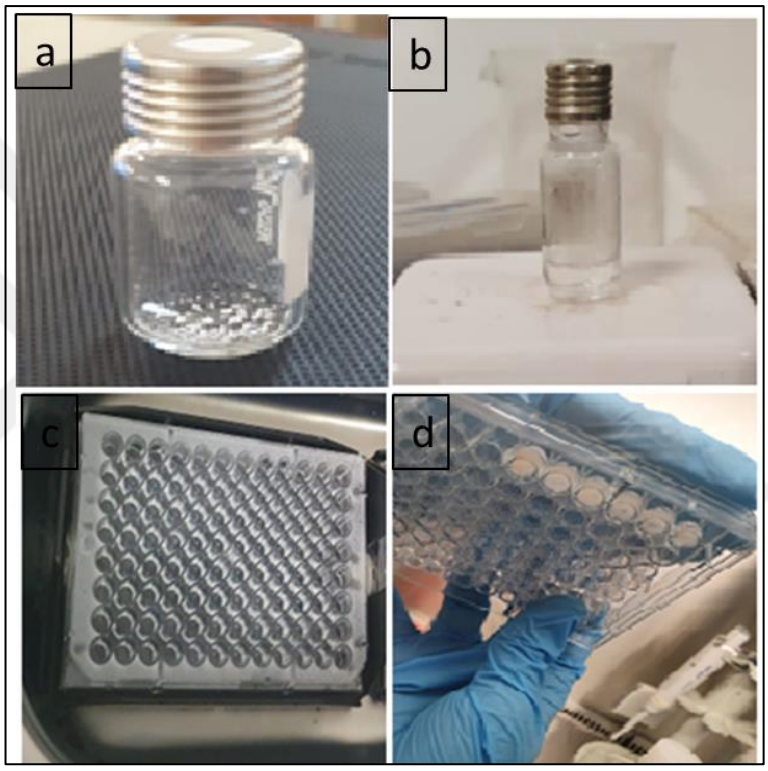
İndükleyici besi yeri hazırlamak için her 5 ml için 100 mikro molar askorbik asit (Ascorbis asit, Merk Millipore, Burlington, USA) ve 2 mikromolar beta-gliserofosfat,(SIGMA-ALDRIC, 20020-100G,Germany) eklenip karıştırıldı.

3.3. GalC7 Hidrojelin Hazırlanması



Şekil 3.3. Jel dökümü deney düzeneği.

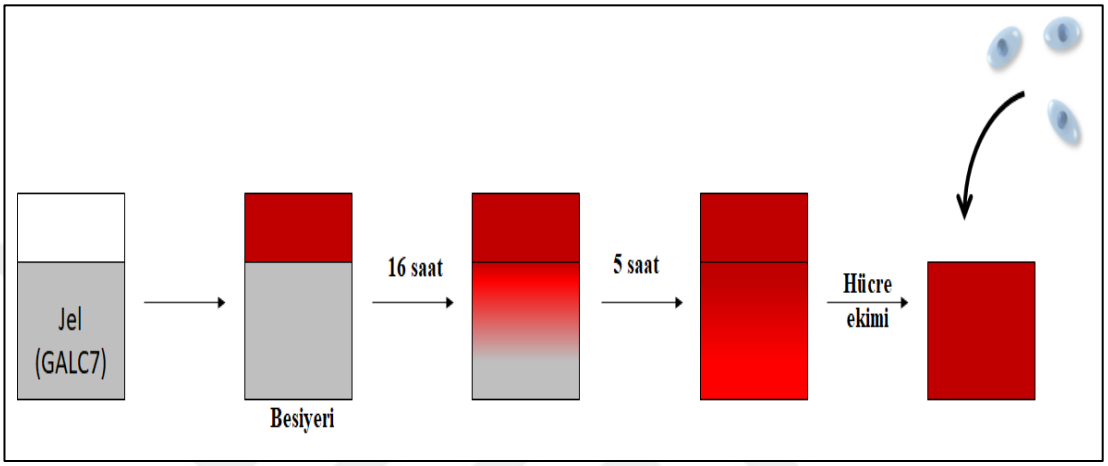
- Her hücre grubu için 4,50 mg toz tartılıp bir şişeye konuldu üzerlerine 1,50 ml saf su eklendi.
- Kullanılan şişe hacmi suyun hacminden en az 5 katı katı kadar büyük olacak şekilde belirlendi.
- Kontrollü Fırın 120°C'ye hazırlanıp kullanılacak olan pipet uçları da fırın içerisinde ısınmak üzere bırakıldı.
- Derin metal kap içerisine kaynar su konulup 120°C'ye getirilen ısıtıcı plaka üzerine yerleştirildi.



Şekil 3.4. GalC7 hidrojelin hazırlanması (a) GALC7 toz hali ,(b) suda çözünmüş GALC7 (c) jelleşme ortamında GALC/ (d) Jelleşmiş GALC7.

- Kullanılacak olan plaka bu suyun içerisine alınarak ısınması ve sıcak kalması sağlandı. Hazırlanan toz-su karışımı 120 °C dereceye ayarlı ısıtıcı tabla üzerine yerleştirildi. Tozun tamamen çözünmesi gözlemlenene kadar ısıtılmaya devam edildi.
- Homojen görüntü sağlandıktan sonra dikkatli ve hızlı bir şekilde plaka içerisine pipetlendi.
- Plaka iki boş plaka arasına alınarak fırına yerleştirildi.

- Fırın 120 °C dereceden oda sıcaklığı 25 °C ye en az doksan dakikada gelecek şekilde soğutuldu.
- Jelleşme sonrası plaka biyogüvenlik kabini içerisine alınıp kuyucuk kenarlarında oluşan su damlaları pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Kuyucuk başına 50 mikro litre besi yeri eklenip 5 saat inkübe edildi. 5 saat sonunda besi yeri değiştirilerek hücre ekimi için hazır hale getirildi.



Şekil 3.5. Jelleşme sonrası hücre ekimi.

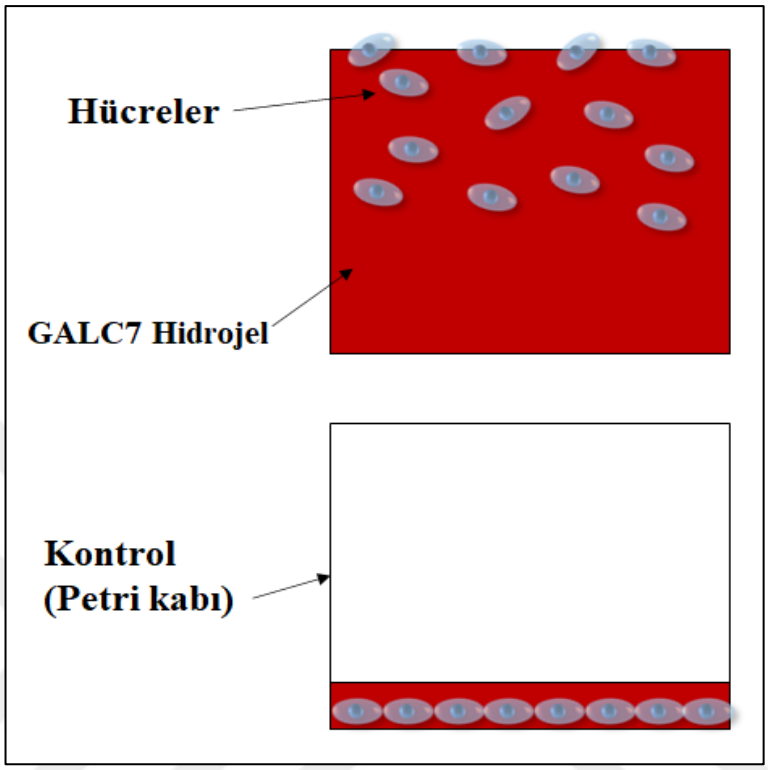
3.4. XTT Yöntemiyle Hücre Canlılığının Belirlenmesi

XTT (2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid) hücreler tarafından alınan ve mitokondriyal enzimler tarafından indirgenen bir tetrazolium tuzudur. Bu indirgenme reaksiyonu sonucunda formazan adı verilen renkli bir ürün oluşur. Formazan miktarı, hücre canlılığını yansıtan bir ölçüt olarak kullanılır. Formazanın renk değişimi görsel olarak değerlendirilebilir veya spektrofotometrik olarak ölçülebilir (52).

Bu çalışmada hücre canlılığı tahlili için XXT (Biological Industries Cell Proliferation Kit, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) kiti kullanıldı. 96 kuyucuklu plaka üzerine 5 kuyucuk jel 5 kuyucuk kontrol grubu ve 3 kuyucuk blank olmak üzere toplam 13 kuyucuk üzerinde çalışıldı.

- İnkübasyon süreci sonrasında kuyucuklarda bulunan besi yeri uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuk için 50 µl XTT solüsyonu ve 15 µl XTT aktivatörü eklendi.
- 3 saat CO2 inkübatörde inkübe edildi.

- 3 saat sonunda plaka çoklu plaka okuyucu spektrofotometre cihazında 1.okuma için 600 nm ve 450 nm dalga boyunda ve 2. okuma için 600 nm (nonspesifik absorbans) absorbans değerlerinde ölçüm yapıldı.



Şekil 3.6. Deney grubu ve kontrol grubu şematik gösterimi.

3.5. Floresan Mikroskopi Analizi

Floresan boyama, özel floresan boyaların kullanılmasıyla hücre veya doku örneklerindeki belirli bileşikleri veya yapıları görünür hale getirme yöntemidir. Birincil antikorlar veya floresan boyalar doğrudan hedef moleküllere bağlanabilir. Bu bağlanma, hedef molekülün floresanla işaretlenmesini sağlar. Bu boyalar, bağlandıkları yer ile etkileşime girdiklerinde floresan ışığı yayarlar. Floresan mikroskop veya lazer konfokal mikroskop gibi floresan görüntüleme ekipmanları kullanılarak floresan sinyalleri algılanır ve görüntüler elde edilir (53).

Bu çalışmada FAK100 (Actin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit) kullanıldı. 5 kuyucuk jel ve 5 kuyucuk kontrol grubu olmak üzere 10 kuyucuk üzerinde çalışıldı.



Şekil 3.7. İmmunfloresans boyama çalışmalarında kullanılan ışık mikroskobu.

Üretici firmanın talimatlarına göre:

- Hücreler 1x PBS ve %4'lük glutaraldehit çözeltisi ile 20 dakika bekletildi.
- 1x yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkama yapıldı.
- 1x PBS içine %0,1 Triton X-100 hazırlandı ve hücrelere eklenerek 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- 1x yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkama yapıldı.
- Block solüsyonu eklenip 30 dakika bekletildi. (1/500 seyreltildi, 100µl kuyucuk başına eklendi)
- TRITC konjuge Phalloidin (1/1000 seyreltilmiş) ile oda sıcaklığına 1 saat bekletildi.
- 1x yıkama solüsyonu ile 10 dk aralarla 3 kez yıkama yapıldı.
- Hücreler DAPI ile 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi (kuyucuk başına 100µl eklendi).
- 9.Yıkama solüsyonu ile 5 dk aralarda 3 kez yıkandı.
- Kurumalarını önlemek amacıyla hücrelere PBS eklendi.
- Floresan mikroskop ile görüntüler elde edildi.



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan FAK100 floresan mikroskopi analiz kiti.

3.6. GalC7 ile Kültürlenen Hücrelerden RNA İzolasyonu

3 kuyucuk indükleyici besiyeri ile hazırlanan jel, 3 kuyucuk normal besi yeri ile hazırlanan jel ve 3 kuyucuk kontrol grubu 1 hafta boyunca büyütülerek RNA izolasyonu için hazırlandı. Bu çalışmada RNA izolasyon kiti kullanıldı.

RNA izolasyon basamakları:

- Kültürün 7. gününde besiyeri dikkatlice çekildi.
- Jel üzerine 20 µl PBS eklenerek yıkama yapıldı.
- Her bir kuyucuğa Riboex eklenerek jelin çözülmesi sağlandı.
- Her kuyucuktan elde edilen karışım ayrı ayrı eppendorf tüplerine aktarıldı ve vortekslendi.
- 200 µl kloroform eklenerek 15 sn vortekslendi.
- Örnekler soğutmalı santrifüj cihazına (Thermo Scientific, Micro CL 21R Centrifuge, Almanya) alındı. 4 °C 10.000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Üst kısım (süpernatant) yeni bir Eppendorf tüpüne aktarıldı.



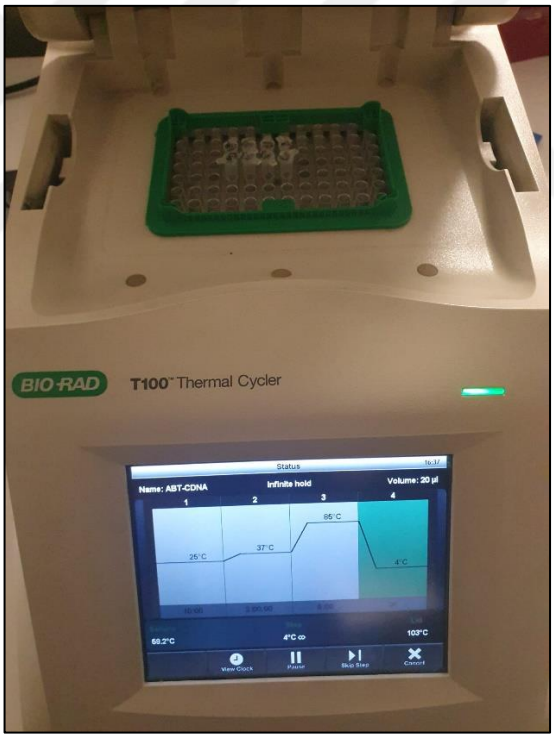
Şekil 3.9. Çalışmada kullanılan mikro santrifüj cihazı.

- Tüplere 250 µl izopropanol eklenerek ters yüz edildi. Sulu faz toplandı. -20 °C de overnight bırakıldı.
- 3 tüp normal besi yerili jel, 3 tüp indüksiyon besi yerili jel ve 3 tüp de kontrol grubu şeklinde 9 tüp elde edilmiş oldu.
- İnkübasyondan sonra tüpler 4 °C'de 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj (....) edildi. Süpernatant atıldı.
- Yıkama için pellet üzerine 1 ml etanol eklendi. Tüpler birkaç kez ters yüz edildi.
- 4 °C'de 8.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Bir kez daha aynı şekilde yıkama yapıldıktan sonra santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- Pellet 30 µl NFW içerisinde çözüldü. Absorbans ölçümleri Biospec Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.
- Kalan numuneler -80 °C'ye kaldırıldı.

3.7. cDNA Sentezi

Tek zincirli komplementer DNA (cDNA) sentezi için ticari olarak elde edilen A.B.T. cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Normal besi yerili jel, indüksiyon besi yerili jel ve kontrol grubu olmak üzere 3 örnek üzerinde çalışıldı. Komplementer DNA sentez basamakları:

- Her bir tüp için 1 µl 10X buffer, 0.5 µl dNTP, 1 µl Random, 0,5 µl reverse transkriptaz primeri, 0.25 µl inhibitör ve 6,75 µl RNA karışımı hazırlandı.
- Hazırlanan karışım BIO-RAD T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, Singapur) cihazına yerleştirildi.
- 5 ^{0}C 10 dakika, 37^{0}C'de120 dakika 85 ^{0}C 5 dk ve 4 ^{0}C 15 dk inkübe edildi.
- Cihazdan alınan cDNA'lar -20 ^{0}C ye kaldırıldı.



Şekil 3.10. cDNA sentezi için kullanılan Biorad T100 pcr cihazı.

3.8. RT-qPCR Sentezi

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu DNA veya RNA hedeflerinin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem bir dizi termal döngü ile gerçekleştirilir. Her döngü, üç temel aşamayı içerir:

denatürasyon, tavlama ve uzama. Denatürasyon, DNA'nın çift sarmalanın ayrıştığı yüksek sıcaklık adımıdır. Tavlama, primerlerin hedef DNA veya RNAya bağlandığı düşük sıcaklık adımıdır. Uzama aşaması ise DNA polimerazın yeni DNA zincirini sentezlediği ve hedef DNA veya RNA'yı kopyaladığı ısınma adımıdır. Her döngüden sonra, amplifikasyon ürününe bağlı olan floresan etiketli probun floresans sinyali üretir bu sinyal sürecin sonunda ölçülerek hedef DNA veya RNA miktarı nicel olarak belirlenir (54).

Her bir tüp için 16,6 µl Syber Green Master ve 0,4 µl primer karıştırılıp pipetaj yapıldıktan sonra her bir tüp için 3 µl cDNA eklendi. Numuneler Rotor-Gene-Q Real-Time PCR cihazına yerleştirildi. 95 ^{0}C 15 dk 55 ^{0}C 30 dk 72^{0}C 45 dk şeklinde protokol uygulandı.



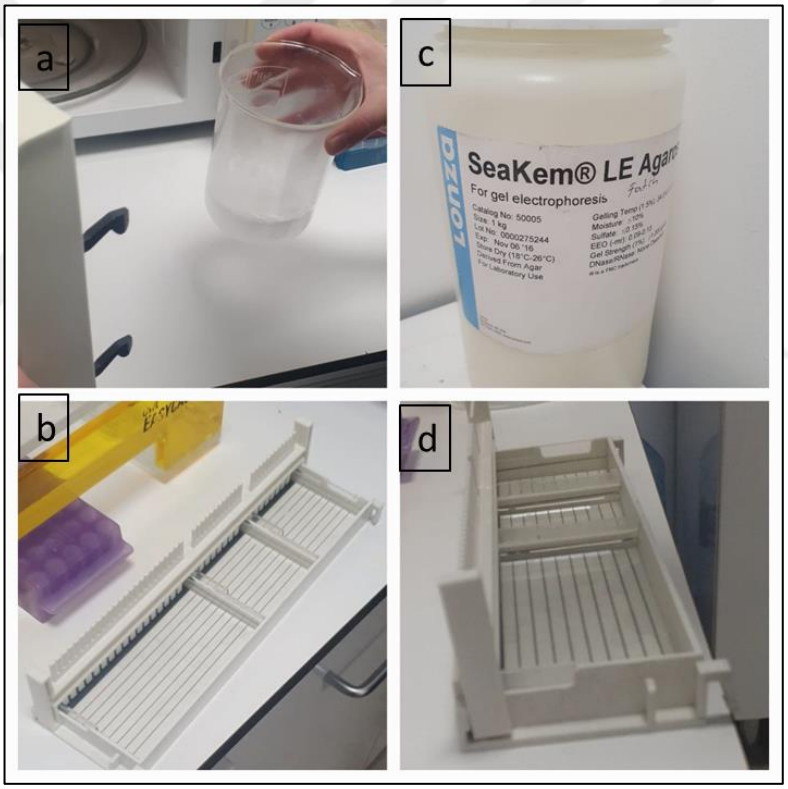
Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan real time PCR cihazı.

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforez yönteminde, agaroz jel kullanılır ve elektrik akımı uygulanarak nükleik asitler jel üzerinde hareket ettirilir. Agaroz elektroforezi cihazı, jel tankı, elektrotlar, güç kaynağı ve UV aydınlatma sistemi gibi bileşenlerden oluşur. Elektroforez işlemi sırasında, nükleik asit örnekleri jelin üzerine uygulanır ve elektrik akımıyla jel boyunca hareket ettirilir. Nükleik asitlerin boyutlarına göre farklı hızlarda hareket etmeleri nedeniyle jel üzerinde ayrışırlar. Elektroforez tamamlandıktan sonra,

agaroz jel DNA boyama yöntemi kullanılarak görselleştirilir. Bu sayede DNA bantları görünür hale gelir (55).

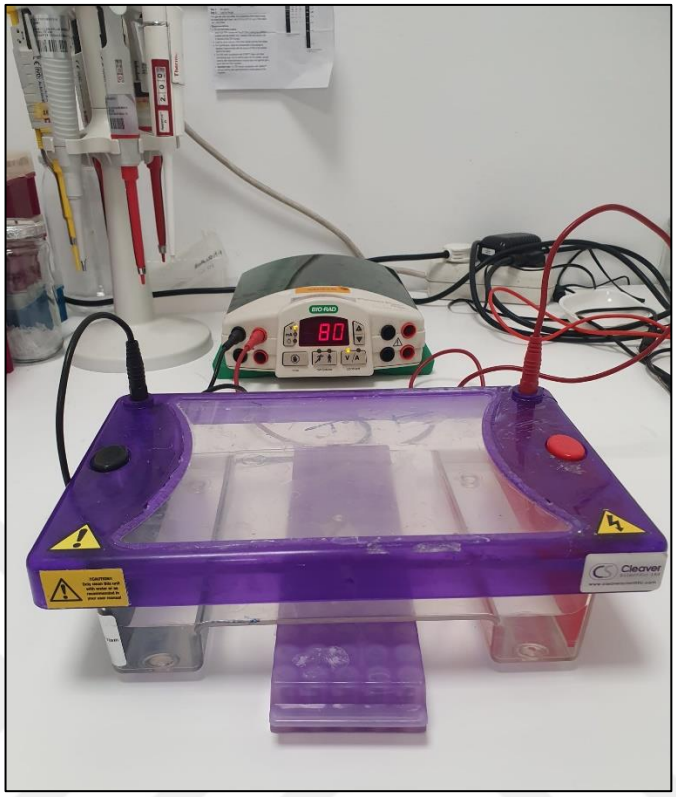
- Elektroforez tankını doldurmak ve agaroz jel hazırlığında kullanılmak üzere TBE buffer hazırlandı.
- Jel için 100 ml TBE buffer ve 2 g agaroz jel, beher içerisinde karıştırılıp mikrodalga fırın içerisinde eriyene kadar kaynatıldı.
- Jel tabaklarına hazırlanan karışım döküldü ve tarakları yerleştirilerek kurumaya bırakıldı.
- Jel örnek sayısı ve bir tane de ladder için olacak şekilde 5 kuyucuk sayılarak kesilerek tank içerisine yerleştirildi.



Şekil 3.12. Jel elektroforezi hazırlık aşamaları (a) Agaroz jelin kaynatılması, (b) Agaroz jel tankı (c) Agaroz jel toz hali (d) Donmaya bırakılmış Agaroz jel.

- 10 µL ladder ilk kuyucuğa pipetlendi
- Her 20 µL DNA için 4 µL loading dye eklenip pipetaj yapıldı ve kalan kuıyucuklara pipetlendi.
- Cihaz 80 kV a ayarlanıp yürütme işlemi gerçekleştirildi.

- Yürütme işlemi biten jel Etidyum Bromür içerisine alınıp 25 dk bekletildikten sonra görüntüleme yapıldı.



Şekil 3.13. Çalışmada kullanılan elektroforez cihazı.

3.10. Alkalin Fosfataz (ALP) Tayini

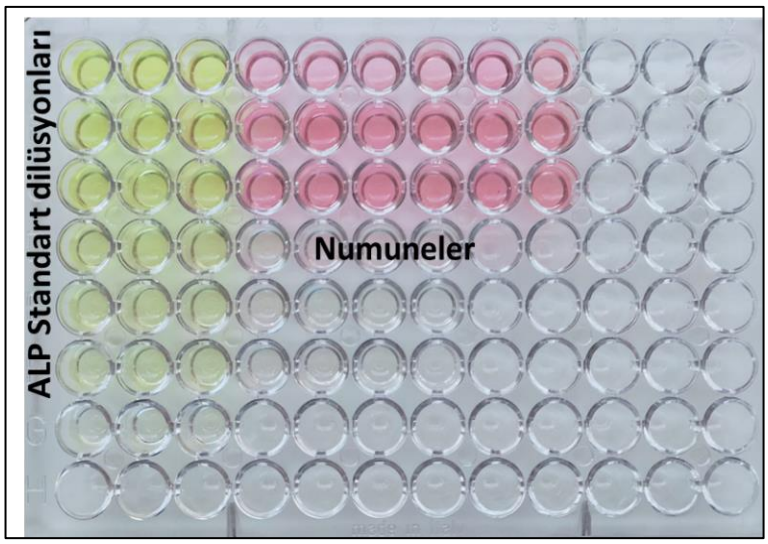
Paranitrofenil fosfat (pNPP) tabanlı alkalin fosfataz tayini yönteminin çalışma prensibi şu şekildedir: Alkalin fosfataz enzimi, pNPP'yi hidrolize eder, böylece p-nitrofenol (pNP) adı verilen bir ürün ortaya çıkar. Bu hidroliz reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan pNP'nin sarı renge sahip olduğu bilinir. Bu renk değişimi, spektrofotometre veya fotometre gibi bir cihazla ölçülerek ALP aktivitesi belirlenir (56).

Alkalin Fosfataz tayini için SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit kullanıldı. KİT içeriği:

Komponent A	pNPP,
Komponent B	10X Tampon çözelti
Komponent C	Durdurma çözeltisi
Komponent D	Triton-X-100
Komponent E	ALP standardı (buzağı bağırsağı kaynaklı)

ALP tayini basamakları:

- Deney kitinin oda sıcaklığa gelmesi beklendi.
- Protokole göre ilk olarak 10X olan komponent B deiyonize su ile seyreltilerek 1X tampon çözeltisi hazırlandı.
- Komponent E, 1:50 oranında seyreltilerek 100, 50, 25, 12.50, 6.20, 3.10 ve 0 ng/mL konsantrasyon serileri oluşturacak şekilde hazırlandı.
- Hücrelerin besiyerileri toplandı.
- Tampon çözeltisi ile 2 kez yıkama yapıldı.
- 1996 µL 1x tampon çözelti ve 4 µL Komponent D (Tritonx-100) karıştırıldı. Santrifüj tüplerine alındı. Kuyucuk başına 200 µL olarak şekilde ayarlama yapıldı.



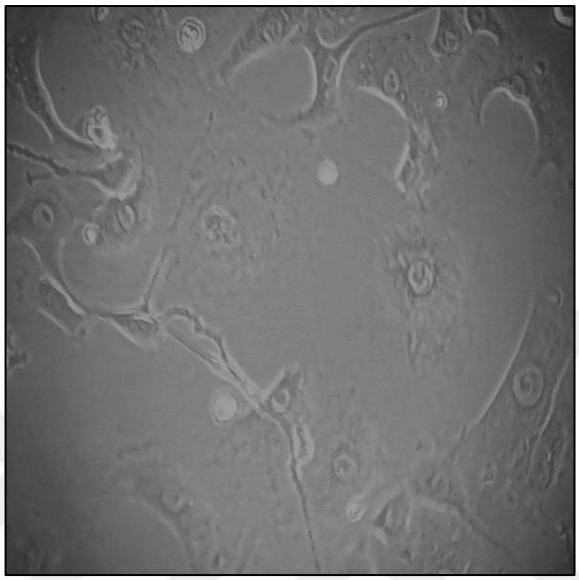
Şekil 3.14. ALP analizi plaka görüntüsü.

- Tüplere alınan karışım orbital çalkalayıcı da 4 °C’ de 10 dakika çalkalandı.
- Çalkalama sonrası santrifüj cihazına alınan tüpler 2500 X g 4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant toplandı.
- Her kuyucuğa 50 µL pNPP (komponent A) eklendi. Plaka 30 sn boyunca hafifçe sallandı ve karanlık bir ortama alınarak oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (komponent C) eklenip hafifçe sallandı.
- 405 nm de absorbans ölçümleri yapıldı.

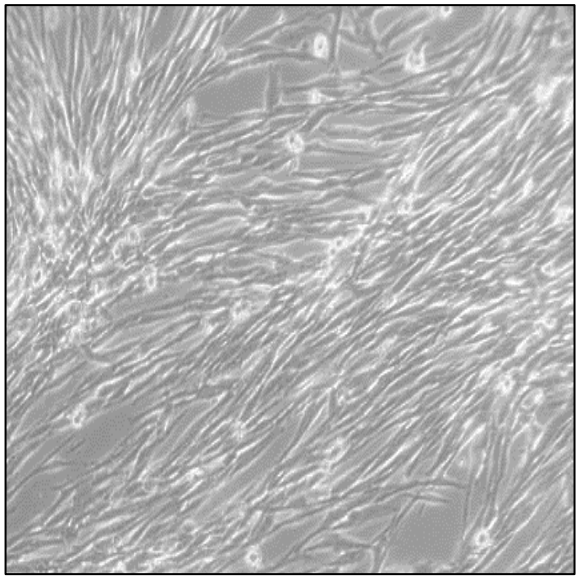
4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin Büyütülmesi

Hücrelerin morfolojik analizleri invert mikroskop yardımıyla yapılmıştır



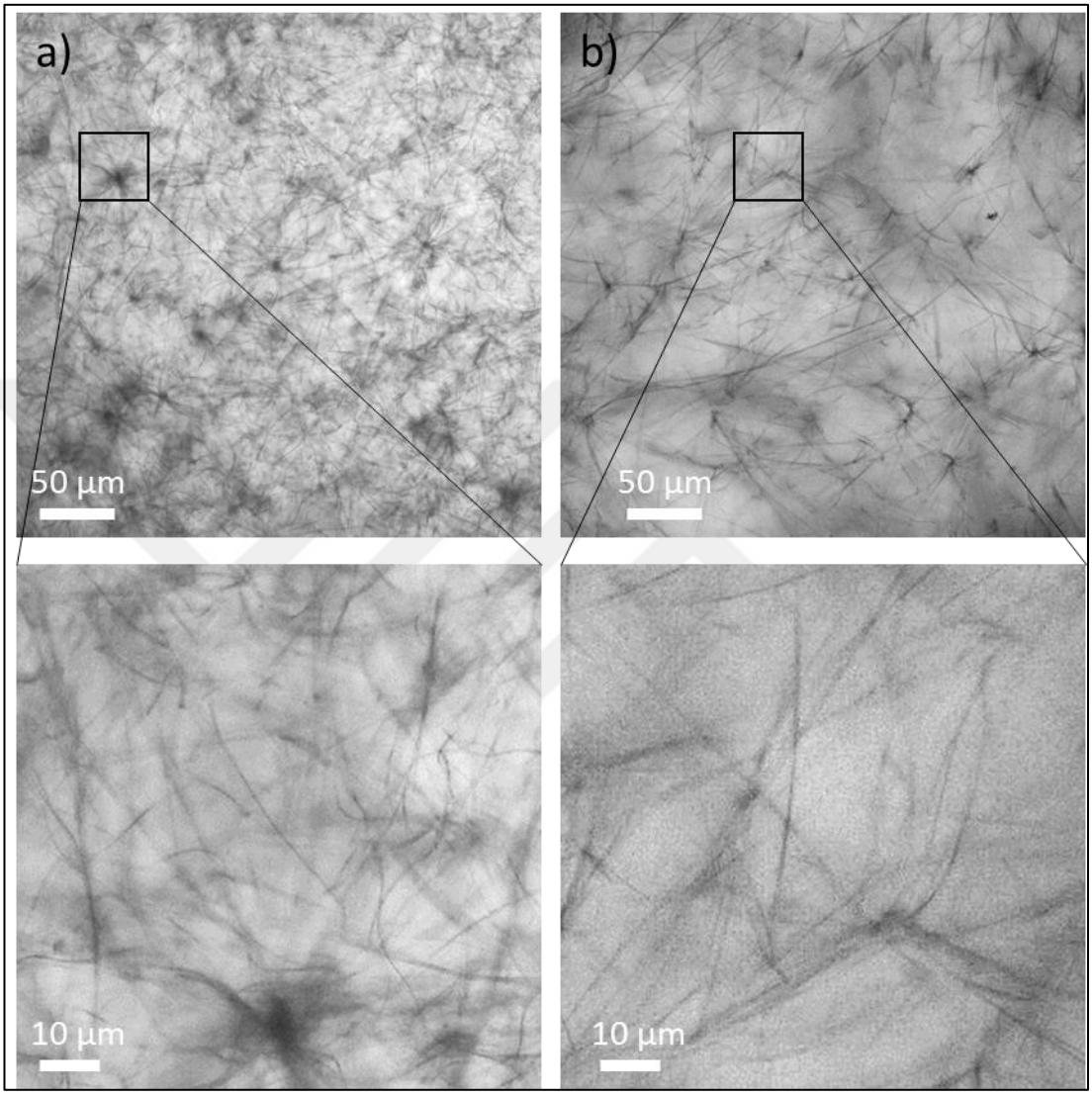
Şekil 4.1. Saos-2 hücrelerin ters optik mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.2. Diş pulpa kökenli mezenkimal kök hücre ters optik mikroskop görüntüleri.

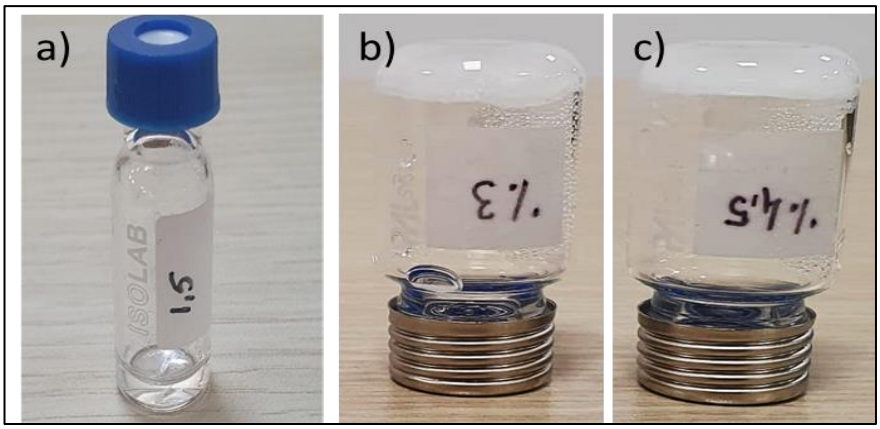
4.2. GALC7 Jelin Optimizasyon Bulguları

Hidrojel optimizasyonu için %1,5 w/v, %3 w/v ve %4,5 w/v oranlarında jel hazırlandı.



Şekil 4.3. GalC7 A) %3 w/v ve B) %4,5 w/v luk jellerin optik mikroskop görüntüleri.

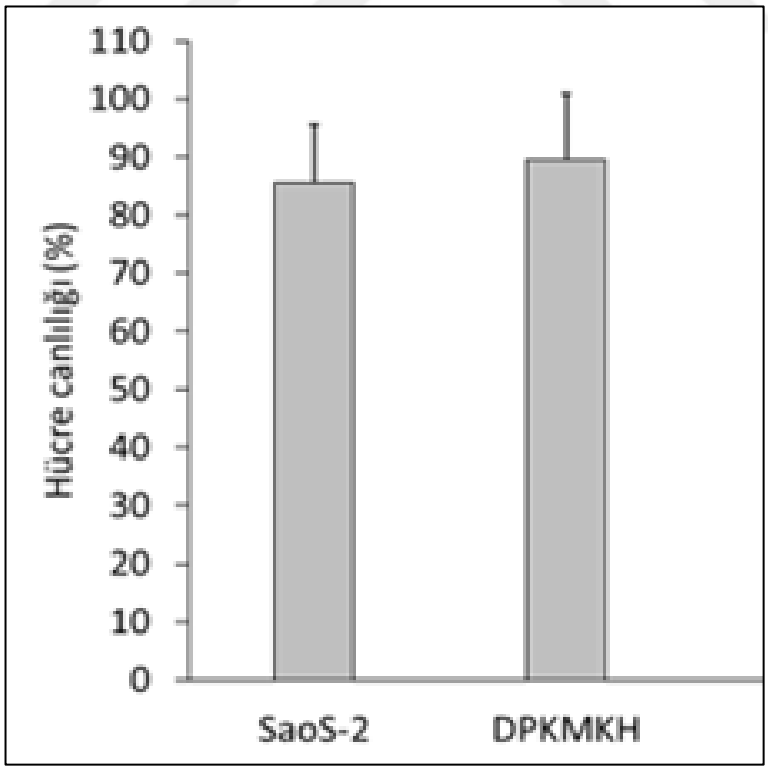
%1,5 w/v hazırlanan numune de jelleşme gözlenmedi. %3w/v ve %4,5 oranında hazırlanan jeller kıyaslandığında %3w/v oranında hazırlanan jel de fibriller arası mesafe %4,5 orasında hazırlanan jellere göre daha azdı. Fibril yoğunluğu olarak kıyaslandığında ise %3w/v olan konsantrasyonda yoğunluk %4,5 olana göre fazla olduğu görüldü.



Şekil 4.4. %1 (a), %3 w/v (b), %4,5 (c) GalC7 jellerin şişe içeresindeki görünümü.

4.3. Hücre Canlılığı Tayinine İlişkin Bulgular

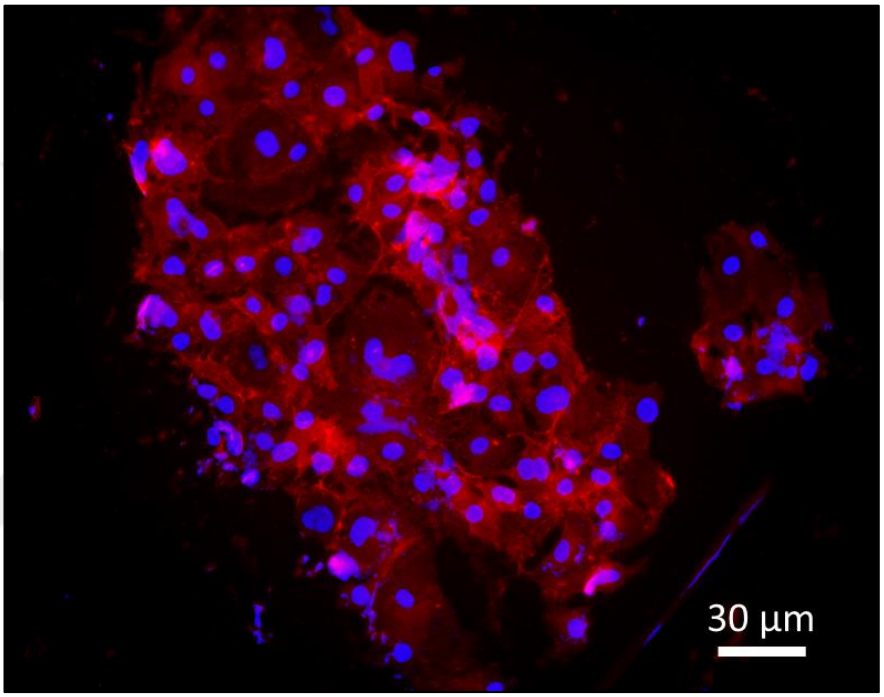
Sitotoksisite tayini, ticari XTT hücre canlılık analizi kiti kullanılarak yapıldı. Petri kabında jel olmadan büyütülen hücreler kontrol grubunu olarak belirlendi. %3w/v oranında hazırlanan jellerde büyütülen hücrelerde XTT sonucunda pulpa kökenli mezenkimal kök hücrelerde %85 osteosarkoma Saos-2 hücre hattında %92 canlılık oranı elde edilmiştir.



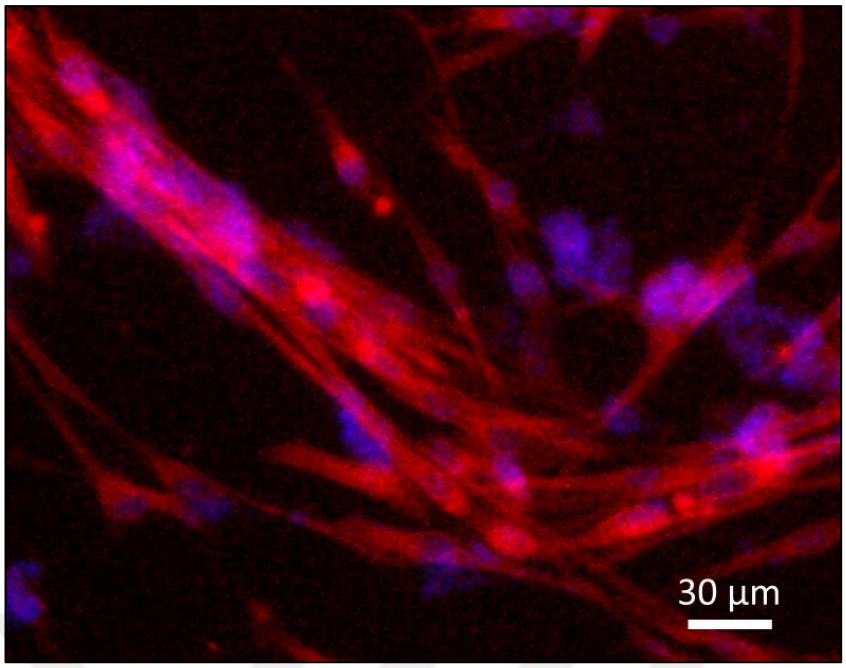
Şekil 4.5. Saos-2 ve dental pulpa kökenli mezenkimak kök hücreleri XTT tahlil sonuçları.

4.4. Floresan Mikroskopi Bulguları

Hücre morfolojisi hücre çekirdeklerinin 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile ve aktin filamanlarının tetrametilrodamin işaretli falloidin ile boyanması ile incelendi. Görüntülerdeki kırmızı ile boyanan yerler aktin filamentleri mavi ile boyanan yerler hücre çekirdeğini ifade etmektedir. Alınan görüntülerde hücrelerin hidrojel liflerine göre yönelim gösterdikleri ve belirgin bir sito iskelet yapısı oluşturdukları gözlemlendi.



Şekil 4.6. GalC7 jel içerisinde büyütülmüş Saos-2 hücre hattı immünofloresan boyama görüntüsü (kırmızı: aktin (TRITC-falloidin), mavi: çekirdek (DAPI)).



Şekil 4.7. GalC7 içerisinde büyütülmüş diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre immünofloresan boyama görüntüsü (kırmızı: aktin (TRITC-falloidin), S.

4.5. Rt-qPCR Sentezine İlişkin Bulgular

İnsan pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre için RT-PCR cihazıyla elde edilen ham Ct değerleri: normal besiyerili jel için 25,43, indükleyici besiyerili jel için 20,86, indükleyici besiyerili kontrol için 25,43 olarak ölçülürken normal besiyerili kontrol için >35 olan Ct değerleri alındı. Benzer aralıklarda (75-85 °C) ve tek bir pik melting curve değerleri görüldü.

Saos-2 osteosarkoma hücre hattı için RT-PCR cihazıyla elde dilen ham Ct değerleri normal besiyerili jel için 22,36, indükleyici besiyerili jel için 19,23 olarak ölçülürken normal besiyerili kontrol ve indükleyici besiyerili kontrol gruplarında >35 olan Ct değerleri alındı. Melting curve tek bir pik ve benzer aralıklarda (75-85 °C) görüldü.

4.6. Agaroz Jel Elektroforezine İlişkin Bulgular

İnsan kaynaklı diş pulpa kök hücreleri için yürütülen jel de soldan sağa:

1.kuyucuk ladder

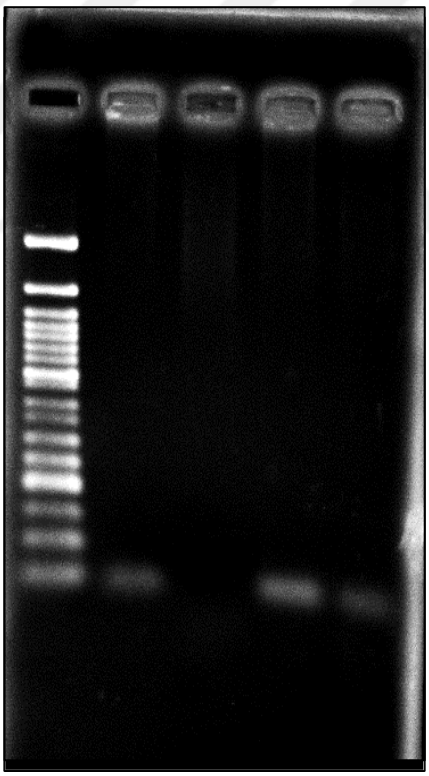
2.kuyucuk normal besiyerili jel

3. kuyucuk normal besiyerili kontrol

4. kuyucuk indükleyici besiyerili jel

5. kuyucuk indükleyici besiyerili jel

Normal besiyerili olan grupta bant alınamazken diğer gruplarda aynı noktalarda bant alınmıştır.



Şekil 4.8. Diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre tüm grup elektroforez jel görüntüleri.

Saos-2 osteosarkoma hücre hattı için yürütülen jelde soldan sağa:

1.kuyucuk ladder

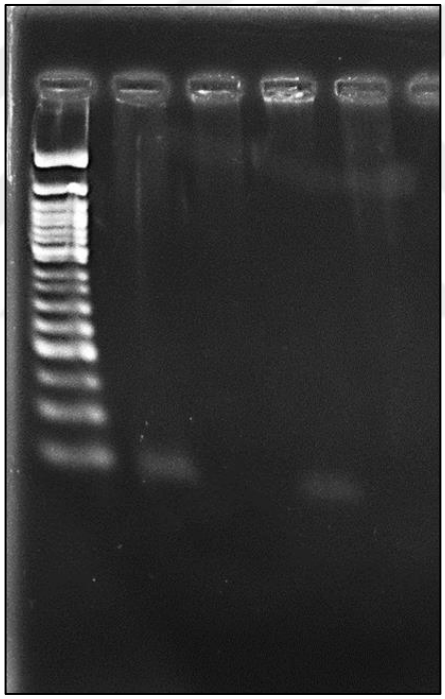
2.kuyucuk normal besiyerili jel

3.kuyucuk normal besiyerili kontrol

4. kuyucuk indükleyici besiyerili jel

5. kuyucuk indükleyici besiyerili kontrol

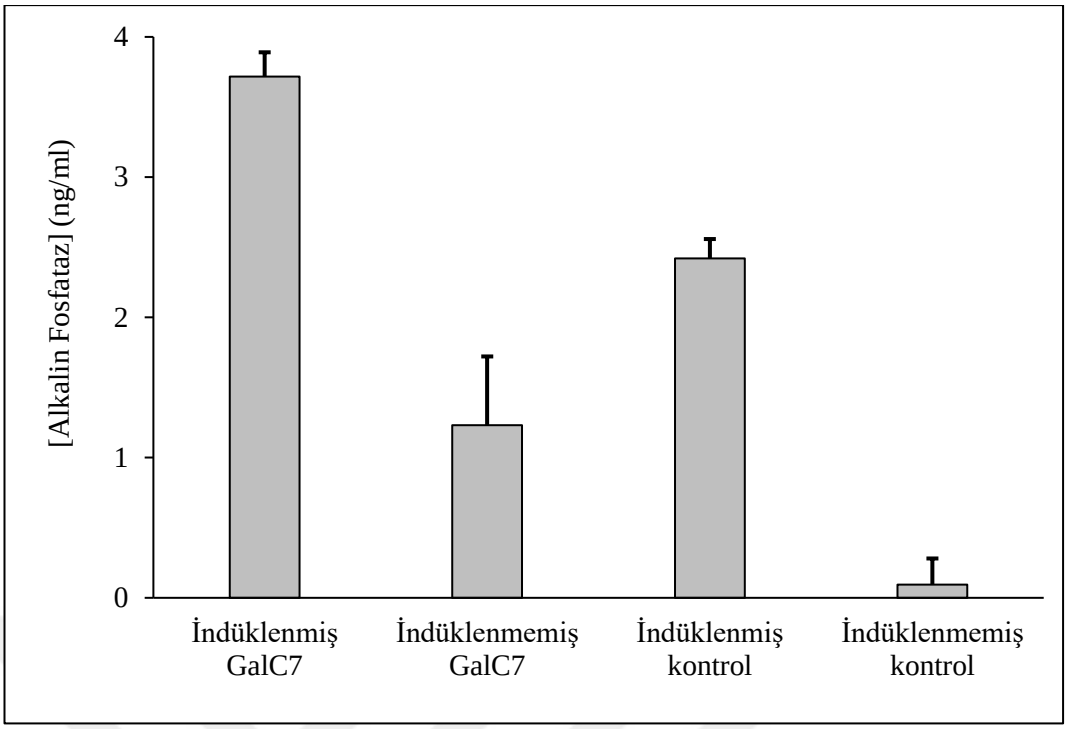
Normal besiyerili kontrol ve indükleyici besiyerili kontrol gruplarında bant alınamazken diğer kuyucuklarda aynı noktalarda bant alınmıştır. (şekil)



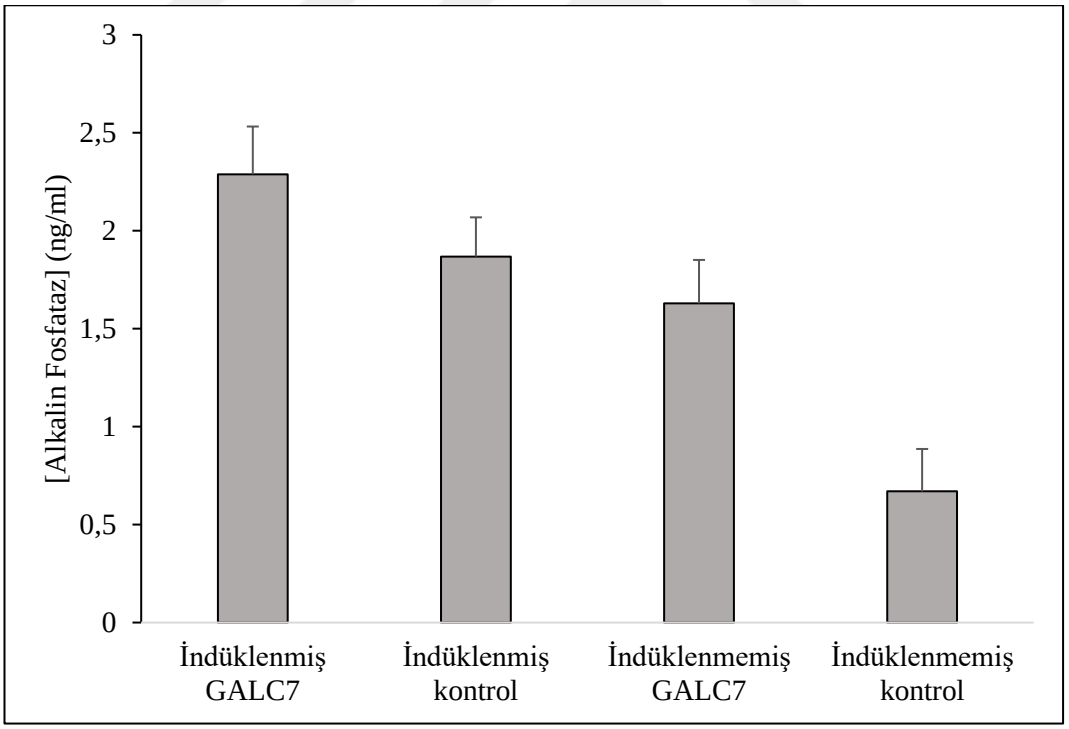
Şekil 4.9. Saos-2 hücre hattı tüm grup elektroforez jel görüntüleri.

4.7. Alkalin Fosfataz Tayinine İlişkin Bulgular

Kolorimetrik AP tahlilinde hem indüklenmiş hem de indüklenmemiş jel ortamında ekstraselüler AP miktarının, petri kabında büyütülen hücrelere göre daha yüksek olduğu diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve Saos-2 osteosarkoma hücre hattı için benzer şekilde gözlemlendi.



Şekil 4.10. Saos-2 osteosarkoma hücre hattı için tespit edilen ALP miktarları.



Şekil 4.11. Diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler için tespit edilen ALP miktarları.

5. TARTIŞMA

Sert doku mühendisliği kemik, kıkırdak ve diş benzeri sert dokuların onarımı ve restorasyonu üzerinde çalışmalar yapan ve hızla ilerleyen disiplinler arası bir alandır. Sert dokuların temel özelliklerinden biri, basınca ve ağırlığa dayanmalarını sağlamak için hücre dışı matrislerinin mineralizasyonudur. Sert doku mühendisliği bu dokuların mineralizasyon sürecini yönlendirebilmek içi yeni yöntemler geliştirmeyi hedefler (57). Sert doku mühendisliğinin diğer bir önemli konusu da doku rejenerasyonuna yardımcı olmak adına önemli bir parametre olan üç boyutlu gözenekli bir yapı iskelesinin geliştirilmesidir. Doku oluşumunu teşvik etmek ve hücre proliferasyonuna uyum sağlamak için yeterli gözeneklilik oranı sağlanmalıdır (58).

Doku mühendisliğinde iskelet tasarımı optimum besin-atık akışı ve doku büyümesi için tercihen yüzde yüz bağlantılı olan yüksek gözeneklilik, uygun geometri ve gözenek boyutları dikkate alınarak optimize edilmelidir (59). Literatürde yer alan bir çalışma daha büyük gözenek boyutlarına sahip iskelelerin hücre tutunması ve proliferasyonunu artırdığı fakat migrasyonu azalttığı gözlemlenmiştir. Daha küçük gözenek boyutlarına sahip iskelelerin ise hücre migrasyonunu teşvik ettiği ancak hücre tutunması ve proliferasyonunu sınırladığını tespit etmişlerdir. Kemik doku mühendisliği için ideal gözenek boyutunun hücre davranışını optimize etmek için dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır (60). Biz de çalışmamızda üç farklı konsantrasyonda jeller hazırladık ve gözenek boyutunun daha az olması ve fibrillerin daha yoğun olması nedenlerinden dolayı %3 lük konsantrasyonda hazırlamış olduğumuz jellerde çalışmalarımızı gerçekleştirdik.

Hücre temelli çalışmalarda deneyin sonunda ne kadar canlı hücre kaldığını bilmek önemlidir. Hücre canlılığı testleri, test moleküllerinin hücre proliferasyonu üzerinde etkileri olup olmadığını veya sonunda hücre ölümüne yol açan doğrudan sitotoksik etkiler gösterip göstermediğini belirlemek için kullanılır. Hücre canlılığı testleri kolorimetrik, florometrik ve luminometrik gibi çeşitli metodlarla yapılabilmektedir (61). Biz bu çalışmada hızlı ve güvenilir oluşu, basit ve kolay uygulanabilirliği sebebiyle kolorimetrik bir yöntem olan XTT testini kullandık. İnsan kaynaklı pulpa kök hücrelerde % 92 ve Saos-2 osteosarkoma hücre hattında is %85 canlılık oranı elde ettik. Bu sonuçlar GALC7 jel içerisinde büyütülen hücrelerin sitotoksik bir etki yaratmadığını gösterdi. Literatürde GALC7 hidrojeli ve insan

mezenkimal kök hücreleriyle yapılan bir çalışmada Alamar mavisi canlılık tahlili metoduyla hücre canlılık testleri gerçekleştirilmiş ve hücrelerin çalışma süresi boyunca canlı ve metabolik olarak aktif oldukları dolayısıyla jelin sitotoksik bir etki ortaya çıkarmadığı gösterilmiştir (62). Yine GALC7 hidrojeli üzerinde büyütülmüş insan nöronal kök hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada da hücre canlılık testleri gerçekleştirilmiş olup GALC7 hidrojeli için %98 canlılık oranı elde edilmiş ve sitotoksik bir etkisi olmadığı vurgulanmıştır (63).

Hücre iskeleti, hücrenin şekil ve düzeninden sorumludur. Hücrelerin birbirleriyle ve çevreleriyle etkileşimlerini düzenler hücreyi fiziksel ve biyokimyasal olarak dış dünyaya bağlar. Hücrenin hareket etmesini ve şekil değiştirmesini sağlayan koordineli kuvvetler üretir. İskelet yapısının analiz edilmesi hücrenin şeklinin nasıl oluştuğunu ya da nasıl değişebildiğini anlamamıza yardımcı olur. Hücre iskeletinin tespit edilmesi hücrenin dokuda doğru konumlanması ve hücre içindeki yapıların doğru konumunu ve fonksiyonunun korunduğunu anlamak için önemlidir (64). Biz de bu çalışmada hücrenin sitoiskelet yapısının analizi için hücre çekirdeklerini 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile ve aktin filamanlarının tetrametilrodamin işaretli falloidin ile boyanması ve bir floresan mikroskop aracılığıyla görüntülenmesi yoluyla görsel olarak inceledik. Jel içerisinde büyütülen Saos-2 osteosarkoma hücre hattında ve insan pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde yapılan analiz sonucunda hücrelerin hidrojel liflerine göre yönelim gösterdikleri ve belirgin bir sitoiskelet yapısı sergiledikleri gözlemlenmiştir. Chalard ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada GALC7 jel üzerinde büyütülmüş nöronal hücrelerde tubulin floresan boyama yapılmıştır. Bu çalışmada bizim çalışmamızla da benzer şekilde, jelin düz lifli yapısıyla uyumlu akson demetlerinin oluştuğunu göstermişlerdir (63).

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) hedeflenen bir DNA molekülünün amplifikasyonuna ve aynı anda miktarının belirlenmesine izin veren bir moleküler biyoloji tekniğidir (65). Doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzeme hücre etkileşimin sonuçlarının araştırılması ve ilgili dokudaki hücrelerin büyümeleriyle alakalı olan genlerin ifadesinin anlaşılması oldukça faydalıdır. Biz de bu çalışmada hem diş hem kemikte bulunan bir protein olan osteokalsin ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirdik. Her iki hücre grubunda da indükleyici besiyerili jel ve normal besiyerili jelde elde ettiğimiz ham ct değerleri 20,86 ve 25,43 arasındaydı.

Tasarladığımız primerin spesifik olan bağlandığı görüldü. Jelin mineralizyonu destekleyebileceği yönüne ön bulgu elde edilmiş oldu.

Agaroz jel elektroforezi, DNA fragmanlarının ya da protein moleküllerin boyutlarının belirlenmesi, ayrılması ve analiz edilmesi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. (66) PCR yaptığımız numuneleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle analiz ettik. Osteokasin geninin sentezlenebildiği görüldü.

Biyomineralizasyon, kabuk, kemik ve diş gibi biyolojik olarak üretilen malzemelerin ve bu hiyerarşik yapılı organik-inorganik kompozitlerin oluşumuna yol açan süreçlerin incelenmesidir. (67). Kemik mineralizasyonu, kemiklerin sert ve dayanıklı hale gelmesini sağlayan kemik dokusunda kalsiyum ve fosfat minerallerinin birikimiyle gerçekleşen bir süreçtir. Alkalin fosfataz enzimi kemik mineralizasyonunda önemli bir enzimdir ve aktivitesinin kemik minerali oluşumu ve düzenlenmesinde kritik bir faktördür. Bu enzim pirofosfat moleküllerini hidroliz ederek serbest fosfat iyonlarını üretir. Bu hidroliz iki sonuç ortaya çıkarır ilk olarak, kemik mikro çevresindeki PPi miktarını azaltır ve ikinci olarak, PPi'den serbest bırakarak mineralizasyonu teşvik eden Pi iyonlarının miktarını artırır. Bu bağlantılı faaliyetler, kemik ECM'deki Pi/PPi oranını değiştirerek, kemik mineralizasyonunda önemli bir rol oynayan kalsiyum fosfat kristallerinin oluşumunda ve büyümesinde katkıda bulunur. Ayrıca, Alkalin fosfatazın aktivitesi, osteoblastların farklılaşmasında ve osteoidin mineralizasyonunda önemli bir düzenleyici olarak rol oynar (68). Dental mineralizasyon dişlerin doğal olarak mineralize olma süreci olarak tanımlanır. Mineralizasyon, dişlerin mine ve dentin adı verilen sert dokularının mineral kristalleriyle dolmasını ifade eder. Bu mineral kristalleri genellikle hidroksiapatit adı verilen bir kalsiyum fosfat formunda bulunur (69). Biz de GALC7 hidrojeli üzerinde büyütülmüş hücrelerde mineralizasyon süreçlerini anlayabilmek amacıyla kolorimetrik bir yöntem olan Pnpp tabanlı Alkalin fosfataz tayini tahlili gerçekleştirdik. Yaptığımız deneylere göre her hücre grubu içinde indüklenmiş ve indüklenmemiş jeller kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, jellerde büyütülen hücrelerdeki Alkalin fosfataz miktarı petri kabında büyütülen hücrelere göre daha yüksekti. En yüksek alkalin fosfataz indüklenmiş GALC7de görüldü. İndüklenmemiş GALC7 de indüklenmemiş kontrolden yüksek Alp görüldü. GALC7nin mineralizayonu tetikleyebildiği görüldü. PCR çalışmalarıyla da örtüşen sonuçlar elde

edildi. Literatürde bulunan bir çalışmada Saos-2 hücreleri kullanılarak titanyum dioksit nanopartiküllerinin 2B ve 3B hücre kültürü modellerindeki osteoblastlar üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. 3B hücre kültürü modellerinin, vücut için ortamı daha gerçekçi bir ortam sağlayarak simüle ettiğini ve hücrelerin daha iyi mineralizasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir (70). Fare dental pulpa hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada da hücrelerin 3B bir yapıda yetiştirilmesinin osteoblastik farklılaşma nasıl etkilediğini araştırılmıştır. 2B kültür ile 3B kültürü karşılaştırdıklarında, 3B kültürde hücrelerin daha fazla dentin ve kemik benzeri mineralizyon yeteneğinin arttığı gözlemlenmiştir (71).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- GALC7'nin gözenek boyutu ve viskozitesinin sert dokular için de ayarlanabilir olduğu görüldü.
- GALC7 mineralize olan ya da mezenkimal kök hücreler içinde sitotoksik bir etki yaratmayarak hücre canlılığını desteklediği görüldü.
- Hücrelerin jel içerisinde fibril yapısını takip ettiğini ve uygun morfolojide olduğu görüldü.
- İndükleyici besiyeri olmadan mineralizasyonu tetikleyebildiği ALP ve OCN tayini ile gösterildi.
- GALC7'nin sert doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli olduğu ve ilerleyen daha ayrıntılı çalışmalarla bu potansiyelin araştırılabileceği sonucuna ulaşıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3B cell culture?, *Front. Mol. Biosci.*, 2020, 7, 33.

2. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay Drug Dev. Technol.*, 2014, 12(4), 207-218.

3. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3B cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021,22(22), 12200.

4. Correa S, Grosskopf AK, Lopez Hernandez H, Chan D, Yu AC, Stapleton LM, Appel E A. Translational Applications of Hydrogels, *Chem rev.*, 2021, *121*(18), 11385–11457.

5. Guo B, Ma PX. Conducting polymers for tissue engineering, *Biomacromolecules*, 2018, *19*(6), 1764-1782.

6. Chalard A, Vaysse L, Joseph P, Malaquin L, Souleille S, Lonetti B, Fitremann J. Simple synthetic molecular hydrogels from self-assembling alkylgalactonamides as scaffold for 3B neuronal cell growth, *ACS Appl. Mater. Interface.*, 2018, *10*(20), 17004-17017.

7. Abdollahiyan P, Oroojalian F, Hejazi M, de la Guardia M, Mokhtarzadeh A. Nanotechnology, and scaffold implantation for the effective repair of injured organs: An overview on hard tissue engineering, *J Control Release.*, 2021, 333, 391-417.

8. O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. today.*, 2011, *14*(3), 88-95.

9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*., 1993, 260(5110), 920-926.

10. Chang HI, Wang Y. In Regenerative medicine and tissue engineering-cells and biomaterials, Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds, *InTechOpen*, 2011, doi: 10.5772/21983.

11. Cakmak S. Osteokondral Doku Mühendisliği, *N. Appl. Sci. Journal.*, 2018, 1(1), 9-22.

12. Moysidou CM, Barberio C, Owens RM. Advances in engineering human tissue models, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021. *8*, 620962.

13. Abdulghani S, Mitchell GR. Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review, *Biomolecules.*, 2019, *9*(11), 750.

14. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2007, *85*(7), 1051-1064.

15. Jahangirian H, Azizi S, Rafiee-Moghaddam R, Baratvand B, Webster TJ. Status of plant protein-based green scaffolds for regenerative medicine applications, *Biomolecules.*, 2019, *9*(10), 619.

16. Lu L, Garcia CA. Mikos AG. *In vitro* degradation of thin poly(DL-lactic-*co*-glycolic acid) films, *J. Biomed. Mater. Res*., 1999, 46: 236-244.

17. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare, *Biomatter*., 2013, *3*(3), e24717.

18. Godbey W, Antony A. In vitro systems for tissue engineering, Ann. N. Y. Acad. Sci., 2002, 961, 10–26.

19. Ha TB, Quan TM, Vu DN, Si DM. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application, *J Tissue Eng Regen Med*., 2013, 247-274.

20. Yılmaz Y, Avcı B, Demirören H, Biyomalzeme Sektöründe Kullanılan Titanyum ve Alaşımları, *4 th International Symposium on Innovative Approaches in Engineering and Natural Sciences.*, Samsun, 2019, 4(6) 357-362.

21. Park J, Lakes RS. Biomaterials: an introduction, *Springer Science Business Media*, New York, 2007: 486-509.

22. Maria VR. Bioceramics with Clinical Applications, *John Wiley & Sons Ltd. Chichester*, UK, 2014:10-12.

23. Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3B-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy, *Acta Biomater*., 2018, 79, 37–59.

24. Varma V, Kandasubramanian B, Ibrahim, SM. 3D printed scaffolds for biomedical applications, *Mater. Chem. Phys.*, *255*, 123642.

25. Lei M,Wang X. Biodegradable polymers and stem cells for bioprinting, *Molecules.*, 2016, 21(5), 539.

26. Eggar M, Maria IB, Catherina CG. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs, *Int. J. Nanomedicine*., 2013, 3071-3091.

27. Ramakrishna, S. An introduction to biocomposites *Imperial College Press*, London, 2004:1-9.

28. Prasad K, Bazaka, Chua M, Rochford M, Fedrick L, Spoor J, Bazaka K. Metallic biomaterials: Current challenges and opportunities, *Materials.*, 2017, 10(8), 884.

29. Niinomi M. Metallic biomaterials, *Jpn. Soc. Artif. Org.*, 2017, 11 (2008), 105-110.

30. Eberli, D. Tissue Engineering, InTech, 2010, doi: 10.5772/189.

31. Nigam R, Mahanta B. An overview of various biomimetic scaffolds: Challenges and applications in tissue engineering, *J. Tissue Eng.*, 2014, *5*(2), 1.

32. Fa-Ming C, Min Z, Zhi-Fen W. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering, *Biomaterials.*, 2010, 6279-6308.

33. Ikada Y. Challenges in tissue engineering, *J. R. Soc. Interface.*, 2006, *3*(10), 589-601.

34. Carole AH. Cells for tissue engineering, *TIBTECH*., 2000, 18(1) 17-19.

35. Neubauer VJ, Döbl A, Scheibel T. Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering, *Materials.*, 2021, 1;14(3):674.

36. Pawan K, Brijnandan SD, Anil S. Bioceramics for Hard Tissue Engineering Applications: A Review, *Am. J. Biochem. Biotechnol*., 2006, 2 (2) 49-56.

37. Sang-Hyug P, Chi SJ, Byoung-Hyun M. Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering, *Tissue Eng. Regen. Med*., 2016,13 (6) 622-635.

38. Thavornyutikarn B, Chantarapanich N, Sitthiseripratip K, Thouas GA, Chen Q. Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques, *Prog Biomater*., 2014, 3:61-102.

39. Neubauer VJ. Hard Tissue Engineering. Encyclopedia. https://encyclopedia.pub/entry/7958. 5 Mayıs 2023.

40. Thavornyutikarn B, Chantarapanich N, Sitthiseripratip K, Thouas GA, Chen Q. Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Prog Biomater*., 2014, 3:61-102.

41. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, 2004, 32, 477-486.

42. Aguilar A, Zein N, Harmouch E. Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering, *Molecules*., 2019,24(16):3009.

43. Uskoković V. When 1+1>2: Nanostructured composites for hard tissue engineering applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 2015, *57*, 434–451.

44. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering, *J. Cell. Physiol.*, 2006, *206*(3), 693–701.

45. Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem cells int.*, 2016, (10):1-13.

46. Pereira H, Cengiz IF, Maia FR, Bartolomeu F, Oliveira JM, Reis RL, Silva FS. Physicochemical properties and cytocompatibility assessment of non-degradable scaffolds for bone tissue engineering applications, *J. Mech. Behav. Biomed Mater.*, 2020, 112, 103997.

47. Chalard A, Joseph P, Souleille S , Lonetti B , Saffon-Merceron N , Loubinoux I , Fitremann J. Wet spinning and radial self-assembly of a carbohydrate low molecular weight gelator into well organized hydrogel filaments, *Nanoscale.*, 2019, 11(32), 15043-15056.

48. Bayram KK, Fitremann J, Bayram A, Yılmaz Z, Mehmetbeyoğlu E, Özkul, Rassoulzadegan M. Gene expression of mouse hippocampal stem cells grown in a galactose-derived molecular gel compared to in vivo and neurospheres, *Processes.*, 2021, 9(4), 716.

49. Sun M, Liu A, Yang X, Gong J, Yu M, Yao X, He Y. 3B cell culture can it be as popular as 2d cell culture?, *Adv. Biomed. Res*., 2021, *1(5), 2000066.*

50. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3B cell culture to organs-on-chips, *Trends Cell Biol.*, 2011, 21(12), 745-754.

51. De Dios-Figueroa GT, Aguilera-Marquez JDR, Camacho-Villegas TA, Lugo-Fabres PH. 3B cell culture models in covid-19 times: A review of 3B technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery, *Biomedicines.*, 2021, *9*(6), 602.

52. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *InTech.*, 2018, doi: 10.5772/intechopen.71923.

53. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy, *JHC.*, 1997, *45*(1), 49-53.

54. Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, *21*(8), 3004.

55. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *J. Bacteriol.*, 1976, 127(3), 1529–1537.

56. Qi S, Zheng H, Qin H, Zhai H. Development of a facile and sensitive method for detecting alkaline phosphatase activity in serum with fluorescent gold nanoclusters based on the inner filter effect, *Analyst.*, 2020, 145(11), 3871-3877.

57. Abdollahiyan P, Oroojalian F, Hejazi M, de la Guardia M, Mokhtarzadeh A. Nanotechnology, and scaffold implantation for the effective repair of injured organs: An overview on hard tissue engineering, *J controll release.*, 2021, *333*, 391-417.

58. Yusop AH, Baki AA, Shaharom NA, Abdul Kadir M, Hermawan H. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review. *Int. J. Biomater.*, 2012, 2012:641430.

59. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering, *Biomaterials.*, 2012, 33(26), 6020-6041.

60. Murphy CM, Haugh MG, O'brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.*, 2010, *31*(3), 461-466.

61. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J.Cytotoxicity assays: in vitro methods to measure dead cells. Assay guidance manual, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31070879/, 29 Mayıs 2023.

62. Piras CC, Kay AG, Genever PG, Fitremann J, Smith DK. Self-assembled gel tubes, filaments and 3B-printing with in situ metal nanoparticle formation and enhanced stem cell growth, *Chem Sci*., 2022, 13(7), 1972-1981.

63. Chalard A, Vaysse L, Joseph P, Malaquin L, Souleille S, Lonetti B, Fitremann J. Simple synthetic molecular hydrogels from self-assembling alkylgalactonamides as scaffold for 3B neuronal cell growth, *ACS appl. Mater. interfaces.*, 2018, 10(20), 17004-17017.

64. Fletcher DA Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature.*, 2010, 463(7280), 485-492.

65. Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data, *Biomol. Detect. and Quantif*., 2014, 1(1), 23-33.

66. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments, *J. Vis. Exp.*, 2012, (62), 3923.

67. Estroff LA. Introduction: biomineralization, *Chem rev.*, 2008, 108(11), 4329-4331.

68. Murshed M. Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2018, 8(12), a031229.

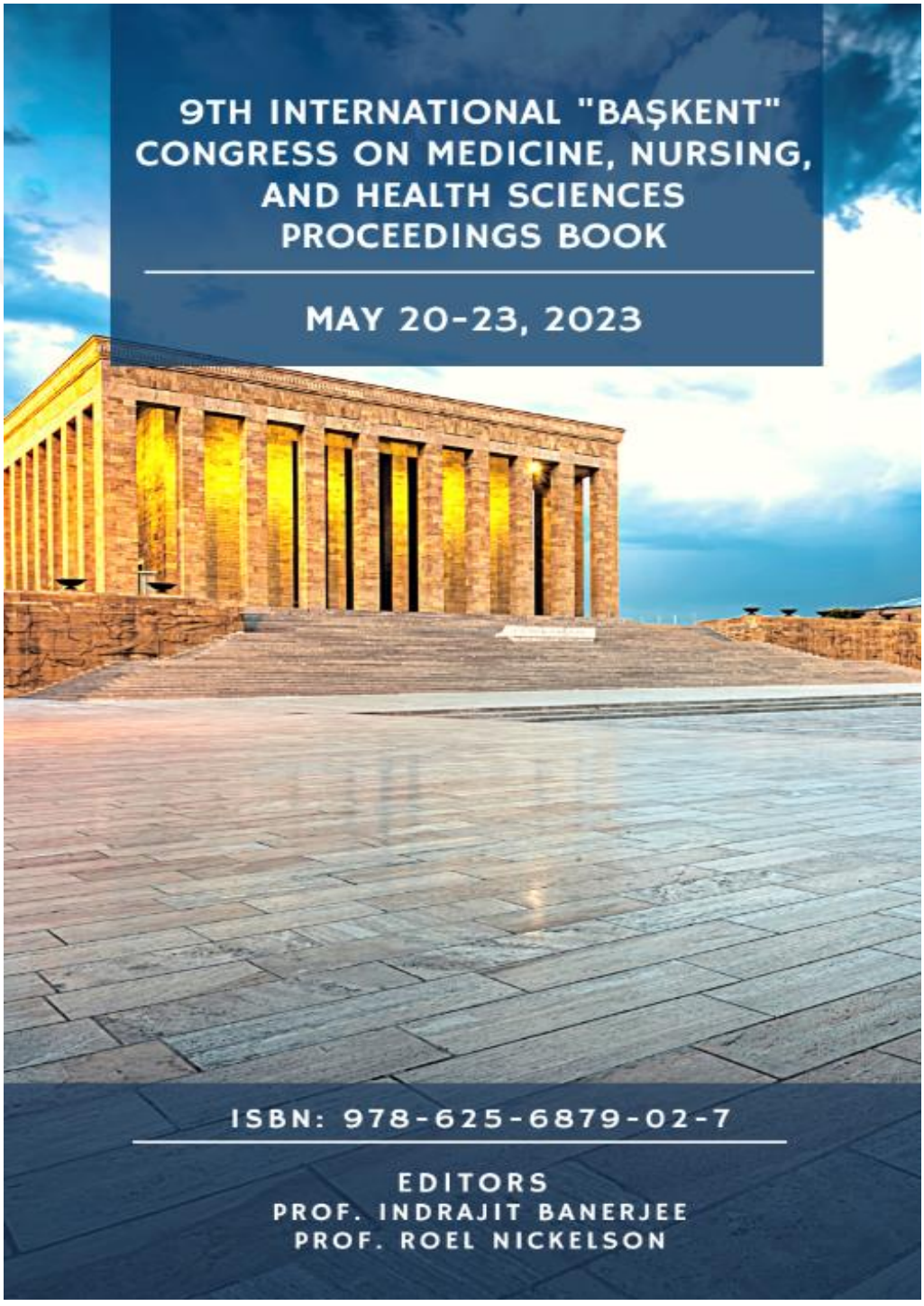
69. Chavez MB, Kramer K, Chu EY, Thumbigere-Math V, Foster BL. Insights into dental mineralization from three heritable mineralization disorders, *J. Struct. Biol.*, 2020, 212(1), 107597.

70. De Souza Castro G, de Souza W, Lima TSM, Bonfim DC, Werckmann J, Archanjo BS, Gemini-Piperni, S. The Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Osteoblasts Mineralization: A Comparison between 2D and 3B Cell Culture Models, *Nanomaterials*, 2023, *13*(3), 425.

71. Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N, Suda H. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells, *Arch. Oral Biol.*, 2014, 59(3), 310-317.

EK-2. Tezden Üretilmiş Sözlü Sunum, Poster Sunumu ve Yayınlar

1. Yalçınkaya S., Demiral A., Güngörmüş M. N-Heptil-D-Galaktonamid (Galc7) Tabanlı Hidrojellerin Sert Doku İskelesi Olarak Kullanım Potansiyellerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi. Sözlü Sunum, 9. Uluslararası "başkent" fen, sosyal ve sağlık bilimleri kongreleri 20-23 Mayıs 2023, Ankara, Türkiye.



EK- 2. (devam)

N-HEPTİL-D-GALAKTONAMİD (GALC7) TABANLI HİDROJELLERİN SERT DOKU İSKELESİ OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN *in vitro* OLARAK İNCELENMESİ

SEMİHA YALÇINKAYA

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Translasyonel Tıp Anabilim Dalı

Orcid id: 0000-0002-5275-9567

AYŞE DEMİRAL

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Translasyonel Tıp Anabilim Dalı

Orcid id: 0000-0001-8547-6558

DR. ÖĞR. ÜYESİ MUSTAFA GÜNGÖRMÜŞ

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü

Orcid id: 0000-0001-8894-0467

ÖZET

Sert doku mühendisliği, hasarlı veya hastalıklı kemik ve kıkırdak gibi dokular için fonksiyonel ikameler geliştirmeyi amaçlayan bir rejeneratif tıp alanıdır. Bu alandaki en önemli zorluklardan biri, doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebilen ve hücre büyümesi ve doku rejenerasyonu için yapısal destek sağlayabilen uygun iskelelerin geliştirilmesidir.

Sitotoksik olmayan yapısı ve lif ve gözenek boyutlarının kolay ayarlanabilmesi nedeniyle N-Heptil-D-Galaktonamid'in (GalC7), sert doku mühendisliği uygulamalarında kullanım potansiyeli olan bir doku iskelesi malzemesidir. GalC7, lifli (fibröz) hidrojel yapılar oluşturabilen amfifilik bir sentetik karbonhidrat türevidir. Daha önce insan nöral kök hücrelerin büyümesini ve nöron ve glial hücrelere farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir. (Bayram vd., 2020; Chalard vd ., 2021) Ancak sert doku mühendisliğine yönelik potansiyeli daha önce değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada, GalC7'nin sert doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanım potansiyeli hücre kültürü ortamında değerlendirilmiştir.

İlk önce sert doku mühendisliği uygulamaları için uygun koşullar olduğu kabul edilen ~300 µm gözenek boyu, ~%70 gözeneklilik oranı ve kendi ağırlığını taşıyabilme özellikleri bakımından hidrojel üretim protokolü optimize edildi. Daha sonra kültür ortamında mineral oluşturabilen Saos-2 hücre hattı kullanılarak sitotoksisite, hücre morfolojisi ve alkalin fosfataz (AP) üretimi açısından incelendi. Sitotoksisite tayini ticari 2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid

EK-2. (devam)

(XTT) hücre canlılık analizi kiti kullanılarak yapıldı. Hücre morfolojisi hücre çekirdeklerinin 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile ve aktin filamanlarının tetrametilrodamin işaretli falloidin ile boyanması ile incelendi. AP üretimi ise p-Nitrofenil Fosfat (pNPP) tabanlı ticari bir kolorimetrik kit kullanılarak incelendi.

Hidrojel optimizasyonunda %3w/v oranında hazırlanan jellerin istenen özellikleri taşıdığı belirlendi. Bu oranda hazırlanan jellerde büyütülen hücrelerde XTT testi sonucunda %92 canlılık oranı elde edilerek sitotoksik bir ekti oluşmadığı gözlemlendi. Floresan boyamada hücrelerin hidrojel liflerine göre yönelim gösterdikleri ve belirgin bir sitoiskelet yapısı oluşturdukları gözlemlendi. Kolorimetrik AP tahlilinde hem indüklenmiş hem de indüklenmemiş jel ortamında ekstraselüler AP miktarının, petri kabında büyütülen hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

GalC7'nin sert doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin ilk defa incelendiği bu çalışmada Saos-2 hücre hattı ile uyumlu olduğu ve mineralizasyonun önemli belirteçlerinden olan AP üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir. Mineral üretebilen diğer hücre hatları kullanılan ve mineralizasyonun gen ekspresyonu seviyesinde incelendiği çalışmalar devam etmektedir. Devam eden çalışmalar sonucunda da olumlu sonuçlar elde edildiği taktirde sert doku mühendisliğinde ideal doku iskelesi özelliklerini büyük ölçüde taşıyan yeni bir malzeme ortaya koyulmuş olacaktır.

Anahtar kelimeler: doku mühendisliği, hücre kültürü, doku iskelesi, GalC7.

1. Bayram, K. K., Fitremann, J., Bayram, A., Yılmaz, Z., Mehmetbeyoğlu, E., Özkul, Y., & Rassoulzadegan, M. (2021). Gene Expression of Mouse Hippocampal Stem Cells Grown in a Galactose-Derived Molecular Gel Compared to In Vivo and Neurospheres. *Processes*, 9(4), 716.

2. Chalard, A., Mauduit, M., Souleille, S., Joseph, P., Malaquin, L., Fitremann, J. 3D printing of a biocompatible low molecular weight supramolecular hydrogel by dimethylsulfoxide water solvent exchange. *Additive Manufacturing*. 2020;33:101162.

in vitro INVESTIGATION OF N-HEPTYL-D-GALACTONAMIDE (GALC7)-BASED HYDROJELS AS POTENTIALS AS HARD TISSUE SCAFFOLDS

Hard tissue engineering is a field of regenerative medicine that aims to develop functional substitutes for damaged or diseased tissues such as bone and cartilage. One of the major challenges in this area is the development of suitable scaffolds that can mimic the natural extracellular matrix (ECM) and provide structural support for cell growth and tissue regeneration.

Due to its non-cytotoxic nature and easy adjustment of fiber and pore sizes, N-Heptyl-D-Galactonamide (GalC7) is a tissue scaffold material with potential for use in hard tissue engineering applications. GalC7 is an amphiphilic synthetic carbohydrate derivative capable of forming fibrous hydrogel structures. It has previously been shown to enable human neural stem cells to grow and differentiate into neurons and glial cells. (Bayram et al., 2020; Chalard et al., 2021) However, its potential for hard tissue engineering has not been evaluated before. In this study, potential of GalC7 in hard tissue engineering applications was evaluated in cell culture medium.

First, the hydrogel production protocol was optimized in terms of ~300 µm pore size, ~70% porosity, and self-supporting properties, which are considered suitable conditions for hard tissue engineering applications. Then, it was examined in terms of cytotoxicity, cell morphology and alkaline phosphatase (AP) production using the Saos-2 cell line, which can form minerals in culture medium. Cytotoxicity assay was performed using commercial 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT) cell viability assay kit. Cell morphology was examined by staining cell nuclei