

**TENDON DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN
POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT) (PGS) TABANLI
ELASTOMERİK MATRİSLER**

**POLY(GLYCEROL-SEBACATE) (PGS) BASED
ELASTOMERIC MATRICES
FOR TENDON TISSUE ENGINEERING**

PELİN DENİZ

DOÇ. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

PELİN DENİZ'in hazırladığı "Tendon Doku Mühendisliği İçin Poli(GliseroI-Sebakat) (PGS) Tabanlı Elastomerik Matrisler" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim VARGEL
Başkan



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
Danışman



Doç. Dr. Memed DUMAN
Üye



Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN
Üye



Doç. Dr. Sedat ODABAŞ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 14.06.2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

14/ 06 / 2018


PELİN DENİZ

Canım Ailem'e



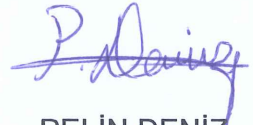
ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/06/2018



PELİN DENİZ

ÖZET

TENDON DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT) (PGS) TABANLI ELASTOMERİK MATRİSLER

PELİN DENİZ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik A.D.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Haziran 2018, 93 sayfa

Tendonlar kasları kemiğe bağlayarak kuvvet iletimini sağlayan dokulardır. Tendon metabolizması yapısal özelliklerini uygulanan mekanik kuvvetlere göre değiştirebilmektedir. Yaralanmalardan sonra tendonun sahip olduğu doğal iyileşme mekanizması dokunun tam olarak onarılmasında yetersizdir. İnsan tendon dokusunda oluşan hasarlar ve dejeneratif hastalıklar insanın günlük yaşantısında fonksiyon kaybına ve şiddetli ağrılara sebep olmaktadır. Başarılı tendon dokusunun geliştirilmesinin anahtarı, ortamın dinamiklerini in vivo olarak taklit eden kültür ortamının sağlanmasıdır. Bu nedenle, tendon doku mühendisliğinde uygun koşullar yaratmak için biyoreaktörler kullanılır. Tendon doku mühendisliği alanındaki doğal greft kullanmanın zorluğu araştırmacıları biyolojik olarak bozunabilen ve biyouyumlu sentetik bazlı doku iskeleleri geliştirmeye yöneltmiştir. Poli(gliserol-sebakat) (PGS) çeşitli biyomedikal uygulamalarda giderek artan şekilde kullanılan biyolojik olarak parçalanabilir, elastomerik bir polimerdir. Bu tez çalışması ile uygulanan mekanik stimülasyonun, tenositlerin PGS doku iskelelerine proliferasyonunun arttırılmasıyla progenitör tendon yapısının geliştirilmesi amaçlanmıştır. PGS polimerinin sentez aşaması prepolimerizasyon ve kürlenme aşamalarından oluşmaktadır. Prepolimerizasyon aşamasında polimerin yapısına giren monomerler, 1 dakika x 5

kez ve 10 saniye aralıklarla mikrodalga fırın içerisinde mikrodalga ışımasına maruz bırakılmıştır. Kürlenme basamağında ise elde edilmiş prepolimer halindeki viskoz sıvının, vakumlu etüv içerisinde 10,5 saat boyunca (50 mbar, 150 °C) apraz bağlanması sağlanmıştır. alışmalar sonucu optimize edilen poli(gliserol-sebakat) doku iskelesine hücre ekilmiş daha sonra durağan kültürden, biyoreaktör tabanlı dinamik kültüre aktarılmıştır. Bu tez çalışması, mekanik stimülasyonun, tenositlerin PGS iskelelerine proliferasyonunu artırarak progenitör tendon yapısını ve mekanik özellikleri geliştirdiğini göstermeyi amaçlamıştır. 12şer günlük hücre kültür çalışmaları yapılmış olup, 4., 7. ve 12. günler için taramalı elektron mikroskobu, canlı/l boyama, GAG/DNA analizi gibi karakterizasyon yöntemleri ile incelenmiş, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak gen ekspresyonu incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Poli(gliserol-sebakat), Biyoreaktör, Mekanik Stimülasyon, İnsan Tenositi, Doku Mühendisliği

ABSTRACT

POLY(GLYCEROL-SEBACATE) BASED ELASTOMERIC MATRICES FOR TENDON TISSUE ENGINEERING

PELİN DENİZ

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

June 2018, 93 pages

Tendon have an important function in transferring force from muscle to bone. Tendon metabolism can change the structural properties according to the applied mechanical forces.. The natural healing mechanism after the injuries it is inadequate for the complete repair of tendon tissue. Damage to tendon tissue causes loss of function and severe pain in daily life. In other words, the key to successful tendon tissue development is the provision of a culture medium that mimics the dynamics of the in vivo environment. For this reason, bioreactors are used to create suitable conditions in tendon tissue engineering. The difficulty of using natural grafts in the area of tendon tissue engineering has led researchers to develop biodegradable and biocompatible synthetic based tissue scaffolds. Poly (glycerol sebacate) (PGS) is a biodegradable polymer that is increasingly used in a variety of biomedical applications. This study aimed to show that mechanical stimulation improves progenitor tendon structure and mechanical properties by increasing proliferation of tenocytes to PGS scaffolds. The synthesis phase of the PGS-based elastomer is composed of pre-polymerization and curing steps. In the prepolymerization step, the petri dish was weighed at a suitable scale and then placed in a microwave oven (Midea, China). The mixture to be prepolymerized was exposed to microwave

radiation in a microwave at 650 W in medium/high setting for 1 minute x 5 times with 10 seconds intervals. In the curing step, a vacuum oven was used for 10,5 hours in order to cross-link the obtained prepolymer liquid (50 mbar, 150 °C). Optimized poly(glycerol-sebacate) scaffolds were cultured and then transferred to a dynamic culture based on a bioreactor from stationary culture. Cell culture studies were carried out for 12 days and examined by characterization methods such as scanning electron microscopy, live/dead staining, GAG/DNA analysis for days 4th, 7th and 12th. In addition, gene expression was examined using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Keywords: Poly(glycerol-sebacate), Bioreactor, Mechanical Stimulation, Human Tenocyte, Tissue Engineering

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresi boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, çalışma azmini ve yol göstericiliğini hayatım boyunca örnek alacağım değerli bilim insanı, danışman hocam Doç. Dr. Halil Murat Aydın'a çok teşekkür ederim.

215M071 nolu "Kornea Doku Mühendisliği için Yenilikçi Sentetik ve Deselülerize Matrikslerin Hazırlanması" adlı ve 215S835 nolu "Üretan-Seramik Tabanlı Kompozit Orbital İmplantların Geliştirilmesi" adlı proje kapsamında beni destekleyen ve çalışmam boyunca bana burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve desteklenmesinde çok büyük katkıları olan BMT Calsis Ailesi'ne ve Levent Mete Özgürbüz'e;

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan, elinden gelen desteği benden esirgemeyen ve dostluklarını her zaman hissettiğim Arş. Gör. Selcan Güler ve Arş. Gör. Ekin Çelik'e;

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve arkadaşlıklarını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım; Pezhman Hosseinian, Bengisu Topuz, Gülçin Günel Karataş, Atakan Tevlek, Muhanned Almemar, Abdulraheem Alya, Meryem Erken, Merve Cicioğlu ve Dilara Türkel'e;

En zor zamanlarda hep yanımda olduğunu bildiğim, yıllara meydan okuyan dostluğumuz için Eser Ilgıt'a, içimdeki bilim ışığının sönmemesi için beni her koşulda cesaretlendiren ve desteğini göstermekten çekinmeyen bilim aşığı canım dostum Dilek Şura Özden Dinç'e, mutluluklarımı ve üzüntülerimi paylaşarak beni hiç yalnız bırakmayan, hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim canımın içi bitanecik dostum Sevim Eda Öğüt'e, Beytepe kampüsünün bana kazandırdığı en güzel insanlardan biri olan Bedri Okan Yarman'a, içtenlik ve samimiyet bir insan olsaydı kesinlikle o olurdu dediğim Meltem Aydın'a, iyi ki var iyi ki tanıdığım dediğim güzel insan Altay Koyaş'a, zor geçen zamanlarımda ayağa kalkarak, kendime gelmemi sağlayan ve kahve aşığı olmamın sebebi canım arkadaşım Deniz Sarp Özdi'e, Biyoloji bölümünün bana kazandırdığı güzel insanlar Seda Avcı, Cihan Değirmenci ve Duygu Deniz Kazancı'ya, yüksek lisans zamanımın en eğlenceli zamanlarını beraber geçirdiğim Can Ataoğlu'a, Kimya Mühendisliği'nin bana hediyesi güzel insanlar Utku Tanrıvere, Cem Menten ve Aslı Ünal'a ve yardımları için Arito Soto'ya,

Ankara'nın bana en güzel hediyesi, zor zamanlarımda en yakın tanıdığı, en iyi dostum ve yol arkadaşım Eray Uçgun'a ve beni aralarına dahil ederek benden sevgilerini esirgemeyen, her koşulda destek olan Emsal Uçgun ve Hasan Hüseyin Uçgun'a,

Hayatta bana verilen en büyük şansım olan ve bugünlere gelmemdeki en büyük payı olan canım ailem, annem Süeda Ahu Deniz, babam Yasin Deniz, kardeşim Deha Ali Deniz'e;

TÜM KALBİMLE TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tendon.....	3
2.1.1. Tendon Yapısı ve Bileşimi	4
2.1.2. Tendon Fizyolojisi ve Biyomekaniği	8
2.2.Tendon Hastalıkları ve Tedavi Yöntemleri	11
2.3. Biyomalzemeler.....	16
2.4. Doku Mühendisliği	18
2.5. Tendon Doku Mühendisliği.....	19
2.6.Tendon Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri.....	19
2.6.1. Doğal Doku İskeleleri	19
2.6.2. Biyolojik Doku İskeleleri	21
2.6.3.Sentetik Doku İskeleleri	22
2.7. Poli(gliseryl-sebakat).....	23
2.8. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyoreaktörler	24
2.8.1. Tanım ve Çeşitleri	24
2.8.2. Tendon Doku Mühendisliğinde Reaktör Kullanımı	26
2.9. RT-PCR (Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	28
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Doku İskelesinin Sentezi	30
3.1.1. Poli(gliseryl-sebakat) Doku İskelesi Hazırlanması	30
3.2. Doku İskelesi Karakterizasyon Yöntemleri	31
3.2.1.Degradasyon Testi.....	31
3.2.2. FT-IR Analizi	31
3.2.3. SEM Analizi	32

3.2.4. ¹ H-NMR (Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans) Analizi.....	32
3.2.5. DSC Analizi.....	32
3.2.6. Üniversal Mekanik Çekme Testi	32
3.2.7. Temas Açısı Ölçümü.....	33
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.3.1. Doku İskelesi Sterilizasyonu ve Durağan Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.3.2. Biyoreaktör Sterilizasyonu ve Dinamik Kültür Çalışmaları	36
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları Karakterizasyonu	38
3.4.1. Tenosit Karakterizasyonu	38
3.4.2. SEM Analizi	38
3.4.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	38
3.4.4. İn Vitro Sitotoksosite Testi.....	39
3.4.5. RT-PCR Çalışmaları	40
3.4.6. Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Analizi	44
3.4.7. DNA Miktarı Analizi	45
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1.Doku İskelesi Karakterizasyonu	46
4.1.1. Degradasyon Testi.....	46
4.1.2. FTIR Analizi	47
4.1.3. SEM Analizi	49
4.1.4. ¹ H-NMR Analizi	49
4.1.5. DSC Analizi.....	50
4.1.6. Üniversal Mekanik Çekme Testi	51
4.1.7.Temas Açısı Ölçümü.....	52
4.2.Hücre Kültürü Çalışmaları	52
4.2.1. Tenosit Karakterizasyonu	52
4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	54
4.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	59
4.2.4. İn Vitro Sitotoksosite Testi.....	62
4.2.5. RT-PCR (Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi	63
4.2.6. Glikozaminoglikan Miktarı Analizi.....	66
4.2.7. DNA Miktarı Analizi	67
5.GENEL SONUÇLAR	69
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	82

ÖZGEÇMİŞ	93
----------------	----



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Biyoreaktör çalışma parametreleri	34
Çizelge 3.2. Biyoreaktör/ hücre kültürü çalışma planı	37
Çizelge 3.3. RT-PCR çalışmaları için deney şeması.....	41
Çizelge 3.4. RT-PCR çalışması için kullanılan primer sekansları.....	43
Çizelge 4.1. PGS doku iskelesi çekme testi sonuçları (n=3) (σ_M :Çekme Mukavemeti, ϵ_M : Çekme mukavemetinde kopma uzaması, E_T : Young Modülü, MPa).....	51



ŞEKİLLER

Şekil 2.1. El tendon anatomisi (ET: ekstensör tendon, FT: Fleksör tendon)	4
Şekil 2.2. Tendonun histolojik yapısı	5
Şekil 2.3. Tendon gerilme-gerinim eğrisi	11
Şekil 2.4. Tendon iyileşme evreleri	14
Şekil 2.5. PGS polimeri sentez şeması	24
Şekil 2.6 Polimeraz zincir Reaksiyonu	29
Şekil 3.1.Mekanik çekme testi esnasındaki PGS doku iskelesi görüntüleri	33
Şekil 3.2. A) Sentez işlemleri tamamlanmış PGS polimeri. B) Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanmış PGS polimeri	35
Şekil 3.3. TC-3 modeli mekanik stimüle edici biyoreaktör.	36
Şekil 3.4. Malzeme yerleştirilmesi ile kurulumu tamamlanmış, çalışmaya hazır biyoreaktör	37
Şekil 4.1. PGS doku iskelesine ait degradasyon testi grafiği (n=4)	47
Şekil 4.2. 5 kez x 1 dk prepolimerizasyon işlemi yapılmış PGS polimeri FTIR analizi	48
Şekil 4.3. 5 kez x 1 dk prepolimerizasyon işlemi yapılmış ve 10.5 saat kürlenme aşaması tamamlanmış PGS polimeri FTIR analizi	48
Şekil 4.4. Hücre ekimi yapılmamış PGS doku iskelesi SEM görüntüleri A)1000X B) 5000X	49
Şekil 4.5. PGS elastomeri ¹ H-NMR spektrumu	50
Şekil 4.6.PGS elastomerinin termal özelliklerini belirleyen DSC termogramı	50
Şekil 4.7. Mekanik çekme testinde PGS doku iskelesine ait % gerilme-kuvvet grafiği	51
Şekil 4.8. İnsan tenositlerinin (P3) faz-kontrast mikroskobu ile incelenen görüntüleri	53

Şekil 4.9. PGS doku iskeleleri üzerindeki tenositlerin boyutları karşılaştırılmalı histogram grafiği	53
Şekil 4.10. PGS doku iskeleleri üzerindeki tenosit sayılarının karşılaştırmalı histogram grafiği	54
Şekil 4.11. PGS doku iskeleleri 4. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X.....	56
Şekil 4.12. PGS doku iskeleleri 7. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/ Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X	57
Şekil 4.13. PGS doku iskeleleri 12. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/ Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X	58
Şekil 4.14. PGS doku iskelelerine ait 4. gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X	60
Şekil 4.15. PGS doku iskelelerine ait 7. gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X	60
Şekil 4.16. PGS doku iskelelerine ait 12 gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X	61
Şekil 4.17. PGS doku iskelesi sitotoksiste grafiği	62
Şekil 4.18. Dinamik ve durağan kültür arasındaki TNC-1 gen ifadesi farkını gösteren histogram grafiği	64
Şekil 4.19. Dinamik ve durağan kültür arasındaki TNC-2 gen ifadesi farkını gösteren histogram grafiği	65

Şekil 4.20. Dinamik ve durağan kültür arasındaki TNMD gen ifadesi farkını gösteren histogram grafiği	65
Şekil 4.21. Dinamik ve durağan kültür arasındaki GAG miktarı farkını gösteren histogram grafiği	67
Şekil 4.22. Dinamik ve durağan kültür arasındaki DNA miktarı farkını gösteren histogram grafiği	68



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	Santimetre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mL	Mililitre
mbar	Milibar
µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
M	Molar
mM	Milimolar
°C	Santigrat derece
r	Yarıçap

Kısaltmalar

DNA: Deoksiribonükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

GAG: Glikozaminoglikan

ECM: Ekstraselüler Matriks

PLLA: Poli(L-laktat)

PCL: Polikaprolakton

PGS: Poli(gliserol-sebakat)

DMEM: Dulbecco Modified Eagle's Medium

FBS: Fetal Sığır Serumı

AA: Antibiyotik-Antimiyotik

SEM: Taramalı Elektron Mikroskopu

FTIR: Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi

DSC: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

DHT: Dehidrotermal Yöntem

RT-PCR: Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

UV: Ultraviyole

HMDS: Hekzametildisilazan

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür

cDNA: Komplementer DNA

COL1-A1: Kolajen 1-A1 Geni

COL3: Kolajen 3 Geni

ACTB: Beta- aktin Geni

Tnmd: Tenomodulin Geni

TnsC: Tenaskin-C Geni

1.GİRİŞ

Tendonlar, ekstraselüler matriste gömülü paralel kolajen liflerinden oluşan yumuşak bağ dokularıdır. Bu organize yapı, tendonların kas ve kemik arasında büyük kuvvetlere dayanması ve iletmesini sağlar. Tenositler, sıkı bir şekilde düzenlenmiş tendon ekstraselüler matriks (ECM) üreten ve regüle eden son derece türemiş hücrelerdir. Normal tendon doku hacminin sadece %5'i tenositler, %95'i ECM ile temsil edilmektedir. Tendon ECM'si paralel çalışan kolajen fibrillerinden oluşur ve normal tendonda kolajenin yaklaşık %95'i tip I'dir. Bununla birlikte, tendonlar zamanla tekrarlanan hareket ve dejenerasyona maruz kaldıklarından hem akut hem de kronik yaralanma eğilimi gösterirler. Yaralanmadan sonra tendon iyileşmesi, fonksiyonel olarak daha düşük seviyede bir onarım dokusu olarak yara oluşumuna yol açan zaman alıcı bir süreçtir.

Tendon yaralanmaları önemli morbiditeye neden olur ve hastalar birkaç ay veya daha uzun süre etkisiz hale gelir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, tendon ve bağlara yönelik yaralanmalar 33 milyon kas-iskelet sistemi yaralanmasının yaklaşık yarısını temsil etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 33.000'den fazla tendon rekonstrüksiyonu gerçekleşmekte ve 30 milyar ABD dolarına mal olmaktadır. Avustralya'da rotator manşet tamiri için yılda 250 milyon dolar harcanmaktadır. Bununla birlikte, tendon hasarı ve ilişkili tendinopatinin dünya genelindeki yaygınlığının yüksek olmasına rağmen, tedavi seçenekleri zayıf olarak tanımlanmıştır. Yara izleri, dağınık bir ECM ile karakterizedir, çevresel tendon yapışmalarına neden olur ve bu nedenle eski yaralı bölgede azalmış tendon stabilitesi ve esneklik ile sonuçlanır. Hiposelüler histolojik yapı, zayıf kan kaynağı ve tendonların bradiyotropik metabolizması, tendonun kendi kendine iyileşme özelliklerinin sınırlılığının ana nedenidir.

Otogreft ve allogreft transplantasyonları, yaralanan veya dejenere olmuş tendon ve ligamentlerin sık görülen cerrahi tedavisidir. Bu tedavilerin dezavantajı olarak otogreftlerin alındığı verici bölgenin hasarlanma riskleri ve allogreftler için olası bağışıklık reaksiyonları örnek verilebilmektedir. Tendon yaralanması veya dejenerasyonunun tedavisine umut verici translokasyon yaklaşımı, *in vitro* olarak tendon dokusu üreten biyoreaktörlerin geliştirilmesi yoluyla elde edilen mühendislik otolog greftlerin kullanımı yoluyla yapılmaktadır. Başarılı bir tendon doku

geliştirmenin anahtarı ise *in vivo* ortamın dinamiklerini taklit eden kültür ortamın sağlanması olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir.

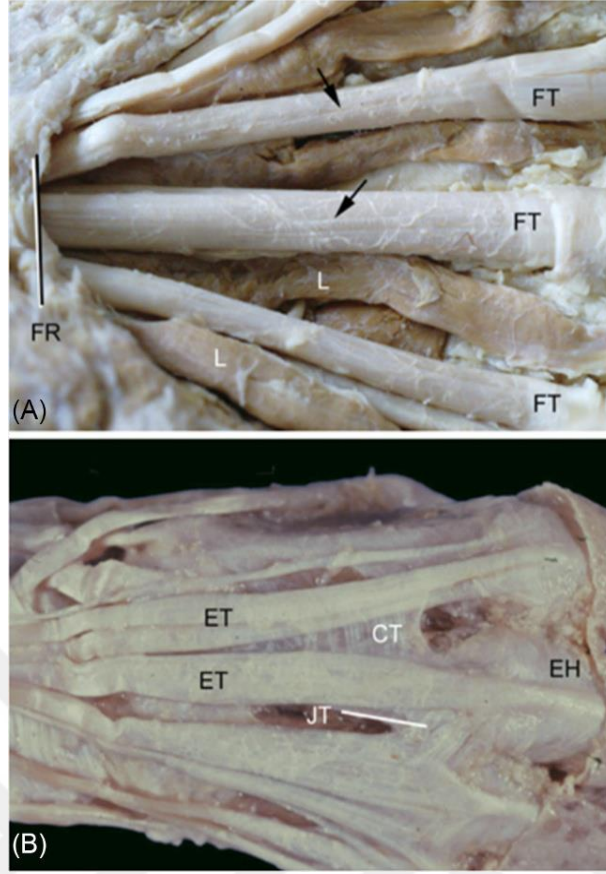
Tendon doku mühendisliği çalışmalarında mekanik stimülasyonun hücre proliferasyonu ile gen ifadesini arttırdığı, öncül tendon yapısını ve mekanik özelliklerini geliştirdiği gösterilmiştir. Bu tez çalışması ile uygulanan mekanik stimülasyonun, tenositlerin PGS doku iskelelerine proliferasyonunun arttırılmasıyla birlikte progenitör tendon yapısının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında tendon doku mühendisliği için doğal tendon yapısına uygun olabileceği düşünülen poli(gliserol-sebakat) doku iskelesi üretilmiştir. Elde edilen elastik yapılı doku iskelesi *in vitro* koşullarda insan tenositleri ile kültüre edilmiş ve kültürün optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimize edilen hücre ekilmiş poli(gliserol-sebakat) doku iskeleleri daha sonra durağan kültürden, biyoreaktör tabanlı dinamik kültüre aktarılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları 12 gün sürmüş olup, 4., 7. ve 12. günler için taramalı elektron mikroskobu, canlı/l boyama, GAG/DNA analizi gibi karakterizasyon yöntemleri uygulanmış, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak gen ekspresyonu incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tendon

Tendon, kas ve kemik arasında bağlantı sağlayan fibröz yapıdaki yumuşak doku çeşididir. Görevi ise kas ve kemik arasındaki güç aktarımına izin vererek eklem hareketlerinin oluşmasını sağlamaktır. Bu durum eklemleri kararsız durumlardan koruyarak vücut postürünün dik olarak muhafaza edilebilmesine olanak sağlamaktadır [1]. İnsan popülasyonunun yaşı ve artan yaşam temposuna bağlı nedenlerden dolayı yaklaşık %25'i tendon kaynaklı rahatsızlıklar yaşamaktadır. Dünya çapında 30 milyonu aşkın tendon sebebiyle tedavi ihtiyacı, sağlık hizmetlerinde 140 milyar dolarlık masrafa neden olmaktadır [2].

Tendonlar canlı dokulardır ve bundan dolayı mekanik özelliklerini ve yapılarını uygulanan mekanik kuvvetlere göre değiştirebilmektedir. Örneğin uygun fiziksel antrenman sonucu, tendon dokusu bu duruma yanıt olarak kesit alanını arttırarak çekme dayanımını yükseltir ve kolajen 1-A1 seviyesini arttırır [3]. Bağlantı sağladıkları kas ve kemik gruplarının konumlarına, özelliklerine ve enerji ihtiyaçlarına göre özelleşmektedir. İnsan aşil tendonu, hareket işlevine ek olarak dokuda enerji depolanması konusunda özelleşmiştir [4].

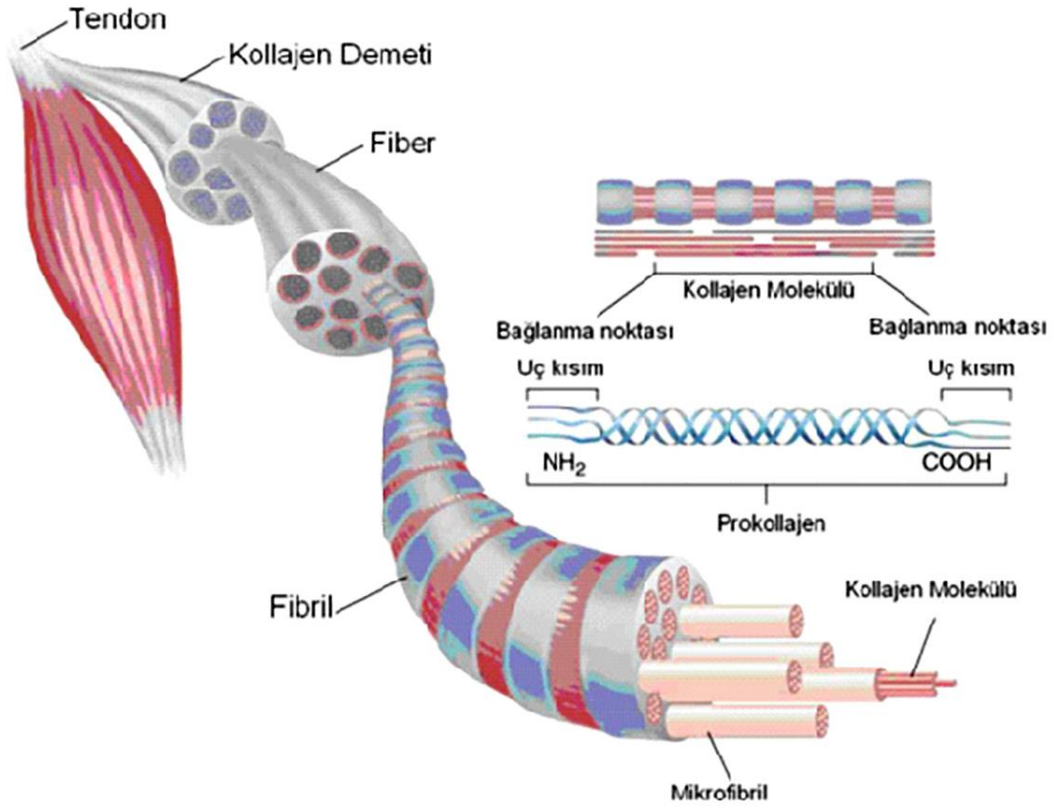


Şekil 2.1. El tendon anatomisi (ET: Ekstensör tendon, FT: Fleksör tendon) [5].

Tendonun ana bileşeni, ıslak ağırlığının %55-70'ini oluşturan sudur. Tendon ekstraselüler matriksinin temel bileşeni olan kolajen ise kuru ağırlığının %60-80'ini oluştururken, kuru ağırlığın geri kalanını %1-5 arasında proteoglikanlar ve %2 elastin proteinleri oluşturmaktadır [6]. Tendon; yüksek oranda hizalı bir yapıya sahip olan kolajen liflerinden ötürü belirli bir hiyerarşik yapıya sahiptir. Bu yapı, uzunlamasına bir biçimde mekanik eksene paralel bir şekilde düzenlenmektedir ve bu durum tendonu yüksek gerilim kuvvetlerine dayanıklı bir hale getirmektedir [7].

2.1.1. Tendon Yapısı ve Bileşimi

Tendon, uzunlamasına paralel olarak yapılanmış kolajen molekülleri, fibriller, lif demetleri, fasiküller ve tendon birimlerinden oluşan çok üniteli hiyerarşik bir yapıya sahiptir [8]. Mikroskopik açıdan incelenecek olursa tendon kıvrımlı yapısı, mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin daha küçük kıvrım açısına sahip olan tendon lifleri, büyük açığa sahip olanlara göre dayanıklılık daha zayıftır [3].



Şekil 2.2. Tendonun histolojik yapısı [9]

Tendonun en küçük yapısal birimi olan fibriller, büyük ölçüde çubuk şekilli kolajen moleküllerinin uçtan uca belirli aralıklarla sıralanarak bir dizi oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Fibril boyutları türe, yaşa ve örnek lokasyonuna bağlı olarak 10 ile 500 nm arasında değişmektedir. Bir sonraki seviyedeki tendon yapısal formuna, lif adı verilir. Lifler, kolajen fiberlerin bir araya gelmesiyle oluşur ve kan damarlarını, lenfleri ve sinirleri içeren endotendon adı verilen bağ doku katmanıyla birbirine bağlanır [10]. Endotendon, kolajen demetlerini çevreleyen gevşek bağ dokusunun bir ağıdır. Endotendon demetleri bir arada tutmakta ve demetlerin birbirlerine göre hareket etmesini sağlamaktadır [11]. Lif demetlerinin bir araya gelmesiyle bir sonraki seviye olan fasiküller meydana gelmektedir. Fasikül demetleri, tendonun vasküler ve lenfatik olarak beslenmesini sağlayan epitendon katmanı ile çevrelenmiştir. Epitendon 8-10 nm boyutundaki iplikçiklerden oluşan yoğun fibriller bir kolajen ağıdır [10]. İnce bir bağ dokusu kılıfı epitendon, iç yüzey boyunca endotendon ile devamlı olup, tüm tendonu çevreler [11]. Buna ek olarak

tendon, en dışta paratendon adı verilen üçüncü bir bağ doku ile çevrilidir. Bu katman tendonu çevreleyen gevşek, yağlı, iri bir dokudan oluşur, sinirler ve kan damarları onu geçer. Paratendonun iç yüzeyi sinoviyal hücreler tarafından astarlanmıştır ve epitendon ile arasındaki sinoviyal sıvı varlığı katmanlar arası sürtünmeyi önler. Bu bağ dokunun ana bileşenleri ise tip I ve tip III kolajen fibriller ve elastik fiberlerdir. Mukopolisakkaritler açısından zengin olan bu katman, kolajen lif sistemlerinin oluşumunu desteklemektedir [3, 10].

Proteoglikanlar, bir ya da daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zincirinin kovalent olarak bağlandığı küçük protein çekirdeğinden oluşur ve dokunun mekanik özelliklerini geliştirmektedirler. GAG zincirleri negatif yüklüdür, bu durum nedeniyle çevresindeki iyonları kendisine çekmesinden dolayı oluşturduğu osmotik dengesizlikle, çevredeki suyun GAG'lara çekilmesine sebep olmaktadır. Proteoglikanlarda negatif yüklüdür, hidrofiliktir. Genelde kolajen fibriller ve lifler arasında bulunurlar. Buna ek olarak proteoglikanlar suda çözünür yapılarından dolayı moleküllerin difüzyonunu kolaylaştırır ve hücre göçünde aktif rol oynarlar. Dokudaki proteoglikan miktarı, tendonun maruz kaldığı kuvvete göre değişiklik göstermektedir, bu içerik kompresyona direnmede rol oynayan faktörün proteoglikanlar olduğu düşünülürse, sıkışmaya maruz kalan alanlarda daha yüksek oranda gözlenmektedir. GAG zincirlerinin negatif yüke sahip bölgeleri ise kolajen molekülleri üzerinde pozitif bölgelere bağlanarak dokunun mekanik stabilitesine katkıda bulunmaktadır [12]. Hyalüronan ise uzun bir GAG zinciridir. Bu kompleks yapı sıkışmaya hareketine direnç göstermek için doku içinde osmotik basınç yaratarak, kolajen doku üzerinde şişme baskısı yaratmaktadır. Dekorin ise tendon dokusunda en çok bulunan proteoglikandır ve tüm kolajen tiplerine bağlanabilmektedir. Fibroblastlar, kondrositler ve endotel hücreleri tarafından çekme yüküne karşı tepki olarak üretilir [13]. Bir başka proteoglikan ise fibromodüldür. Bu proteoglikan fibrilogenезin modülatörü olarak görev almaktadır. Genetik açıdan tendonda yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Dekorin, fibromodülün üretiminin gerçekleşmesi için tip I kolajene bağlanmaktadır ve böylece büyük fibrillerin oluşumunu teşvik etmektedir. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda fibromodülünün transforme edici büyüme faktörü olarak adlandırılan TGFβ'ya bağlandığı gözlemlenilmiştir [12]. Agregan ise dokuların sıkışmaya karşı mekanik özelliklerini arttırmak için üretilen bir başka proteoglikandır. Mekanik direnci

arttırmak amacıyla ekstraselüler matriksin (ECM) içinde su tutulmasına yardımcı olmaktadır [14].

Bunlara ek olarak tendon dokusu fibronektin ve tenaskin-C adı verilen glikoproteinleri de içermektedir. Kolajenin üzerine yapışık şekilde konumlanan fibronektin, tendon rejenerasyonu ve onarımıyla ilgili olarak üretilmektedir [15]. Tenaskin-C ise hem kolajen fibilleri hem de bir proteoglikan dekorin ile etkileşerek, tendon dokusu ECM'sinin mekanik stabilitesine katkıda bulunan ECM ağı oluşumunda yer almaktadır. Tenaskin-C ağır mekanik etkilere maruz kalan ve elastikiyet gerektiren bölgelerde bulunmasına rağmen, sağlıklı kas dokusunda net olarak ifadesi gözlemlenmemektedir [16]. Bir diğer tendon komponenti olan glikoprotein ise elastin, tendon kuru içeriğinin %2'sini oluşturmaktadır [17].

Moleküler açıdan incelenecek olursa tendon dokusunda en bol miktarda bulunan bileşen kolajen tip I'dir. Bu bileşen tendon kuru kütlesinin %60'ını oluştururken, tendon kolajen içeriğinin yaklaşık olarak %95'ini oluşturur [18]. Tendon içeriğinin kalan %5'lik kısımda ise tip III ve tip V kolajen bulunmaktadır. Doku geneline bakılacak olursa II, VI, IX, X, XI tip kolajenler tendon yapısında iz miktarda bulunmaktadır [19]. Tip I kolajen molekülleri kendiliğinden olajen lifleri oluşturan, yüksek oranda organize fibrillerdir. Matrikste bulunan kolajenlerin çapraz bağlı olması dokuya direnç kazandırarak mekanik kuvvetlere daha dayanıklı hale getirir. Tip III kolajen ise fibril oluşturmaya rağmen daha küçük ve daha az organize [20].

Tendon dokusundaki hücre içeriği oldukça düşüktür. Dokunun temel olan iki tip hücresi vardır. Bu hücreler tenositler ve tenoblastlardır. Her iki hücre de mezenkimal kökenlidir. Tenoblastlar olgunlaşmamış tendon hücreleridir. İğ şekilli olup, sitoplazmalarında yüksek metabolik aktivitelerini yansıtan sayısız organel gözlemlenebilmektedir. Tenoblastlar, tendonda baskın hücre türüdür, bu hücre yapılarının fibroblastik bir morfoloji yapısına dönüşerek, daha düşük sitoplazma ve çekirdek oranına ve metabolik aktiviteye sahip olmasıyla tenosit haline olgunlaşmaktadır [21]. Olgun tenositlerin boyutları 80-300 µm arasında değişmektedir. Kolajen zengin matriks arasında yaygın şekilli olarak gömülü halde bulunur. Tenositler çok farklı oranda proliferasyon gösterirler ve kolajen liflere bağlı olarak doku boyunca dağılım göstermektedirler. Tenositlerin mekanik uyarılara

yanıt olarak kolajen ve proteoglikanlar gibi bileşenlerin sentezi yoluyla ECM'yi yeniden şekillendirmek ve muhafaza etmek gibi görevleri vardır [22]. Tendon dokusunda farklı lokasyonlara göre tenosit farklılaşması gözlemlenebilmektedir. Tendon dokusunda daha az miktarda gözlemlenebilen diğer hücreler ise progenitör hücreler, endotel hücreler, sinoviyal hücreler ve kondrositlerdir [23]. Buna ek olarak normal tendon dokusunda mevcut olan miyofibroblast benzeri bir alt hücre popülasyonu da bulunmaktadır. Bu hücreler kas-tendon kompleksinin kasılma-gevşeme parametrelerini ayarlamakla görevlidir [24].

2.1.2. Tendon Fizyolojisi ve Biyomekaniği

Tendonların çeşitli mekanik stres türlerine direnme özelliği doğrudan ekstraselüler matriksin yapısal düzenine bağlıdır. İn vivo olarak maruz kaldıkları dinamik ve mekanik kuvvetler, tendonların lif desenlerinin ve viskoelastik özelliklerinin gelişip değişmesine sebep olmaktadır. Bu özellikleri temelde kuvvetlere maruz kalan kolajen moleküllerinin bağlanma biçimi ve bu moleküllerin diğer ekstraselüler matriks elemanlarıyla olan ilişkisi belirlemektedir. Farklı biyomekanik güçler aynı tendon üzerinde farklı organizasyon-kompozisyon farklılıklarına sebep olabilmektedir. Tek bir yönde gerilimin uygulandığı alanlarda ise lifler düzgün ve tek yönlü bir yapı göstermektedir.

Mekanik yük yeni mekanik talepleri karşılayacak şekilde yapısal düzeni değiştirerek, strese tepki veren dokunun fizyolojik uyarlanmasına yol açar. Mekanik stimülasyon bağ dokusundaki ekstraselüler matriksin homeostazi için önemlidir çünkü ekstraselüler matriksin spesifik proteinlerinin ekspresyonunu etkilemektedir. Bu nedenle hücrelerin proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek mekanik stresle aktive olan sinyallere tepki verdikleri ve dolayısıyla ekstraselüler matriksi biyomekanik ihtiyaçlara adapte etmek için yeniden şekillendirdikleri bir geri bildirim mekanizması oluşmaktadır. Buna ek olarak hücre dışı matriksin miktarı ve bileşimi, sadece dokuya gönderilen mekanik stresin tipi ve büyüklüğü tarafından değil aynı zamanda endojen hücresel programlar ve büyüme faktörleri tarafından da kontrol edilir [3]. Tendon hücreleri perikardiyal kıkırdağın periselüler matriksine benzer şekilde mekanotransformasyonunda önemli bir rol oynayan özel bir periselüler matrikste bulunur. Bu matriks uygulanan mekanik stres sonucu hücre dışı matriksin deformasyonu, tendon hücrelerine belirle seviyede basma ve çekme, kayma-gerilim

kombinasyonunu iletir. Tendonda siklik gerilme yüküne yanıt olarak intersitiyel sıvı akışının artışı tendon hücrelerinde basıncın artışına neden olmaktadır. Hücreler üstündeki bu doku ve ekstraselüler matriks bileşimi, uygulanan kuvvetlerin büyüklüğü, sıklığı, süresi gibi parametrelere bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Bu parametrelere tendon tipi, yaş, cinsiyet, hastalık gibi biyolojik etmenlerde dahildir [25].

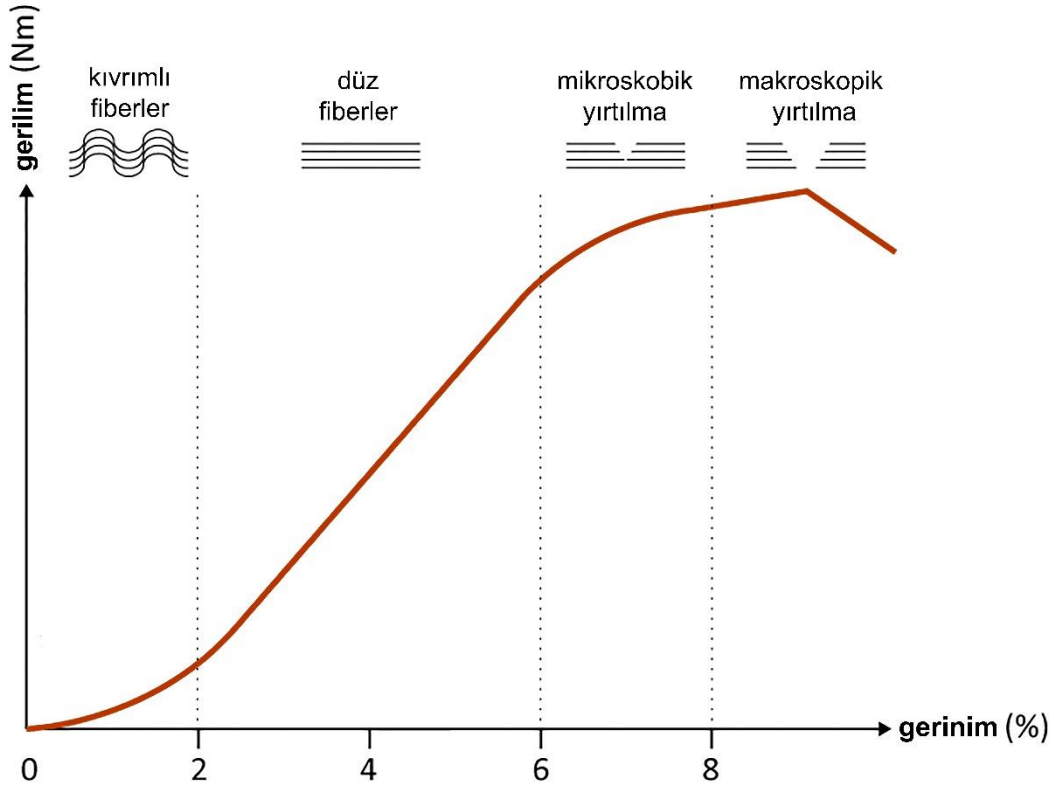
Ekstraselüler matriks ve hücreler arasındaki etkileşim hücre içi sinyalizasyonun aktivasyonu ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini indükler. Bu durumun temel mekanizması tam olarak çözülemese de hücre zarı dışındaki proteoglikanlar ve glikozaminoglikan yanal zincirlerinin büyüme faktörlerine bağlanabilmesi ile etkileşim kurma şeklinde açıklanabilmektedir. Ayrıca ekstraselüler matriks büyüme faktörlerini mekanik stimülasyon altında serbest bırakabilmektedir. İntegrinler ise mekanokonsdüksiyon için önemlidir çünkü bu yapılar ekstraselüler matriksi hücre iskeletine bağlayan hücre zarı içindeki bağlanma komplekslerinin ana yapısal molekülleridir. Bu moleküllerin hücre zarı yüzeyde gerilim-deformasyon sensörleri olarak çalıştığı düşünülmektedir. Çalışmalar bu moleküllerin hücredeki mekanik sinyallere adaptasyon yanıtlarına dönüşebildiğini göstermektedir[25].

Mekanik açıdan tendon matriksinde uzunlamasına paralel fibriller içerdiği için kompozit materyal olarak değerlendirilebilir. Mekanik yük yüklendiğinde, tendon matrisi ile komşu kolajen fibriller arasında kayma gerilimi oluşur. Bu kayma gerilimi tendon fibrilleri arasında gerilim stresi olarak sonuçlanır. Kayma gerilimi, matriks vasıtasıyla fibril merkezlerine iletilir. Bu transfer fibril yüzey alanının, kesit alanından daha büyük olmasına ve matriks modüler dayanımının fibril dayanımından daha düşük olmasına rağmen gerçekleşir. Ayrıca kolajen fibrilin uçları daha incedir, bu noktada matris maksimum gerinime sahipken, fibrilin ucu sıfır stres gerinimindedir. Fibril içerisindeki gerilme fibril uzunluğuna transfer olur ve matrikste gerinim azalır. Buna ek olarak tendon matriksinde kayma gerilimi glikozaminoglikanlar ve fibriller arası çapraz bağlar yardımıyla aktarılmaktadır[26].

Tendon gerilme-gerinim çalışmaları, tendon mekanobiyolojisi altında incelenen başka bir konudur. Şekil 2.4'te tipik bir tendon gerilim-gerinim eğrisi görülmektedir. Başlangıç bölgesi, tırnak bölgesi olarak adlandırılmakta ve tendonun %2'lik gerinim noktasını ifade etmektedir. Bu bölge tendon yapısındaki kıvrımlı yapının uzamasını

temsil eder. Kıvrımlı desenin yapısındaki açı ve uzunluk farklılıkları, aynı canlı vücudu içinde bulunan tendonlarda kıvrımlı yapının farklı olmasına neden olmaktadır. Örnek verilecek olursa küçük bir kıvrım açısına sahip olan tendon lifleri örnek verilecek olursa, daha büyük kıvrım açısına sahip olan tendon liflerine göre daha güçsüzdür.

Gerilme-gerinim eğrisinin doğrusal bölgesi, tendonun %4'ten daha az gerildiği yeri ifade etmektedir. Bu bölgede kolajen lifler kıvrım desenlerini kaybetmektedir. Bu lineer bölgenin eğimi tendon young modülü olarak adlandırılır. Young modülü, yük altında deformasyona uğramış malzemenin tekrar eski halini alma özelliğinin ölçüsü olarak bilinmektedir. Eğer tendon %4 üzerinde bir gerinim oranına ulaşırsa tendon lifleri üzerinde mikroskobik yırtıklar oluşmaktadır. %8 gerinimin fazlasında ise tendonda makroskobik yani gözle görülebilen yırtıklar oluşmaktadır. Ve daha fazla esneme tendonun kopmasına sebep olur. Şekilde görülen değerler ortalama değerleri göstermektedir. Yeni yapılan çalışmalarda kuş fleksör tendonlarının elastiki olarak %14'e kadar kopmadan gerildiği bildirilmiştir [3]. Tendon yapısı, ligamentler ve deri benzeri yumuşak dokular gibi viskoelastik yapıya sahiptir ve farklı gerinim hızlarına duyarlıdır. Tendonun viskoelastik davranışı kolajen, su, kolajenöz proteinler ve kolajen olmayan proteinler arası etkileşimden kaynaklanmaktadır. Bir maddenin viskoelastisitesi stres, gevşeme, sürünme ve histerez kavramlarıyla tanımlanmaktadır. Tendonun viskoelastisitesi nedeniyle tendonlar daha düşük gerilme hızlarında daha fazla deforme olabilirler. Bu nedenle tendonlar daha fazla enerji emerler ancak yük aktarmada daha az etkili olurlar. Yüksek gerinme hızlarında tendonlar yüksek derece setlik ile daha az deforme olabilir ve daha büyük yük taşımada daha fazla etkili olabilir [3].



Şekil 2.3. Tendon gerilme-gerinim eğrisi [3]

2.2. Tendon Hastalıkları ve Tedavi Yöntemleri

Tendon yaralanmalarına travma, tümör rezeksiyonu, atrofi veya aserasyon (yırtık) gibi durumlar sebep olmaktadır. Bu durumlar tüm dünyadaki popülasyonlar arası yaşam kalitesini etkileyen yaygın ve zayıflatıcı lezyonlardır ve intrinsik ya da ekstrinsik faktörlerden kaynaklanabilir. Hastalık veya vücut ağırlığı tendon yaralanmalarıyla ilgili intrinsik faktörlerdir. Ancak hastalardaki bazı yaralanmalar önceki biyomekanik düzensizliklere bağlı olabilir. Buna örnek olarak anatomik yapı farklılıkları, kas dengesizlikleri, genetik faktörler verilebilir. Ekstrinsik faktörler ise çevresel koşullar, ilaç kullanımı, beslenme ve hayat tercihlerini içerir. Bu faktörler spor faaliyetleri içinde omuz, diz, dirsek veya ayak bileği eklemlerinin tekrarlayan hareketleri içeren insanlarda daha sık görülmektedir. Hasta cinsiyeti bu faktörler içinde değerlendirilmese de cinsiyet hormonları kolajen sentezini ve tendon kompozisyonunu etkiler. Buna ek olarak kadın-erkek arasındaki tendon anatomilerindeki farklılıklar yaralanma üzerinde de farklı etkilere sebep olurlar.

Bahsedilen tüm bu faktörlere rağmen mekanik yükleme, tendon fizyolojisi yeniden şekillendirilmeye ya da tendinopati gibi patolojik değişikliklere sebep olabilir. Tendinopati, 25 yaşın üstündeki insanlarda spor ve aşırı aktivite nedeniyle aşırı kullanma ve yüklenme kaynaklı sebeplerden oluşmaktadır. Sık görülen bu hastalığın iyileşme oranı genellikle düşüktür. Tendinopati, iltihaplı olarak tanımlanabilen tendiniti ve iltihaplı olmayan kronik dejenerasyonu ile tendon zayıflaması kaynaklı tendonozu içerir. Bu sorunlar tendon kopmasına yol açabilir. Tendon ekstraselüler matriksinin selüleritesi ve yeniden modellenme aktivitesindeki değişiklikler tendinopatilerin başlangıcı ile ilgilidir.

Ağrılı ve kronik patellar tendinopati hastalığı spor kaynaklı hastalıkların %30'luk kısmını oluşturmaktadır [27]. Patellar tendonun aşırı kullanılması mesleki ya da spor amaçlı sporcuların ağrı hassasiyetine, işlevsel açığına ve engelliliğine neden olabilir. Patellar tendon için cerrahi tedavinin etkinliği üzerine yapılan çalışmalar, cerrahi prosedürlerin heterojenliği ve tedavi edilmeyen kontrol grubunun sınırlı olması nedeniyle klinik çalışmalardan dolayı yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte kas ve tendonları güçlendirmek için fizyoterapi önerilir.

Aşil tendonu, yürümeyi ve koşmayı sağlayan vücudun en önemli ve en güçlü tendonudur. En sık görülen aşil tendonu rahatsızlıkları aşil tendinozu ve aşil tendonu kopmasıdır. Ameliyatlı ya da ameliyatsız tedavi olmak üzere iki tip tedavi çeşidi vardır. Ameliyatsız tedaviler dinlenme, kas güçlendirme, fiziksel terapiler ve nonsteroid antiinflatuar ilacı kapsar. Yaralanmanın ciddiyetine bağlı olarak aşil yaralanmalarını iyileştirmek için tamamen sabitleme ya da ameliyat gerekebilmektedir.

El ve ayaktaki fleksör tendonlar son derece kompleks ve karışıktır. İlgili yaralanmalar genellikle hastalar için önemli işlev kaybına neden olur ve sıklıkla damar, sinir yaralanmaları ile ilişkilendirilir. Fleksör tendon kopmalarından sonra eski haline dönebilmesi için tendon liflerinin devamlılığının ve tendonu çevreleyen yapı arasındaki kayma mekanizmasının yeniden kurulması gerekir. Bu da fleksör tendon cerrahisinin zorlu problemlerinden biridir.

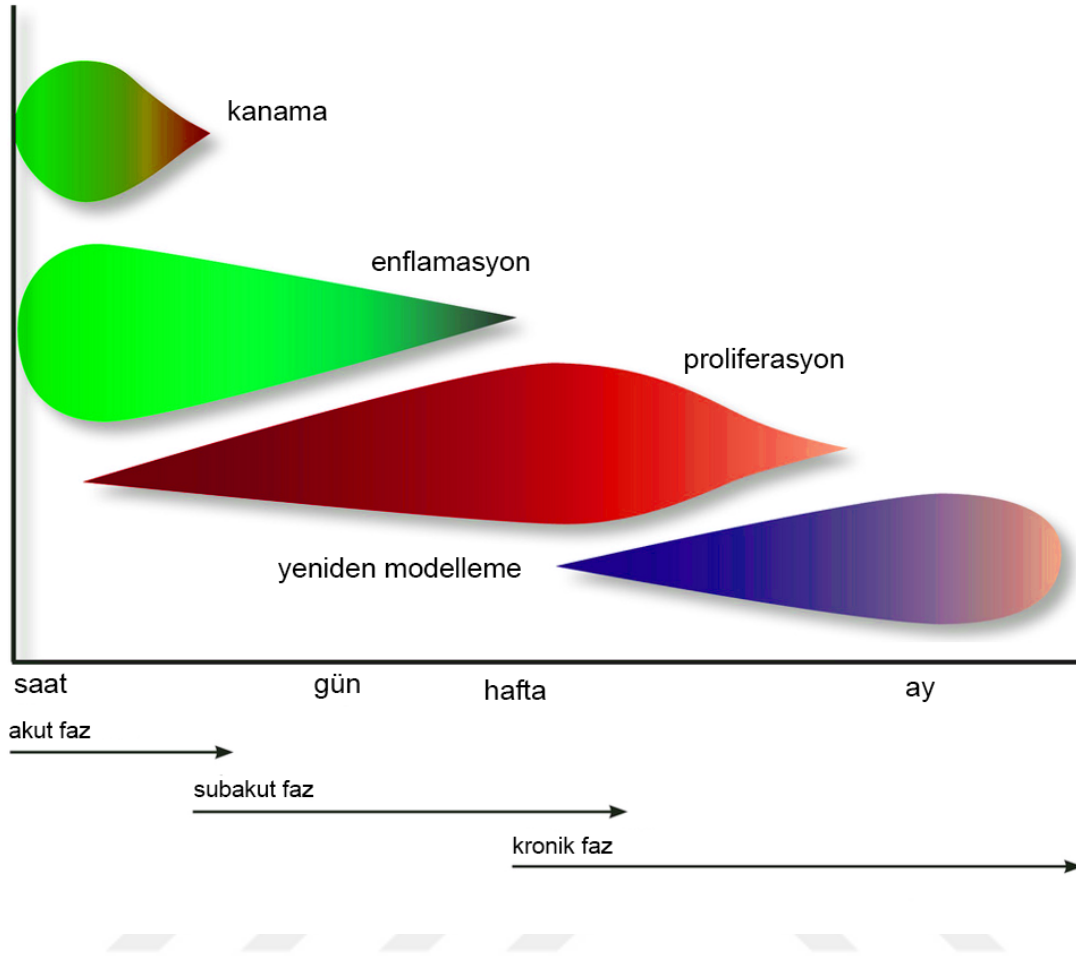
Tüm vücut bağlantıları, etkili fiziksel hareketleri gerçekleştirmek için önemlidir. Eğer bu dokular zedelenirse ve etkili bir şekilde iyileşme sağlanmazsa normal hareket ve yapısal bütünlük tehlikeye girer. Bağ hasar mekanizmaları çok fazla faktöre bağlıdır

ve bu faktörler aşırı yüklenme, tekrarlayan yüklenme, yapısal zayıflık, zayıf esneklik kas dengesizliği veya hızlı büyüme olarak tanımlanabilir [28]. Aktivite ile ilgili olan yaralanmalar nadiren izole bir bağın hasar görmesine neden olur ancak diğer bağlantılı olduğu dokularda görülen hareket çeşitliliği ile diğer bağların da yaralanmasına neden olur. Bu yaralanmalar maksimum gerginliği aşan tek bir yükte veya yetersiz iyileşme süresine sahip tekrarlayan burkulmalar vasıtasıyla meydana gelebilir [29].

Tendon rejenerasyonu yavaş bir süreçtir. İntrinsik-ekstrinsik iyileşmeden veya kombinasyonundan oluşur. Hasar görmüş tendon iyileşme eğilimde olmasına karşın, yaralanma sonrası iyileşme verimsizdir, eski biyolojik ve mekanik özellikleri geri kazanmak pek mümkün olmamaktadır. İntrinsik iyileşme mekanizması tenosit/fibroblastlardan kaynaklanırken, tendon kılıfı ve bu kılıfı çevreleyen yumuşak dokulardaki fibroblastlar ile enflamatuar hücrelerin yaralı bölgeye göç etmesiyle ekstrinsik iyileşme başlar ve hücreler yeni bir kolajen matriks oluşturmak için proliferer olur. İçsel iyileşme yerleşik hücrelerin çoğalmasına, çevreleyen sıvılardan yeterli miktarda kan ile beslenmeye ve yapışma oluşumu gözlemlenmemesine bağlıdır. Ekstrinsik iyileşmede dış hücrelerin lezyon alanına proliferasyonuna, yaralanma ve perfüzyon alanına da bağlıdır. Dış fibroblastlar genellikle yerleşik hücrelere baskınlık gösterir ve bundan dolayı çevre dokular onarım bölgesine bağlanarak adhezyon oluşumuna neden olur.

Diğer doku yaralanmalarında olduğu gibi iyileşme süreci iltihaplanma, onarım ve yeniden şekillendirme olmak üzere üç aşamalıdır (Şekil 2.5.).

İlk basamak olan enflamatuar basamağının amacı kolajeni yeniden üreterek ekstraselüler matriksi birleştirici dokulara kuvvet ve karakterizasyon sağlamaktır [30]. Yaralanmadan hemen sonra ortaya çıkan ve 24 saat ile 5 gün arasında süren inflamatuvar fazda hücreler yara bölgesine, fagositoz yapan hücreler ise nekrotik dokuya ve oluşan pıhtıya göç ederler. Bu hücreler aynı zamanda kolajen sentezi ve birikimini başlatmak için fibroblast kemotaktik faktörünün salımını yaparlar.



Şekil 2.4. Tendon iyileşme evreleri [31]

Yaralanmadan birkaç gün sonra proliferasyon diğer adıyla fibroblastik faz başlar. 5 günden birkaç haftaya kadar süren bu faz proliferasyon ya da fibroplazi ile karakterizedir. Tendon fibroblastları, proteoglikanlar gibi bol kolajen ve diğer ekstraselüler matriksi sentezler ve onları tendon kuvvetini arttırmak için lezyon bölgesine iletimini sağlar. Bu fazda glikozaminoglikan konsantrasyonunun artışı ve buna bağlı olarak doku su içeriğinin artışı gözlenmektedir. COL3 geni bu basamağa özgü pik noktasında sentezlenmektedir [32].

Yeniden şekillendirme aşaması canlının oluşan lezyonu ilk durumuna getirmeye çalıştığı, 6 ile 9 ay arası süren fazdır. Bu faz azalmış hücresellik, kolajen ve glikozaminoglikan sentezi ile karakterizedir. Hücresel metabolizma ve vaskülerite de azalır, onarım dokusunun fibröz dokuya dönüşümü gerçekleşir. COL3 geninin ifadesi baskılanır, onun yerine COL1 -A1 geninin ifadesinde artış gözlenir.

Yeniden şekillenme aşaması konsolidasyon ve olgunlaşma evresi olarak iki kısımda incelenebilir. Hücresel doku daha lifli bir hale gelir, kolajen lifler kovalent bağ yaparak hizalanmaya başlar. Konsolidasyon safhasının sonunda yaklaşık 10-12 hafta içinde olgunlaşma evresinin başlamasıyla fibröz dokunun daha güçlü bir yara dokusuna dönüşümü gözlemlenir. Doku 1 yıl kadar iyileşme sürecine devam etmektedir.

İyileşme sürecinde doku onarımına çeşitli faktörler katılır. Bunların arasında nitrik oksit (NO), hayvan modellerinde doku iyileşmesi ve insanlarda tendinopati iyileşmesini arttırmak için kullanılmaktadır. Antiinflamatuvar ilaçlar ve kortikosteroid kullanan invaziv olmayan inflamasyonun yan etkilerini en aza indirmek ve tendon iyileşmesinde bu aşamayı bloke ederek doku bütünlüğünü korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bundan dolayı onarımın ilk aşaması ciddi şekilde etkilenir bu da tam doku rejenerasyonunu sınırlandırabilir. Uygun beslenme, hızlı iyileşme, yapışmanın en aza indirilmesi ve kayma biyomekaniğinin restorasyonu için çok önemlidir. Tendonlarda sinoviyal sıvı difüzyonuna ek olarak vaskülerizasyon ağı aracılığıyla besin maddeleri sağlanır çünkü bazı bölgeler avaskülerdir.

Bazı cerrahi teknikler ve postoperatif hareket dahil olmak üzere tendon iyileşmesini ve yapışma oluşumunu etkileyen çeşitli faktörler tanımlanabilir. Postoperatif yara oluşumu, tendon ile çevresinde arasında oluşan yapışıklıklar en sık görülen komplikasyondur. Yara dokusu oluşumu, yapışıklıklar, tendon kayma işlevi kaybı, hareket kaybı, kontraktür oluşumu fonksiyonel tendon yetersizliği ile sonuçlandığı için en önemli komplikasyonlardır. Yapışmanın ana nedenlerinden biri travmatik veya cerrahi hasardan sonra tendon kılıfında oluşan kusurdur. Tendon kılıfı, periferik fibrotik dokunun istilasını önleyen ve tendonun dış kaynaklı iyileşmesini engelleyerek biyolojik bir bariyer gibi davranan membran yapısındadır. Bu bariyerin hasar görmesi durumunda tendonun normal işlevselliği tehlikeye girer.

Yapışma oluşumu, iskemi, immobilizasyon ve onarım yerinde açılma sonrasında artar. Bu tür komplikasyonlar doku özelliklerini tehlikeye atarak hareket, kayma işlevselliğine müdahale eder. Bu durumu en aza indirmeye yönelik deneysel girişimler; oral yoldan steroid, antihistaminik, kolajen çözeltileri, fibrin veya silikon/selofan sargılar ve polietilen tüplerin uygulanmasını kapsar [29].

2.3. Biyomalzemeler

Biyomalzeme bilimi, biyolojik sistemler ile temas halinde kullanılan sentetik ya da doğal materyallerin özelliklerini ve uygulamalarını ele alır. Bu materyaller genellikle biyomalzeme adını almaktadır. Yaklaşık yarım yüzyılı aşkın sürede sabit, güçlü bir büyüme gösteren bir alan olan biyomateryaller tıp, biyoloji, kimya ve malzeme bilimi konularını kapsamaktadır. Başka bir tanım yapacak olursak biyomalzemeler büyüme faktörü veya gen gibi biyolojik işaretleme molekülleri sunarak, yeni hücre dışı matris ve doku iç büyümesinin oluşumunu teşvik ederek mikro ortamları modüle edebilir olmalıdır.

Biyomateryaller, optimum koşullarda hücrelerin spesifik olarak çoğalmasını ve farklılaşmasını kolaylaştıran malzemelerdir. Doku mühendisliği çalışmalarının işlevselliğini desteklemek için iskele biyomalzemeleri birçok özelliğe sahip olmalıdır. Bu özelliklere genel olarak bakacak olursak;

- i. Hücre büyümesi, besin maddelerinin ve metabolik aktivite ürünlerinin taşınması için gözenekli yapıda olmalıdır.
- ii. Kontrol edilebilir şekilde biyobozunur olmalıdır.
- iii. Hücre proliferasyonu ve farklılaşması için uygun yüzey kimyasına ve mekanik özelliğe sahip olması.
- iv. Tekrarlanabilir olması ve istenilen şekil, boyutlarda üretimi yapılabilmelidir.
- v. Doku rejenerasyonu için biyouyumlu olmalıdır.

Biyomalzemeler; polimerler, seramikler ve metaller olarak üç ana başlık altında incelenebilir. İşlenilebilirlik, yüksek stabilite oranı ve adsorpsiyon sebebiyle polimer bazlı materyaller günümüz çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [33]. Tıp ve biyomühendislik alanında kullanılan biyomateryaller kalça protezleri, kemik çimentosu, yapay tendon/ligament, kalp kapakçıkları, deri yamaları, kontakt lensler ve dental implantlar gibi örnekler verilebilir. Biyomalzemelerin tasarımı ve seçimi kullanılan vücut bölgesine göre değişiklik göstermektedir.

Vücut içinde kullanılan biyomateryallerin uzun süre kullanılması ve bağışıklık sistemi tarafından reddedilmemesi için bazı standart özelliklere sahip olmalıdır. Bu özellikler aşağıdaki gibidir;

- I. Ana Yanıt: Konakçı organizmanın lokal veya sistemik olarak implante edilen materyal veya cihaza cevabı olarak tanımlanmaktadır.

- II. Biyouyumluluk: Araştırmacılar materyallerin biyolojik performansını belirtmek için “biyomateriyal” ve “biyouyumlu” kelimelerini üretmişlerdir. Biyouyumlu olan materyaller biyomalzeme adını alır. Biyouyumluluk ise materyalin uygulama sonrasında konakçı tepkisi ile uyumlu sonuç vermesi anlamına gelmektedir. Basitçe biyolojik materyalin canlı sistemler ile uyumluluğunu anlatmaktadır. Etkileşimin yerel ve sistemik konakçı ortamı (kemik, yumuşak dokular, plazmanın iyonik bileşimi ve hücre içi/dışı sıvılar) olumsuz bir şekilde etkilenmemelidir. Bu durum, bir maddenin organizmada güvenle kullanılması için gereken bir dizi özellik anlamına gelmektedir. Bu özellikler biyomateriyalin karsinogenik ile pirojenik olmaması, alerjenik olmayan ve kana uyumlu malzemelerden yapılmasıdır.
- III. Biyofonksiyonellik: Biyomateriyaller fiziksel ve mekanik açıdan belirli bir işleve sahip olmalı ve tasarım gereksinimleri karşılamalıdır. Örneğin kemik implantları, yük ve stres dağılımını orantılı olarak yaparken, kalp pilleri gerekli şiddetteki impulsu üretebilmelidir [34].
- IV. Fonksiyonel Doku Yapısı ve Patobiyolojisi: Tıbbi cihazlara dahil edilen biyomateriyaller doku veya organlara implante edilir. Bu nedenle normal veya anormal hücrelerin, dokuların, organların yapısını düzenleyen temel prensipler ile dokuların yapı ve fonksiyonlarının incelendiği teknik ya da hastalık süreçlerinin temel mekanizmalarının uyumu çok önemlidir [35].
- V. Toksisite: Biyomalzemeler için toksikoloji, o malzemelerin degrade olmasıyla ortaya çıkan maddelerle ilgilidir. Bir biyomalzemenin özellikle degrade olması istenmedikçe kütesinden herhangi bir şey kaybetmemelidir.
- VI. Uygun Tasarım ve Üretilebilirlik: Biyomalzemeler işlenebilir, kalıplanabilir veya ekstrüde edilebilir olmalıdır. Örneğin günümüzde ortopedik cihazlarda istenilen kaliteyi garantilemek için modern imalat prosesleri ve kalite yönetim sistemleri oluşturulmuştur.
- VII. Mekanik Özellikler: Biyomateriyallerin bazı önemli özellikleri dikkatli bir şekilde analiz edilmelidir. Bu özellikler çekme mukavemeti, elastik modülü, sürtünme ve sertlik gibi özelliklerdir. Örneğin bir diyaliz membranı belirgin bir geçirgenliğe sahipken, kalça eklemi için üretilen protezlerin eklem kabı yüksek derecede kayganlığa sahiptir.
- VIII. Yüksek Korozyon Dayanımı: Bazı materyaller biyouyumlu olarak görünmesine rağmen vücut sıvısı ile uzun yıllar temas ettiğinde istenmeyen

iyonlar vücut içinde serbest kalabilir. Bunun için vücut içi materyallerin vücut sıvılarına karşı dayanıklı ve inert malzeme olması gerekmektedir. Böylece hastanın yaşam kalitesi daha çok arttırılabilmektedir.

- IX. Yorgunluk Direnci: Bazı materyallerin tekrarlanan siklik yüke karşı verdiği tepkiye yorgunluk direnci denilmektedir. Yorulma kırığı, implant gevşemesi, stres dayanıksızlığı gibi sorunlar kalça protezlerinde sıkça karşılaşılan sorunlardandır. Bunun için biyomateriyallerde kullanılacağı bölgeye uygun mikroyapı geliştirilmektedir.

2.4. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, biyomühendislik, malzeme bilimi ve yaşam bilimleri ilkelerini kapsayan multidisipliner bir yaklaşıma sahip bir bilim dalıdır. Doku mühendisliğinin genel prensipleri fonksiyonel, yapısal ve mekanik olarak değiştirilecek olan dokuya eşit ya da daha iyi olan üç boyutlu bir yapı oluşturmak için canlı hücrelerin doğal/sentetik iskele ile birleştirilmesini hedeflemektedir. Bu hedefin gerçekleşmesi için iskele, büyüme faktörü, hücre dışı matris ve hücreler olmak üzere dört temel öğenin bir araya gelmesi gerekmektedir. Doku mühendisliği, günümüzde çok fazla tercih edilen bir çalışma alanıdır. Ancak tam verimli çalışan organ ve dokular henüz geliştirilemediği için alan kapsamında ileri düzey çalışmalar devam etmektedir. Üretilen doku örneklerinde vaskülerizasyon problemi tam anlamıyla çözülememiştir [36]. Doku mühendisliği uygulamalarının asıl amacı hücrelerin implante edilerek matris yoluyla birleştirme doku yenilenmesini sağlayarak organ fonksiyonunun geri kazandırılmasıdır [37]. Hasar gören dokuların etkili ve uzun süreli onarımı için birtakım kurallara uyulmalıdır. Bu kurallardan ilki oluşan kusurun doldurulması için yeterli sayıda hücre üretimi yapılmalıdır. Buna ek olarak elde edilen hücreler istenilen fenotipe göre ayırt edilebilmelidir. İmplant edilen hücreler üç boyutlu iskeleyi benimsemeli ve ekstraselüler matriks üretimini gerçekleştirmelidir. Üretilen hücreler orijinal doku hücresi ile uyumlu olmalıdır aksi takdirde immünolojik ret oluşabilir.

Doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerin kaynağı otolog (hastadan), allojenik (insan donöründen ancak immünolojik olarak özdeş olmayan) veya ksenojenik (başka bir tür) olabilir. Otolog hücreler, düşük oranda bağışıklık komplikasyonu yarattığı için doku mühendisliği için mükemmel bir kaynaktır. Bununla birlikte otolog hücreler, evrensel klinik çalışmalar için uygunluk açısından sıkıntı yaratabilmektedir.

Ancak allojenik hücrelerin kullanımındaki zorunlu kalite kontrol prosedürlerinin varlığı ve homojen olması gibi avantajları nedeniyle doku mühendisliği alanında sıkça tercih edilmektedir [3].

2.5. Tendon Doku Mühendisliği

Tendon yaralanmalarının başarılı bir şekilde iyileşmesi, anatomik lokalizasyon, vaskülerite, iskelet olgunluğu ve doku kaybı miktarı gibi faktörlere bağlıdır. Tendon dokusu oldukça organize bir üç boyutlu yapıdır. Spontan iyileşme meydana gelebilir ancak bu iyileşme genellikle morfolojik, biyokimyasal ve biyomekanik olarak sağlıklı tendon dokusundan farklı olarak bir yara dokusunun oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan farklı doku, tendonun işlevselliğini negatif yönde etkiler. Tendon doku mühendisliği, in vivo olarak tendon dokusunun kendiliğinden rejenerasyonunu başlatmayı veya daha sonra vücuda implante edilebilen in vitro fonksiyonel bir doku üretmeyi amaçlamaktadır.

Hem canlı hem de işlevsel olan tendon dokusu üretimi, tek yönlü yönlendirilmiş bir matriksin üretimini gerektirir. Bu matriksin üretimi ve yönlendirilmesi, gerekli biyokimyasal ve fiziksel faktörlerin kombinasyonu ile sağlanabilir. [37].

2.6. Tendon Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri

Tendon doku mühendisliği, disiplinler arası mühendislik stratejileri ile tendonu kısmen işlevselleştiren yaklaşımlara karşı tam tendon iyileşmesini amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda kullanılan doku iskeleleri hücre proliferasyonunu artırıp, matriks üretimini destekleyerek ve matrisi işlevsel tendon dokularına organize ederek tendogenezi arttırabilir. Ayrıca tendogenez hücresel hibridizasyon, yüzey modifikasyonu, büyüme faktörleri ve mekanik stimülasyon gibi işlemlerle daha da kolaylaştırılabilmektedir. Bölgesel iyileştirmelerde kullanılan doku iskeleleri yalnızca hücre çoğalmasını ve farklılaşmayı teşvik etmekle kalmayıp aynı zamanda doğal ekstraselüler matriks kompozisyonunu ve tendonun histolojik yapısını da restore etmelidir [29].

2.6.1. Doğal Doku İskeleleri

Doğal doku iskeleleri, yapısı gereği doğal kaynaklı olup, parçalanma ürünleri canlı metabolizmada kolayca absorbe edilebilen iskelelerdir. Bu iskelelere kolajen, glikozaminoglikanlar, kitosan ve aljinat örnek verilebilir. Doğal malzemenin avantajı düşük toksisiteye sahip olmaları ve inflamasyon riski taşımamalarıdır. Bu

malzemeler, diğer doğal malzemeler ya da sentetik polimerler ile bir kompozit hale getirilebilir ve doğal olarak metabolizmada bulunan enzimler tarafından degrade edilebilir. Bununla birlikte bazı dezavantajlarına bakacak olursak zayıf mekanik direnç sahip olmalarının yanı sıra karmaşık bir yapı içerdiklerinden manipülasyonları zordur. Kolaylıkla denatüre olabilirler, genellikle de çalışmalarda kullanılırken kimyasal modifikasyonlara ihtiyaç duyarlar. Bu durumdan ötürü iskelelerin toksisitesi artarak hücrelere zarar verebilmektedir. Tendon doku mühendisliğinde en yaygın olarak kullanılan doğal iskele çeşidi, tendon yapısında da çok fazla miktarda bulunan kolajendir. Kolajen bağ dokuların doğal bir bileşenidir ve mekanik destek sağlayan ekstraselüler matrikse ait önemli bir proteindir. Bu protein yapısı uzun, sağlam, üçlü sarmal ve lifli olma gibi özelliklere sahiptir. Çoğunlukla kıkırdakta baskın olan tip II, ciltte ve kemikte tip I ve kan damarlarında baskın kolajen çeşidi tip III kolajendir. Daha önce de bahsedildiği gibi doğal materyaller mutlaka kimyasal modifikasyona ihtiyaç duyarlar, kolajende de çapraz bağlanma basamağının gerçekleştirilmesi için çeşitli kimyasal modifikasyonlar gerekmektedir. Ayrıca kolajen, yüksek üretim maliyeti, immonojenik riskler taşıması ve üretim bazında stabil olma zorluğu gibi dezavantajlara da sahiptir [38].

Fibrin, tendon doku mühendisliğinde sıkça tercih edilen bir diğer doğal malzemedir. Kan pıhtılaşmasıyla doğal olarak oluşan fibrin yara üzerinde homeostatik bir tıkaç oluşturmak üzere polimerize olan lifli bir proteindir. Bu lifli protein biyolojik olarak degrade olabilen ve absorbe olabilen bir yapıya sahiptir. Bu özellikleri ile kolajen fibrilasyon oluşumunu destekleyici olarak, biyolojik cevabı uyaran büyüme faktörlerinin kontrollü olarak verilmesiyle tendon rejenerasyonunda kullanılmaktadır [39].

Tendon doku mühendisliğinde farklı biyomalzemelerin kombinasyonu ile hibrit iskele elde etmek önemli bir stratejik yaklaşımdır. Shimode ve ark. tarafından 2009 yılında yapılmış bir çalışmada sünger matriks şeklinde ipek/kolajen doku iskeleleri yapılmış bunun yanı sıra bu matrikste fibroblast yapışmasını desteklemek için aljinat/kitosan hibrit lifler eklenmiştir [40].

Doku mühendisliğinde seçilen iskele spesifik çalışma dokusunun ihtiyaçlarını da karşılamalıdır. Tendon lifleri paralel olarak düzenlenmiştir. Doğal tendon fibrilleri gibi yönlendirilen kolajen lifleri, yanlış hizalandırılmış kolajen iskele ile

karşılaştırıldığında fibroblast ve tenositlerin proliferasyonunu daha çok desteklediği görülmüştür. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada ise hizalanmış liflere proliferere olmuş fibroblastların çekme dayanımını arttırdığı ve ekstraselüler matriks oluşumunu desteklediği sonucu bulunmuştur. İskele diziliminin önemi, bir hücrenin alt tabakasının yapısal, kimyasal ve mekanik özellikleriyle ilişkili yönlerde proliferere olma olasılığının en yüksek olduğu tems rehberliği teorisi ile açıklanabilmektedir [41].

Bir diğer doğal iskele malzemesi olan ipek, hücre proliferasyonunu ve ekstraselüler matriks üretimi destelemektedir. İpek liflerinin organizasyonunun değiştirilmesi ile tendon dokusuna benzer mekanik özelliklere sahip doku iskelesi materyali üretmek mümkündür. Yapılan çalışmalarda ipek ve kolajenle oluşturulmuş hibrit doku iskelelerinin tendonda mekanik gerilme dayanıklılığını arttırdığı gözlemlenmiştir.

İpeğin başka bir formu olan Bombyx ipeği tendon doku mühendisliğinde iyi bir hücre proliferasyonu gösteren ve sitotoksik olmayan başka bir doğal iskele çeşididir. Son yıllarda yapılan çalışmalar Bombyx ipeğinden yapılan doku iskelelerinin tenositlerin üremesini desteklediği ve oluşan greftin, doğal tendonla kıyaslandığında çekme dayanımı ve young modülü bakımından eşit sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Bombyx ipeğinin tendon doku mühendisliğinde mekanik dayanım açısından stabil bir doku iskelesi olduğunu göstermektedir.

Kitosan tendon GAG'larının kimyasal yapısında da bulunan, glikozamin kalıntılarından oluşan kitinden türetilmiş bir polisakkarit materyaldir. Hidrofilik yapısı ve glukozamin grupları sebebiyle biyodegrade olabilen biyofonksiyonel bir yapıya sahiptir. Bu nedenle kitosan, iskeletlerin mekanik bütünlüğünü güçlendirirken aynı zamanda amin gruplarının varlığına bağlı olarak mükemmel hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Son yapılan çalışmalarda kitosanın tek başına kullanımı yerine hibrit iskele elemanı olarak kullanımında daha çok başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Tendon doku mühendisliği için kitosan kolaylıkla işlenebilen, biyouyumlu doğal bir materyaldir. Ancak kitosan üzerine yapılan literatür çalışmalarının daha çok hayvan modelleri ile desteklenmesi gerekmektedir [42].

2.6.2. Biyolojik Doku İskeleleri

Deselülerize edilmiş allojenik veya ksenojenik dokular tendon doku mühendisliğinde kullanılan bir başka iskelet türüdür. Bu iskeleler doğal yapısını muhafaza ederek biyomekanik dayanımlarını korumaktadırlar. At perikardı, sığır dermisi gibi bazı

biyolojik iskeleler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve ticari satışına izin verilmiştir [43]. Dokular, konak immün reaksiyonunu başlatabilecek materyali yani DNA ya da RNA kalıntılarını dokudan uzaklaştırmak için katı temizleme, lipidlerin alınması, DNA'nın uzaklaştırılması, iskele çapraz bağlanması ve sterilizasyon gibi işlem basamaklarına tabi tutulmaktadır. Deselülerize iskeleler doğal ekstraselüler matrikleri (ECM) olduğundan hücre proliferasyonu, gaz/besin/metabolit difüzyonu ihtiyacı için ideal ortamı sağlamaktadırlar. Deselülerizasyon işlemi kimyasal, fiziksel ve enzimatik olmak üzere 3 çeşittir. Deselülerizasyon işlemlerinde metot ne olursa olsun mutlaka dezavantajları da göz önüne alınmalıdır.

Enzimatik yöntemde dokular hayvansal kaynaklı enzimlerle muamele edilerek deselülerize edilir. Dokudan tam olarak uzaklaşmayan DNA kalıntılarından dolayı immünojenik tepkilerle karşılaşılabilir.

Kimyasal yöntemle deselülerizasyonda, kimyasalların dokudan tam arıtılamamış olması hücreler için toksik etki yaratabilmektedir. Fiziksel yöntemlerle yapılan deselülerizasyon işleminde ise uygulanan fiziksel prosedürler, ECM'nin yapısal ve işlevsel bileşenlerini bozarak iskeletin bozunma hızını ve mekanik davranışlarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir [24].

2.6.3.Sentetik Doku İskeleleri

Sentetik doku iskeleleri, kimyasal yöntemlerle oluşturulan polimer doku iskeleleridir ve yapay olarak iyileşme sağlaması amacıyla tendon gereksinimlerini karşılayacak şekilde tasarlanmıştır. Sentetik doku iskeleleri, biyolojik iskelelerden farklı olarak doku iskeleri ve suni protezlerde daha başarı olmasına rağmen biyouyumluluk oranı daha düşüktür. Tendon doku mühendisliğinde en çok çalışılan polimerler poli(glikolik asit) (PGA), poli(L-laktik asit) (PLLA) ve bunların kopolimeri olan poli (laktik-ko-glikolik asit)'tir [44]. Bu iskelelerde bozunma ürünleri doğal olarak vücutta da bulunur. Geniş çaplı hayvan modelleri ile çalışılmış olan PGA doku iskelesi, biyouyumlu, biyobozunur ve tenositler ile insan dermal hücrelerinin iyi proliferasyon gösterdiği iskele tipidir. Hücre proliferasyonunu arttırmasından dolayı tendon doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılmış ve sonuçlarına bakıldığında yenilenen tendonun gerilme dayanımı, normal tendonun %75'i kadar bulunmuştur [45]. Bu sonuç cerrahi operasyonlar sonucu elde edilen altın standarttan daha başarılıdır.

PLLA iskelelere bakacak olursak günümüz doku mühendisliği alanında sıkça kullanılan sentetik bir polimerdir. Tendon doku mühendisliği alanında da kullanılmaya başlanmış ve yük direncini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Fakat sonuçlar normal tendon dokusu ile kıyaslandığında sonuç olarak daha düşük dereceli dayanım göstermiş ve PLLA iskelelerde iskele/hücre arayüzünde fibrotik oluşumlar olduğu gözlemlenmiştir [46]. Tendon doku mühendisliğindeki diğer materyallerin başarısı ile kıyaslanacak olursa kompozit malzemeler ile desteklenmediği sürece klinik alanda zayıf kalacak bir polimer olduğu söylenebilir.

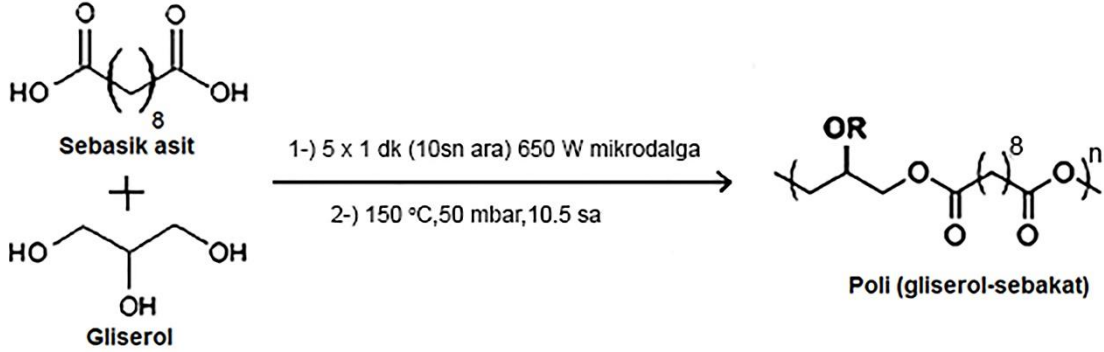
PLGA doku iskeleleri PLLA ve polikaprolakton (PCL) iskele ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu destekleme oranının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Biyouyumlu olması ve hızlı bir şekilde bozunmaya uğraması nedeniyle birçok doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmiştir. Ancak düşük tendon iyileşmesi göz önüne alındığında kullanılacak doku iskelesinin mekanik direncinin %50'sini 3 ay koruyabilmesi gereklidir. PLLA doku iskelesi ile yapılan çalışmalarda iskelenin 4 hafta içerisinde mekanik direncinin %99 olarak kaybettiği gözlemlenmiştir [24]. Bu nedenle PLLA polimeri tendon doku mühendisliğinde kompozit doku iskelesi yapılarına dahil olmadıkça kullanımı uygun olmayacaktır.

2.7. Poli(gliseryl-sebakat)

Poli(gliseryl-sebakat) (PGS) polimeri biyomedikal uygulamalarda gittikçe artan bir şekilde kullanılan, biyobozunur, termoset elastomer özellikleri gösteren yeni nesil bir polimerdir. PGS, ilk olarak 2002 yılında yumuşak doku mühendisliği için sentezlenen biyolojik olarak parçalanabilir bir polyester olarak raporlanmıştır [47]. Esnek ve elastomerik yapısı ile biyomedikal uygulamalarda ağırlıklı olarak yumuşak doku iyileşmesi, kalp kası, sinir doku, kıkırdak ve retina gibi yumuşak doku mühendisliğini hedef alınarak geliştirilmiştir ancak son yıllardaki PGS uygulamaları kemik ve tendon doku mühendisliğini kapsayacak biçimde geliştirilmiştir. PGS polimerinin medikal kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır [48].

Sebasik asit ve gliserol vücutta sitotoksik etkileri olmaksızın bozunarak metabolizmaya dahil olabilmektedir [49]. PGS elastomeri gliserolün hidroksil grubuyla sebasik asidin karboksilik asit grubu arasında katalizöre gerek kalmadan gerçekleşen polikondensasyon tepkimesi ile meydana gelir [50]. Polimerin elastomerik yapısı, ana zincirlerine bağlı hidroksil gruplarının kovalent bağ ile üç

boyutlu olarak birbirine bağlanması ile oluşur. Hidroksil gruplarının arasındaki hidrojen bağları etkileşiminin oranı polimerin elastisite özelliğini etkileyerek daha elastik ya da daha kırılkan olmasına sebep olmaktadır [51].



Şekil 2.5. PGS polimeri sentez şeması

PGS polimerinin mekanik ve bozunma kinetiği özelliklerinin reaksiyonun kürlenme sıcaklığının, kürlenme zamanının ve reaktif konsantrasyonunun kontrollü olarak ayarlanmasıyla istenilene göre ayarlamak mümkündür.

Geleneksel sentez yöntemleri PGS'nin endüstriyel kullanımını sınırlamaktaydı. Sentez aşamasının prepolimerizasyon ve kürlenme olarak iki adet basamağı vardır. Bu basamakların inert gazların varlığına ihtiyaç duyması ve prepolimerizasyon basamağının günlerce sürmesi gibi dezavantajları oluştu PGS'nin kullanımını verimsiz hale getirmekteydi. Yapılan bu çalışmada PGS polimerinin, Aydın ve arkadaşları tarafından 2012 yılında geliştirilen mikrodalga ile prepolimerizasyon metodu kullanılarak, prepolimerizasyon aşamasının süresi kısaltılmıştır [50]. Mikrodalga polimerizasyonu son zamanlarda avantajları ile polimer biliminin önemli bir konusu haline gelmiştir [51].

2.8. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyoreaktörler

2.8.1. Tanım ve Çeşitleri

Biyoreaktörler, belirli bir doku türüne doğru hücre yanıtlarını yönlendirerek kontrollü bir ortam sağlayan yapılardır. İdeal olarak bir biyoreaktör hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklemek için (sıcaklık, nem) uygun ortamı ve biyokimyasal koşulları (pH, pO₂, besin maddeleri, büyüme faktörleri) muhafaza etmelidir. Ayrıca

gelişmekte olan doku için sağladığı yapısal ve mekanik desteğe ek olarak doku için homojen metabolit taşınımını gerçekleştirmek zorundadır.

Martin ve Vermette (2005) kültürü edilen hücrelere metabolit taşınması sırasında iki farklı akış türünü tanımlamıştır. Kültür ortamı toplu konveksiyon ile hücre gruplarının dış yüzeyini kaplar ve akan bu ortam hücre grupları içine difüzyon ile aktarılır. Fakat besiyerinin difüzyon yoluyla ulaşabileceği mesafe sınırlı kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda kanın, kültür ortamındaki oksijenin 45 katını taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum da büyük boyutlu dokuların kültüre edilmesi için oksijen taşıyan bir sıvının kullanılması gerektiği anlamına gelmiştir. Kütle transferi, sıvı akış hızı ve hücre grup boyutunun kontrolü ile modüle edilebilir. Altman ve ark. araştırmalarında gözlemledikleri kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin farklılaşmasının, uygulanan mekanik yük nedeniyle uygulanan mekanik yük kuvvetleri nedeniyle farklı sıvı taşıma özelliklerinden etkilenebileceğini göstermiştir. 2 boyutlu biyoreaktörlerde durağan kültürasyon yöntemi ile deri, karaciğer ve kardiyovasküler yamalar gibi düz doku tabakaları üretilmektedir [52].

Ancak bu doku tabakalarının kalınlıkları belirli ölçüleri geçememiştir çünkü difüzyon yolu ile beslenme yani kütle taşınımı belirli bir tabakaya kadar etki etmektedir.

Dinamik kültürler 3 boyutlu doku iskeleleri veya mikrot taşıyıcılar üzerinde gelişen kültüre iyi bir çevre sağlamak ve besin akışını sağlamak için kullanılır. Dinamik kültür biyoreaktörlerin en bilinen çeşitleri perfüzyon, kesikli, hava kabarcıklı, döner yataklı, karıştırmalı şişelerdir [53].

İlk olarak oluşturulmuş dinamik reaktör çeşidi karıştırmalı şişelerdir. Karıştırmalı şişelerde doku iskelesi bir çubuk yardımıyla şişe içinde sabitlenir ve kültür ortamının bir manyetik karıştırıcı ya da manuel çark ile karıştırma işlemi gerçekleştirilir. Bu karıştırma sistemi hem laminar hem de türbülanslı akış oluşturur. Oluşan bu akış sistemi sonucunda kültürdeki oksijen, karboksidioksit miktarı kontrol edilebilir ve kültür ortamı bileşenleri homojen olarak dağılabilir. Ancak reaktörde akış yönleri kaynaklı kötü akış alanları ve vorteksler doku iskelelerinin iç kısmındaki yoğunlukta düşüşe sebep olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.

Döner yataklı biyoreaktörler, NASA tarafından tasarlanmış, yer çekimi bakımından yeryüzü koşullarının taklit edilerek hücre kümelenmesini engellemek amaçlı döner silindir ve bu silindirin yarattığı laminar akışın kültür ortamını homojen olarak

dağıttığı reaktör çeşididir. Reaktör içerisinde doku iskeleleri serbest olarak dolaşmaktadır, silindirin yaratmış olduğu kayma gerilimi ile yerçekimi kuvveti birbirine dengelemektedir bu durum hücrelerin doku iskelesinde homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Ancak döner yataklı reaktörlerin hücre kümelenmesini engelleyici özelliği, kemik doku mühendisliği alanındaki çalışmalarda doku gelişimini negatif yönde etkilediği gözlenmiştir [54].

Perfüzyon biyoreaktörler dokunun geliştiği ortamın belli basınçta perfüze edilmesini sağlamaktadır. Oluşan tek yönlü akım, besin ortamının homojen olarak oluşmasını sağlamaktadır. Bir perfüzyon biyoreaktörü, pompa, perfüzyon çemberi, kültür ortamı deposu ve atık toplama kutusundan oluşmaktadır. Bu reaktörlerin kullanım amacı 3 boyutlu doku iskeleleri için ortam aktarımı ve atık uzaklaştırma işleminin dengeli olarak sirkülasyonunun sağlanmasıdır. Böylece çok tabakalı dokular nekroz olmadan geliştirilebilmektedir. Perfüzyon çemberi farklı iskele boyutuna uyacak şekilde kolaylıkla şekil değiştirilebilecek şekilde tasarlanmıştır. Reaktör içerisindeki sistemde basın, sıcaklık sabittir ve kültür için belirlenen devirlerde besin ortamının değişmesi sağlanır [55].

Kesikli dinamik biyoreaktörler ise herhangi bir perfüzyon sistemi olmadan kültüre sadece mekanik uyarım yapan biyoreaktörlerdir. Mekanik uyarımın şiddeti, süresi ve kültür içi gazlarının miktarı cihaz tarafından kontrol edilebilmektedir. Ancak nem ve sıcaklık açısından ortam stimülasyonuna ihtiyaç duyabilmektedirler.

Hava kabarcıklı biyoreaktörde ise kültür ortamın karıştırılma işlemi, kültür boyunca hava kabarcıklarının yüzdürülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda reaktör içinde sürekli kabarcık akımının bulunması doku iskelelerinin üzerinde dengesiz kayma gerilimi oluşturarak hücre canlılığının azalmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir [56].

2.8.2. Tendon Doku Mühendisliğinde Reaktör Kullanımı

Temel olarak tendon ve bağlar, fibriler matrikslerinde düzenli aralıklarla her bir yapının eksenine paralel olarak yönlendirilmiş kalın, sık bir şekilde kolajenöz demet yapısı ile histolojik olarak benzerlik göstermektedir. Genelde tendonlar minimum enerji kaybı ve deformasyonla yükü ileten viskoelastik materyaller olarak bilinmektedir [57]. Tendon disfonksiyonu hem insanlarda hem de hayvanlarda yüksek morbitide oluşturmaktadır ve hareket özgürlüğü ile yaşam kalitesini

düşürmektedir. Tendonların hiyerarşik düzeni ve ECM'sinin özel yapısı meknik uyarıları yerleşik hücrelere aktarırken çekme mukavemeti sağlar [58]. İn vitro tendon doku mühendisliği çalışma başarısı, tendon doğal yapı ortamının ne kadar sağlandığına ve bu durumun hücreler arası iletişimi ne kadar etkilediğine bağlı olarak değişmektedir. Yani başarılı bir tendon doku geliştirmenin anahtarı in vivo ortamın dinamiklerini taklit eden kültür ortamın sağlanmasıdır [59]. Bunun için tendon doku mühendisliğinde uygun koşulların oluşturulması için biyoreaktörler kullanılmaktadır. Biyoreaktörler elle çalışmayı en aza indirgeyerek kontaminasyon riskini azaltır ve aynı anda birçok örneğin kontrolünün sağlanmasına olanak verir [60]. Tendonda yüke ve strese doğrusal tepki veren doğrusal tepki veren tamamen elastik bölge, toplam gerininin %4 oranı kadar uzamayı aşmaz ve grafik üzerinde elastik modülü hesaplanabilir. Ancak %8'in üzerindeki gerinimlerde mikroskobik arızalar görülmeye başlar [61].

Tendon ve bağlar için yapılan doku mühendisliği alanındaki çalışmalar için üç temel kriter vardır. Bu kriterlerden birincisi hücre proliferasyonunu destekleyici biyobozunur iskele kullanmak, ikincisi bu iskeletin biyouyumlu olması ve üçüncü ve son kriter çoğalma, farklılaşma gibi düzenleyici uyarıcılara sahip bir hücre kaynağının çalışmada kullanılmasıdır [62].

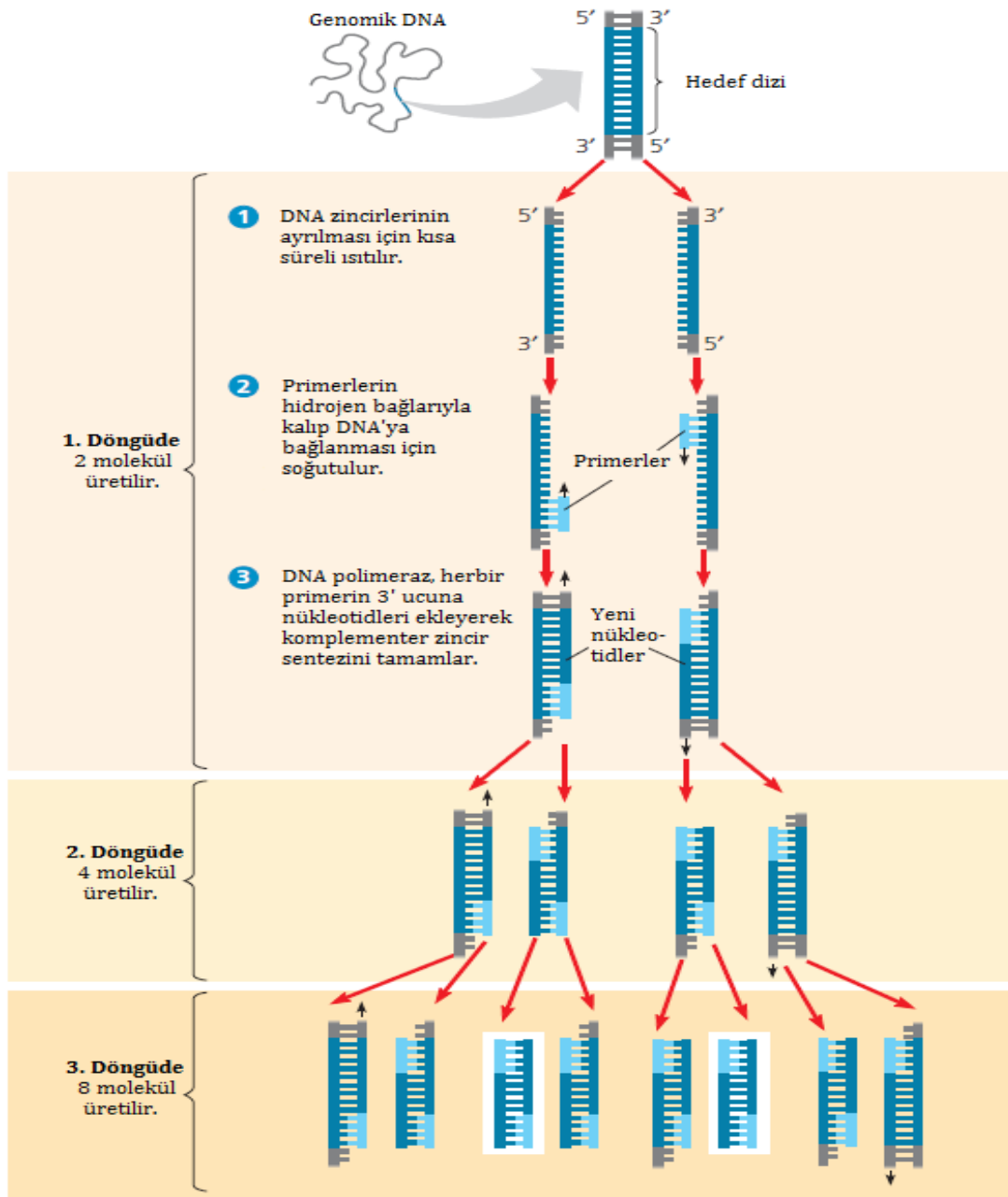
Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar biyokimyasal (büyüme faktörleri) ve mekanik uyarıcıların (uygulanan siklik kuvvetler) ya da bu etmenlerin kombine edilmesiyle oluşturulan etkilerin, tendon dokusunun rejenerasyonu için hücre çoğalmasına, ECM üretimine, mekanik özelliklerine ve gen ifadelerine olan pozitif etkilerini göstermiştir [63]. Son yıllarda bir biyoreaktörün kullanılarak siklik çekme uyarımının uygulanması tendon doku mühendisliği çalışmaları için ilgi çekici olmuştur. Çünkü mekanik stres tendon ve ligamentler için biçimlenmenin düzenlenmesinde önemli faktörlerden biridir [64]. Bir biyoreaktör tendon dokusundaki uyarıcı sinyalleri düzenleyebilir ve bu nedenle siklik mekanik stimülasyon hücre proliferasyonunu ve gen ifadesini arttırabilir. Mekanik uyarıların hücreler üzerindeki etkisi mekanik stresin büyüklüğü, süresi ve frekansına bağlıdır. Mekanik sinyaller hücrelerdeki veya ECM'deki adhezyon reseptörlerini tetikleyebilir ve mekanik stresin iletimi yoluyla hücre içi sinyal yolları oluşturabilir [55]. Doku içinde oluşan bu aktivasyon ile ECM bileşenlerinin sentezi de teşvik edilmektedir [65].

2.9. RT-PCR (Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) herhangi bir DNA parçasının hücre kullanılmadan kısa bir sürede çoğaltılabildiği bir tekniktir. Bu teknikte DNA'nın eldesi için özel bir DNA polimerazın, nükleotidlerin ve DNA sentezinde primer olarak kullanılan sentetik tek zincirli kısa DNA parçalarının bulunduğu bir test tüpü içerisinde inkübasyonu sağlanmaktadır. Otomasyon ile PCR'ın hedef DNA bölgesinin milyarlarca kopyası birkaç saat içinde oluşturulabilmektedir. PCR işleminde (Şekil 2.9) DNA moleküllerinin üssel olarak artışına neden olan üç basamaktan oluşan bir döngü bulunmaktadır. Bu işlem için üretilen ilk polimeraz enzimi sıcak su kaynaklarında yaşayan *Thermus aquaticus* isimli bakteri türünden elde edilmiştir. Pek çok proteinin aksine bu enzim, her döngü başında DNA zincirlerinin ayrılması için gereken sıcaklığa dayanıklıdır. PCR'ın hızına ek olarak özgünlüğü de önemlidir [9].

İlk aşama olan denatürasyon aşamasında, reaksiyon tüpü yaklaşık 95- 96°C'ye kadar ısıtılarak DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması sağlanır. İkinci aşama olan annealing yani hibridizasyon aşamasında ise tüp yavaşça 50-55°C'ye soğutulur. Soğutma işlemi, primerlerin hedef dizinin karşıt uçlarında bulunan tamamlayıcı bazlar ile hidrojen bağı yapmasını sağlamaktadır. Son aşama olan elongasyon yani uzama aşamasında ise sıcaklık hafifçe 70-75 °C'ye yükseltilir ve DNA polimeraz tamamlayıcı zincirin sentezlenmesi için şablon olarak kabul edilen her bir primerin 3' ucuna nükleotidleri ekler. Bir tam döngü sonunda hedef DNA miktarı iki katına çıkmaktadır.

Eş zamanlı PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kantitatif analizlerinde floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Real-time PCR Reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışarak, reaksiyon aşamaları sonucunda oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.



Şekil 2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu [9].

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmalar başlığında altında çalışmaya konu olan doku iskelelelerinin üretimi, karakterizasyonu ve hücre kültürü için yapılan çalışmalar 4 ana başlık altında toplanmıştır. Bu başlıklar:

- 1- Doku İskelelerinin Hazırlanışı
- 2- Doku İskeleleri Karakterizasyon Yöntemleri
- 3- Hücre Kültürü Çalışmaları
- 4- Hücre Kültürü Çalışmaları Karakterizasyonudur.

Doku iskelesinin hazırlanması başlığında polimerik PGS tabanlı elastomerik matriksin sentez aşamalarından ve özelliklerinden bahsedilmiştir. Doku iskeleleri karakterizasyon yöntemleri başlığı altında iskele sentez aşamasının çok parametreliliğinden dolayı gereken tüm karakterizasyon analizleri verilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları ve karakterizasyonu başlıklarında ise sentezlenen elastomerik PGS matriksinin insan tenosit hücresi ile in vitro çalışmaları ve karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

3.1. Doku İskelesinin Sentezi

Bu bölümde tendon doku mühendisliğine uygun olarak tasarlanan polimerik tabanlı PGS doku iskelesinin hazırlanması ve üretilmesi incelenmiştir.

3.1.1. Poli(gliseryl-sebakat) Doku İskelesi Hazırlanması

PGS tabanlı elastomerin sentez aşaması iki basamaktan oluşmaktadır. Bu sentez basamakları: Prepolimerizasyon (polikondensasyon) ve kürlenme aşamalarıdır [66]. Sentez aşamalarından önce PGS polimerinin monomerleri olan 1 mol sebasik asit (Sigma, ABD) ve 1 mol gliserol (Merck, ABD) daha önceden optimize edilen 6 cm'lik petri kabı içerisinde, gliserolün viskoz bir sıvı olmasından dolayı zor dağılması nedeniyle küçük miktarlarda damlatılmasıyla homojen olacak şekilde tartılır.

a) Prepolimerizasyon (polikondensasyon) aşaması: Bu basamakta petri kabında uygun ölçülerde tartımı yapılmış örnek mikrodalga fırın (Midea, Çin) içerisine yerleştirilmiştir. Prepolimerizasyonu yapılacak karışım 650 W orta/yüksek ayarlarındaki mikrodalga fırında 1dk x 5 kez ve 10 saniyelik aralıklar olacak şekilde

elektromanyetik dalgalara maruz bırakılır. Reaksiyon karışımı, 10 saniyelik ara zamanlarında mikrodalga fırının çalışması durdurularak cam bir çubuk yardımıyla karıştırılmıştır.

b) Kurlenme Aşaması: Prepolimerizasyon işleminin yapılmasından sonra elde edilen prepolimer halindeki homojen viskoz sıvının çapraz bağlanarak elastomerik bir matriks haline dönüşmesi amacıyla vakumlu etüve (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiş ve 50 mbar vakum altında 150°C'de 8, 10, 12 saat boyunca çapraz bağlanması sağlanmıştır [67]. Çapraz bağlanma aşaması tamamlanmış poli(gliserol-sebakat) elastomerik matris, kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuştur.

3.2. Doku İskelesi Karakterizasyon Yöntemleri

3.2.1. Degradasyon Testi

Optimizasyonu tamamlanmış PGS matriks, eşit boyut ve ağırlıkta olması için bir delgeç yardımıyla yarıçapı $r = 5\text{mm}$ olan daireler şeklinde kesilmiştir. 4 adet 250 mL'lik erlene %1 antibiyotik-antimikotik çözeltisi içeren 100 mL ringer solüsyonu [68] konulmuştur. Tek bir erlen içine $n=4$ adet olmak üzere toplamda 16 adet steril örnek eklenmiştir. Örneklerin içinde bulunduğu çözeltiler haftada bir kez yenilenmiştir. 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. günde örnekler çözelti içerisinde çıkarılmış ve üzerindeki su kurutularak önce ıslak tartımı yapılmıştır. Daha sonra kuruması için 90 °C sıcaklıktaki vakumlu etüv içersine konularak 24 saat bekletilmiş [69] ve ağırlık tartımları yapılmıştır. [70]. Oluşturulan şekil aşağıdaki formüle göre oluşturulmuştur. Formüle göre M_0 iskelenin kuru ağırlıklarını temsil ederken, M_t ise degradasyon testinden çıkan ıslak iskele örneklerinin kuru ağırlığını ifade etmektedir.

$$M_{Kayıp} = \frac{M_0 - M_t}{M_0}$$

3.2.2. FT-IR Analizi

Çalışma kapsamında kullanılan PGS polimerinin ve prepolimerlerinin yapılarının belirlenmesi için Hacettepe bünyesinde bulunan FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrum) (Shimadzu DR 8101, Japonya) cihazı ile ölçümleri yapılmış ve PGS polimerine ait pikler elde edilmiştir. Örnekler KBr ile kaplandıktan sonra analizi

gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 500 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} dalga boyları arasındaki pikler incelenmiştir.

3.2.3. SEM Analizi

Yapılan PGS doku iskelesinin yapı morfolojisi belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopunda (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) görüntülenmiştir. PGS iskele biyolojik materyal içermediği için fiksasyon işlemi uygulanmamıştır. Örnek görüntülenmeden önce altın-paladyum ile kaplanmıştır. Daha sonra uygun büyütmelelerdeki görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. ^1H -NMR (Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans) Analizi

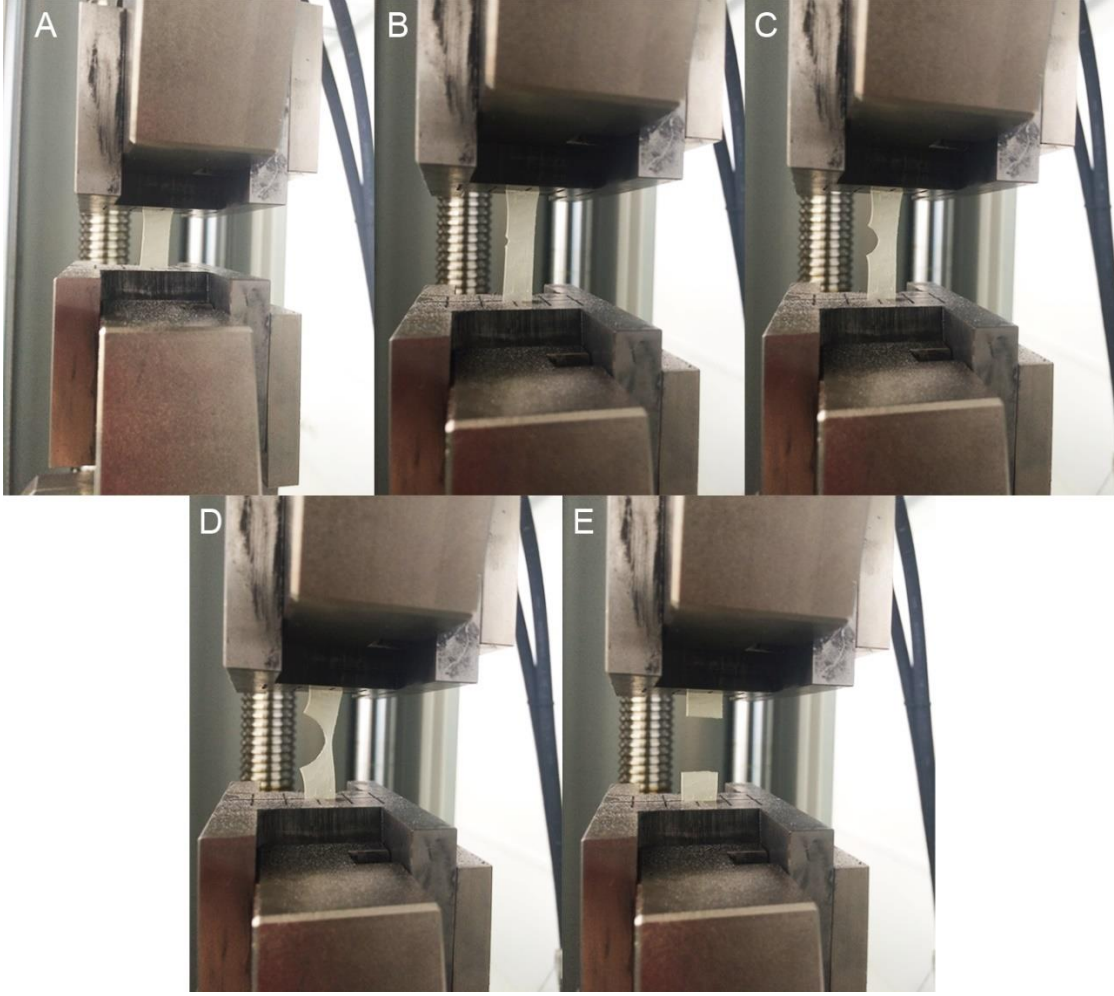
Tez kapsamında üretilen PGS doku iskelelerinin moleküler ve kimyasal yapısının belirlenmesi amacıyla H-NMR (Bruker H-NMR, ABD) analizi ambient sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Analiz çözücüsü olarak %99,8'lik CHCl_3 , iç standart için tetrametilsilan kullanılmıştır.

3.2.5. DSC Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetre, numune ve referansa ısı akısı arasındaki farkı kontrollü bir sıcaklık programı uygulayarak sıcaklığın fonksiyonu olarak inceleyen termal bir yöntemdir. Tez kapsamında üretilen PGS doku iskelesinin termal özelliklerini belirlemek amacıyla analiz -80°C 'den 100°C 'ye kadar $10^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer, ABD).

3.2.6. Üniversal Mekanik Çekme Testi

Hücre kültürü çalışması kapsamında üretilen PGS polimerinin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla çekme analizi (Zwick/Roell Z250, Almanya) yapılmıştır. Analiz 3 tekrarlı olarak her bir örneğe 0.2N 'luk yük uygulanarak 10 mm yükseklikten çekme hızı $10\text{ mm}/\text{dk}$ olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1'de PGS doku iskelesinin analiz anındaki aşama görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 3.1. Mekanik çekme testi esnasındaki PGS doku iskelesi görüntüleri

3.2.7. Temas Açısı Ölçümü

Islanmanın en temel eşitliği Young eşitliğidir. Bu eşitlik temas açısı belirlemede kullanılan bir eşitliktir. Bu eşitlik aşağıda verilmiştir:

$$\cos(\theta_c) = \frac{(\gamma_{KB} - \gamma_{SB})}{\gamma_{KS}}$$

Bu eşitlikte θ_c , temas açısıdır. γ_{KB} katı gaz arasındaki yüzey gerilimi, γ_{SB} sıvı gaz arasındaki yüzey gerilimi ve γ_{KS} ise katı sıvı arasındaki yüzey gerilimidir [71]. Temas açısı ölçümü Attension Theta (İsveç) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Referans

sıvı olarak deiyonize su (4 µL) kullanılmış, damla oluşturan gaz geçirmez bir mikro şırınga yardımıyla numuneye yerleştirilmiştir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

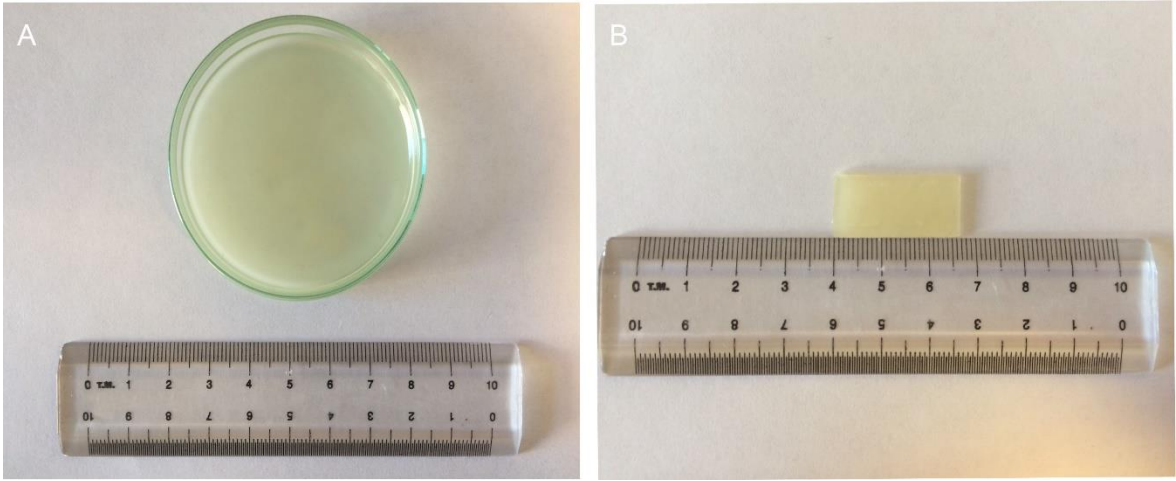
Doku iskelesi karakterizasyonu aşamalarından sonra bir sonraki aşama olan *in vitro* çalışma aşamasına geçilmiştir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların tümünde yurt dışından temin edilmiş insan tenosit hücreleri (Zenbio, ABD) kullanılmıştır. Daha sonra kültüre edilmiş PGS doku iskelesi, dinamik kültür (biyoreaktör) ortamına aktarılmış ve tüm kültürün 4., 7. ve 12. günlerinde çalışma başarısını belirlemek amacıyla çeşitli karakterizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Çalışma kapsamına kullanılan mekanik stimülasyon parametreleri çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.1.) [72]. Biyoreaktör çalışmaları ile ilgili detaylı bilgi başlık 3.3.2. Biyoreaktör Sterilizasyonu ve Dinamik Kültür Çalışmaları'nda verilmiştir.

Çizelge 3.1. Biyoreaktör çalışma parametreleri [72]

Çalışma Süresi (dk)	İlk 2 gün 30'ar dakika, sonraki 8 gün 60'ar dakika
Frekans (Hz)	0.33
Çekme Yüzdesi	%6
Devir Sayısı	7200 (ilk 2 gün) /14400 (son 8 gün)

3.3.1. Doku İskelesi Sterilizasyonu ve Durağan Hücre Kültürü Çalışmaları

PGS doku iskeleleri, biyoreaktörün optimal koşulları sağladığı bölme içindeki kısa boyutuna ve literatüre uygun olarak 1 cm x 2,5 cm boyutlarında kesilmiştir (Şekil 3.2.). Bir reaktör çalışması için toplamda 12 adet örnek kullanılmıştır. Bu örneklerin 6 tanesi durağan kültürde kontrol grubu olarak kullanılmış, diğer 6 örnek ise dinamik stimülasyona maruz bırakılmıştır. Kesilen doku iskeleleri hücre ekiminden önce 20 dakika etanol içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra örnekler hücre kültürü ortamına alınmış ve steril pens ile aktarımı sağlanarak 2 defa 45 dakika boyunca %3'lük AA içeren PBS çözeltisinde bekletilmiştir. AA içeren solüsyonda bekletilen doku iskeleleri pens yardımıyla 6 kuyucuklu kültür kabına yerleştirilmiş ve steril PBS ile yıkanarak kurutulmuştur. Daha sonra iskeleler 1 saat UV ışınlarına maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.2. A) Sentez işlemleri tamamlanmış PGS polimeri. B) Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanmış PGS polimeri

Sterilizasyon basamağı tamamlanan PGS doku iskeleleri, hücre yapışmasını arttırmak amacıyla sığır kaynaklı kolajen Tip I (Devro, İngiltere) sıvı solüsyonuna batırılmış ve 1 saat bekletilmiştir.

Daha sonra kuruması beklenen PGS doku iskelelerine, kuruma işlemi sonrasında 200.000 hücre/cm² miktarında hücre içeren 10 µL hücre solüsyonu eklenmiş ve pipetaj ile homojen olarak iskele yüzeyi üzerinde dağılması sağlanmıştır. Ekim işleminden sonra doku iskeleleri hücre yapışması amacıyla 37°C'de %5 CO₂ şartlarındaki inkübatöre kaldırılmış ve 6 saat bekletilmiştir. İskeleler her saat başında kontrol edilmiş, gerektiğinde üzerine 5 µL besiyeri eklenmiştir. Besiyeri olarak DMEM/ Ham's-F12 (Merck, Almanya) ile %1 AA (Capricorn, Almanya) %1 L-Glutamin (Capricorn, Almanya), %1 askorbik asit (Sigma, ABD) ve %10 FBS (Capricorn, Almanya) oranlarında hazırlanan besiyeri kullanılmıştır [73, 74]. 6 saat sonunda yapışan hücreler için, içinde doku iskeleleri bulunan 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna dikkatli bir şekilde 3'er ml besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin tam olarak proliferasyon sağlaması için bütün örnekler 2 gün durağan kültürde bekletilmiştir. Tüm hücre kültürü çalışması boyunca doku iskelelerin üzerindeki besiyeri iki günde bir 37 °C'deki su banyosunda ısıtılan taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

3.3.2. Biyoreaktör Sterilizasyonu ve Dinamik Kültür Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmalarında EBERS firması (İspanya) tarafından üretilen TC-3 modeli mekanik stimüle edici biyoreaktör kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. TC-3 modeli mekanik stimüle edici biyoreaktör (Ebers, İspanya)

Çalışma steril koşullarda yürütüldüğü için ana gövde düzeneği hariç otoklavlanabilir olan tüm parçaları cihazdan sökülmüş ve sabunlu su ile yıkanmıştır. Daha sonra ayrılabilen parçalar kullanılacağı aşamalara göre otoklav poşetlerine yerleştirilmiş ve 120 °C'de 20 dakika otoklav cihazında (Nüve, Türkiye) sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Otoklavlanma işleminden sonra otoklav poşeti içinde bulunan parçalar ve alkol ile temizlenmiş ana gövde bir gece boyunca UV'ye maruz bırakılmıştır.

Cihazın dikkatli bir şekilde kurulumunu gerçekleştirilirken, alt kıskaç parçası takıldığı zaman örnekler dikkatli bir şekilde steril pens yardımıyla hazne içine yerleştirilmiştir. Daha sonra üst kıskaç yerleştirilmiş ve örnekler sabitlenmiştir. Sabitlenen örneklerle her bir hazne başına 8'er mL besiyeri eklenmiş ve hazne üstü kapağı kapatılarak vidalanmıştır. Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi hazne üzerindeki kapak üzerindeki vidalı

boşluğa ise kültürün inkübatör şartlarına uygun olması için şırınga filtresi (Sigma, ABD) yerleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Malzeme yerleştirilmesi ile kurulumu tamamlanmış çalışmaya hazır biyoreaktör

Kurulumu tamamlanmış biyoreaktör, aşağıda verilmiş parametrelere göre çalıştırılmıştır. Toplam kültür günün 4., 7. ve 12. gününde örnekler biyoreaktör içerisinden çıkarılmış ve PBS ile yıkanarak testlerde kullanılmak amacıyla -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Biyoreaktör/ hücre kültürü çalışma planı

1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün	9.gün	10.gün	11.gün	12.gün
Durağan Kültür		30 dk Dinamik Kültür		60 dk Dinamik Kültür							

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları Karakterizasyonu

3.4.1. Tenosit Karakterizasyonu

Tez kapsamındaki gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında dinamik ve durağan kültür örneklerinde hücre sayısı ve boyutları Image J (Wayne Rasband, Image J version 1.5.2j8) programı kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. SEM Analizi

Hücrelerin PGS doku iskelesi üzerindeki mekanik stimülasyon sonrası morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin görüntülenmesi amacıyla kültürün 4., 7. ve 12. günlerinde alınan örnekler SEM ile görüntülenmiştir. Örnekler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile dikkatli bir şekilde yıkama yapılmış ve daha sonra uzaklaştırılmıştır. Daha sonra doku iskelelerinin üzerini geçecek kadar PBS içerisindeki %2,5'lük (v/v) gluteraldehit solüsyonu eklenmiş ve 30 dakika boyunca fiksasyon için beklenmiştir. Fiksasyon sonunda örneklerin üzerindeki sıvı atılmış ve örnekler bir kez PBS ile yıkandıktan sonra analiz zamanına kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. SEM analizinden önce PGS doku iskeleleri üzerinde biyolojik materyal barındırması nedeniyle bünyesindeki suyu uzaklaştırmak için alkol serisine tabi tutulmuştur. İskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) alkol çözeltilerinin içinde 2 dakika bekletilmiştir. Çözeltilerin uzaklaştırılmasından sonra örneklerin üzerine hekzametildisilazan (HMDS) eklenmiş ve 5 dakika bekletilmiştir [75]. Daha sonra oda sıcaklığında tamamen kurutulması sağlanan örnekler altın(Au)-paladyum(Pd) ile kaplanmış ve görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.4.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirmesi amacıyla Canlı/Ölü boyama işlemi yapılmıştır. Bu işlem doku iskelesi üzerindeki hücrelerin canlı olup olmadıklarını belirlemeye yarayan testtir. Canlı/Ölü test kiti (Sigma Live/Dead Cell Double Staining, ABD) ile iki renkli boyama yapılır. Bu kit ölü hücrelerin ışınmasını sağlayan propidyum iyodür ve canlı hücrelerin ışınmasını sağlayan kalsein olmak üzere 2 adet boya içermektedir [76]. Bu boyalar konfokal mikroskopta kalsein 490 nm/ 520 nm (Uyarma/Emisyon), propidyum iyodür 535 nm/ 617 nm (Uyarma/Emisyon) dalga boylarında görüntülenmektedir.

Canlı/Ölü boyama uygulaması için örnekler üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmış ve üzerini geçecek kadar PBS ile yıkanmıştır. PBS'in uzaklaştırılmasından sonra, her bir kuyucuğa 1'er mL PBS konulmuştur. Test kitindeki boyalar çok yoğun olduğu için seyreltme işlemi yapılmıştır. 1.5 mL'lik ependorf içine 1 mL PBS konulmuş ve içine 1 µL propidyum iyodür 2 µL kalsein eklenmiştir. Oluşan çözelti iyice pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Üzerinde 1 mL PBS bulunan PGS doku iskelelerin her birine 100 µL çözeltiden eklenmiş ve inkübatörde 15 dakika boyunca 37 °C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 15 dakika sonunda örnekler üzerindeki çözelti uzaklaştırılmış ve örnekler PBS ile dikkatli bir biçimde yıkanmıştır. Yıkanmış örnekler tekrar 1 mL PBS içine konulmuş ve görüntüleme zamanına kadar ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir. Daha sonra örneklerin konfokal mikroskopunda (Olympus, Japonya) görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. İn Vitro Sitotoksisite Testi

PGS polimerinin, doku iskeleleri üzerine ekilen insan tenosit hücresinin proliferasyonuna olan etkisinin belirlenmesi amacıyla in vitro sitotoksisite testi olarak MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) analizi uygulanmıştır. Analizin uygulanması için belirlenen standartlara göre 100 mg PGS doku iskelesi (5 mg/mL) tartılarak %70'lik alkol içerisinde 20 dakika bekletilmiştir [77]. Daha sonra 2 kez 45'er dakika boyunca %3 AA içeren PBS solüsyonu içerisinde bekletilmiş ve bu süre sonunda PBS ile yıkanmıştır. Üzerindeki PBS alınan PGS doku iskelesi parçası 1 saat UV'ye maruz bırakılmıştır. Sterilizasyon işlemi sonunda PGS doku iskelesi (100mg), 1., 2. ve 3. gün için n=5 adet doku iskelesine 1'er mL olacak şekilde total 20 mL serumsuz, düşük glikozlu DMEM (Capricorn, ABD) içine aktarılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sırasında 24 kuyucuklu kültür kabı içine her 3 gün için n=5 olacak şekilde ve 2×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda tenosit hücresi (P3) ekimi yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon aşaması sonrasında elde edilen besiyeri, 0.2 µm gözenek çapındaki şırında filtresi (Corning, ABD) yardımıyla süzölmüş ve ekim öncesinde steril olan bu besiyerine %1 L-Glutamin, %1 AA ve %10 FBS eklenmiştir. Daha sonra kuyucuklar üzerindeki besiyeri uzaklaştırmış ve hazırlanan besiyeri, 1'er mL olacak şekilde 15 adet kuyucuğa eklenmiştir. 24 saat sonra her gün için ekim yapılmış 5 adet kuyucuğun üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her gün için 5 adet

kuyucuğa 600 µL serumsuz besiyeri ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenmiştir ve 37°C'deki etüvde 3 saat boyunca inkübe olması sağlanmıştır. Bu süreç sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 µL asidik izopropanol eklenmiştir. Kuyucuk içindeki izopropanol çözeltisine pipetaj yapılarak hücreler içerisindeki formazan kristallerini çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden 200 µL alınmış ve plaka okuyucu kullanılarak 690 nm referans olmak üzere 570 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.5. RT-PCR Çalışmaları

Tez kapsamında planlanan RNA izolasyonu Zymo Research Quick-RNA Mini Prep kiti kullanılarak yapılmıştır. Çalışma planındaki örneklerle uygulanan %6'lık çekme oranına ek olarak %3'lük çekme oranı ile muamele edilmiş bir deney grubu daha eklenmiştir. Her bir deney seti 6 adet dinamik ve 6 adet durağan olmak üzere toplam 12 adet örnekten oluşmuştur. Örnekler 4., 7. ve 12. günlerde kültürden çıkarılmıştır. Kültürden çıkarılan örneklerin üzerindeki besiyerleri atılmış ve örnekler PBS ile yıkanıp PCR çalışmasına kadar -80 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra analiz için kullanımı gerektiğinde -80°C'den çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. PCR çalışması için bir sonraki başlıkta verilen protokol takip edilmiştir. İzolasyon aşamasından önce hücrelerin doku iskelesinden ayrılmasını kolaylaştırmak için iskeleler 1 ünite/mL kolajenaz (Sigma, ABD) içinde 6 saat 37 °C'de bekletilmiştir. Bekletme işleminden sonra oluşan supernatani alınarak, RNA izolasyon aşamasına başlanılmıştır.

Çizelge 3.3. RT-PCR Çalışmaları için deney şeması

Parametreler	%0 Durağan/Kontrol - %6 Dinamik/Grup Çalışması		%0 Durağan/Kontrol – %3 Dinamik/Grup Çalışması	
	Durağan grup örnek sayısı	Dinamik grup örnek sayısı	Durağan grup örnek sayısı	Dinamik grup örnek sayısı
4.GÜN	2	2	2	2
7.GÜN	2	2	2	2
12.GÜN	2	2	2	2
Toplam Örnek	6	6	6	6

3.4.5.1. RNA İzolasyon Aşaması

- Örnekler üzerine 300 µL lizis tamponu eklenerek hücrelerin plakadan kaldırılması için vortexlenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- Çözelti RNA izolasyon kolonuna aktarılmış ve 14000rpm'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- Oluşan lizat çözeltileri üzerine 300 µL izopropanol eklenmiş ve pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
- Alınan çözelti ikinci bir RNA izolasyon kolonuna aktarılarak 30 saniye santrifüj edilmiş ve tüp altında biriken çözelti uzaklaştırılmıştır.
- RNA ile birlikte DNA da izole edilmiş olma ihtimaline karşı, sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacıyla DNaz I eklenerek DNA'lar uzaklaştırılmıştır. Bunun için kolonlar üzerine 80ul DNaz I çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında kolonlar üzerine 400ul RNA hazırlama tamponu eklenerek 30 saniye 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- Kolonlar üzerine sırasıyla primer ve sekonder tamponlar eklenerek izole edilen RNA'lar yıkanmıştır.
- Sonrasında 2 dakika 14000rpm'de santifüj yapılarak fazla etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır.

- RNA izolasyonu gerçekleştirilen tüpler, RNA/DNA içermeyen tüpler içerisine yerleştirilerek 100 µl elüsyon tamponu eklenmiş daha sonra 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 14,000 rpm'de 1 dakika santifüj edilerek RNAların tüpte birikmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazında kontrol edildi. 15-35 ng/ µl olarak bulunan konsantrasyonlar, deneyde süreklilik elde edilmesi açısından her örnekte 15 ng/µL olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.4.5.2. cDNA Sentez Aşaması

- İzole edilen RNAlardan, konvansiyonel PCR cihazı (Veriti, Applied Biosystems) kullanılarak RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) yardımıyla komplementer DNA sentezlenmiştir.
- Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda, her tüpün hacmi 20 µL olacak şekilde, aşağıdaki gibi cDNA solüsyonları hazırlanmıştır:
 - 11 µL RNA örneği
 - 1 µL primer
 - 4 µL 5X Cdna tampon çözeltisi
 - 2 µL dNTP çözeltisi
 - 1 µL RNase inhibitörü
 - 1 µL reverse transkriptaz enzimi
- Yukarıdaki gibi hazırlanan tüpler, belirtilen reaksiyon koşullarında normal PCR cihazında inkübe edilmiştir:
 - 25 °C'de 5 dakika,
 - 43 °C'de 60 dakika,
 - 70 °C'de 5 dakika
- Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PCR uygulamasından önce elektroforez yürütülerek kontrol edilmiş ve -80 °C'de saklanmıştır.

3.4.5.3.Gerçek zamanlı PCR Aşaması

- Gen analizlerine geçmeden önce kullanılan primerlerin 10mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Primer sekansları olarak çizelge 3.5'te belirtilen sekanslar kullanılmıştır.
- Primer optimizasyonları yapılarak; sekans uzunlukları, GC oranları ve molekül ağırlıkları dikkate alınmış ve uygun PCR koşulları belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. RT-PCR Çalışması için kullanılan primer sekansları [72, 73, 78-80]

Gen Adı(İnsan)	Forward Primer (5'- 3')	Reverse Primer (5' – 3')
COLIII	AGCGGTTCTCCAGGCAAGGAT	AGTGATCCCAGCAATCCCAAG
COLI	ATCGACAGTGACGCTGTAGG	CCAGCAGATCGAGAACATCC
TNC-1	GGTACAGTGGGACAGCAGGTG	RGAGAAGGATCTGCCATTGTGG
TNC-2	GAGACATCTGTGGAAGTGGA	CGTACTCAGTGTCAGGCTTC
TNMD	ATTCAGAAGCGGAAATGGCACTGA	TAGGCTTTTCTGCTGGGACCCAA

- Yapılan optimizasyonlar sonucunda, reaksiyon her tüpte 20 µL hacimde, aşağıdaki koşullarda, 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir:
 - 50°C 2dk
 - 95°C 2 dk
 - 95°C 15 sn
 - 60°C 1 dk
- 20 µL tüp hacmi ise aşağıdaki gibi belirlenmiştir:
 - 10 µL qPCR master mix
 - 0,6 µL F primer
 - 0,6 µL R primer
 - 2 µL örnek
 - 6,8 µL su
- Tüm örnekler aynı reaksiyon içerisinde, Comparative Ct metoduyla, 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Referans gen olarak ACTB (beta aktin) kullanılmıştır.

- Deneyler Applied Biosystems Viia7 cihazında PowerUp Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. QuantStudio Real Time PCR Software Version 1.2. yazılımı kullanarak analiz basamağı gerçekleştirilmiştir.
- Primerlerin data kılavuzunda belirtildiği şekliyle reaksiyonun etkinliği 1 olarak kabul edilmiştir.

3.4.6. Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Analizi

Hücre kültürü çalışmasının sona ermesiyle PGS doku iskelesi üzerindeki ekstraselüler matrikste gelişim gösteren GAG miktar ölçümü, DMMB (dimethyl methylene blue) analizi yardımıyla gerçekleştirilmiştir [81]. 12. gün kültürden çıkarılmış dinamik ve durağan gruplar için örnek miktarı 6 adet olarak belirlenmiştir. Örnekler PBS ile yıkanıp üzerinde kalan besi ortamından arındırılmıştır. Örneklerin hücre ekili olan kısmı dikkatlice kesilerek çıkarılmıştır. Bu aşamadan sonra önceden hazırlanan ve -80 °C'de muhafaza edilen 100 mM amonyum asetat çözeltisi içindeki (BDH Analar, İngiltere) 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan Proteinaz K (Sigma, ABD) solüsyonu ile 60 °C'de gece boyunca (16 saat) enzimatik parçalanma aşaması gerçekleştirilmiştir. Ancak PGS doku iskelesi hayvan kaynaklı doku iskelesi olmadığından dolayı enzimatik parçalanma meydana gelmemiştir. Örnek üzerinden elde edilen solüsyon, hücresel yapının yüzeyden akmasıyla elde edilmiştir.

DMMB test solüsyonu, 4 mg 1,9-dimethyl-methylene mavisi ile çinko klorür ikili tuzunun (Sigma, ABD) 40 mM NaCl (Sigma, ABD), 40mM glycine (Fluka) ve 0.1M HCl (BDH AnalaR, İngiltere) karışımının içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Test sonucunun anlamlı olarak okunması için gerekli olan standartlar (0-50 µg/mL) sığır kıkırdığı kaynaklı kondroitin sülfatın (Sigma, ABD) daha önceden hazırlanan amonyum asetat solüsyonunda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan DMMB test solüsyonu örneklerin üzerine ilave edilmiş ve plaka okuyucu içerisinde 520nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Plaka okuyucuda elde edilen değerler doku iskelesi başına göre normalize edilmiştir.

3.4.7. DNA Miktarı Analizi

12 günlük kültür işleminin ardından oluşan örnek üzerindeki hücre topluluğunun DNA miktarının ölçümü için Quant-iT™ PicoGreen ® (Thermofisher, ABD) test kiti kullanılmıştır. Bu kitin en büyük özelliği sadece çift sarmallı DNA'yı ölçmesidir ve kit 25pg/mL miktarındaki DNA'ya kadar ölçüm yapabilmektedir. Örnek sayısı dinamik ve durağan kültürlerin her biri için 3 olarak belirlenmiştir. Doku iskelesinde olan tüm DNA'nın eldesi için 100 mM amonyum asetat çözeltisi içindeki (BDH Analar, İngiltere) 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan Proteinaz K (Sigma, ABD) solüsyonu ile 60 °C'de gece boyunca (16 saat) enzimatik parçalanma işlemine tabi tutulmuştur. PicoGreen test kitinin talimatlarına göre solüsyonlar hazırlanmış ve örnekler üzerine eklenmiştir. Daha sonra 480/520 nm'de plaka okuyucuda absorbans değeri ölçülmüştür. Test sonucunun anlamlı olarak okunması için gerekli olan standart grafiğinin ölçümü (0-1 µg/mL) aralığında, Tris-Edta tamponu ile seyreltilen DNA stok solüsyonu ile hazırlanmıştır. Sonuçlar tek bir doku iskelesine göre normalize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

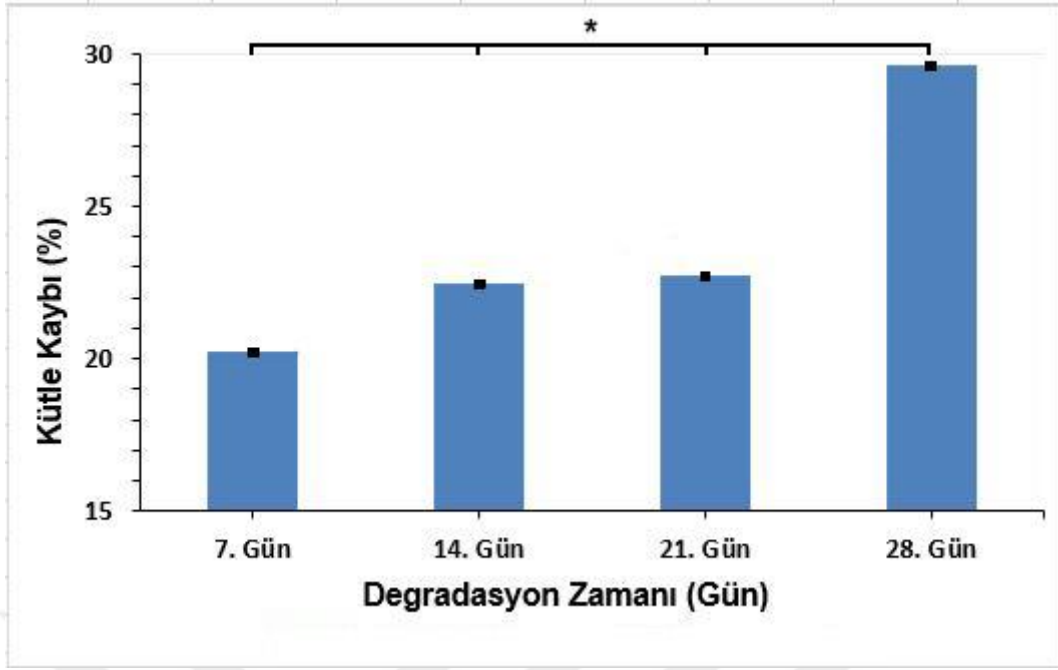
4.1.Doku İskelesi Karakterizasyonu

Hücre kültürü yapılan doku iskelelerinin malzemesi ve kullanılacağı alana göre tasarımı çeşitlilik gösterebilmektedir. Buna ek olarak seçilen doku iskelesi hücre proliferasyonunu kolaylaştırmalı, matris üretimini teşvik etmeli ve matrisi işlevsel doku haline getirmelidir. Tendon doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan matrislerin ise tendonun doğal yapısına uygun olarak elastik ve mekanik gerinime dayanıklı olmalıdır. Kültüre edilen doku iskelesi mutlaka biyouyumlu olmalı eğer bozunması bekleniyorsa da biyobozunur olmalıdır. Aksi takdirde implante edilen doku iskelesine karşılık oluşan immün sistem cevapları çalışmanın başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır.

Bu tez kapsamında PGS doku iskelesinin karakteristik özellikleri SEM analizi, FTIR analizi, H-NMR analizi ve DSC analizi, Üniversal çekme testi ve bozuma davranışının analizi ile belirlenmiştir.

4.1.1. Degradasyon Testi

Doku mühendisliği alanında doku iskelesi için kullanılan polimerler belirli standartlara sahip olmalıdırlar. Doku iskelelerinin kullanım bölgelerine bağlı olarak farklı biyobozunurluk davranışlarını göstermesi beklenebilir. Tez kapsamında kullanılan PGS doku iskelesi pH 7.4 olan %1 AA içeren Ringer solüsyonu içine konulmuş ve 7., 14., 21. ve 28. günlerde degradasyon hızına bakılmıştır [82]. Test sonuçlarına genel olarak bakılacak olursa kuru ağırlıkları bilinen PGS doku iskelelerin zamana karşı degradasyon hızları yüzde olarak belirtilmiştir. PGS iskeleler (n=4) ilk 7 günlük süreçte ortalama %20 oranında degrade olmuştur. Bu süreci izleyen haftalarda degradasyon oranı zamanla artmış fakat ilk 7 günlük periyotta gözlemlendiği kadar yüksek ivmeli olmamıştır. İstatiksel analizi yapıldığında ise ortaya çıkan sonuçlar, örneklerin kütle kayıp miktarları arasında anlamlı bir farklılık görülmediğini göstermiştir. Bu nedenle standart sapma barları grafikte gösterilmemiştir (Şekil 4.1).



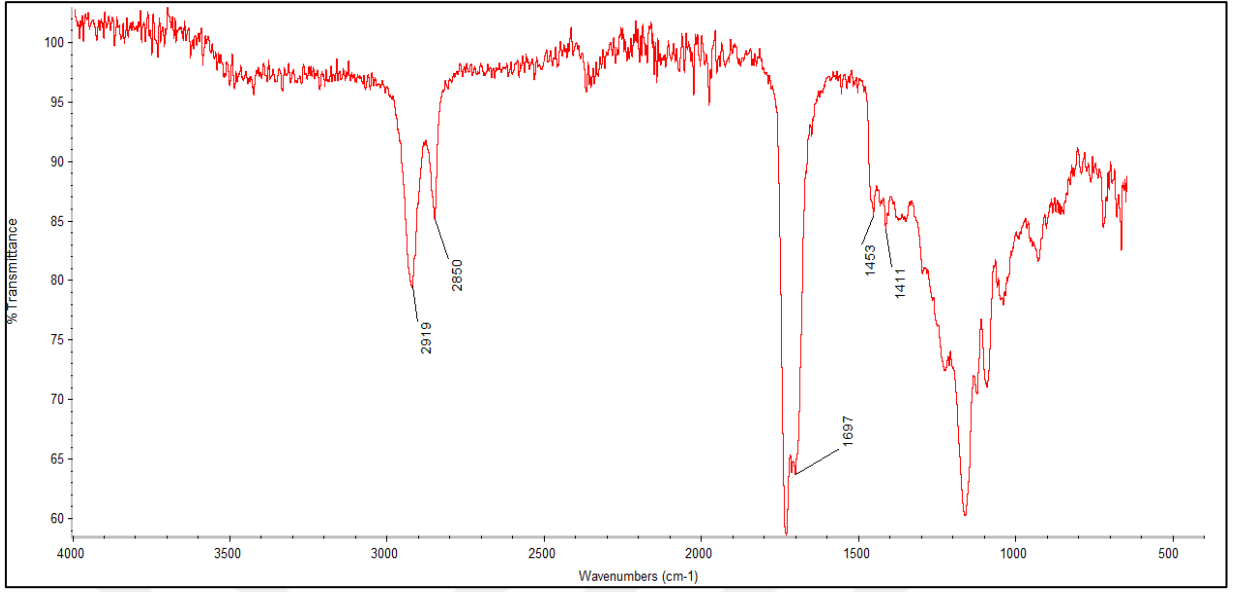
Şekil 4.1. PGS doku iskelesine ait degradasyon testi grafiği (n=4) (p < 0,05)

4.1.2. FTIR Analizi

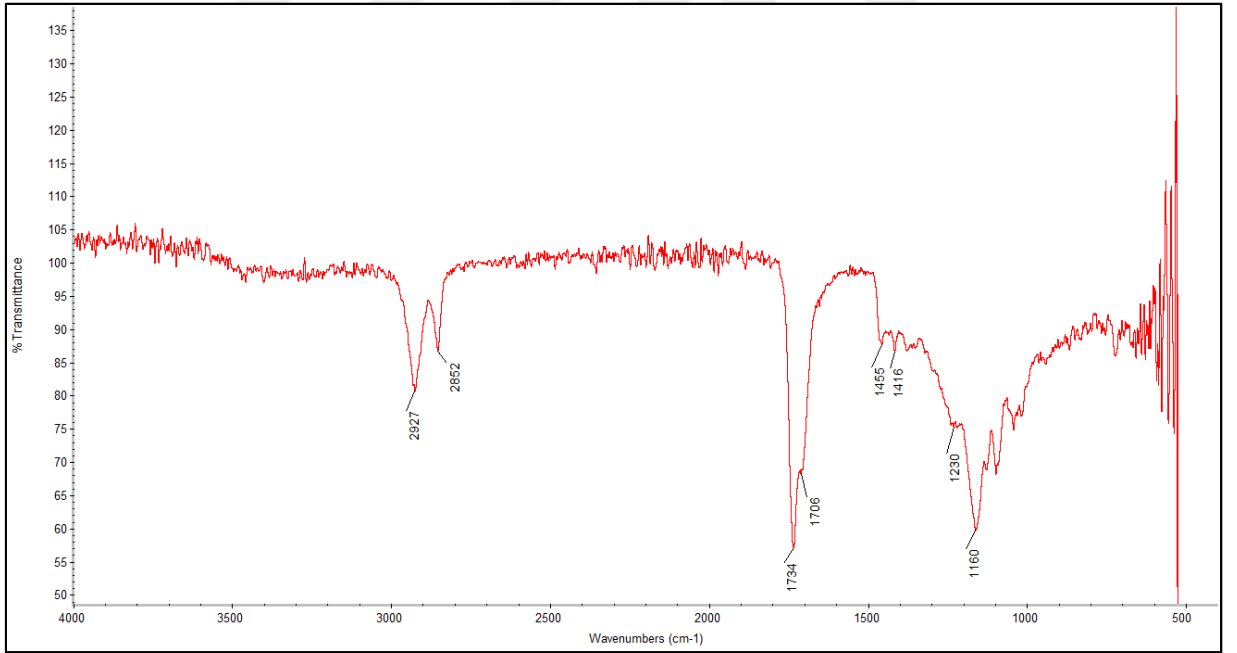
Tez kapsamında kullanılan PGS doku iskelesinin prepolimer aşamasındaki ve çapraz bağlanma aşaması sonrasındaki yapılarının belirlenmesi amacı ile FTIR analizi yapılmıştır.

Prepolimer halindeki elastomerin 1150 ve 1730 cm^{-1} deki bantlarında sırasıyla oluşan C-O ve C=O bağları görülmektedir. 2928-2851 cm^{-1} arasındaki bantlar $-\text{CH}_2$ gruplarının $-\text{C}-\text{H}$ gerilme bantlarına aittir. 1411-1464 cm^{-1} arasındaki bantlar ise $-\text{CH}_3$ metil gruplarının bükülme absorpsiyonundan gelmektedir. 925 cm^{-1} de $-\text{C}-\text{O}$ düzlem içi bükülme titreşim bandı görülmektedir. 1730 cm^{-1} deki keskin bant $-\text{C}=\text{O}$ gerilme bandı ile çapraz bağlanmanın kanıtıdır.

Süre arttıkça 1730 cm^{-1} deki bantların absorpsiyonlarının arttığı görülmektedir. Bu durum, uygulanan süreyle 1730 cm^{-1} deki C=O bağlarının arttığını göstermektedir. Kürlenme aşaması tamamlanmış PGS FTIR sonuçları ise literatüre uygunluk göstermiş ve 2927-2852 cm^{-1} 'deki pikler alken ($-\text{CH}_2$) gruplarını, 1734 cm^{-1} 'deki pik C=O gruplarını, 1455 cm^{-1} 'deki pik metil grubu ($-\text{CH}_3$), 1416 cm^{-1} 'deki O-H gruplarını ifade etmiştir [50].



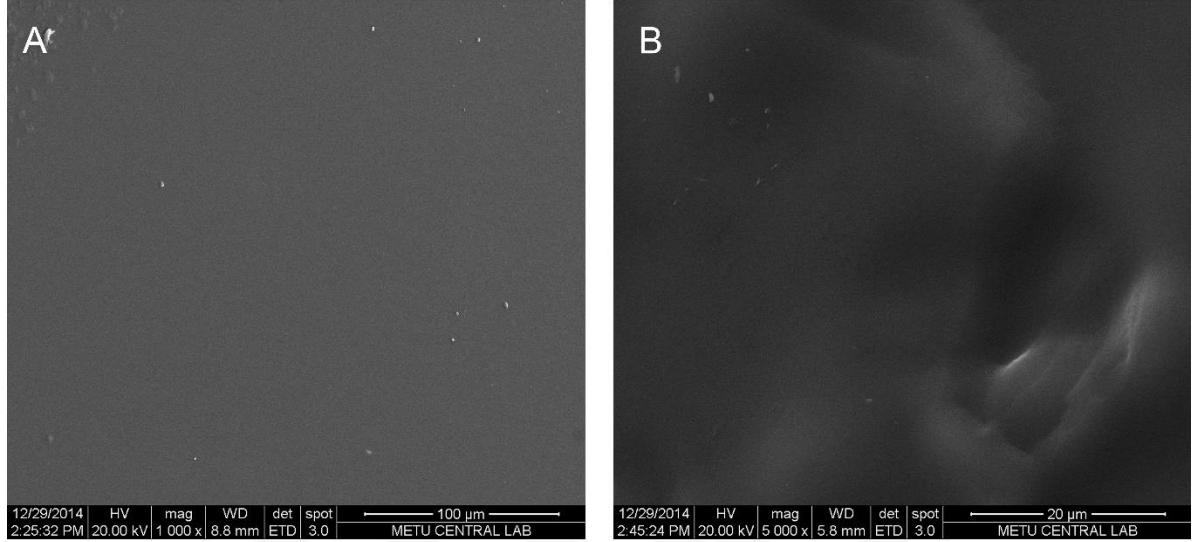
Şekil 4.2. 5 kez x 1 dk prepolimerizasyon işlemi yapılmış PGS polimeri FTIR analizi



Şekil 4.3. 5 kez x 1 dk prepolimerizasyon işlemi yapılmış ve 10.5 saat kürlenme aşaması tamamlanmış PGS polimeri FTIR analizi

4.1.3. SEM Analizi

Üretilen PGS doku iskelesinin yapı morfolojisinin belirlenmesi amacıyla Şekil 4.6.'da hücre ekimi gerçekleştirilmemiş PGS doku iskelesinin SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelenecek olursa doku iskelesi yüzeyinin düz bir yapıya sahip olduğu gözlemlenebilmektedir.



Şekil 4.4. Hücre ekimi yapılmamış PGS doku iskelesi SEM görüntüleri A) 1000X
B) 5000X

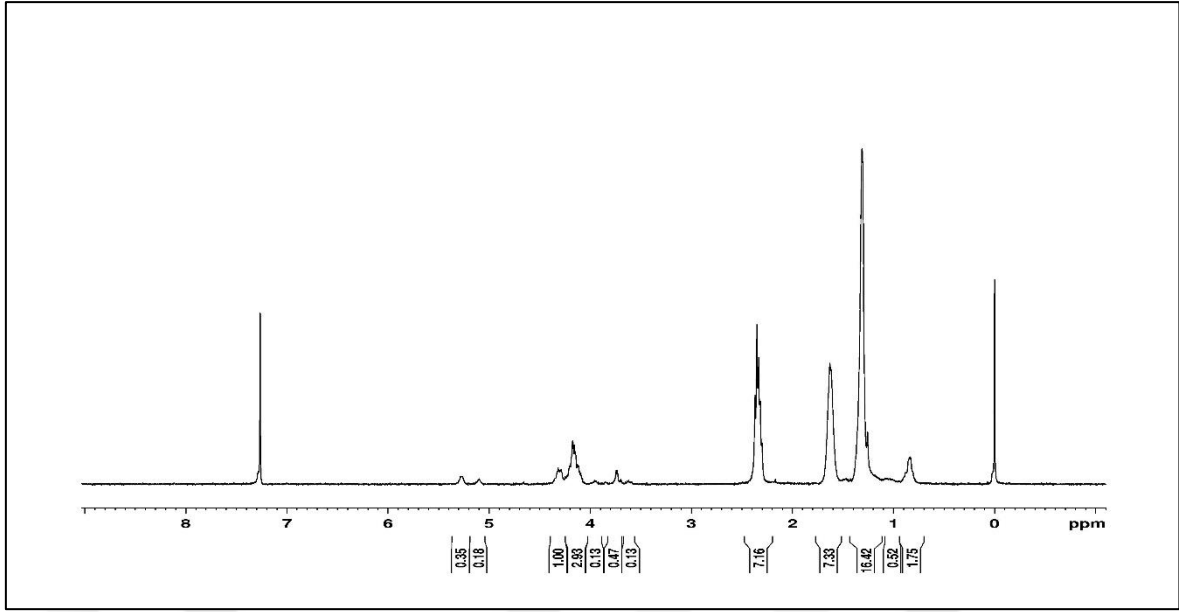
4.1.4. ¹H-NMR Analizi

Yapılan morfolojik gözlem sonucunda 5 kez x 1 dk prepolimerizasyon aşaması gerçekleştirilmiş ve 10.5 saat 150°C altında çapraz bağlanmış PGS polimeri çalışmaya göre en dayanıklı ve en elastik sonucu vermesinden dolayı karakterizasyon basamaklarında bu özellikteki PGS elastomeri yapısı incelenmiştir.

Gliserolden $-(CH)-$ (m_1), sebasik asitten $-(CH_2)_2-$ (m_2) gelen grupların proton alanları karşılaştırılmıştır.

$$m_1/m_2 = n_2Am_1/n_1Am_2 = 3.808$$

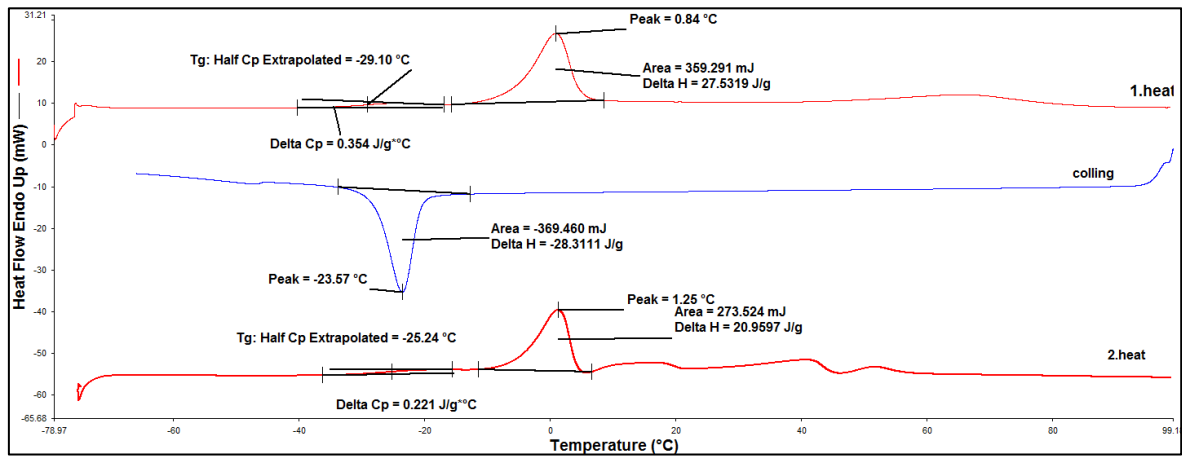
$m_1 + m_2 = 1$ olarak baz alındığı bilindiğinden her bir monomer biriminden analitik gruplardaki proton sayıları $n_1=4$ ve $n_2=1$ 'dir. $Am_1 = 7.16$, $Am_2 = 0.47$ olduğundan bu eşitlikten elastomerdeki monomer birim oranları (% mol); $m_1=79.20$ (sebasik asit): $m_2=20.80$ (gliserol) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. PGS Elastomeri ^1H -NMR spektrumu

4.1.5. DSC Analizi

Şekil 4.8.'de PGS elastomerinin termal özelliklerini belirleyen DSC termogramı verilmiştir. Termograma göre 1. ısıtmada çizilen eğri ile ortaya çıkan T_g değeri polimerin camı geçiş sıcaklığını ifade etmektedir (T_g : -29.10 °C). Soğutma aşamasında ise ortaya çıkan ters pik ise polimerin kristallenme sıcaklığını ifade etmektedir. PGS yarı kristalin bir polimerdir ve elde edilen sıcaklık değeri 23.57 °C'dir. DSC termogramı sonucunda gözlemlenen değerler literatür ile uygunluk göstermektedir [83].



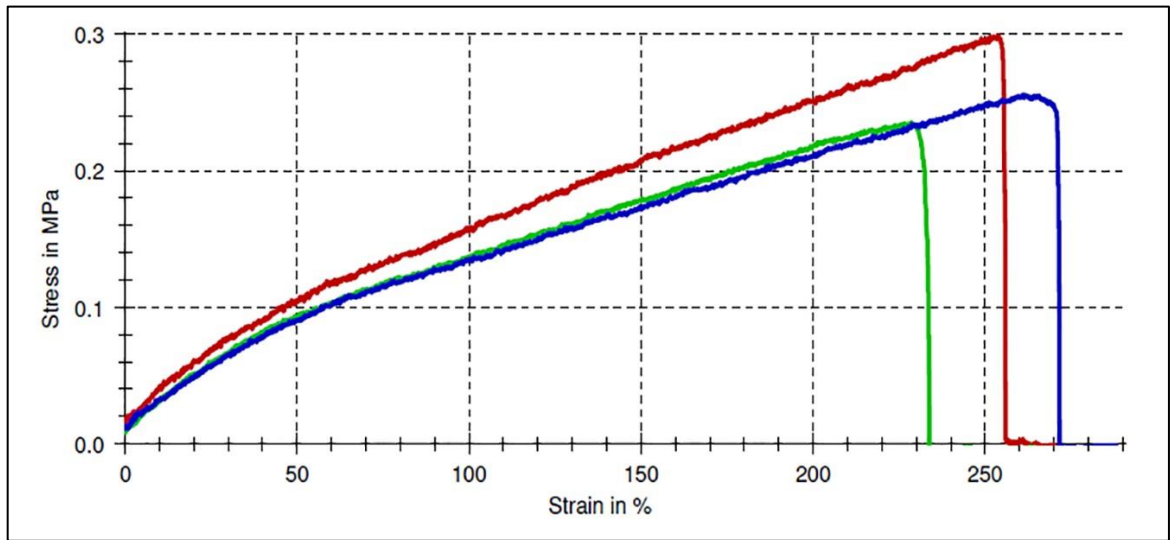
Şekil 4.6.PGS elastomerinin termal özelliklerini belirleyen DSC termogramı

4.1.6. Üniversal Mekanik Çekme Testi

Yapılan analiz sonucuna göre PGS doku iskelesinin çekme mukavemeti σ_M : 0.26, kopma uzaması ϵ_M : 260,94 ve Young Modülü $E\tau$: 0,1567 çıkmıştır. Analiz sonrası elde edilen değerler literatür ile uygunluk göstermiştir [84]. Şekil 4.8’de PGS doku iskelesine yapılan mekanik çekme testinin grafiği görülmektedir. PGS doku iskelesinin mekanik çekme testi verileri, iskelenin tendon doğal yapısına uygun olarak elastisite gösterdiğini belirtmektedir [47, 85-87].

Çizelge 4.1. PGS doku iskelesi çekme testi sonuçları (n=3) (σ_M : Çekme Mukavemeti, ϵ_M : Çekme mukavemetinde kopma uzaması, $E\tau$: Young Modülü, MPa)

	PGS Doku İskelesi
σ_M (MPa)	0,26 $\pm$ 0,0326
ϵ_M %	260,94 $\pm$ 17
$E\tau$ (MPa)	0,1567 $\pm$ 0,00647



Şekil 4.7. Mekanik çekme testinde PGS doku iskelesine ait % gerilme-kuvvet grafiği (n=3)

4.1.7.Temas Açısı Ölçümü

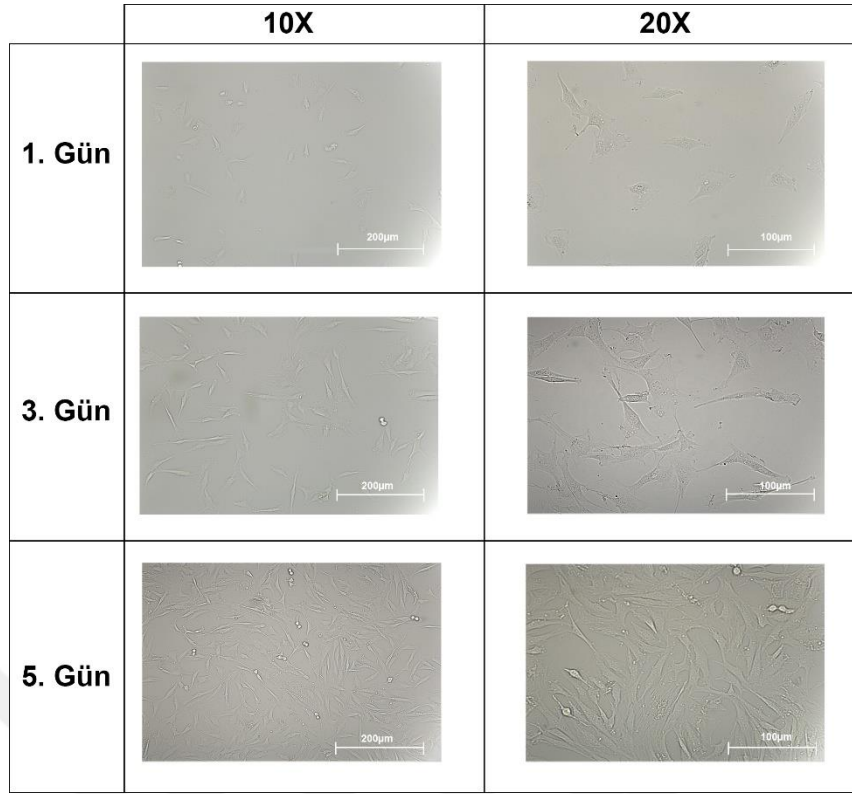
N= 5 adet PGS doku iskelesi temas açısı ölçümü yapılmıştır. Ölçüm için distile su kullanılmıştır. Formüle göre hesaplanan değerlerin ortalaması ($76,2 \pm 10,5$) literatür ile uygunluk göstermektedir [88].

4.2.Hücre Kültürü Çalışmaları

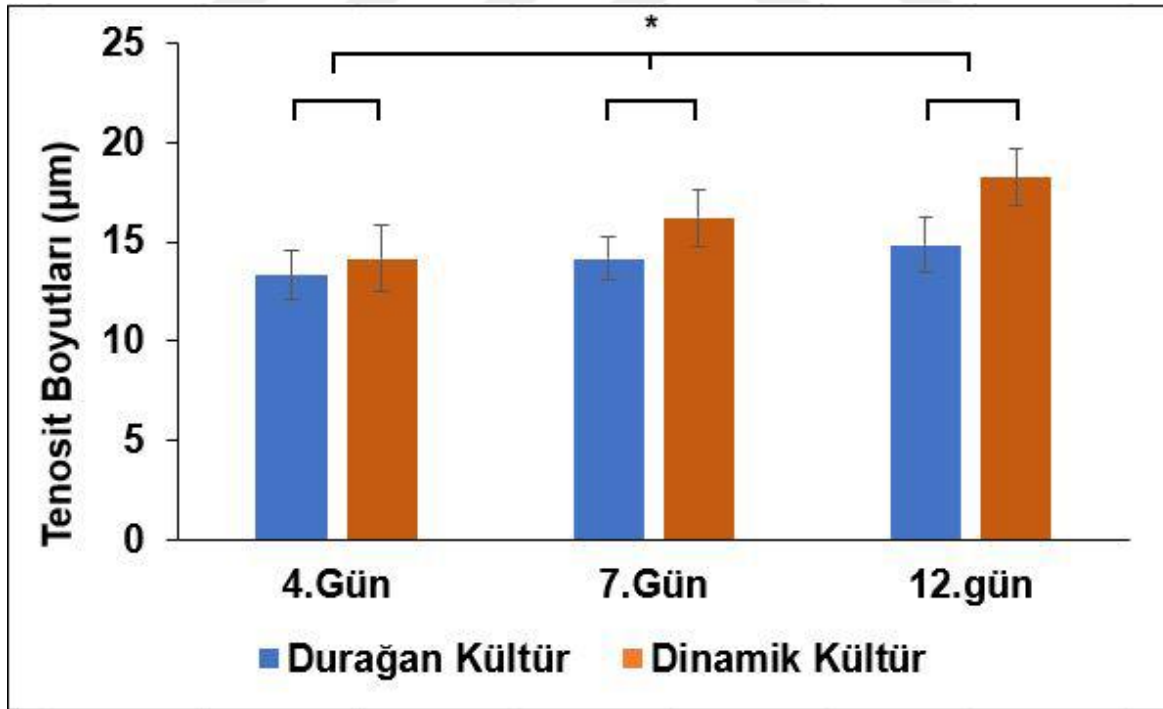
Hücre kültürü çalışmaları kapsamında P1 insan tenositleri (Zenbio, ABD) temin edilmiştir.

4.2.1. Tenosit Karakterizasyonu

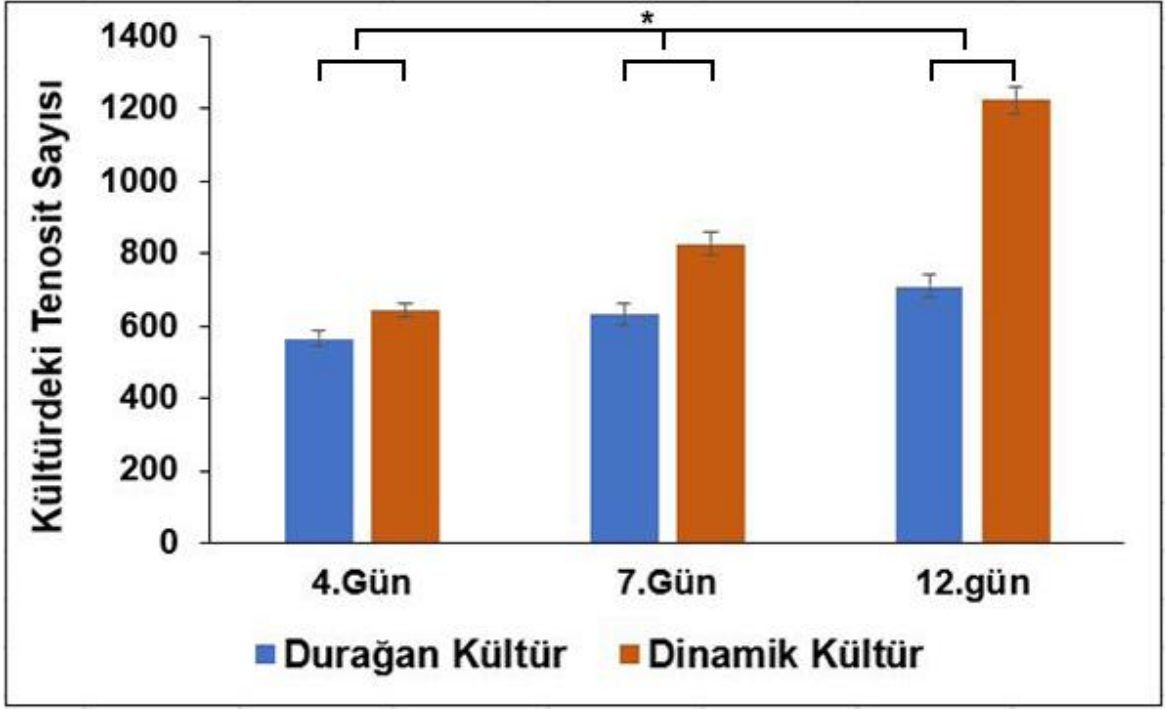
İnsan tenositlerinin flask üzerinde (P3) faz-kontrast mikroskobu ile incelenen görüntüleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Gün sayısı arttıkça hücreler karakteristik yapıları olan iç şekli almıştır [89]. Çalışma kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmalarında, PGS doku iskeleleri üzerinden analiz edilmiş hücre boyutları ve hücre sayıları ImageJ programı yardımıyla hesaplanmıştır. Dinamik kültürdeki hücre boyutları 4. gün için $14,140 \pm 1,69 \mu\text{m}$, 7. gün için $16,198 \pm 1,41 \mu\text{m}$ ve 12. gün için $18,236 \pm 1,41 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Durağan kültürdeki hücre boyutları 4. gün için $13,320 \pm 1,26 \mu\text{m}$, 7. gün için $14,144 \pm 1,07 \mu\text{m}$ ve 12. gün için $14,824 \pm 1,36 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında dinamik kuvvete maruz kalan tenositler, durağan kültürdeki tenositlere göre daha fazla proliferasyon göstermiştir ve boyutları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha büyüktür (Şekil 4.9.). Hücre sayıları bakımından PGS örnekler karşılaştırıldığında dinamik kültür için 4. günde $643 \pm 17,67$ 7.günde $828 \pm 12,40$, 12. günde $1225 \pm 11,39$ adet hücre sayılmıştır. Durağan kültür örneklerinde ise 4.günde $565 \pm 18,66$, 7. günde $632 \pm 15,57$, 12.günde $710 \pm 15,99$ adet hücre sayılmıştır (Şekil 4.10.). Grafiğe bakılacak olursa dinamik kültür etkisiyle hücrelerin daha homojen olarak dağılım gösterdiği ve sayı olarak daha fazla çoğaldıkları görülmektedir. Grafikler mekanik uyarının hücreler üzerindeki morfolojik etkisini açıkça göstermektedir. Sayısal veriler diğer hücre kültürü karakterizasyon analizleri ile uygunluk göstermektedir.



Şekil 4.8. İnsan tenositlerinin (P3) faz-kontrast mikroskobu ile incelenen görüntüleri



Şekil 4.9. PGS doku iskeleleri üzerindeki tenositlerin boyutları karşılaştırılmalı histogram grafiği (p<0,05)



Şekil 4.10. PGS doku iskeleleri üzerindeki tenosit sayılarının karşılaştırmalı histogram grafiği ($p<0,05$)

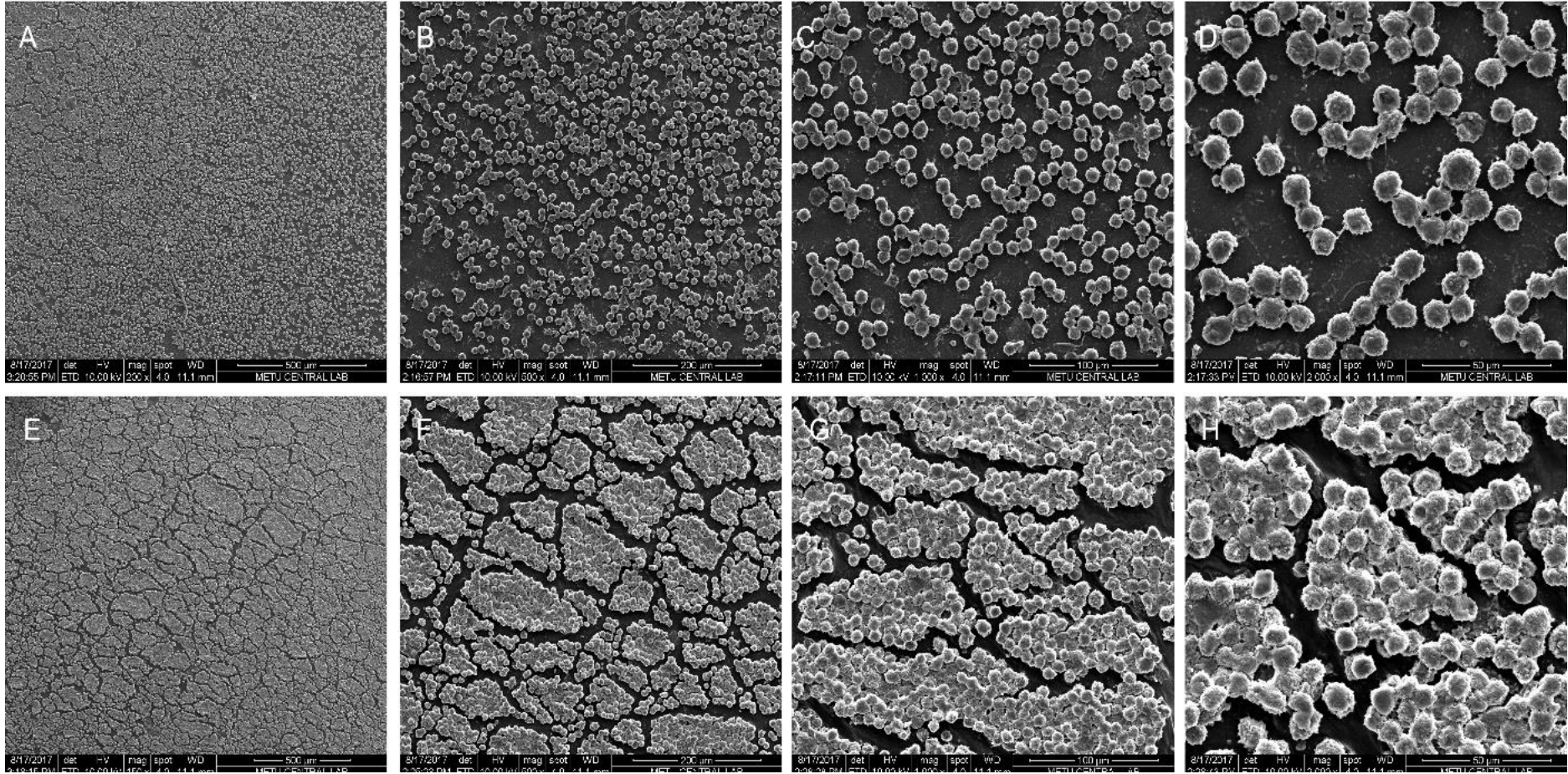
4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

SEM görüntüleme tekniği ile PGS doku iskelesine ekilmiş insan tenositlerinin dinamik ve durağan kültürdeki 4., 7. ve 12 gün yapısal ve davranış özellikleri incelenmiştir. PGS doku iskelesi yüzeyinin pürüzsüz olması ve hücrelerin dinamik çekme kuvvetinden etkilenecek yerinden kalkmaması için tüm örnekler 2 günlük durağan kültüre tabi tutulmuştur. Doku iskelesi olarak kullanılan PGS doku iskelesinin asidik özelliğe sahip olması, normalde iğ şeklinde olan tenosit yapısının malzeme üzerinde daha küresel bir yapıda olmasına neden olmuştur. PGS doku iskelesinin sahip olduğu bu etkinin hücreler üzerinde yarattığı tepki daha önceki literatür çalışmalarında raporlanmıştır [90]. 2. gün durağan kültürün sonunda 6 adet örnek dinamik kültüre transfer edilmiştir ve 4. kültür gününün sonuna kadar günde 30 dakika %6 çekme oranına maruz bırakılmıştır. Şekil 4.10'da görünen 4. gün SEM fotoğrafları karşılaştırılacak olursa 2 kez uygulanan 30 dakikalık mekanik çekme kuvveti, dinamik kültürdeki hücrelerin durağan kültürdeki hücrelere oranla daha homojen dağılım gösterdiği görülmektedir. Doku gelişimi, dinamik kültür etkisinde kalan örnekler üzerinde daha net gözlemlenebilmektedir.

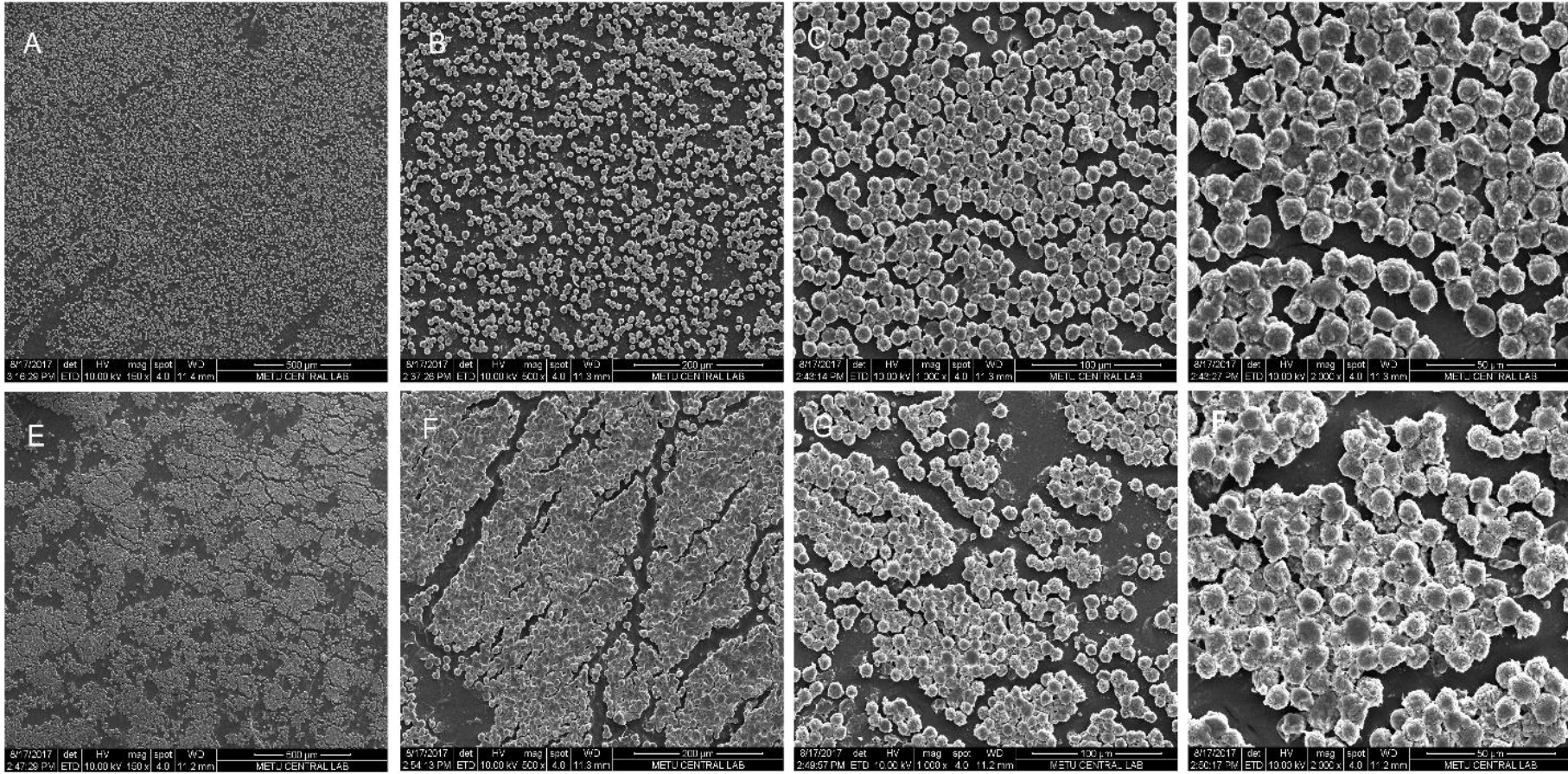
7.gün kültürlerinin (Şekil 4.11) SEM görüntülerine bakılacak olursa kültürün 4. gününden sonra günde 60 dakika dinamik çekme kuvvetine maruz kalan dinamik kültür örneklerindeki hücre dağılımının 4. güne kıyasla daha çok homojen olduğu ve örnek üzerindeki hücrelerin birbirleriyle etkileşime geçerek ECM salgılamaya başladıkları açıkça görülmektedir. Kontrol grubu olan durağan kültür grubunda ise hücreler homojenlikten uzaklaşarak daha çok kümelenme davranışı göstermiştir. Gözlemlenen kümelenme davranışı, kültürdeki hücrelerin doku oluşturma eğilimlerinin azaldığını göstermektedir.

12. gün kültürünün SEM görüntülerine bakılacak olursa hücrelerin homojen dağılımı 7. güne kıyasla daha da arttığını ve hücreler arası iletişimin artarak salgıladıkları ECM ile öncül bir doku oluşturmaya oldukça yakın oldukları açıkça görünmektedir (Şekil 4.12). Kontrol grubu olan durağan grupta ise mekanik kuvvete maruz kalınmaması nedeniyle oluşan kümeleşme davranışı, örnek üzerindeki hücre gruplarının seyrekleşmesine neden olmuştur. Durağan kültür örneklerinin kültürdeki gün sayısı arttıkça hücre kümeleşmesi sebebiyle doku oluşturmaya yönelik başarısının düşük olduğu söylenebilmektedir.

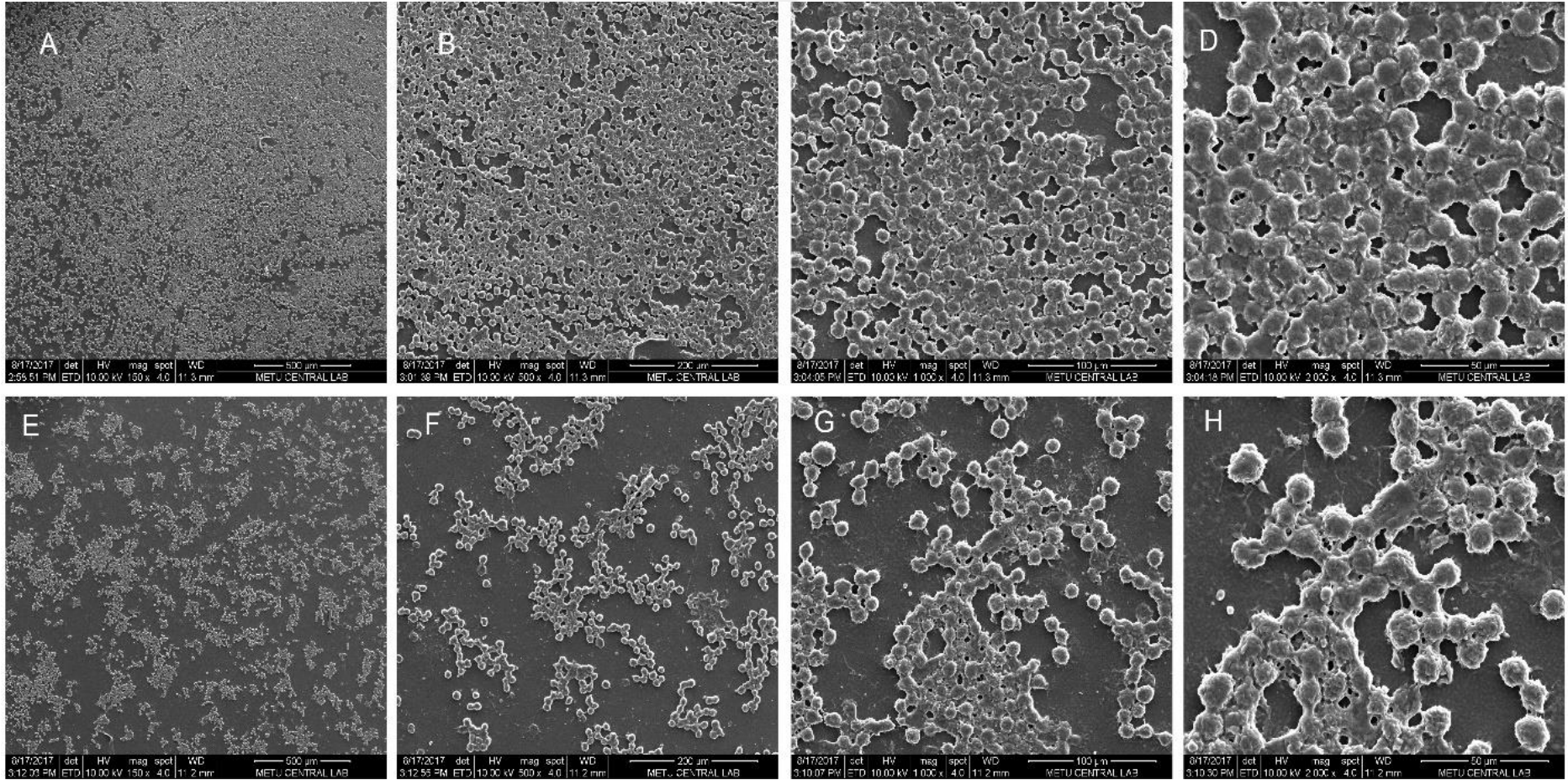
Dinamik çekme kuvvetine maruz kalan örneklerle genel olarak bakılacak olursa kültürde geçirilen günle doğru orantılı olarak hücreler arası iletişimin daha güçlü olması sebebiyle hücre dağılımının homojen olması ve bundan dolayı öncül doku oluşumuna daha yatkın olduğu söylenebilir.



Şekil 4.11. PGS doku iskeleleri 4. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/ Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X



Şekil 4.12. PGS doku iskeleleri 7. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/ Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X



Şekil 4.13. PGS doku iskeleleri 12. gün kültüre ait SEM görüntüleri. A) PGS/Dinamik kültür-150X, B) PGS/Dinamik kültür-500X, C) PGS/Dinamik kültür-1000X, D) PGS/Dinamik kültür-2000X, E) PGS/ Durağan kültür-150X, F) PGS/ Durağan kültür-500X, G) PGS/ Durağan kültür-1000X, H) PGS/ Durağan kültür-2000X

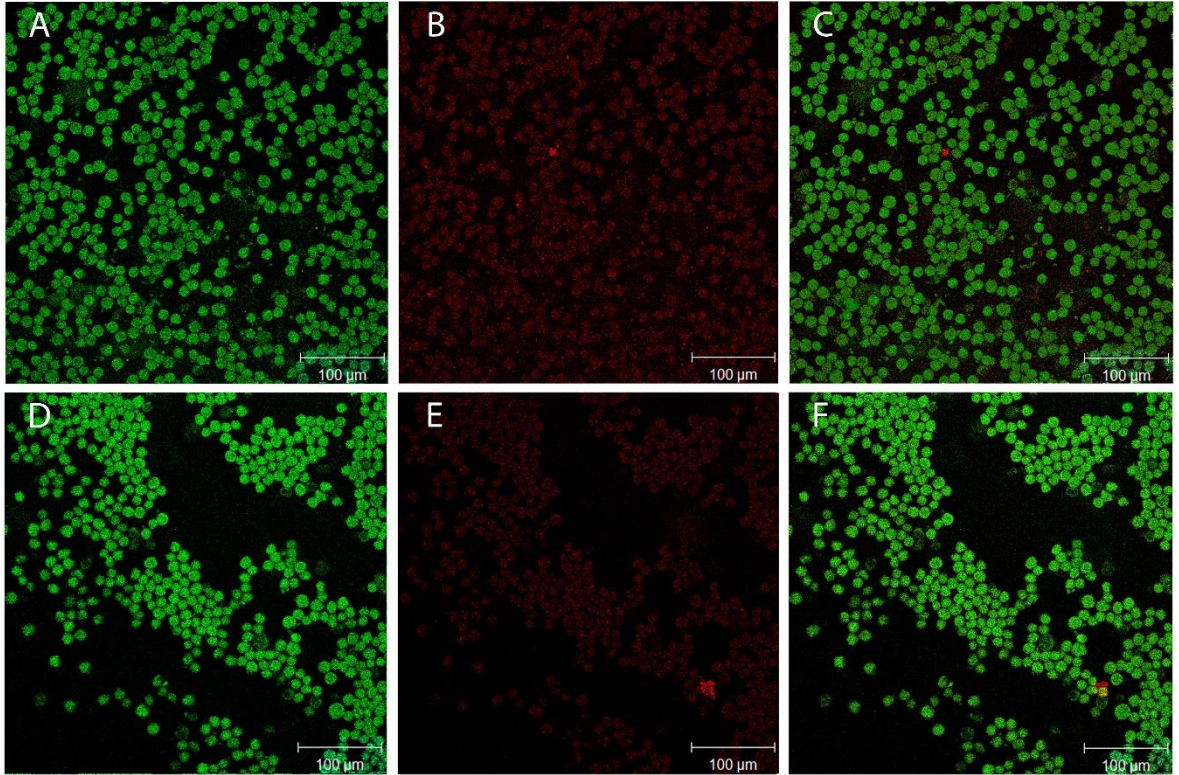
4.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Canlı/Ölü boyama kalsein ve propidyum iyodür boyalarının hücrelerin canlı veya ölü olması ile ilgili bilgi vermektedir. Kalseinin asetoksimetil esteri lipofiliktir ve bu nedenle hücre zarı geçirgenliği oldukça yüksektir. Kalsein, kedisi florasın bir molekül olmamasına rağmen canlı hücrelerde bulunan esteraz enzimi ile etkileşime girdiği zaman güçlü yeşil renkli florasın ışımaya yapmaktadır (uyarma: 490 nm, emisyon: 515 nm). Bu nedenle kalsein sadece canlı hücreleri boyamaktadır. Propidyum iyodür boyası ise çekirdek boyasıdır ve canlı hücre zarı içerisinden geçememektedir. Ölü hücre zarının düzensiz bölgelerinden geçerek çekirdeğe ulaşır ve hücrenin DNA çift sarmalını boyayarak kırmızı florasın ışımaya yapmaktadır (uyarma: 535 nm, emisyon: 617 nm). Hem kalsein hem de propidyum iyodür 490 nm ile uyarılabilir olduğundan, canlı ve ölü hücrelerin aynı anda izlenmesi bir floresan mikroskopu ile mümkündür.

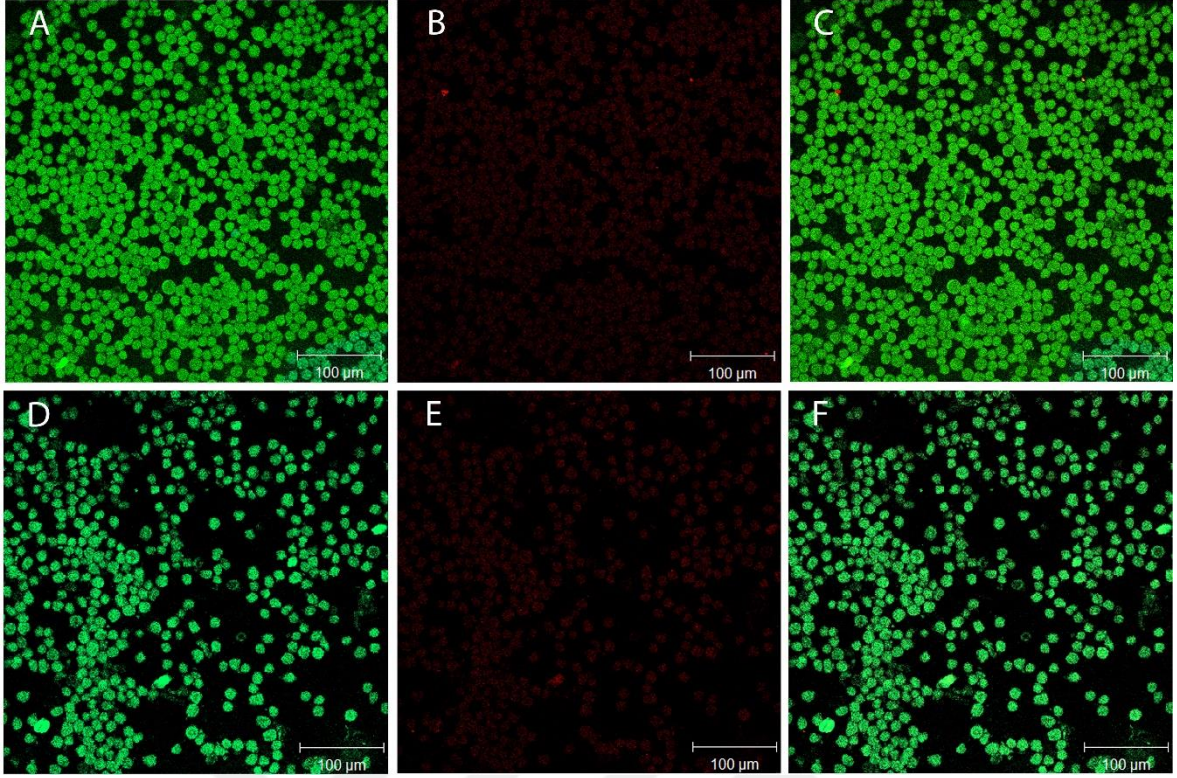
Tez kapsamında dinamik ve durağan kültürdeki PGS doku iskelelerine 4. gün, 7. gün ve 12. günlerde bu kit uygulanmış ve sonuçlar görüntülenmiştir. Tüm doku iskelelerinde hücre yapışması ve çoğalması net bir şekilde gözlemlenebilmektedir. 4. gün örneklerine bakılacak olursa kültürdeki canlılık oranları oldukça yüksektir (Şekil 4.13). Ancak 2 günlük 30 dakikalık dinamik kuvvete maruz bırakılan örnekler durağan kültür örnekleriyle kıyaslanacak olursa daha homojen bir dağılım göstermiştir. Hücre boyutları bakımından dinamik kültürdeki hücrelerin boyutları, durağan kültürdekilere göre daha eşit büyüklükte olduğu açıkça görülmektedir. Durağan kültürdeki örneklerin SEM görüntülerini destekleyici şekilde kümeleşme davranışı göstermişlerdir. Tendon dokusu geliştirmek için uygulanan ve gereken dinamik kuvvetin net etkisini 4. günden itibaren gözlemlenebilmektedir.

7. gün örneklerine bakılacak olursa kültürlerdeki canlılık oranının yüksek olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.14.). Daha fazla dinamik kuvvete maruz kalmış olan örnekler 7. günün sonunda homojen olarak dağılım göstererek çoğalmaya devam etmişlerdir. 4. güne göre daha fazla homojen çoğalma göstermiş durağan kültürdeki örneklerde ise hücre boyutları bakımından dengesizlikler görülmektedir. Durağan kültür örneklerinin düzensiz çoğalmalarından dolayı hücre topluluklarının kümeler halinde ayrıldığı açıkça görülmektedir.

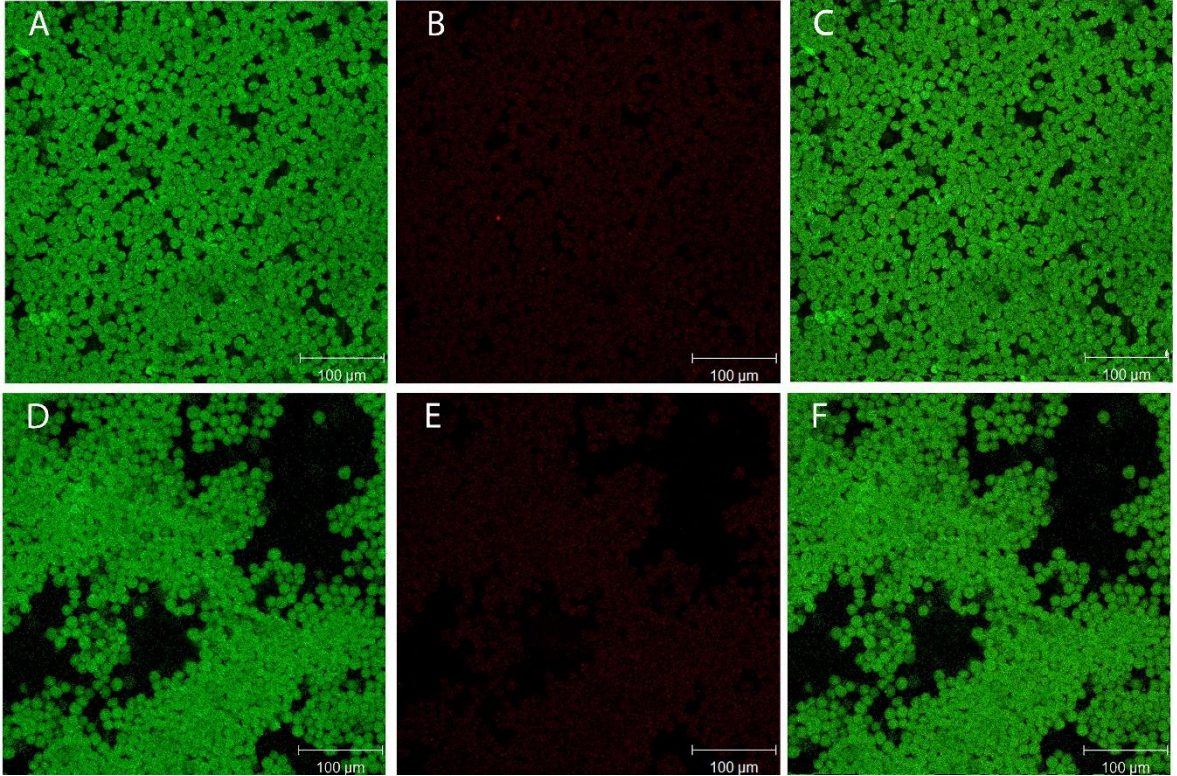
12. gün kültür örneklerinde ise canlılık oranı oldukça yüksektir (Şekil 4.15). Dinamik kültür örneklerine bakılacak olursa durağan kültürdeki örneklere göre proliferasyon ve canlılık başarısı bakımından oldukça pozitif yönde belirgin bir farklılık göstermektedir. Durağan kültür örnekleri ise kümelenme davranışı göstermeye devam etmiştir ve doku bütünlüğü bakımından dinamik kültür örneğine göre daha zayıf sonuç vermiştir.



Şekil 4.14. PGS doku iskelelerine ait 4. gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X



Şekil 4.15. PGS doku iskelelerine ait 7. gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X

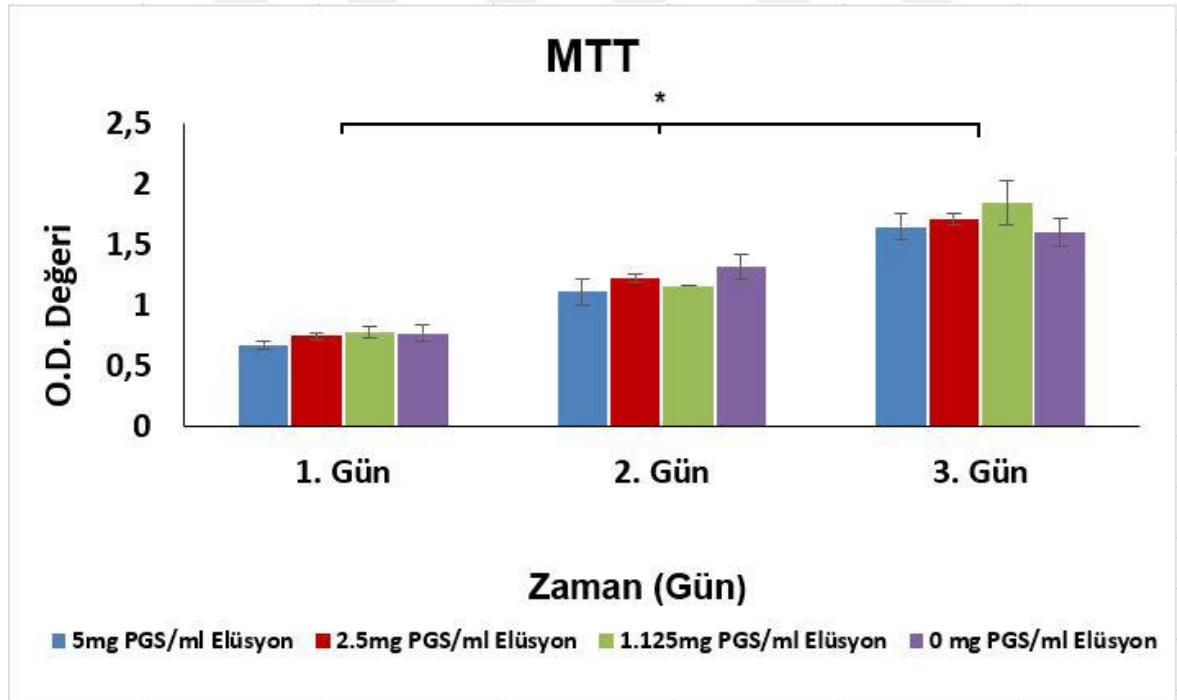


Şekil 4.16. PGS doku iskelelerine ait 12 gün canlı/ölü boyama floresan mikroskobu görüntüleri. A-B-C) Dinamik kültür 20X, D-E-F) Durağan kültür 20X

4.2.4. *In Vitro* Sitotoksosite Testi

İnsan tenosit hücreleri, PGS doku iskelesinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilmiş besiyeri ekstraktı ile kültüre edilmiştir [91]. Ekstrakt halindeki besiyerindeki meydana gelen herhangi bir değişim (pH vb.) hücre çoğalma davranışını etkilemektedir. Buna ek olarak testte kullanılan doku iskelesi malzemesinin hücreler üzerindeki toksik etkisi, eklenen besiyeri ekstraktı oranına bağlıdır.

Yapılan bu çalışmada 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonunda ekstrakte edilmiş besiyeri oranlarına göre gruplandırılmış hücrelerin mitokondriyal aktivitelerine bakılmıştır. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşiğini (3-[4, 5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) formazan kristallerine indirgemektedir. Bu dönüşüm sonrası oluşan bu kristaller izopropanol yardımı ile çözülerek, işlem sonucunda ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenmiştir. Elde edilen bu absorbans değeri proliferasyonunu devam ettiren hücre miktarı ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.17. PGS doku iskelesi sitotoksosite grafiği n=4 (p<0,05)

Şekil 4.16.'te 1.gün verileri bakılacak olursa bütün gruplar eklenen besiyeri ekstraktlarına benzer oranlarda çoğalma göstererek tepki vermiştir. Ancak en yüksek ortalamalar 0 mg/mL ile kontrol grubunda ve 1.125mg/mL oranlarında görülmektedir. 2. gün verilerinde ise gruplar doğrusal olarak çoğalmaya devam etmişlerdir. Elüsyon miktarlarının değiştirilmesiyle oluşturulan deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak elüsyon miktarlarının hücre metabolik aktivitesine sitotoksik etki yapmadığı sonucu çıkarılmıştır. 3. gün verilerinde ise doğrusal olarak çoğalma devam etmektedir. Ancak kontrol grubunun barında gözlemlenen düşüşün sebebi ise çok fazla çoğalmasından dolayı yaşanan ters etkidir. Yani hücrelerin aşırı olarak çoğalmasından dolayı sayılarında azalma meydana gelmiştir. Deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemesine rağmen günler arasındaki sonuçlar kıyaslandığında anlamlı olarak pozitif yönde farklılık çıkmıştır. Gün bazında deney grupları incelenecek olursa hücrelerin metabolik aktivitelerinde gün geçtikçe artış olduğu gözlemlenmektedir.

4.2.5. RT-PCR (Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi

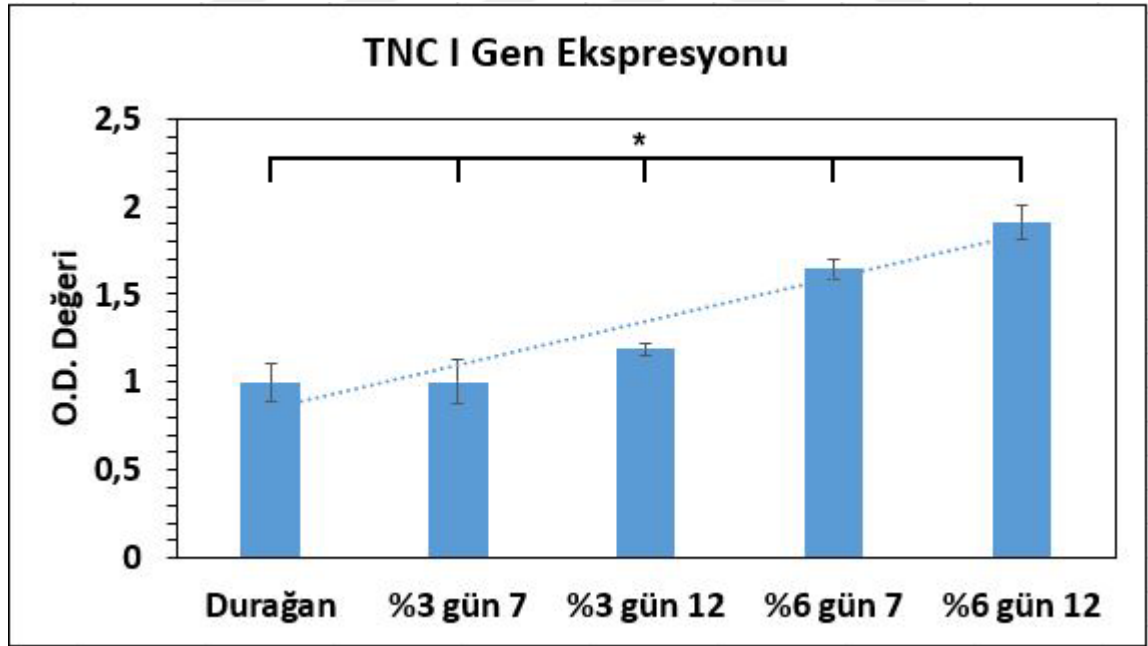
RT-PCR analizi, tez çalışması kapsamında yapılan dinamik ve durağan hücre kültürü çalışmasında, tenositlerin uygulanan dinamik kuvvete olan moleküler düzeyde cevabını ölçmek amacıyla yapılmıştır. Analiz sonrası alınan sonuçlara göre uygulanan mekanik kuvvetin (%3- %6) tenositlerin gen ifadesi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. COL1-A1 geninin ifadesi hücre metabolizmasında anlık olarak değişebildiğinden gruplardan alınan ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Uzun kültürasyon süreçlerinden sonra tenositler için iz miktarda ifade edilen COL3 geninin, çalışma kapsamında 12 günlük olarak planlanan kültür süresinin COL3 gen ifadesi için gerekli olan azami süreden daha az olmasından dolayı ifadesi net olarak gözlemlenememiştir.

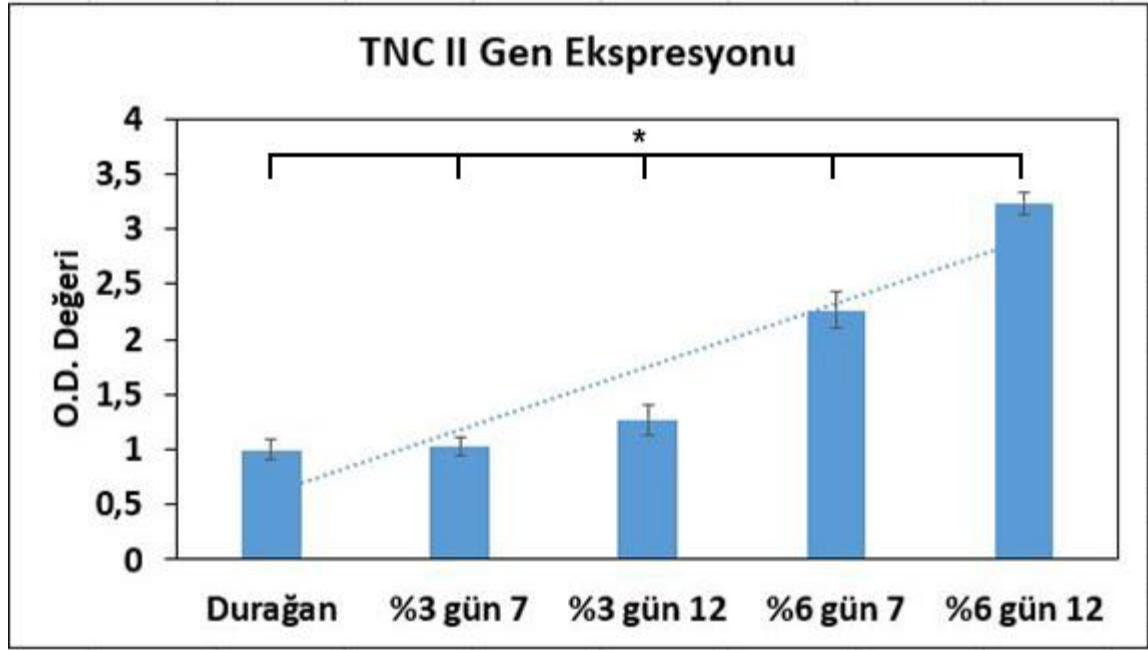
Mekanik kuvvetler, doku homeostazinin temel düzenleyicileridir ve kas iskelet sistemi dokuları ve bağ dokularının normal işlevi için önemlidir. Ligamentler ve tendonlar gibi yüksek gerilme stresi taşıyan dokular, normal olarak tenaskini eksprese eder [92]. Tenomodulinin ekspresyonunun tendon gelişiminde ve tenosit proliferasyonunda rol oynadığı belirlenmiştir, ancak sentezi ileri dönem hücre

kültüründe net olarak belirlenebilmektedir [93]. Çalışma kapsamında değerlendirilen Tenomodülin gen ifadesi, kültürün erken döneminde iz miktarda ifade olduğundan kültürdeki ifadesi diğer genlere göre daha düşük çıkmıştır (Şekil 4.20).

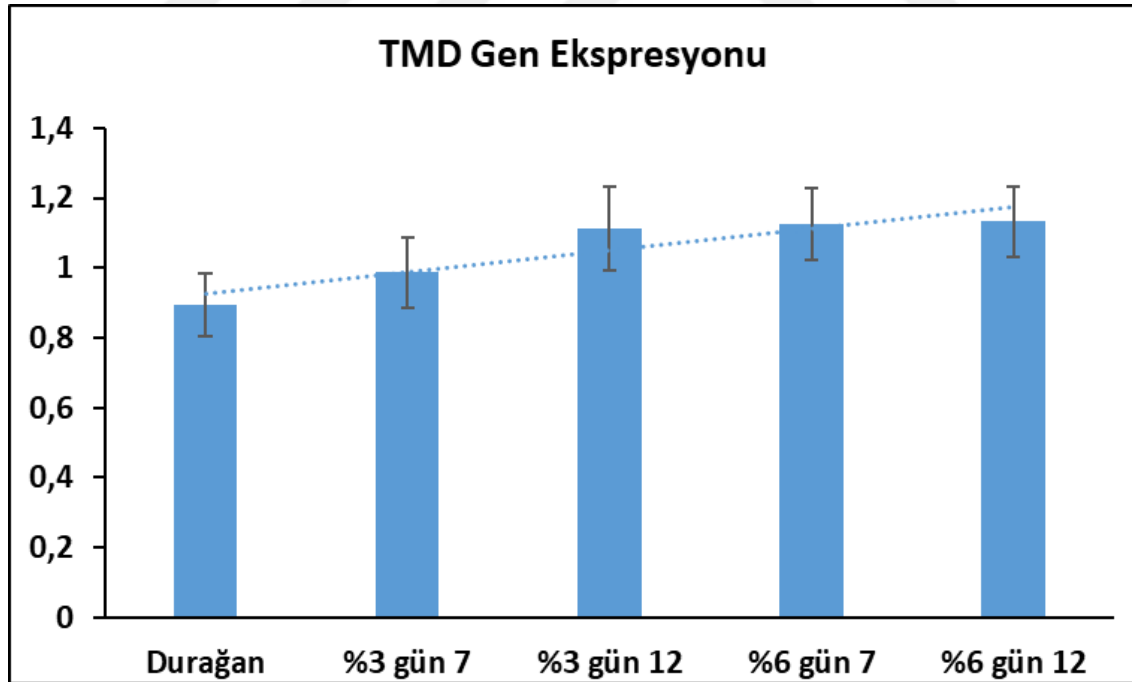
Çalışma kapsamında değerlendirilen bir diğer gen ifadesi olan Tenaskin 1 (Şekil 4.18) ve Tenaskin 2 genleri (Şekil 4.19), dinamik ve durağan kültür koşullarındaki örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı çıkmıştır ($p<0,05$). Grafikler incelenecek olursa mekanik kuvvete maruz bırakılan örneklerdeki TNC1 ve TNC2 geni, kendi günlerindeki durağan kültür örneklerine göre daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Sonuç olarak TNC1 ve TNC2 gen ifadesinin artışına bakılarak, mekanik kuvvetin tenositlerin öncül dokulaşma davranışını pozitif olarak etkilediği ve salgıladıkları ECM yapısını bu duruma göre şekillendirdikleri anlaşılmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda, hasar görmüş tendondaki tenaskin-C'nin izoformlarının, potansiyel olarak tenosit proliferasyonunu uyardığı belirlenmiştir [73, 89].



Şekil 4.18. Dinamik ve durağan kültür arasındaki TNC-1 gen ifadesi farkını gösteren histogram grafiği ($p<0,05$)



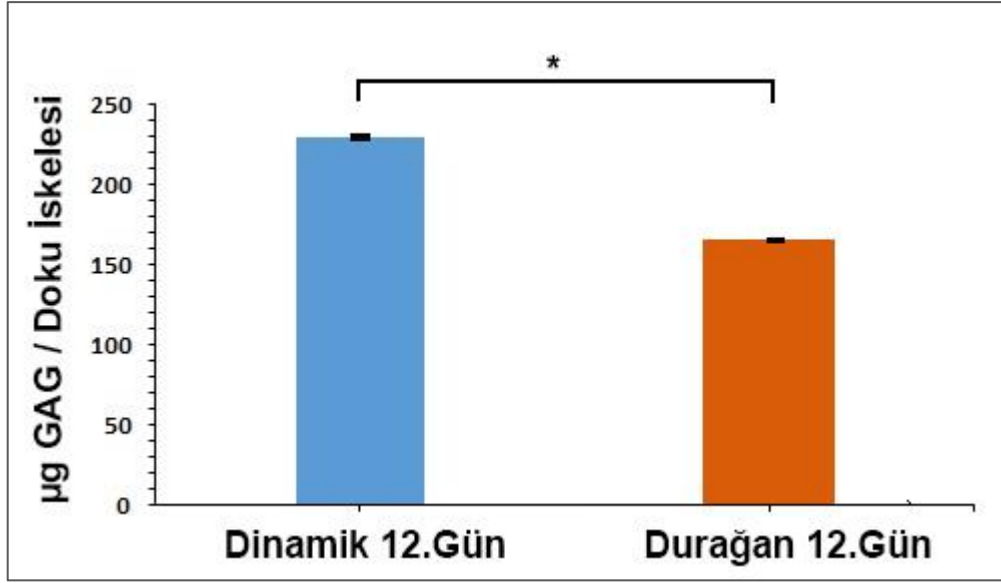
Şekil 4.19. Dinamik ve durağan kültür arasındaki TNC-2 gen ifadesi farkını gösteren histogram grafiği ($p < 0,05$)



Şekil 4.20. Dinamik ve durağan kültür arasındaki GAG miktarı farkını gösteren histogram grafiği

4.2.6. Glikozaminoglikan Miktarı Analizi

Planlanan deney çalışmaları kapsamında bölüm 3.4.5'te ayrıntılarıyla anlatılmış olan DMMB (dimethyl methylene blue) testi ile yapılmıştır. 12 gün boyunca durağan ve dinamik kültür şartlarındaki tenosit ekili PGS doku iskelelerindeki GAG miktarı ölçülmüştür. PGS doku iskeleleri 100 mM amonyum asetat çözeltisi içindeki 1 mg/mL konsantrasyonundaki Proteinaz K solüsyonu ile muamele sonrası çözünmemiştir. Bundan dolayı normalizasyon işlemi doku iskelelerinin hücre ekilen kısımlarına göre doku iskelesi başına gerçekleştirilmiştir. Test analizinin normalize edilmesi amacıyla kullanılan standart eğri grafiği EK 1 bölümünde paylaşılmıştır. Şekil 4.20 incelenecek olursa kültür sonrasında dinamik kuvvete maruz kalan doku iskelelerindeki GAG miktarı 230,3 µg/doku iskelesi iken, durağan kültürdeki kontrol grubu örneklerindeki GAG miktarı ise 166,6 µg/doku iskelesi çıkmıştır. Sonuçlar karşılaştırılacak olursa mekanik kuvvete maruz kalan tenositlerin salgıladıkları GAG miktarı, durağan kültürdeki tenositlerin salgıladığı GAG miktarına göre daha fazladır. Dinamik kuvvet uygulanan grupta diğer gruba oranla yaklaşık %28 oranında daha fazla GAG içeriği tespit edilmiştir. Uygulanan dinamik kuvvetin, tenosit proliferasyonunu artırarak öncül doku oluşumunu desteklediği görülmektedir. Dinamik kuvvetin, tenosit proliferasyonuna olumlu yöndeki etkileri daha önceki başlıklarda tartışılmış olan Canlı/ Ölü boyama sonuçlarıyla desteklenmektedir. Elde edilen tenosit-GAG miktarı sonuçları literatür ile uygunluk göstermektedir [94, 95].

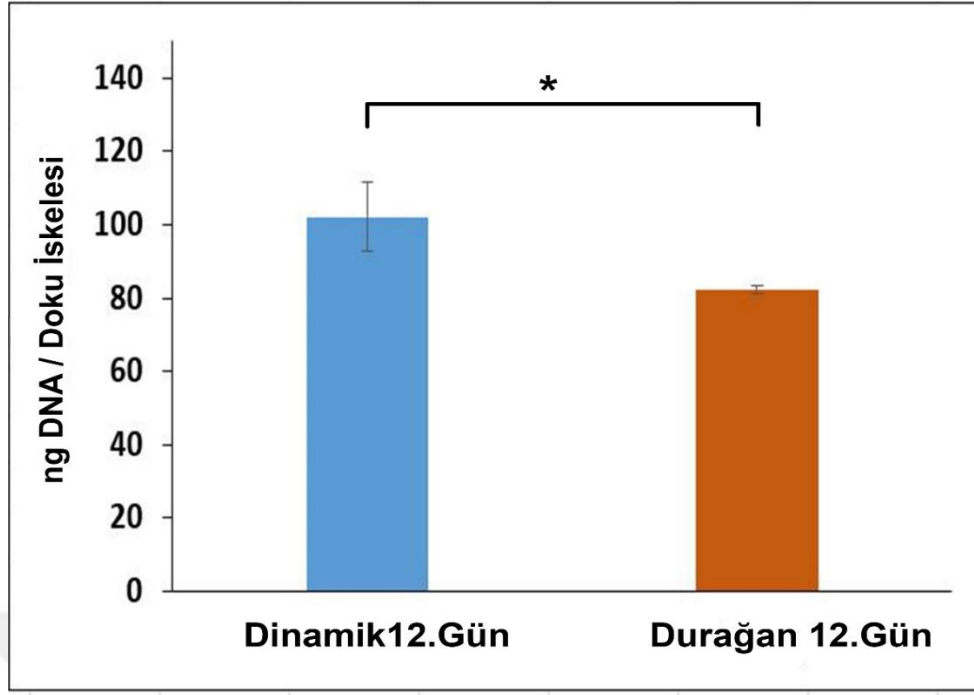


Şekil 4.21. Dinamik ve durağan kültür arasındaki GAG miktarı farkını gösteren histogram grafiği ($p < 0,05$)

4.2.7. DNA Miktarı Analizi

Tez çalışması kapsamında tenosit ekili doku iskelelerine uygulanan dinamik kuvvetin etkisini gözlemlemek amacıyla durağan ve dinamik deney gruplarının 12. kültür günündeki DNA miktarı analizi yapılmıştır. DNA analizi bölüm 3.4.6'da ayrıntılı olarak bahsedilen PicoGreen testi ile gerçekleştirilmiştir. Test analizinin normalize edilmesi amacıyla kullanılan standart eğri grafiği Ek 2 bölümünde paylaşılmıştır.

Şekil 4.21'e bakıldığında dinamik kuvvete maruz bırakılan tenosit ekili PGS doku iskelesi için doku iskelesi başına düşen DNA miktarı 102,04 ng iken, durağan kültürdeki örnek başına düşen DNA miktarı 82,24 ng olarak ölçülmüştür. Sonuçlar daha önceki başlıklarda verilen GAG ölçümü sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Dinamik kuvvet uygulanan grupta diğer gruba oranla %20 oranında daha fazla DNA olduğu açıkça görülmektedir. Bunun nedeni olarak dinamik kuvvet uygulanan deney grubunda gözlemlenen ($n=3$) hücre proliferasyonunun diğer gruba göre daha fazla olması, DNA miktarındaki fazlalığın nedeni olarak gösterilebilir. Deney gruplarına bakılacak olursa özellikle dinamik kuvvet uygulanan örnekler hücre kültürünün erken dönemlerinde olmalarına karşın öncül doku oluşumu gerçekleşmiştir sonucu çıkarılabilmektedir.



Şekil 4.22. Dinamik ve durağan kültür arasındaki DNA miktarı farkını gösteren histogram grafiği ($p < 0,05$)

5.GENEL SONUÇLAR

- ❖ Çalışma kapsamında PGS polimeri optimizasyonu 5 kez x1 dakika süresinde yapılan prepolimerizasyon işlemi uygun sonuçlar vermiştir. Çapraz bağlanma aşaması için 10 saat 30 dakikalık süre optimize edilmiştir.
- ❖ PGS iskeleler (n=4) ilk 7 günlük süreçte ortalama %20 oranında degrade olmuştur. Bu süreci izleyen haftalarda degradasyon oranı zamanla artmış fakat ilk 7 günlük periyotta gözlemlendiği kadar yüksek ivmeli olmamıştır.
- ❖ PGS polimeri FTIR sonuçlarına göre 1730 cm^{-1} 'deki keskin bant --C=O gerilme bandı ile çapraz bağlanmanın kanıtıdır. Süre arttıkça 1730 cm^{-1} 'deki bantların absorpsiyonlarının arttığı görülmektedir.
- ❖ PGS polimeri içindeki her bir monomer birimindeki analitik gruplarda proton sayıları $n_1=4$ ve $n_2=1$ 'dir. $A_{m1} = 7.42$, $A_{m2} = 0.48$ olduğundan bu eşitlikten elastomerdeki monomer birim oranları (% mol); $m_1=79.20$ (sebasik asit): $m_2=28,80$ (gliserol) olarak bulunmuştur.
- ❖ Yapılan çekme analizi sonucuna göre PGS doku iskelesinin çekme mukavemeti σ_M : 0.26, kopma uzaması ϵ_M : 260,94 ve Young Modülü E_T : 0,1567 MPa çıkmıştır. Analiz sonrası elde edilen değerler literatür ile uygunluk göstermiştir.
- ❖ PGS doku iskelesi yüzeyinin çalışma kapsamında ölçülmüş yüzey temas açısı $76,2^\circ \pm 10,5$ olup, malzemenin çapraz bağ oranlarında yapılacak değişiklikler ile bu değer ileriki çalışmalarda değiştirilmesi öngörülmektedir. Sadece DHT sürelerinin değiştirilmesi ile hidroksil gruplarının tüketilmesi üzerinden hidrofobisite değerinin kolaylıkla modifiye edilebileceği düşünülmektedir.
- ❖ Doku iskelesi olarak kullanılan PGS doku iskelesinin sahip olduğu yüzey degradasyonu özelliği ile serbest kalan sebasik asit miktarı ile doğru orantılı olarak artan düşük pH, normalde iğ şeklinde olan tenosit yapısının malzeme üzerinde daha küresel bir yapıda olmasına neden olmuştur. Bu durum Keratinitayan ve ark. tarafından 2015 yılında gerçekleştirilmiş PGS polimeri ile yapılan hücre kültürü çalışmasında raporlanmıştır [96].

- ❖ Image J programı kullanılarak dinamik kültürdeki hücre boyutları 4. gün için $14,140 \pm 1,69 \mu\text{m}$, 7. gün için $16,198 \pm 1,41 \mu\text{m}$ ve 12. gün için $18,236 \pm 1,41 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Durağan kültürdeki hücre boyutları 4. gün için $13,320 \pm 1,26 \mu\text{m}$, 7. gün için $14,144 \pm 1,07 \mu\text{m}$ ve 12. gün için $14,824 \pm 1,36 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.
- ❖ Image J programı yardımıyla hücre sayıları bakımından PGS doku iskeleleri karşılaştırıldığında dinamik kültürdeki PGS doku iskeleleri için 4. günde $643 \pm 17,67$, 7. günde $828 \pm 12,40$, 12. günde $1225 \pm 11,39$ adet hücre sayılmıştır. Durağan kültür örneklerinde ise 4. günde $565 \pm 18,66$, 7. günde $632 \pm 15,57$, 12. günde $710 \pm 15,99$ adet hücre sayılmıştır.
- ❖ Image J analizi sonucunda dinamik kültür etkisiyle hücrelerin daha homojen olarak dağılım gösterdiği ve sayı olarak daha fazla çoğaldıkları görülmektedir. Grafikler mekanik uyarının hücreler üzerindeki morfolojik etkisini açıkça göstermektedir. Sayısal veriler diğer hücre kültürü karakterizasyon analizleri ile uygunluk göstermektedir.
- ❖ 4.gün SEM fotoğrafları karşılaştırıldığında 2 defa uygulanmış 30 dakikalık mekanik çekme kuvveti, dinamik kültürdeki hücrelerin durağan kültürdeki hücrelere oranla daha homojen dağılım göstermesine neden olmuştur.
- ❖ 7.gün kültürlerinin 4. gün kültürlerine kıyasla daha çok homojen bir biçimde dağılmıştır. Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin birbirleriyle etkileşime geçerek ECM salgılamaya başladıkları açıkça görülmektedir. Durağan kültür grubunda ise hücre davranışları homojenlikten uzaklaşarak daha çok kümelenme davranışı göstermiştir. Gözlemlenen kümelenme davranışı, kültürdeki hücrelerin öncül doku oluşturma eğilimlerinin azaldığını göstermektedir.
- ❖ 12. gün dinamik kültüründeki tenositlerin homojen dağılımının 7. gün kültüründeki dağılıma kıyasla daha da homojen hale geldiği ve hücreler arası iletişimin artarak salgıladıkları ECM ile öncül bir doku oluşturmaya oldukça yakın oldukları açıkça görünmektedir.

- ❖ Canlı/ ölü boyama analizi sonuçlarına göre kültürün 4. gününde dinamik kültüre maruz kalan örneklerde, durağan kültür örneklerine göre hücre boyutları daha homojendir. Dağılımları açısından incelenecek olursa durağan kültür örneklerindeki hücreler kümelenme davranışı göstermiştir. Kümelenme davranışı, durağan kültürdeki hücrelerin öncül doku oluşumunu negatif etkilemiştir.
- ❖ 12. gün örnekleri karşılaştırıldığında dinamik kültürdeki tenositlerin öncül doku oluşumuna oldukça yaklaştıkları görülmüştür. Durağan kültür örneklerinde 7. günden itibaren gözlemlenen hücre kümeleşme davranışının sonucu olarak hücrelerin tabaka halinde kalkmaya başladığı gözlemlenmiştir. Dinamik kuvvet, hücrelerin daha homojen biçimde ve boyutlarda dağılımını sağlayarak öncül doku gelişimini desteklemiştir.
- ❖ MTT analizine göre elüsyon miktarları ile oluşturulan deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemesine rağmen günler arasındaki sonuçlar kıyaslandığında anlamlı olarak pozitif yönde farklılık çıkmıştır. Bu durum hücrelerin metabolik aktivitelerinin PGS polimerinin konsantrasyon oranından etkilenmediği gözlemlenmiştir. Bu durumda tez kapsamında kullanılan PGS elastomerinin sitotoksik olmadığı söylenebilmektedir.
- ❖ PCR analizi sonrası alınan sonuçlara göre uygulanan mekanik kuvvetin (%3-%6) tenositlerin gen ifadesi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.
- ❖ Çalışma kapsamında 12 günlük olarak planlanan kültür süresinin COL III gen ifadesi için gerekli olan azami süreden daha az olmasından dolayı ifadesi net olarak gözlemlenememiştir.
- ❖ COL1-A1 geninin ifadesi hücre metabolizmasında anlık olarak değişebildiğinden dolayı gruplardan alınan ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenememiştir.

- ❖ TNC 1 ve TNC 2 gen ifadesinin artışına bakılarak, mekanik kuvvetin tenositlerin öncül dokulaşma davranışını pozitif olarak etkilediği ve salgıladıkları ECM yapısını bu duruma göre şekillendirdikleri sonucuna ulaşılmıştır.
- ❖ Mekanik kuvvete maruz kalan tenositlerin salgıladıkları GAG miktarı analiz edildiğinde durağan kültürdeki tenositlerin salgıladığı GAG miktarına göre yaklaşık %28 oranında daha fazla miktarda salgılandığı tespit edilmiştir. Uygulanan dinamik kuvvetin, tenosit proliferasyonunu arttırarak öncül doku oluşumunu desteklediği açıkça görülmektedir.
- ❖ Dinamik kuvvete maruz bırakılan tenosit ekili PGS doku iskelesi için doku iskelesi başına düşen DNA miktarı 102,04 nanogram iken, durağan kültürdeki örnek başına düşen DNA miktarı 82,24 ng olarak ölçülmüştür. Sonuçlar daha önceki başlıklarda verilen GAG ölçümü sonuçları ile uygunluk göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] L. C. Almekinders & S. V. Almekinders, "Outcome in the treatment of chronic overuse sports injuries: a retrospective study," *J Orthop Sports Phys Ther*, vol. 19, pp. 157-61, Mar **1994**.
- [2] U. G. Longo, A. Lamberti, N. Maffulli & V. Denaro, "Tendon augmentation grafts: a systematic review," *Br Med Bull*, vol. 94, pp. 165-88, **2010**.
- [3] J. H. Wang, "Mechanobiology of tendon," *J Biomech*, vol. 39, pp. 1563-82, **2006**.
- [4] C. T. Thorpe, P. D. Clegg & H. L. Birch, "A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk?," *Equine Vet J*, vol. 42, pp. 174-80, Mar **2010**.
- [5] M. Benjamin, E. Kaiser & S. Milz, "Structure-function relationships in tendons: a review," *J Anat*, vol. 212, pp. 211-28, Mar **2008**.
- [6] M. Kjaer, "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading," *Physiol Rev*, vol. 84, pp. 649-98, Apr **2004**.
- [7] C. T. Thorpe, H. L. Birch, P. D. Clegg & H. R. Screen, "The role of the non-collagenous matrix in tendon function," *Int J Exp Pathol*, vol. 94, pp. 248-59, Aug **2013**.
- [8] M. J. Moore & A. De Beaux, "A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity," *Journal of Anatomy*, vol. 153, pp. 163-169, **1987**.
- [9] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, R. B. Jackson & N. A. Campbell, *Campbell biology*, **2014**.
- [10] J. Kastelic, A. Galeski & E. Baer, "The multicomposite structure of tendon," *Connect Tissue Res*, vol. 6, pp. 11-23, **1978**.
- [11] D. L. Butler, E. S. Grood, F. R. Noyes & R. F. Zernicke, "Biomechanics of ligaments and tendons," *Exerc Sport Sci Rev*, vol. 6, pp. 125-81, **1978**.
- [12] J. H. Yoon & J. Halper, "Tendon proteoglycans: biochemistry and function," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 5, pp. 22-34, Mar **2005**.
- [13] K. G. Vogel, "What happens when tendons bend and twist? Proteoglycans," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 4, pp. 202-3, Jun **2004**.
- [14] K. G. Vogel & T. J. Koob, "Structural specialization in tendons under compression," *Int Rev Cytol*, vol. 115, pp. 267-93, **1989**.

- [15] T. J. Koob & K. G. Vogel, "Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon," *J Orthop Res*, vol. 5, pp. 414-24, **1987**.
- [16] P. Kannus, L. Jozsa, T. A. Jarvinen, T. L. Jarvinen, M. Kvist, A. Natri & M. Jarvinen, "Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat," *Histochem J*, vol. 30, pp. 799-810, Nov **1998**.
- [17] L. Jozsa, M. Lehto, M. Kvist, J. B. Balint & A. Reffy, "Alterations in dry mass content of collagen fibers in degenerative tendinopathy and tendon-rupture," *Matrix*, vol. 9, pp. 140-6, Mar **1989**.
- [18] S. A. Fenwick, B. L. Hazleman & G. P. Riley, "The vasculature and its role in the damaged and healing tendon," *Arthritis Research*, vol. 4, pp. 252-260, **2002**.
- [19] S. Fukuta, M. Oyama, K. Kavalkovich, F. H. Fu & C. Niyibizi, "Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon," *Matrix Biol*, vol. 17, pp. 65-73, Apr **1998**.
- [20] A. J. Bailey & N. D. Light, "Intermolecular cross-linking in fibrotic collagen," *Ciba Found Symp*, vol. 114, pp. 80-96, **1985**.
- [21] J. Wertz, M. Galli & J. R. Borchers, "Achilles Tendon Rupture: Risk Assessment for Aerial and Ground Athletes," *Sports Health*, vol. 5, pp. 407-409, **2013**.
- [22] F. S. Chuen, C. Y. Chuk, W. Y. Ping, W. W. Nar, H. L. Kim & C. K. Ming, "Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons," *J Histochem Cytochem*, vol. 52, pp. 1151-7, Sep **2004**.
- [23] Y. Bi, D. Ehirchiou, T. M. Kilts, C. A. Inkson, M. C. Embree, W. Sonoyama, L. Li, A. I. Leet, B. M. Seo, L. Zhang, S. Shi & M. F. Young, "Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche," *Nat Med*, vol. 13, pp. 1219-27, Oct **2007**.
- [24] E. Ippolito, P. G. Natali, F. Postacchini, L. Accinni & C. De Martino, "Ultrastructural and immunochemical evidence of actin in the tendon cells," *Clin Orthop Relat Res*, pp. 282-4, Jul-Aug **1977**.
- [25] M. Lavagnino, M. E. Wall, D. Little, A. J. Banes, F. Guilak & S. P. Arnoczky, "Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities," *J Orthop Res*, vol. 33, pp. 813-22, Jun **2015**.

- [26] R. F. Ker, "Mechanics of tendon, from an engineering perspective," *International Journal of Fatigue*, vol. 29, pp. 1001-1009, 2007/06/01/ **2007**.
- [27] P. Sharma & N. Maffulli, "Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 6, pp. 181-90, Apr-Jun **2006**.
- [28] P. K. Beredjiklian, "Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 85-a, pp. 539-50, Mar **2003**.
- [29] M. T. Rodrigues, R. L. Reis & M. E. Gomes, "Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 7, pp. 673-86, Sep **2013**.
- [30] C. B. Frank, "Ligament structure, physiology and function," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 4, pp. 199-201, Jun **2004**.
- [31] Z. M. Peled, G. S. Chin, W. Liu, R. Galliano & M. T. Longaker, "Response to tissue injury," *Clin Plast Surg*, vol. 27, pp. 489-500, Oct **2000**.
- [32] G. Yang, B. B. Rothrauff & R. S. Tuan, "Tendon and Ligament Regeneration and Repair: Clinical Relevance and Developmental Paradigm," *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, vol. 99, pp. 203-222, **2013**.
- [33] B. D. Ratner & S. J. Bryant, "Biomaterials: where we have been and where we are going," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 6, pp. 41-75, **2004**.
- [34] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño & J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 5, pp. 1137-1158, **2008**.
- [35] R. Singh & N. B. Dahotre, "Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 18, pp. 725-51, May **2007**.
- [36] F.-Z. Cui & A. G. Mikos, "Important Topics in the Future of Tissue Engineering: Comments from the participants of the 5th International Conference on Tissue Engineering at Kos, Greece," *Regenerative Biomaterials*, vol. 1, pp. 103-106, 10/20 **2014**.
- [37] P. O. Bagnaninchi, Y. Yang, A. J. El Haj & N. Maffulli, "Tissue engineering for tendon repair," *Br J Sports Med*, vol. 41, p. e10; discussion e10, Aug **2007**.
- [38] G. Verdiyeva, K. Koshy, N. Glibbery, H. Mann & A. M. Seifalian, "Tendon Reconstruction with Tissue Engineering Approach--A Review," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 11, pp. 1495-523, Sep **2015**.

- [39] M. L. Bayer, C. Y. Yeung, K. E. Kadler, K. Qvortrup, K. Baar, R. B. Svensson, S. P. Magnusson, M. Krogsgaard, M. Koch & M. Kjaer, "The initiation of embryonic-like collagen fibrillogenesis by adult human tendon fibroblasts when cultured under tension," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 4889-97, Jun **2010**.
- [40] K. Shimode, N. Iwasaki, T. Majima, T. Funakoshi, N. Sawaguchi, T. Onodera & A. Minami, "Local upregulation of stromal cell-derived factor-1 after ligament injuries enhances homing rate of bone marrow stromal cells in rats," *Tissue Eng Part A*, vol. 15, pp. 2277-84, Aug **2009**.
- [41] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo & Y.-I. Wang, "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate," *Biophysical Journal*, vol. 79, pp. 144-152, 2000/07/01/ **2000**.
- [42] T. Majima, T. Irie, N. Sawaguchi, T. Funakoshi, N. Iwasaki, K. Harada, A. Minami & S. I. Nishimura, "Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering," *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 221, pp. 537-46, Jul **2007**.
- [43] J. Chen, J. Xu, A. Wang & M. Zheng, "Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products," *Expert Rev Med Devices*, vol. 6, pp. 61-73, Jan **2009**.
- [44] D. Ozdil & H. M. Aydin, "Polymers for medical and tissue engineering applications," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 89, pp. 1793-1810, **2014**.
- [45] H. H. Lu, J. A. Cooper, Jr., S. Manuel, J. W. Freeman, M. A. Attawia, F. K. Ko & C. T. Laurencin, "Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4805-16, Aug **2005**.
- [46] K. A. Derwin, M. J. Codsi, R. A. Milks, A. R. Baker, J. A. McCarron & J. P. Iannotti, "Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 91, pp. 1159-71, May **2009**.
- [47] Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard & R. Langer, "A tough biodegradable elastomer," *Nat Biotechnol*, vol. 20, pp. 602-6, Jun **2002**.
- [48] J. M. Kemppainen & S. J. Hollister, "Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications," *J Biomed Mater Res A*, vol. 94, pp. 9-18, Jul **2010**.

- [49] D. G. Barrett & M. N. Yousaf, "Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism," *Molecules*, vol. 14, pp. 4022-50, Oct 12 **2009**.
- [50] H. M. Aydin, K. Salimi, Z. M. O. Rzaev & E. Piskin, "Microwave-assisted rapid synthesis of poly(glycerol-sebacate) elastomers," *Biomaterials Science*, vol. 1, pp. 503-509, **2013**.
- [51] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore & A. R. Boccaccini, "Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review," *Progress in Polymer Science*, vol. 37, pp. 1051-1078, 2012/08/01/ **2012**.
- [52] Y. Martin & P. Vermette, "Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7481-503, Dec **2005**.
- [53] M. Devarapalli, B. J. Lawrence & S. V. Madhally, "Modeling Nutrient Consumptions in Large Flow-Through Bioreactors for Tissue Engineering," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 103, pp. 1003-1015, **2009**.
- [54] V. I. Sikavitsas, G. N. Bancroft & A. G. Mikos, "Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor," *J Biomed Mater Res*, vol. 62, pp. 136-48, Oct **2002**.
- [55] G. H. Altman, R. L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, P. R. Stark, V. Volloch, J. C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic & D. L. Kaplan, "Cell differentiation by mechanical stress," *Faseb j*, vol. 16, pp. 270-2, Feb **2002**.
- [56] G. H. Altman, H. H. Lu, R. L. Horan, T. Calabro, D. Ryder, D. L. Kaplan, P. Stark, I. Martin, J. C. Richmond & G. Vunjak-Novakovic, "Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering," *J Biomech Eng*, vol. 124, pp. 742-9, Dec **2002**.
- [57] J. H. Wang, Q. Guo & B. Li, "Tendon biomechanics and mechanobiology--a minireview of basic concepts and recent advancements," *J Hand Ther*, vol. 25, pp. 133-40; quiz 141, Apr-Jun **2012**.
- [58] D. Cao, W. Liu, X. Wei, F. Xu, L. Cui & Y. Cao, "In vitro tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: a preliminary report," *Tissue Eng*, vol. 12, pp. 1369-77, May **2006**.

- [59] T. Wang, B. S. Gardiner, Z. Lin, J. Rubenson, T. B. Kirk, A. Wang, J. Xu, D. W. Smith, D. G. Lloyd & M. H. Zheng, "Bioreactor design for tendon/ligament engineering," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 19, pp. 133-46, Apr **2013**.
- [60] R. I. Abousleiman & V. I. Sikavitsas, "Bioreactors for Tissues of the Musculoskeletal System," in *Tissue Engineering*, J. P. Fisher, Ed., ed Boston, MA: Springer US, **2007**, pp. 243-259.
- [61] S. Iannace, G. Sabatini, L. Ambrosio & L. Nicolais, "Mechanical behaviour of composite artificial tendons and ligaments," *Biomaterials*, vol. 16, pp. 675-80, Jun **1995**.
- [62] B. Wang, W. Liu, Y. Zhang, Y. Jiang, W. J. Zhang, G. Zhou, L. Cui & Y. Cao, "Engineering of extensor tendon complex by an ex vivo approach," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2954-61, Jul **2008**.
- [63] M. Raif el, B. B. Seedhom, M. J. Pullan & T. Toyoda, "Cyclic straining of cell-seeded synthetic ligament scaffolds: development of apparatus and methodology," *Tissue Eng*, vol. 13, pp. 629-40, Mar **2007**.
- [64] M. Jagodzinski, S. Hankemeier, M. van Griensven, U. Bosch, C. Krettek & J. Zeichen, "Influence of cyclic mechanical strain and heat of human tendon fibroblasts on HSP-72," *Eur J Appl Physiol*, vol. 96, pp. 249-56, Feb **2006**.
- [65] J. Nagatomi, B. P. Arulanandam, D. W. Metzger, A. Meunier & R. Bizios, "Frequency- and duration-dependent effects of cyclic pressure on select bone cell functions," *Tissue Eng*, vol. 7, pp. 717-28, Dec **2001**.
- [66] H. M. Aydin, K. Salimi, M. Yilmaz, M. Turk, Z. M. Rzayev & E. Piskin, "Synthesis and characterization of poly(glycerol-co-sebacate-co-epsilon-caprolactone) elastomers," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 10, pp. E14-22, Jan **2016**.
- [67] I. V. Yannas, J. F. Burke, P. L. Gordon, C. Huang & R. H. Rubenstein, "Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition," *J Biomed Mater Res*, vol. 14, pp. 107-32, Mar **1980**.
- [68] N. Bolgen, Y. Z. Menceloglu, K. Acatay, I. Vargel & E. Piskin, "In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 16, pp. 1537-55, **2005**.
- [69] C. L. E. Nijst, J. P. Bruggeman, J. M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C. J. Bettinger & R. Langer, "Synthesis and Characterization of Photocurable

- Elastomers from Poly(glycerol-co-sebacate)," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 3067-3073, 08/29 **2007**.
- [70] J. P. Bruggeman, B.-J. de Bruin, C. J. Bettinger & R. Langer, "Biodegradable Poly(polyol sebacate) Polymers," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4726-4735, 09/27 **2008**.
- [71] W. Zhao, "Bio-inspired superwetable materials: an interview with Lei Jiang," *National Science Review*, vol. 4, pp. 781-784, **2017**.
- [72] D. W. Youngstrom, I. Rajpar, D. L. Kaplan & J. G. Barrett, "A bioreactor system for in vitro tendon differentiation and tendon tissue engineering," *J Orthop Res*, vol. 33, pp. 911-8, Jun **2015**.
- [73] S. Pauly, F. Klatte, C. Strobel, G. Schmidmaier, S. Greiner, M. Scheibel & B. Wildemann, "Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff," *Eur Cell Mater*, vol. 20, pp. 84-97, Jul 26 **2010**.
- [74] M. U. Wagenhäuser, M. F. Pietschmann, B. Sievers, D. Docheva, M. Schieker, V. Jansson & P. E. Müller, "Collagen type I and decorin expression in tenocytes depend on the cell isolation method," *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 13, p. 140, August 08 **2012**.
- [75] E. R. Fischer, B. T. Hansen, V. Nair, F. H. Hoyt & D. W. Dorward, "Scanning Electron Microscopy," *Current Protocols in Microbiology*, vol. CHAPTER, pp. Unit2B.2-Unit2B.2, **2012**.
- [76] S. Somodi & R. Guthoff, "[Visualization of keratocytes in the human cornea with fluorescence microscopy]," *Ophthalmologe*, vol. 92, pp. 452-7, Aug **1995**.
- [77] S. Salehi, M. Czugala, P. Stafiej, M. Fathi, T. Bahnert, J. S. Gutmann, B. B. Singer & T. A. Fuchsluger, "Poly (glycerol sebacate)-poly (ϵ -caprolactone) blend nanofibrous scaffold as intrinsic bio- and immunocompatible system for corneal repair," *Acta Biomaterialia*, vol. 50, pp. 370-380, 2017/03/01/ **2017**.
- [78] S. G. Kim, T. Akaike, T. Sasagawa, Y. Atomi & H. Kurosawa, "Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells," *Cell Struct Funct*, vol. 27, pp. 139-44, Jun **2002**.
- [79] Z. Yin, X. Chen, J. L. Chen, W. L. Shen, T. M. Hieu Nguyen, L. Gao & H. W. Ouyang, "The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 2163-75, Mar **2010**.

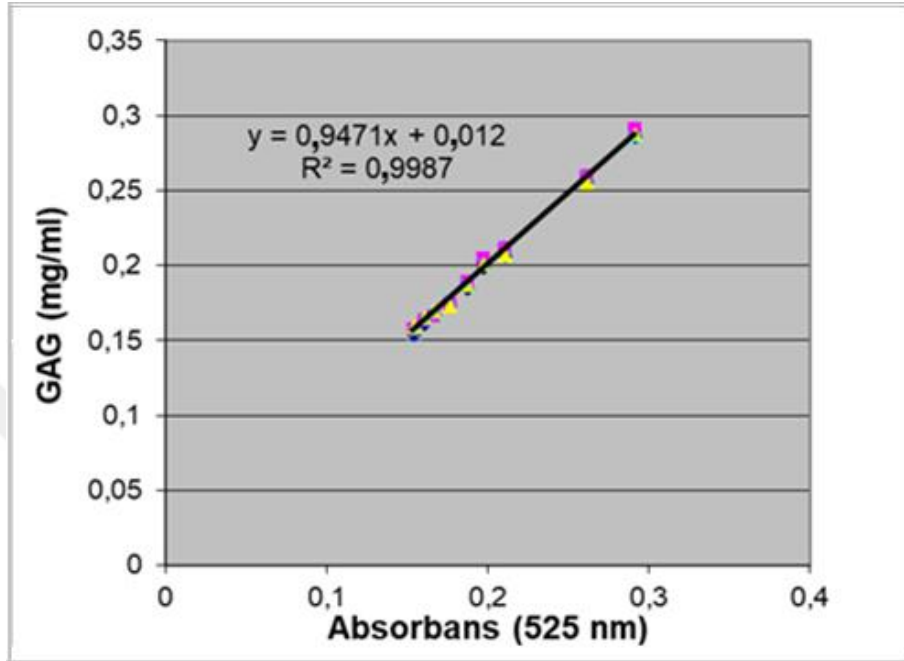
- [80] E. R. Jones, G. C. Jones, K. Legerlotz & G. P. Riley, "Cyclical strain modulates metalloprotease and matrix gene expression in human tenocytes via activation of TGFbeta," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1833, pp. 2596-2607, Dec **2013**.
- [81] I. Barbosa, S. Garcia, V. Barbier-Chassefiere, J. P. Caruelle, I. Martelly & D. Papy-Garcia, "Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies," *Glycobiology*, vol. 13, pp. 647-53, Sep **2003**.
- [82] S. Guler, P. Hosseinian & H. M. Aydin, "Hybrid Aorta Constructs via In Situ Crosslinking of Poly(glycerol-sebacate) Elastomer Within a Decellularized Matrix," *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 23, pp. 21-29, Jan **2017**.
- [83] W. Cai & L. Liu, "Shape-memory effect of poly (glycerol–sebacate) elastomer," *Materials Letters*, vol. 62, pp. 2171-2173, 2008/05/15/ **2008**.
- [84] Q.-Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M. Q. Tran, S. E. Harding, N. N. Ali & A. R. Boccaccini, "Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 47-57, 2008/01/01/ **2008**.
- [85] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch & S. Bernstorff, "Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen," *Journal of Structural Biology*, vol. 122, pp. 119-122, 1998/01/01/ **1998**.
- [86] J. L. Wang, M. Parnianpour, A. Shirazi-Adl & A. E. Engin, "Failure criterion of collagen fiber: Viscoelastic behavior simulated by using load control data," *Theoretical and Applied Fracture Mechanics*, vol. 27, pp. 1-12, 1997/05/01/ **1997**.
- [87] K. Misof, G. Rapp & P. Fratzl, "A new molecular model for collagen elasticity based on synchrotron X-ray scattering evidence," *Biophys J*, vol. 72, pp. 1376-81, Mar **1997**.
- [88] R. Rai, M. Tallawi, N. Barbani, C. Frati, D. Madeddu, S. Cavalli, G. Graiani, F. Quaini, J. A. Roether, D. W. Schubert, E. Rosellini & A. R. Boccaccini, "Biomimetic poly(glycerol sebacate) (PGS) membranes for cardiac patch application," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, pp. 3677-3687, 2013/10/01/ **2013**.

- [89] G. Schulze-Tanzil, A. Mobasheri, P. D. Clegg, J. Sendzik, T. John & M. Shakibaei, "Cultivation of human tenocytes in high-density culture," *Histochem Cell Biol*, vol. 122, pp. 219-28, Sep **2004**.
- [90] P. Kerativitayanan & A. K. Gaharwar, "Elastomeric and mechanically stiff nanocomposites from poly(glycerol sebacate) and bioactive nanosilicates," *Acta Biomaterialia*, vol. 26, pp. 34-44, 2015/10/15/ **2015**.
- [91] J. Gao, A. E. Ensley, R. M. Nerem & Y. Wang, "Poly(glycerol sebacate) supports the proliferation and phenotypic protein expression of primary baboon vascular cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 83A, pp. 1070-1075, **2007**.
- [92] Y. J. Chen, C. H. Huang, I. C. Lee, Y. T. Lee, M. H. Chen & T. H. Young, "Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells," *Connect Tissue Res*, vol. 49, pp. 7-14, **2008**.
- [93] J. Zhang & J. H. Wang, "The effects of mechanical loading on tendons--an in vivo and in vitro model study," *PLoS One*, vol. 8, p. e71740, **2013**.
- [94] H. R. Screen, J. C. Shelton, D. L. Bader & D. A. Lee, "Cyclic tensile strain upregulates collagen synthesis in isolated tendon fascicles," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 336, pp. 424-9, Oct 21 **2005**.
- [95] A. J. Banes, P. Weinhold, X. Yang, M. Tsuzaki, D. Bynum, M. Bottlang & T. Brown, "Gap junctions regulate responses of tendon cells ex vivo to mechanical loading," *Clin Orthop Relat Res*, pp. S356-70, Oct **1999**.
- [96] P. Kerativitayanan & A. K. Gaharwar, "Elastomeric and mechanically stiff nanocomposites from poly(glycerol sebacate) and bioactive nanosilicates," *Acta Biomater*, vol. 26, pp. 34-44, Oct **2015**.

EKLER

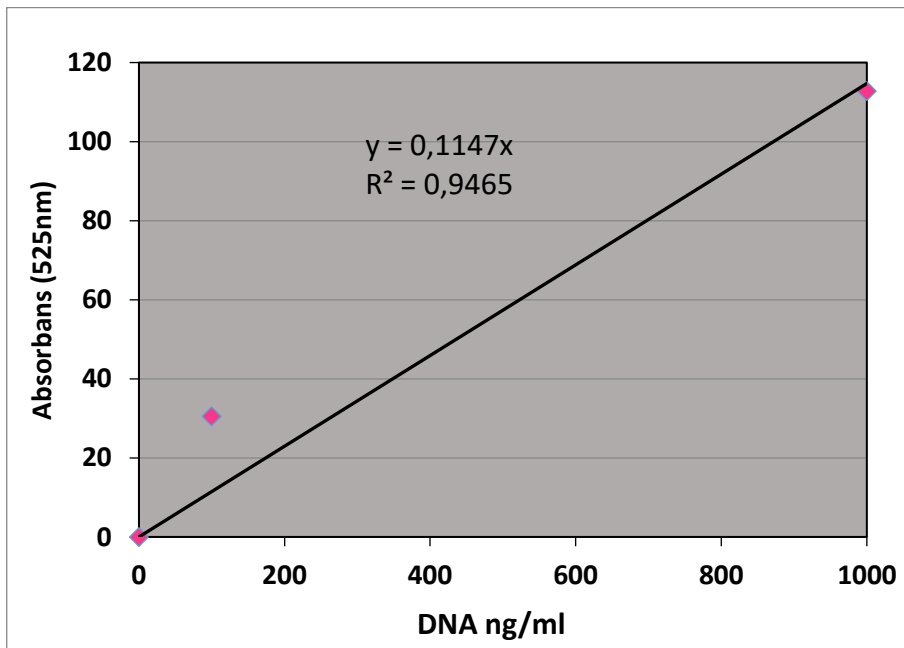
EK-1

KONDROİTİN SÜLFAT KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK-2

DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK-3

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

a)Degredasyon İstatistiksel Analizi

Notes		
Output Created		28-JUN-2018 20:42:30
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	16
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST PAIRS=Zaman WITH Fark (PAIRED) /CRITERIA=CI(.9500) /MISSING=ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00,00
	Elapsed Time	00:00:00,02

Paired Samples Test

Paired Differences			
95% Confidence Interval of the Difference			
Upper	t	df	Sig. (2-tailed)

Pair 1	Doku iskeleleri muamele zamanı - Fark	21,76606077	8,653	15	,031
--------	---------------------------------------	-------------	-------	----	------

b) Hücre Boyutu İstatistiksel Analizi

Notes

Output Created		28-JUN-2018 16:54:02
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	40
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST PAIRS=Durağan_4 Durağan_7 Durağan_12 Durağan_4 Durağan_4 Durağan_7 Dinamik_4 Dinamik_4 Dinamik_7 WITH Dinamik_4 Dinamik_7 Dinamik_12 Durağan_7 Durağan_12 Durağan_12 Dinamik_7 Dinamik_12 Dinamik_12 (PAIRED) /CRITERIA=CI(.9500) /MISSING=ANALYSIS.

Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,02

Paired Samples Test

		Paired Differences			
		95% Confidence Interval of the Difference			
		Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Dinamik 4.Gün Boyut sonucu	779,892	,230	39	,419
Pair 2	Durağan 7. Gün Boyut sonucu - Dinamik 7.Gün Boyut sonucu	-198,257	-2,659	39	,011
Pair 3	Durağan 12.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-2.819,425	-11,539	39	,000
Pair 4	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Durağan 7. Gün Boyut sonucu	-211,097	-2,841	39	,007
Pair 5	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Durağan 12.Gün Boyut sonucu	-594,799	-4,288	39	,000
Pair 6	Durağan 7. Gün Boyut sonucu - Durağan 12.Gün Boyut sonucu	177,108	-1,394	39	,041
Pair 7	Dinamik 4.Gün Boyut sonucu - Dinamik 7.Gün Boyut sonucu	-805,514	-3,972	39	,000
Pair 8	Dinamik 4.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-3.953,971	-13,956	39	,000
Pair 9	Dinamik 7.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-2.343,810	-9,440	39	,000

c)Hücre Sayısı İstatistiksel Analizi

Notes

Output Created		28-JUN-2018 16:54:02
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	40
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST PAIRS=Durağan_4 Durağan_7 Durağan_12 Durağan_4 Durağan_4 Durağan_7 Dinamik_4 Dinamik_4 Dinamik_7 WITH Dinamik_4 Dinamik_7 Dinamik_12 Durağan_7 Durağan_12 Durağan_12 Dinamik_7 Dinamik_12 Dinamik_12 (PAIRED) /CRITERIA=CI(.9500) /MISSING=ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,02

Paired Samples Test

		Paired Differences			
		95% Confidence Interval of the Difference			
		Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Dinamik 4.Gün Boyut sonucu	779,892	,230	39	,819
Pair 2	Durağan 7. Gün Boyut sonucu - Dinamik 7.Gün Boyut sonucu	-198,257	-2,659	39	,011
Pair 3	Durağan 12.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-2.819,425	-11,539	39	,000
Pair 4	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Durağan 7. Gün Boyut sonucu	-211,097	-2,841	39	,007
Pair 5	Durağan 4. Gün Boyut sonucu - Durağan 12.Gün Boyut sonucu	-594,799	-4,288	39	,000
Pair 6	Durağan 7. Gün Boyut sonucu - Durağan 12.Gün Boyut sonucu	177,108	-1,394	39	,041
Pair 7	Dinamik 4.Gün Boyut sonucu - Dinamik 7.Gün Boyut sonucu	-805,514	-3,972	39	,000
Pair 8	Dinamik 4.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-3.953,971	-13,956	39	,000
Pair 9	Dinamik 7.Gün Boyut sonucu - Dinamik 12. Gün Boyut sonucu	-2.343,810	-9,440	39	,000

d)MTT sonucu İstatistiksel Analizi

Notes

Output Created

28-JUN-2018 17:56:19

Comments

Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	36
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values for dependent variables are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any dependent variable or factor used.
Syntax		EXAMINE VARIABLES=Absorbans BY Konsantrasyon Gün /PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT /COMPARE GROUPS /STATISTICS DESCRIPTIVES /CINTERVAL 95 /MISSING LISTWISE /NOTOTAL.
Resources	Processor Time	00:00:13,08
	Elapsed Time	00:00:42,48

Tests of Normality

		Shapiro-Wilk ^a
Elüsyon konsantrasyonu		Sig.
OD değeri	mg/ml	,225

	mg/ml	,289
	mg/ml	,255
	mg/ml	,318

1. Günler

Estimates

Dependent Variable: OD değeri

Günler	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1. Gün	,740	,028	,683	,797
2. Gün	1,184	,028	1,127	1,241
3. Gün	1,702	,028	1,645	1,759

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: OD değeri

(I) Günler	(J) Günler	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1. Gün	2. Gün	-,445*	,039	,000	-,545	-,344
	3. Gün	-,963*	,039	,000	-1,063	-,862
2. Gün	1. Gün	,445*	,039	,000	,344	,545
	3. Gün	-,518*	,039	,000	-,619	-,417
3. Gün	1. Gün	,963*	,039	,000	,862	1,063
	2. Gün	,518*	,039	,000	,417	,619

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: OD değeri

(I) Elüsyon konsantrasyonu	(J) Elüsyon konsantrasyonu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
mg/ml	mg/ml	,010	,045	1,000
	mg/ml	-,013	,045	1,000
	mg/ml	,086	,045	,415
mg/ml	mg/ml	-,010	,045	1,000
	mg/ml	-,023	,045	1,000
	mg/ml	,076	,045	,631
mg/ml	mg/ml	,013	,045	1,000
	mg/ml	,023	,045	1,000
	mg/ml	,099	,045	,233
mg/ml	mg/ml	-,086	,045	,415
	mg/ml	-,076	,045	,631
	mg/ml	-,099	,045	,233

e) GAG Analiz Sonucu İstatistiksel Analizi

Notes

Output Created		28-JUN-2018 15:28:46
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	6

Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST PAIRS=Dinamik_12 WITH Durağan_12 (PAIRED) /CRITERIA=CI(.9500) /MISSING=ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,01

Paired Samples Test

		Paired Differences			
		95% Confidence Interval of the Difference			
		Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Dinamik 12. Gün GAG sonucu - Durağan 12.Gün GAG sonucu	,0482525281	4,535	4	,011

f) DNA Analiz Sonucu İstatistiksel Analizi

Notes

Output Created		28-JUN-2018 15:33:28
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>

N of Rows in Working Data File		6
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST PAIRS=Dinamik_12 WITH Durağan_12 (PAIRED) /CRITERIA=CI(.9500) /MISSING=ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00,02
	Elapsed Time	00:00:00,02

Paired Samples Test

		Paired Differences			
		95% Confidence Interval of the Difference			
		Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Dinamik 12. Gün GAG sonucu - Durağan 12.Gün GAG sonucu	36,7973337010	3,706	3	,034

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Pelin Deniz

Doğum Yeri : Balıkesir

Medeni Hali : Bekar

E-posta : pelin.deniz@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Teknokent Ar-Ge 6 N0 : 60 Beytepe/ANKARA

Eğitim

Lise : Bornova Anadolu Lisesi, İzmir

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce : İleri düzey

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

- Tendon Doku Mühendisliği
- Hücre Kültürü
- Hücre Kültürü ve Malzeme Karakterizasyon Analizleri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçeleri

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:14/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Tendon Doku Mühendisliği İçin Poli(Gliserol-Sebakat) (Pgs) Tabanlı Elastomerik Matrisler
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 82 sayfalık kısmına ilişkin, 14/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Pelin DENİZ
Öğrenci No: N14120838
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza

14.06.2018
P. Deniz

DANIŞMAN ONAYI

Halil
UYGUNDUR.

Doç. Dr. Halil Murat AYDIN