

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OSTEOJENİK FARKLILAŞMAYI TETİKLEYEN ÇOK İŞLEVLİ**  
**KENDİLİĞİNDEN YAPILANAN PEPTİT HİDROJELLERİN**  
**GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Oğuzhan GÖKMEN**

**BİYOMEDİKAL TEKNOLOJİLERİ ANA BİLİM DALI**

**OCAK 2020**

**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OSTEOJENİK FARKLILAŞMAYI TETİKLEYEN ÇOK İŞLEVLİ  
KENDİLİĞİNDEN YAPILANAN PEPTİT HİDROJELLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Oğuzhan GÖKMEN**

**(Y170205003)**

**Biyomedikal Teknojileri Ana Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ozan Karaman**

**OCAK 2020**



İKÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsünün Y170205003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Oğuzhan GÖKMEN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “OSTEOJENİK FARKLILAŞMAYI TETİKLEYEN ÇOK İŞLEVLİ KENDİLİĞİNDEN YAPILANAN PEPTİT HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**

**Dr. Öğr. Üyesi Ozan Karaman**  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**

**Dr. Öğr. Üyesi Ozan Karaman**  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Didem Şen Karaman**  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Prof. Dr. Bahattin Tanyolaç**  
Ege Üniversitesi

**Savunma Tarihi : 06.01.2020**



*Aileme,*



## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren sayın Dr. Öğr. Üyesi Ozan KARAMAN'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Her konuda desteklerini gördüğüm, her zaman yanımda olan hocalarım Günnur ONAK ve Ziyşan Buse YARALI'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca yanımda olan sevgili arkadaşlarım Anıl UZUN, Gizem Dilara EKİMCİ, Çağla YILDIRIM, Elif ÇUKUR, Veli Kaan AYDIN, Duygu GEÇKİN ve Mehmet DEMİRKOL'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca arkamda desteklerini hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan aileme çok teşekkür ederim.

Ocak 2020

Oğuzhan GÖKMEN





# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR .....	xi
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Kemik Doku .....	1
1.1.1 Kemik yapısı ve fonksiyonu.....	2
1.1.2 Kemik çeşirleri .....	3
1.1.3 Kemik doku hücreleri ve yeni kemik oluşumu .....	5
1.1.3.1 İntramembranöz ossifikasyon.....	7
1.1.3.2 Endokonral ossifikasyon .....	8
1.1.4 Kemik iyileşmesi.....	9
1.1.5 Kemik doku mühendisliği .....	10
1.2 Hidrojeller .....	11
1.2.1 Doğal ve sentetik hidrojeller .....	12
1.3 Peptit .....	13
1.3.1 Kendi kendine düzenlenen peptit.....	13
1.3.1.1 $\alpha$ -Heliks sarmal peptitler.....	14
1.3.1.2 $\beta$ -tabaka peptitler.....	15
1.3.1.3 Peptit amfifiler.....	16
1.3.2 Biyoaktif fonksiyonel epitoplur .....	17
<b>2. DENEYLER .....</b>	<b>18</b>
2.1 KYPH Sentezi ve Karakterizasyonu .....	18
2.1.1 Peptit sentezi .....	18
2.1.2 KYPH sentezi.....	19
2.1.3 KYPH biyobozunumu .....	19
2.1.4 Mekanik test .....	19
2.1.5 Taramalı elektron mikroskop analizi .....	19
2.1.6 Atomik kuvvet mikroskop analizi .....	20
2.2 MKH Kültivasyonu ve Çoğaltımı .....	20
2.3 KYPH İçerisine Enkapsüle Edilen MKH'in Canlılık Analizleri .....	20
2.4 KYPH'de MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması .....	21
2.5 İstatiksel Analiz.....	22
<b>3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
3.1 KYPH Sentezi ve Karakterizasyonu .....	23
3.2 KYPH'de MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması .....	28
3.3 KYPH İçerisinde Enkapsüle Edilen MKH'in Canlılık Analizleri .....	36
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>45</b>

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1</b> Sentezlenen KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 peptitlerin gözlenen ve hesaplanan moleküler ağırlığı .....	25
--	----

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.1</b> Trabeküler ve kortikal kemik Trabeküler ve kortikal kemik (Rizzo, 2015). ...	2
<b>Şekil 1.2</b> Kemğin içindeki farklı elementlerin organizasyonunun şematik gösterimi; Osteon, lameller, kan damarı, volkmann kanalı, periosteum, endosteum, havers kanalı (Safadi et al., 2009). ....	3
<b>Şekil 1.3</b> Kemiklerin şekle göre sınıflandırılması (Rizzo, 2015). ....	5
<b>Şekil 1.4</b> Farklı kemik hücre tipleri (Rizzo, 2015). ....	7
<b>Şekil 1.5</b> İntramembranöz ossifikasyonda yer alan elemanların şematik gösterimi (Gilbert).....	8
<b>Şekil 1.6</b> Kemik dokusunda endokondral ossifikasyon işleminin şematik gösterimi (Bilezikian, Raisz, & Martin, 2008).....	9
<b>Şekil 1.7</b> $\alpha$ -Heliks sarmal peptit motifi (Y. Li & Cao, 2018).....	15
<b>Şekil 1.8</b> $\beta$ -tabaka peptit motifi (Y. Li & Cao, 2018).....	15
<b>Şekil 1.9</b> A) EAK16-I B) RADA16-I C) KLD12 (Kisiday et al., 2002; Yanlian et al., 2009).....	16
<b>Şekil 1.10</b> Amfifilik peptit motifi (Y. Li & Cao, 2018).....	17
<b>Şekil 3.1</b> A) KLD, B) KLD-EEEEEE (KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojenlerinin sıvı kromatogram spektrumu.....	23
<b>Şekil 3.2</b> A) KLD, B) KLD-EEEEEE(KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojenlerinin kütle spektrumları.....	24
<b>Şekil 3.3</b> Üretilen kendiliğinden yapılanan peptit hidrojel .....	24

- Şekil 3.4** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (%2, %1 ve %0,5) A) KLD, B) KLD-EEEEEE (KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojellerinin zamana göre bozunum miktarları ..... 25
- Şekil 3.5** Kütlece %0,5, %1 ve %2'lik A) KLD , B) KLD-EEEEEE (KLD-O1) ve C) KLD-EEGGC(KLD-O2) peptit hidrojellerinin depolama modülü (G ') ve kayıp modülü (G ") karşılaştırılması..... 27
- Şekil 3.6** A) %2 KLD, B) %2 KLD-EEEEEE (KLD-O1), C) %2 KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojellerinin AFM görüntüleri ..... 28
- Şekil 3.7** A) %2 KLD , B) %2 KLD-O1, ve C) %2 KLD-O2 hidrojellerinin SEM görüntüsü, Ölçek çubuğu 200nm'dir..... 28
- Şekil 3.8** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra DNA miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)]...... 30
- Şekil 3.9** %0,5, %1 ve %2 konsantrasyonlardaki Biogelx(kontrol) (A), KLD (B), KLD-O1 (C), KLD-O2 (D) hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra DNA miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)]...... 31
- Şekil 3.10** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra alkalın fosfataz aktivitesi. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)]. ..... 32
- Şekil 3.11** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra alkalın fosfataz aktivitesi. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu

karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)].  
..... 33

**Şekil 3.12** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra kalsiyum miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)]...... 34

**Şekil 3.13** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra kalsiyum miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)]...... 35

**Şekil 3.14** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüvasyon sürecinde zamana bağlı MTT analiz sonuçları. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p\0,05, \*\*p\0,01, \*\*\*p\0,001)].  
..... 37

**Şekil 3.15** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 3 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra canlı/ölü hücre oranları. Yeşil renk canlı hücreleri, kırmızı renk ise ölü hücreleri ifade etmektedir. Ölçek çubuğu 100µm'yi gösterir. .... 38

## KISALTMALAR

<b>HA</b>	: Hidroksiapatit
<b>MKH</b>	: Mezenkimal Kök Hücre
<b>PEG</b>	: Poli (etilen glikol)
<b>PGA</b>	: Poli (glikolik asit)
<b>PLA</b>	: Poli (L-laktik asit)
<b>PLGA</b>	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)
<b>PCL</b>	: Poli (kaprolakton)
<b>PDLLA</b>	: Poli (D, L-Laktik asit)
<b>FMOC</b>	: 9-Florenilmetoksikarbonil
<b>MBHA</b>	: 4-Metilbenzhidrilamin
<b>HBTU</b>	: 1-[Bis (dimetilamino) methilen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-Oksit
Heksaflorofosfat	
<b>DIEA</b>	: N-Diizopropiletilamin
<b>DMF</b>	: Dimetilformamid
<b>TFA</b>	: Trifloroasetik Asit
<b>TIPS</b>	: Triizopropilsilan
<b>ESI</b>	: Elektrosprey İyonizasyon
<b>KYPH</b>	: Kendiliğinden Yapılan Peptit Hidrojel
<b>HEPES</b>	: 4- (2-Hidroksietil) -L-Piperazininetansülfonik Asit
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serumı
<b>DMEM</b>	: Modifiye Kartal Ortamı
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-Difenil-2 <i>H</i> -Tetrazolium Bromid
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EthD-1</b>	: Etidiyumhomodimer-1
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin
<b>ALPaz</b>	: Alkalen Fosfataz
<b>pNPP</b>	: P-Nitrofenilfosfat
<b>SBF</b>	: Yapay Vücut Sıvısı





# **OSTEOJENİK FARKLILAŞMAYI TETİKLEYEN ÇOK İŞLEVLİ KENDİLİĞİNDEN YAPILANAN PEPTİT HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

## **ÖZET**

Kemik, kendiliğinden iyileşen ve skar dokusu olmadan yenilenebilen bir doku olmasına rağmen, bu rejenerasyon her zaman tam olarak gerçekleşmez. Büyük defektlerde ve çok parçalı kırıklarda kemiğin yenilenme kapasitesi yetersiz olabilir. Bu gibi durumlarda, kemik defektinin çeşitli materyallerle doldurulması, kemik iyileşmesini tetikleme ve bu süreçte yapısal ve mekanik destek sağlama açısından büyük öneme sahiptir. Doğada bulunan aminoasitlerin yanı sıra, sentetik amino asitler kullanılarak birçok peptit kimyasal sentez yöntemleri ile kolayca oluşturulabilir. Peptitleri oluşturan amino asitlerin çeşitliliği, çok farklı fiziksel ve kimyasal peptit yapılarının edinilmesini sağlar ve bu da geniş bir uygulama yelpazesi elde etmeyi mümkün kılar. Peptit kimyasının bu zenginliği sayesinde, hidrojel oluşturabilen peptitlerin çalışma alanları gittikçe artmaya başlamıştır. Bu çalışmada kütlece farklı oranlardaki fonksiyonel epitoplara ile modifiye edilmiş kendiliğinden yapılanabilen peptit hidrojellerin mekanik özellikleri, hücre canlılığı ve osteojenik farklılaşma üzerinde etkisi araştırılmıştır. Kendiliğinden yapılanan peptit hidrojellerin karakterizasyonu için; degradasyon süreleri, reolojik özellikleri ve yüzey yapısı incelenmiş ve sonuç doğrultusunda tüm gruplarda kendiliğinden yapılanma ve nanofiber oluşumu gözlemlenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın incelenmesi için değerlendirilen Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi ve kalsiyum miktarını beş tekrarlı glutamik asit barındıran KLD-O2 grubunun Biogelx, KLD ve KLD-O1 gruplarına kıyasla daha fazla arttırdığını göstermiştir. Yapılan canlılık deneylerinde hiçbir grubun sitotoksik etki yaratmadığı KLD-O2 grubunun diğer gruplara kıyasla hücre sayısında artış gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak gruplar arasında kıyas yapıldığında en etkin değerlerin KLD-O2 grubunda olduğu, KLD-O2 grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise en etkin değerlerin %2'lik KLD-O2 grubunda olduğu sonucuna varılmıştır.

# **DEVELOPMENT OF MULTIFUNCTIONAL SELF-ASSEMBLED PEPTIDE HYDROGELS THAT TRIGGER OSTEOGENIC DIFFERENTIATION**

## **ABSTRACT**

Although bone is a self-healing tissue that can be regenerated without scar tissue, this regeneration does not always occur completely. Bone regeneration capacity may be insufficient in large defects and multi-part fractures. In such cases, filling the bone defect with various materials is of great importance for triggering bone healing and providing structural and mechanical support in this process. In addition to the amino acids found in nature, many peptides can be readily formed by chemical synthesis methods using synthetic amino acids. The diversity of amino acids that make up the peptides allows for the acquisition of very different physical and chemical peptide structures. This makes it possible to obtain a wide range of applications. Thanks to this richness of peptide chemistry, the working range of the hydrogel-forming peptides is gradually increasing. In this study, the effect of self-assembled peptide hydrogels modified with massively different functional epitopes on mechanical properties, cell viability and osteogenic differentiation was investigated. For the characterization of self-assembled peptide hydrogels; The degradation times, rheological properties and surface structure were examined and in accordance with the results, self-structuring process and nanofiber formation were observed in all groups. It has shown that the alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium amount evaluated for the examination of osteogenic differentiation increased the amount of calcium in five replicated glutamic acid groups more than Biogelx, KLD and KLD-O1 groups. In the viability experiments, it was determined that no group caused cytotoxic effect and the KLD-O2 group increased the number of cells compared to other groups. As a result, when the comparison was made between the groups, it was concluded that the most effective values were in the KLD-O2 group, and when the comparison was made between the KLD-O2 groups, the most effective value was in the 2% KLD-O2 group.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kemik Doku

Kemik omurgalıların iskelet sistemini oluşturan canlı ve yenilenebilir bir dokudur. Ayrıca diğer kritik organların korunması, hareketi ve desteklenmesi, kan üretimi, mineral depolanması ve homeostazı, kan pH regülasyonu ve çoklu progenitör hücreleri (mezenkimal, hemopoietik) barındırma gibi bir dizi vücut fonksiyonuna yardımcı olur [1]. Yetişkin bir insan iskeleti (sesamoid kemikleri hariç) toplamda 213 kemikten oluşur; uzuvlarımızın uzun kemiklerinden, el ve ayak bileklerindeki kısa kemiklere, sternum ve kafatasındaki düz kemiklere, pelvis ve omur gibi düzensiz kemiklere kadar uzanır [2, 3]. Kemik dokusu, kortikal(kompakt) kemik veya trabeküler (süngerimsi) kemik olarak sınıflandırılabilir. Yetişkin bir insan iskeletinin %80'i kortikal kemik ve %20'si trabeküler kemikten meydana gelmektedir. Kortikal kemik, kemik periferik bölgelerinde bulunan yoğun ve katı bir dokudur. Çok mineralli olup mekanik ve yapısal fonksiyonlar için önemlidir. Öte yandan, trabeküler kemik, kalsiyum homeostazında ve asit/baz düzenlemesinde rol oynar. İlik boşluğuna bitişik kemiklerin iç kısmında bulunur. Gözenekli (% 80) ve kortikal kemikten daha yüksek yüzey alanına sahiptir [4, 5]. Kemik ana bileşeni, inorganik ve organik bir fazdan oluşan mineralli bir hücre dışı matristir. Bu hücre dışı matrisinin inorganik bileşeni, kalsiyum ve fosfat tarafından oluşturulan bir mineral olan hidroksiapatittir(HA). Organik faz, esas olarak tip I kollajen gibi kollajen liflerinin yanı sıra fibronektin, osteokalsin, osteonektin ve glikosaminoglikanlar gibi kollajen olmayan proteinlerden oluşur [6].

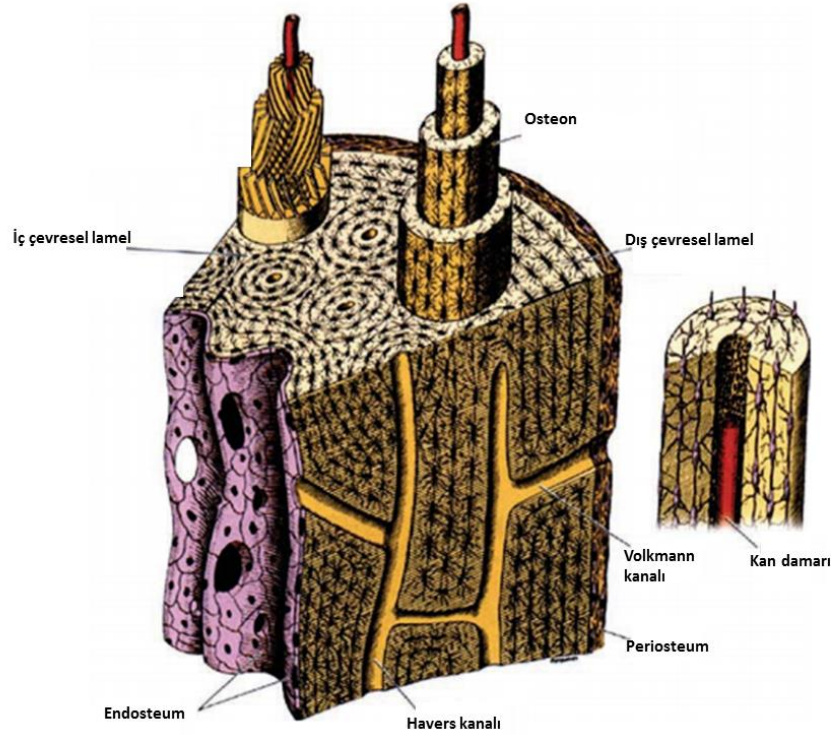


Şekil 1.1 Trabeküler ve kortikal kemik Trabeküler ve kortikal kemik [7].

### 1.1.1 Kemik yapısı ve fonksiyonu

Kemik canlı ve sürekli değişen bir dokudur. Kortikal kemiğin yapısı süngerimsi kemiğe kıyasla nispeten sert olduğu için, yük değiştirildiğinde daha yavaş yanıt verir. Süngerimsi kemik, yüksek bir yüzey/hacim oranına ve yüksek metabolik aktiviteye sahiptir [8]. Kortikal kemik, osteon adı verilen silindirik yapılardan oluşur. Haversian kanalı olarak da adlandırılan osteon, mineral tuz halkaları ile çevrelenmiş kemik hücreleri için etkili metabolizma sağlar. Bu merkezi kanal, kan damarları (kılcal damarlar, arteriyoller, venüller) ve sinirlerle çevrilidir. Matris ve osteositler kemik halkalarına yerleştirilir. Halkaların her katmanına lamel denir. Lakuna adı verilen birkaç küçük boşluk, iki lamel veya kemik halkası arasına yerleştirilmiştir. Her bir lakuna, doku sıvısındaki bir osteositten oluşur. Kan damarları ve osteositler, oksijen, besin maddeleri ve atık ürünleri değiştirir. Periosteumdaki kan damarları, merkezi kanalları perfore eden bu kan damarlarına bağlanır. Periosteum, Volkmann kanallarından geçerek kemiği kaplar. Volkmann kanalları yatay olarak Havers (merkezi) kanallarına gider [9]. Kortikal kemik dokuları diğer kemiklerin dış yüzeyinde bulunur. Diğer tüm kemik türlerinin merkezini oluşturan süngerimsi kemik, uzun kemiklerin ucunda konumlandırılmıştır. Trabekül adı verilen düzensiz kafes örgüsünden oluşur. Kemiğin bölümlerini birbirine bağlayan trabeküller, süngerimsi kemiğin süngerimsi yapısını oluşturur. Kemik damarları ve kemik iliği trabeküllerin arasındaki boşlukları doldurur. Kemik iliğindeki kan damarları, lamellerin kanaliküllerinden lakunadaki osteoitlere difüzyonla besinleri aktarır. Bu kan damarlarının, Volkmann ve Havers kanallarındaki kan damarlarıyla bağlantısı

vardır [10, 11]. Kemikler, kasları ve diğer dokuları bağlayan destekleyici yapılardır. Kemikler, beyni koruyan kafatası, ciğerleri ve kalbi koruyan kaburga gibi vücuttaki hayati organları korur. Ayrıca kemik, kaslar, cilt, sinirler, kan ve yağ gibi doku stabilizasyonu da kemik tarafından sağlanır. Kemikler kan hücrelerini üretir. Bu sürece hematopoez denir ve esasen uzun kemiklerin medüller boşluğunda kırmızı kemik iliğinde meydana gelir. Temel mineraller, özellikle fosfor, kalsiyum ve yağlar depolanır [12].

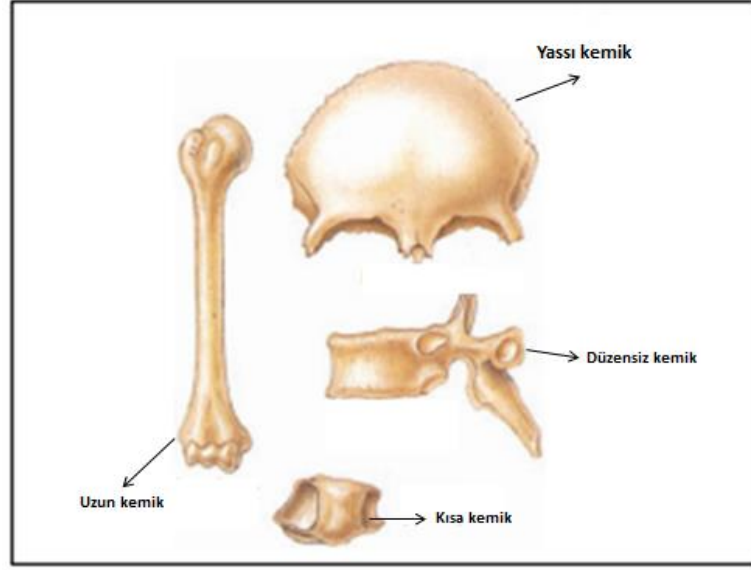


**Şekil 1.2** Kemik içindeki farklı elementlerin organizasyonunun şematik gösterimi; Osteon, lameller, kan damarı, volkmann kanalı, periosteum, endosteum, havers kanalı [13].

### 1.1.2 Kemik çeşitleri

Kemikler, şekil, köken ve yapısına göre sınıflandırılabilir. İnsan vücudunda uzun, kısa, düz, düzensiz ve sesamoid kemikler olmak üzere beş çeşit kemik bulunmaktadır. Uzun kemikler, uzunluğu genişliğinden daha büyük olduğu için uzun kemik olarak adlandırılırlar. Kollar ve bacaklar çoğunlukla uzun kemiklerden oluşur. Koldaki uzun kemikler arasında pazu kemiği, döner kemik, direk kemiği, el tarağı ve parmak kemiği bulunur. Bacağın uzun kemikleri arasında ise uyluk kemiği, kaval kemiği, incik kemiği, ayak tarağı ve parmak kemiği bulunur. Klaviküller (yaka kemikleri) de uzun kemiklerdir. Uzun kemikler, vücudumuzu hareket ettirmek ve

çevremizi değiştirmek için ihtiyaç duyduğumuz kaldıraç oranını sağlar. Tüm uzun kemikler diyafiz ve epifiz olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Diyafiz, medüller kavite (ilik boşluğu) olarak adlandırılan içi boş olan merkezi bir tüptür. Diyafizin duvarı, yoğun ve çok sert olan kompakt kemikten yapılmıştır. Medüller boşluğunda sarı kemik iliği bulunur. Sarı kemik iliği, adipoz doku olarak da bilinen temel yağ dokusudur. Epifiz, genellikle kırmızı kemik iliği içeren ve ince bir kompakt dokuya sahip süngerimsi kemikten oluşur. Dış epifiz tabakası hiyalin kıkırdak ile tutturulmuştur. Epifizin duvarı, diyafiz gibi kompakt bir kemikten yapılıır ve merkezi süngerimsi kemik içerir. Süngerimsi kemik, kırmızı kemik iliği ile doldurulmuş birçok küçük oyuktan (medüller boşluklar olarak da bilinir) oluşur. Kırmızı kemik iliği, kırmızı kan hücrelerini üretir. Kısa kemikler, uzunluklarıyla genişlikleri eşit veya yakın olduğu için bu şekilde adlandırılırlar. Kısa kemikte diyafiz bulunmamaktadır. Epifiz gibi kompakt kemikle çevrili süngerimsi kemikten oluşur. Kısa kemikler ayrıca kırmızı kemik iliği içerir. İnsan iskeletinde 32 kısa kemik bulunur. Tipik olarak, kısa kemikler, el ve ayak bileklerinin karmaşık eklemlerinde hareketi kolaylaştırır. Bilek kemikleri, ayak bileği ve topuk kemikleri ve diz kapağı kısa kemiklerdir. Yassı kemikler, baş ve gövde şekli, omuz ve kalça temeli gibi yapı sağlarlar. Yassı kemikler ayrıca altındaki yumuşak dokuların korunmasında da rol oynarlar. Kısa kemikler gibi yassı kemiklerde de kompakt kemikten yapılmış duvarlar ve süngerimsi kemik merkezi bulunur. Kafatası, kürek kemiği, göğüs kemiği, kaburgalar ve kalça kemiği hepsi düz kemiklerdir. Bunlardan, kürek kemiği, göğüs kemiği, kaburgalar ve kalça kemiğin tümü tendonlar ve kaslar için güçlü ekleme noktaları sağlar. Düz olmayan kemikler düzensiz kemikler olarak kabul edilir. Bu kemiklerin şekilleri çok özel fonksiyonlar sağlar. Yüz kemikleri ve omurganın kemikleri, omurlar, hepsi düzensiz kemiklerdir. Bu kemikler, fonksiyonlarına özgü karmaşık şekillere sahiptir. Düzensiz kemiklerin çoğu, omurların her biri gibi, orta hat boyunca vücutta yalnızca bir kez görünür. Yüzdeki kemiklerin bazıları, zigomatik kemikler (elmacık kemikleri) gibi ayna görüntüsünde görülür. Bazen tendonlar veya bağlar boyunca sürtünme nedeniyle sesamoid kemikler gelişebilir. Genellikle bunlar çok küçük kemiklerdir, bireyler arasında rastgele gelişirler ve isimleri yoktur [13-15].



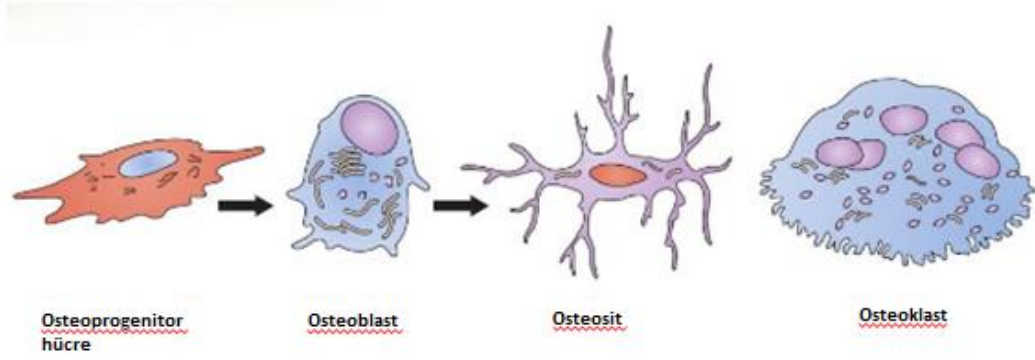
Şekil 1.3 Kemiklerin şekle göre sınıflandırılması [7].

### 1.1.3 Kemik doku hücreleri ve yeni kemik oluşumu

Kemik hücreleri, farklı fonksiyon ve kökene sahip dört bölüme ayrılabilir: osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve osteoprogenatörler. Kemik yapısının temel kök hücreleri olarak osteoprogenitör hücreler, kondroblastlara veya osteoblastlara farklılaşma özelliğine sahiptir. Osteoprogenitör hücreler, kılcıl damarlar gibi oksijene zengin bölgelere yakın konumlandırılmışlarsa osteoblastlara farklılaşır; aksi halde düşük oksijen konsantrasyon seviyeleri nedeniyle kondroblast haline gelirler. Osteoblastlar, hem ilk kemik oluşumu hem de daha sonra kemiklerin yeniden şekillenmesi sırasında kemiğin sentezi ve mineralleşmesinden sorumlu olan büyük hücrelerdir. Osteoblastlar; hücrel işlemlerin gelişen kemik içinden uzandığı, kemik yüzeyinde sıkı bir şekilde kaplanmış bir tabaka oluştururlar. Osteojenik hücrelerin periosteumda, kemiğin dış yüzeyini kaplayan dokuda ve kemik iliği boşluğunun endosteumundaki farklılaşmasından ortaya çıkarlar [16]. Bu hücre farklılaşması, osteoblastlardan ziyade kıkırdak oluşturan kondroblastların oluşmadığı düzenli bir kan temini gerektirir. Osteoblastlar, alkalın fosfataz ve kollajenaz enzimleri, büyüme faktörleri, osteokalsin gibi hormonlar ve osteoid olarak adlandırılan kemiğin organik mineralsiz bileşeninin bir parçası olan kollajen gibi birçok hücre ürünü üretir. Sonunda osteoblast büyüyen kemik matrisi ile çevrilir ve hücre, lakuna adı verilen bir alanda tutulur. Böylece sıkışmış bir osteosit veya kemik hücresi haline gelir [17, 18]. Osteosit, tamamen oluşmuş kemik maddesi içinde yer alan bir hücredir. Kemiğin kalsifiye matrisinde bulunan lakuna adı verilen küçük bir odayı işgal eder.

Osteositler, osteoblastlardan veya kemik oluşturan hücrelerden türetilir [19]. Osteositin sitoplazmik işlemleri, kanalikül adı verilen küçük kanallarla hücreden diğer osteositlere doğru uzanır. Bu kanalikler sayesinde osteositin canlılığını korumak için besinler ve atık ürünler değiştirilir. Osteositler olgun kemik dokularında en bol hücre tipidir. Aynı zamanda uzun ömürlüdürler ve konumlandıkları kemik var olduğu sürece hayatta kalırlar [20]. Osteosit emilim yeteneğine sahiptir. Ayrıca kas aktivitesinin neden olduğu hafif kemik deformasyonlarına yanıt olarak sinyalleri diğer osteositlere ileterek kemiğin yeniden şekillendirmesinde rol oynar. Bu şekilde, üzerine ilave stres konursa kemik güçlenir. Osteositlerin erken ölümü veya disfonksiyonu, osteoporoz ve osteoartrit gibi hastalıklarla ilişkilidir [21]. Osteoklastlar, kemik erimesinden ve emiliminden sorumlu büyük çok çekirdekli hücrelerdir. Kemik, yapısal stres ve vücudun kalsiyum gereksinimi gibi etkilere cevap olarak sürekli kırılan ve yeniden yapılandırılan dinamik bir dokudur. Osteoklastlar kemiğin yüzeyinde Howship lakunası denilen küçük bir çöküntü işgal eder. Lakunaların, osteoklast enzimleri tarafından erozyona uğrayan kemiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Osteoklastlar, kanda dolaşımdaki monositlerden türetilen birçok hücrenin füzyonu ile oluşturulur. Bunlar sırayla kemik iliğinden elde edilir. Osteoklastlar, 5 ila 20 tane olmasına rağmen, 200 kadar çekirdeğe sahip olabilir. Mineralli kemik ilk önce parçalara ayrılır, osteoklast daha sonra parçaları içine çeker ve onları sitoplazmik vakuoller içinde sindirir. Mineralize kemiğin parçalanmasıyla açığa çıkan kalsiyum ve fosfor kan dolaşımına salınır. Mineral olmayan kemik (osteoid) osteoklastik rezorpsiyona karşı korunur [22, 23].



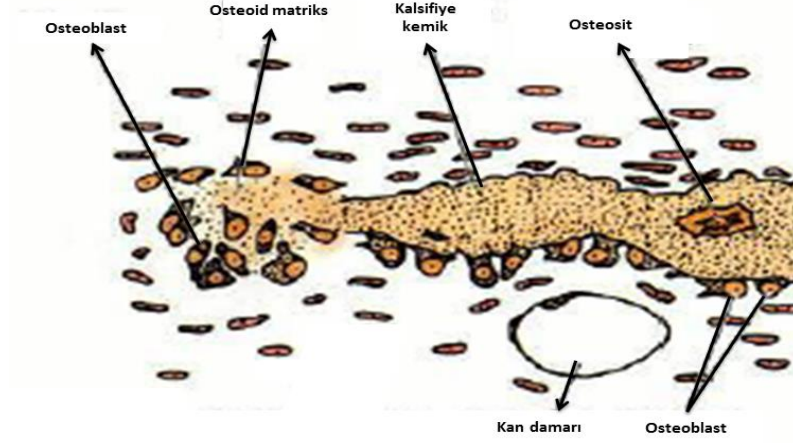


**Şekil 1.4** Farklı kemik hücre tipleri [7].

İskeletin bazı kısımları hamile kaldıktan sonraki ilk haftalar boyunca oluşur. Gebe kaldıktan sonraki sekizinci haftanın sonunda, iskelet yapısı kıkırdak ve bağ dokusu zarlarında oluşur ve kemikleşme başlar. Kemik gelişimi yetişkinlik boyunca devam eder. Yetişkin boylarına ulaşıldıktan sonra bile kemik gelişimi kırık onarımı ve değişen yaşam tarzlarını karşılamak için yeniden şekillenme için devam eder. Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar, kemiklerin gelişimi, büyümesi ve tadilatında rol oynayan üç hücre tipidir. Osteojenez ve ossifikasyon terimleri kemik oluşum sürecini belirtmek için kullanılır. İntramembranöz ve endokondral olmak üzere iki tip ossifikasyon vardır.

### 1.1.3.1 İntramembranöz ossifikasyon

İntramembranöz ossifikasyon mezenkimal hücrelerin kalsifikasyon merkezi denilen bir bölgede osteoblastlara farklılaştığı gelişimsel bir süreçtir. Bu işlem sırasında, osteoblast ve kalsifiye fiber bölgesi arasındaki bir bağ, koleojen proteoglikan matrisin osteoblastlar tarafından salgılanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu bağlanma sonucunda osteoid matris kalsifiye edilir ve ilk gerçek kemik oluşumu tamamlanır. Bunu takiben, kalsifikasyon merkezinin bir ossifikasyon merkezine dönüştürülmesi ve sonra lamellerin arasına alınmış osteositlerin oluşumu da meydana gelir. Daha sonra osteositler spongüller adı verilen ve süngerimsi kemiğin yapısal elementleri olan yapıları oluşturur. Spiküler, süngerimsi kemiği oluşturmak için bir araya gelir ve iç ve dış tarafları periosteum olarak adlandırılan bir kompakt mezenkimal hücre tabakası ile kaplar [24, 25].



**Şekil 1.5** İntramembranöz ossifikasyonda yer alan elemanların şematik gösterimi [26].

### 1.1.3.2 Endokondral ossifikasyon

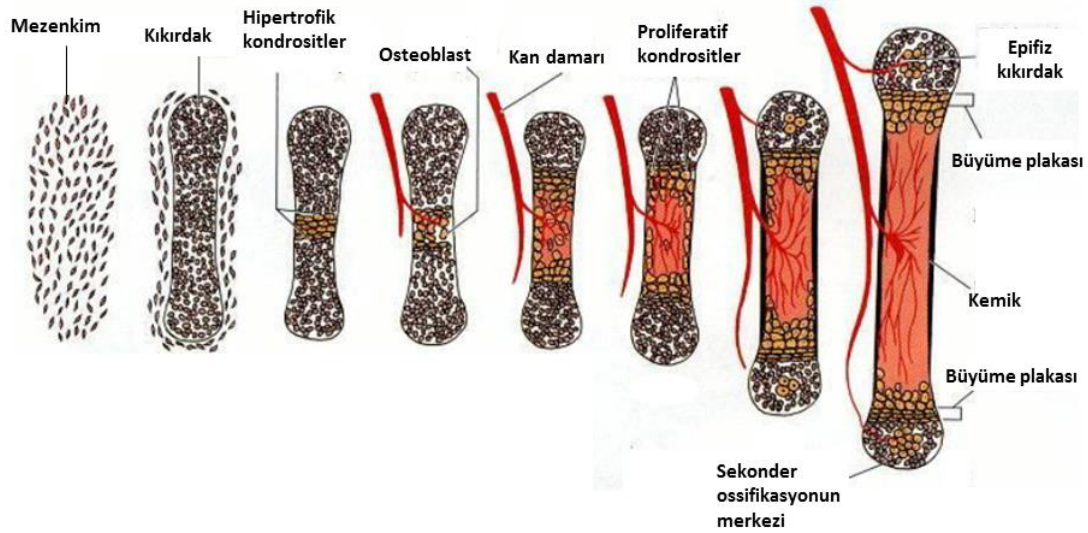
Endokondral ossifikasyon uzun kemiklerde ve vücuttaki diğer kemiklerin çoğunda oluşur. Büyümeye devam eden ilk hyalin kıkırdağını içerir. Uzun kemiklerin büyümesi ve kemik kırıklarının doğal iyileşmesi sırasında önemli bir süreçtir [27].

Endokondral ossifikasyondaki adımlar:

1. Kıkırdak modelinin geliştirilmesi
2. Kıkırdak modelinin büyümesi
3. Birincil ossifikasyon merkezinin gelişimi
4. Sekonder ossifikasyonun merkezinin gelişimi
5. Eklem kıkırdak oluşumu ve epifiz plakası

Karmaşık gelişimsel sinyallere cevap veren matris kalsifiye olmaya başlar. Bu kalsifikasyon, besinlerin matris difüzyonunu önler ve böylece kondrositlerin ölmesine ve diyafiz kıkırdağındaki boşlukların açılmasına neden olur. Kan damarları boşlukları istila eder ve osteoblastlar ile osteoklastlar kalsifiye kıkırdak matrisini süngerimsi kemiğe dönüştürür. Osteoklastlar daha sonra süngerimsi kemiğin bir kısmını parçalayarak diyaframın merkezinde bir ilik veya medüller kavite oluşturur. Yoğun ve düzensiz bağ dokusu, kemiklerin etrafında bir kılıf (periosteum) oluşturur. Periosteum, kemiği çevresindeki dokulara, tendonlara ve ligamentlere tutturmada

yardımcı olur. Epifizlerdeki kıkırdak hücreleri bölündükçe kemik büyümeye ve uzamaya devam eder. Doğum öncesi kemik gelişiminin son aşamasında, epifizlerin merkezleri kalsifiye olmaya başlar. Ergenliğe kadar, hiyalin kıkırdak, uzun kemiklerin uzunlmasına büyümesinden sorumlu olan, diyafiz ve epifiz arasındaki bölge olan epifiz plakasında (büyüme plakası) devam eder [27, 28].



Şekil 1.6 Kemik dokusunda endokondral ossifikasyon işleminin şematik gösterimi [29].

#### 1.1.4 Kemik iyileşmesi

Normal kemik iyileşmesinin gerçekleştiği süreç üç ana aşamaya ayrılır: enflamatuar, onarım ve yeniden şekillenme. Enflamatuar aşamayı başlatmak için yaralanma bölgesinde bir hematoma gelişir. Bu fibrin pıhtısı, enflamatuar hücreler (monositler ve makrofajlar gibi) ve fibroblastların, granülasyon dokusu oluşumu, vaskülarizasyon ve mezenkimal kök hücrelerin (MKH) farklılaşması ile sonuçlanan yaralanma bölgesine sızması için çerçeve sağlar. Çeşitli büyüme faktörlerinin MKH'lerin kemik oluşturma hücrelerine (osteoblastlar) farklılaşmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu büyüme faktörleri, çeşitli göç eden hücreler ve pıhtıdaki trombositler dahil olmak üzere birçok kaynak tarafından sağlanır [30, 31]. Onarım aşaması, 1 ila 2 hafta içerisinde hasarlı hücrelerin çıkarılması ve zayıf fibrin pıhtının daha mekanik olarak stabil bir yapıya (kallus) değiştirilmesiyle başlar. Onarım aşamasında kıkırdak ve kolajen oluşur ve sonrasında mineralleşir. Sonunda kallus ossifiye olur (endokondral ossifikasyon) ve dokuma kemik haline gelir (yeni oluşmuş

kemik sadece erken gelişimde veya kemik onarımı sırasında bulunur). Onarım aşamasında; kemik orijinal şekli, yapısı ve mekanik dayanımı ile restore edilir. Burada dokuma kemik, daha önce tarif edildiği gibi osteoklast ve osteoblast bağlanması yoluyla lamel kemiğine yeniden şekillenir. Popüler bir kemik doku mühendisliği alanı; onarım ve tadilat aşamasına, özellikle de MKH'lerin osteoblastlara farklılaştırılması ve osteoblastların organik-hinorganik matriks ekleme ve üretme kabiliyetine odaklanır [31-33].

### **1.1.5 Kemik doku mühendisliği**

Otogreft ve allogreftlerin klinik kullanımı ile ilgili sınırlamalar, biyomalzemeler ve doku mühendisliği prensiplerini kullanarak kemik grefti ikameleri geliştirme çabalarını sürdürmeye devam etmektedir [34]. Daha önce de belirtildiği gibi doku mühendisliği uygun fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip bir iskele gerektirir. Bu sebeple osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikler dikkate alınmalıdır [35]. Farklı iskele değişkenlerinin biyolojik cevabı nasıl etkileyebileceğini anlamaya çalışmak için çok sayıda sentetik iskele üretilmiş ve araştırılmıştır. Yeterli mekanik özelliklere sahip yapısal iskeleler, iyi biyolojik özellikler elde etmek için sıklıkla biyoaktif bileşenlerle birleştirilmelidir. Son on yılda, iskele malzemelerinin seçiminde olası birçok seçenek yaratmak için biyomalzeme sentez ve karakterizasyonundaki gelişmelerden yararlanılmıştır [36, 37]. Birçok araştırmacı dikkatini kemik dokusu oluşumunu teşvik etmek için büyüme faktörlerinin, hücrelerin ve genlerin olası birçok kombinasyonu arasında yoğunlaştırmaktadır. Bu çabalara rağmen, in vitro ve in vivo olarak kök hücre popülasyonlarının hayatta kalımını, proliferasyonunu ve kaderini tam olarak kontrol eden biyomalzemeler hala iyi gelişmemiştir. Dahası, fiziksel ve morfolojik özelliklerin hücreler ve dokularla nasıl etkileşime girdiği tam olarak belli değildir. Bununla birlikte, günümüzde kemik doku mühendisliği için etkin bir yapı iskelesinin biyomimetik olması ve hücre davranışını kontrol etmek için tasarlanmış olması gerektiği kabul edilmektedir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için araştırmacılar bir çok çalışma yapmıştır. Kemik yenilenmesi için hücre dışı matris ve kollajen bileşenleri gibi hücrelerin doğal ortamlarını taklit ederek doku yenilemek için yeterli mekanik destek sağlayarak yeni doku mühendisliği sistemleri geliştirmişlerdir Böylece; hücrelerin yapıştığı, göç ettiği, çoğaldığı ve sinyal mekanizmaları

kullanarak farklılaştığı gözenekli iskeleler inşa etmek için kapıyı açtılar. Başlangıçta ilk nesil malzemeler kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanıldı. Bu amaçla hem kolajen, kitosan, jelatin gibi doğal polimerlerden hem de poli-metakrilat ve Poli (etilen glikol) (PEG) gibi sentetik polimerlerden farklı hidrojeller geliştirilmiştir. Bu sentetik malzemeler biyoyumludur ancak biyoaktivite içermezler. Daha sonra doku implantasyonunun rejenerasyon cevabını ortaya çıkardığı biyoaktiviteyi karşılamak için ikinci nesil materyaller geliştirilmiştir. Bu amaçla, mevcut dokunun birkaç yönünü taklit etmek için, biyomimetik malzemeler geliştirilmiştir. HA, kemik ve dişlerde bulunan ikinci nesil malzemelere örnek olarak verilebilir. Bu malzemeler biyoyumlu ve biyoaktif özellikler sağlasa da, doğal kemikte olduğu gibi tam kemik dokusu yenilenmesi için bir ortam oluşturmak için moleküler seviyede hücre davranışları kontrol etmek için sinyaller gerekir [36]. Bu görevi gerçekleştirmek için üçüncü nesil malzemeler, biyofonksiyonel gruplar veya büyüme faktörleri gibi başka modifikasyonlara sahip hidrojeller, kemik rejenerasyonunu geliştirmek için yaratıldı. Kendiliğinden yapılanlar peptitler, bu malzemelerin bir örneğidir. Çok yönlü yapılarına ek olarak hücre dışı matris taklit edici özellikleri ve biyofonksiyonu sağlarlar. Bu mühendislik yapılarını tasarlarken; mukavemet, gözeneklilik, pH ve termo-ayarlanabilirlik gibi hidrojellerin mekanik özellikleri, osteojenez ve biyomineralizasyon üzerinde doğrudan bir etkiye sahip oldukları için dikkate alınmalıdır [37, 38].

## 1.2 Hidrojeller

Hidrojeller, polimerik ağların uzun zincirlerinden oluşur ve polimer omurgası üzerindeki hidrofilik fonksiyonel gruplar sayesinde büyük miktarda su tutabilmektedir [39]. Yüksek su içeriğinden (% 90'dan fazla) ve doğal hücre dışı matrisine benzeyen iç içe geçmiş yapıları nedeniyle göç ve çoğalma gibi elverişli ortamlar oluşturdukları için çoğunlukla biyoyumlu ve esnektirler. Hidrojel biyomalzeme uygulamaları; kontakt lensler ve yara örtüleri gibi fiziksel ürünlerin oluşumundan, doku mühendisliği, ilaç dağıtımı, hücre kapsülleme ve 3B baskıdaki uygulamalarına kadar uzanmaktadır [40]. Ayrıca hidrojeller, kemik dokusu mühendisliği için önemli bir biyolojik madde sınıfı olup hücre büyümesi ve yeni kemik dokusu oluşumu için geçici yapısal destek ve sinyal temin etmektedir. Bu alandaki hızlı ilerlemenin bir nedeni, osteojenezde rol oynayan biyolojik, kimyasal

ve fiziksel sinyallerin daha iyi anlaşılmasıdır. Kemik dokusu oluşumunu etkilediği bilinen geniş biyolojik özellik özellikleri arasında hücre yapışması, hidrojel sertliği, bozunma hızı, gözenek büyüklüğü ve gözeneklilik ve osteojenik biyoaktif faktörlerin kontrollü sunumu bulunur. Doku mühendisliği için kullanılan hidrojel malzemeleri sentetik olabilir veya doğal olarak elde edilen kaynaklardan elde edilebilir [41].

### **1.2.1 Doğal ve sentetik hidrojeller**

Doğal olarak türetilmiş hidrojeller 3 grupta sınıflandırılabilir: protein bazlı malzemeler, polisakarit bazlı malzemeler ve hücre dışı matriks bileşenlerinden türetilenler. Doğal jeller tipik olarak proteinlerden ve hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşur; bu doğal olarak biyo-uyumlu, biyoaktif ve muhtemelen birçok hücresel işlevi destekledikleri için birçok biyomedikal uygulamalar için uygun olmasını sağlar. Daha önce de belirtildiği gibi yapıları ve özellikleri doğal yumuşak dokulara benzer, ancak varyasyon çeşitliliği yüksek olduğundan, çoğunlukla bunları manipüle etmekte zorlanan kısıtlamaları vardır. Her bir hidrojel türü, onu amaçlayan uygulama için daha uygun hale getiren farklı özelliklere sahiptir. Elastin, kollajen ve fibrin, hücre dışı matrisi yapısında proteinlerin düzgün çalışması için gerekli gücü ve esnekliği sağlayarak doku mühendisliği ve hücre kültürü sistemleri için çok umut verici materyaller olmasını sağlayan proteinlerdir [42].

Sentetik polimerler, kontrol edilebilir ve tekrar üretilebilir yapısal özellikler, biyouyumluluk ve özel biyobozunma oranlarını sağlama yeteneklerinden dolayı iskele uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden yapılmış iskeleler çeşitli imalat teknikleriyle üretilebilir ve klinik gereksinimlere göre önceden şekillendirilmiş boyutlarda ve şekillerde üretilebilirler. ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış poli (glikolik asit) (PGA), poli (L-laktik asit) (PLA), bunların kopolimerleri poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli (kaprolakton) (PCL) gibi çeşitli sentetik polimerler vardır. Diğer parçalanabilir polimerler de araştırılmış ve PEG, polilaktit ve poliglikolit dahil periodontal doku rejenerasyonu için test edilmiştir. Biyoaktif camlarla kombinasyon halinde kullanılan amorf poli (D, L-Laktik asit) (PDLLA), periodontal doku rejenerasyonu için ümit verici özellikler gösteren biyoseramik materyaller içinde makro gözenekli bir yapı oluşturulmasını sağlar [43, 44]. Sentetik polimerler ayrıca doğal biyomalzemelerle kombinasyon halinde de kullanılabilir.

## 1.3 Peptit

Peptitler, kovalent peptit bağları ile bağlanmış iki veya daha fazla amino asit zincirinden oluşur. Amino asitlerin sayısı ve muhtemel kombinasyonları göz önüne alındığında, oluşabilecek muhtemel sekansların sayısı sonsuzdur. Bu polipeptit zincirleri, bir amino asit kalıntısının karboksil grubunun bir başkasının amin grubuyla tepkimesiyle oluşur ancak zincirdeki monomerlerin sayısı 50 civarında bir eşiği geçtikten sonra bir peptitin bir protein olarak sınıflandırıldığı kabul edilir. Polipeptit zincirleri, tekrar eden amino asitlerin ana gövdesi, omurga ve farklı kalıntılardan oluşan dallardan oluşur. Organizmalarda bulunan 22 farklı amino asit vardır, bunlardan 20'si esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitlere ayrılmıştır [45, 46]. İlki, insanların doğal olarak sentezleyemedikleri ve diyet yoluyla alınması gereken 9 amino asit içerir. Esansiyel olmayan amino asitler insan vücudu tarafından sentezlenebilir ve her iki kategoriye uymayan son ikisi, selenosistein ve piroliz, benzersiz mekanizmalar vasıtasıyla üretilir. Amino asitlerin isimleri, peptitlerin sırasını tarif etmek için ya bir ya da üç harfli kısaltmalar ile kısaltılabilir. Yan zincirlerdeki değişkenlikleri, onları farklılaştırır ve bu yan zincir farklılıklarına (hidrofobik, hidrofilik, alifatik, aromatik ve yüke dayalı; pozitif, negatif veya nötr) göre kategoriler oluşturulabilir.

Peptit tarafından benimsenen ikincil yapılar hiyerarşik organizasyon (örneğin, sentetik membranlar, çok katmanlı yapılar, miseller, tübüller) ile biyomalzemelerin tasarlanmasına ve üretilmesine katkıda bulunur. Peptitler, nano ölçekte kontrol edilebilir yapısal özelliklere sahip düzeneklerin tasarımı için çok yönlü yapı taşlarıdır. Peptit kendi kendine yapılanması, tek bir peptitin kovalent olmayan etkileşimler yoluyla başka bir tamamlayıcı peptit ile etkileşimi sonucu olabilir (hidrojen bağı, hidrofobik, elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi).

### 1.3.1 Kendi kendine düzenlenen peptit hidrojeller

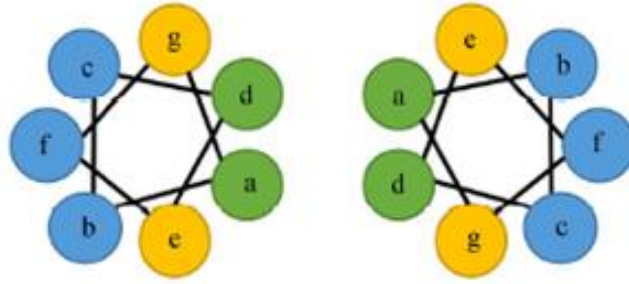
Moleküler kendi kendine yapılanma; hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi ve van der Waals etkileşimleri gibi zayıf, kovalent olmayan bağların aracılık ettiği hiyerarşik sıralı yapılarda moleküllerin kendiliğinden yapılanmasıdır. Bu strateji, hem uygulamadaki sadeliği hem de çeşitli

farklı nanoyapılar üretmek için eşsiz kapasitesiye sahiptir. Kendi kendine yapılanan molekülleri tasarlamak ve sentezlemek, yeni fonksiyonel biyomalzemeler geliştirmek için ilgi duyulan bir aşağıdan yukarıya (bottom up) yaklaşımdır. Doğada, peptitler ve proteinler önemli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarla ilişkili iyi tanımlanmış yapılar oluşturmak için etkileşime girer ve kendi kendini düzenler. Peptitler, nano ölçekte kontrol edilebilir yapısal özelliklere sahip kendiliğinden yapılanan malzemelerin tasarımı için benzersiz bir platformdur. Son yıllardaki önemli araştırmalar, peptitlerin kendi kendine yapılanma yoluyla yeni biyomimetik malzemelerin tasarlanması ve üretilmesine adanmıştır [47-49].

### **1.3.1.1 $\alpha$ -Heliks sarmal peptit**

$\alpha$ -Heliks yapılar, peptitlerin ana sekonder yapılarıdır ve biyolojik sistemlerde hücre iskeleti ve hücre dışı matrikste yaygın olarak görülür. Teorik olarak,  $\alpha$ -Heliksin dönüş başına 3.6 kalıntısı vardır, bu nedenle hidrofobik amino asitler  $\alpha$ -heliks geometrisinin gereksinimlerini karşılamak için genellikle üç ila dört amino asidi yerleştirmek üzere tasarlanmıştır. İki veya daha fazla  $\alpha$ -heliks, çok düzenli ve kararlı olan süper-sarmal yapılar birleştirilmesi yoluyla bir  $\alpha$ -Heliks sarmal yapı oluşturulabilir [50]. Öncü çalışma olarak Petka ve ark. 1998'de tersine çevrilebilir şekilde bir hidrojel halinde monte edilebilen sentetik bir bobinli peptit tasarladılar. Tipik  $\alpha$ -Heliks sarmal peptit, bir heptad tekrar düzeninden (abcdefg)n oluşur, burada a ve d genellikle hidrofobik amino asittir ve geri kalan tortular polar olma eğilimindedir. Bu tekrar eden heptad, hidrofobik etkileşimler altında amfipatik helislere jelleşmeyi teşvik eden sarmal-bobin dimerlerine kendiliğinden monte edilebilir [51, 52].

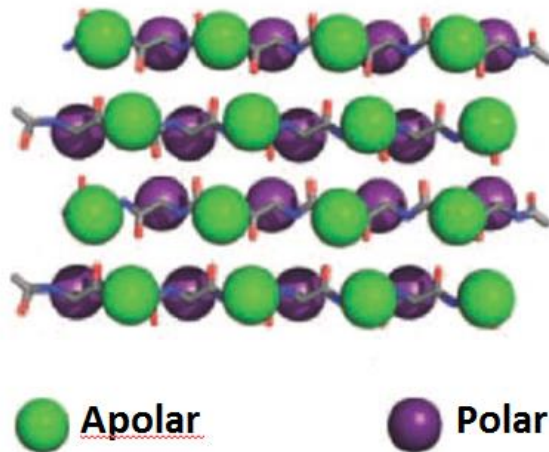




Şekil 1.7  $\alpha$ -Heliks sarmal peptit motifi [48]

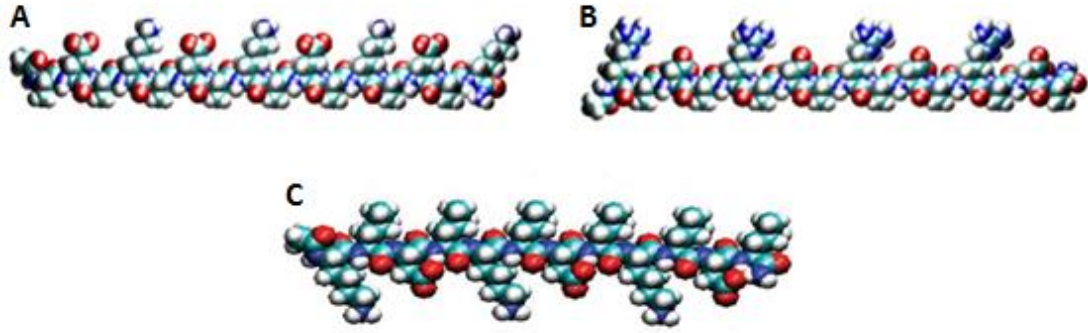
### 1.3.1.2 $\beta$ -tabaka Peptitler

1993 yılında Zhang ve ark. 16 amino asitten oluşan maya proteini Zuotin'i, EAK16-II (Ac-AEAEAKAKAEAEAKAK-CONH<sub>2</sub>) bulmuştur. Alanin (A) nötr bir hidrofobik tortuya sahipken, glutamik asit (E) ve lizin (K) sırasıyla negatif ve pozitif yüklü hidrofilik tortulara sahiptir. Yüksek iyonik mukavemetli ortamda, iyonik kendinden tamamlayıcı oligopeptit EAK16-II,  $\beta$ -tabaka ile kendiliğinden yapılanabilir ve ayrıca bir makroskopik membran oluşturabilir. İyonik kendinden yapılan peptitlerin özelliği % 50 yüklü kalıntı içeren alternatif iyonik hidrofilik ve hidrofobik amino asitlerin periyodik tekrarlarıdır. Hidrofilik yüzeyin yük dağılımına göre, iyonik kendiliğinden yapılan peptitler genellikle dört kategoriye ayrılabilir: modül I (- + - + - + - +), modül II (- - + + - - +), modül III (- - - + + +) ve modül IV (- - - + + + +) [52].



Şekil 1.8  $\beta$ -tabaka peptit motifi [48]

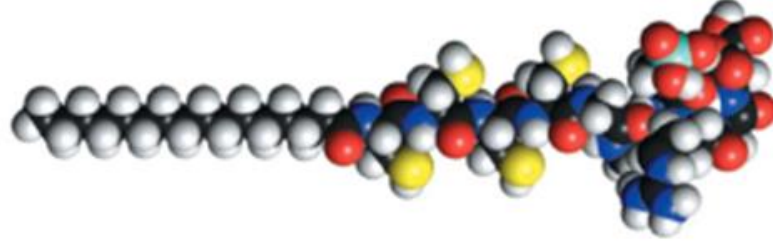
Güçlü hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerle, bu amfifilik oligopeptitler, moleküler kendiliğinden yapılanmayla stabil nanolifler oluşturabilir. RADA16-I, Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedilen iyonik-tamamlayıcı peptit ailesinin iyi bilinen bir başka üyesidir. EAK16-II'den farklı olarak, bu peptit, lizin ve glutamatın arginin ve aspartat kalıntıları ile değiştirilmesiyle tasarlanmıştır. Sulu bir ortamda, kendiliğinden yapılan peptit RADA16-I,  $\beta$ -tabakalı bir yapı oluşturur ve nanoliflere kendiliğinden yaplanır.  $\beta$ -tabaka hidrojel yapıları oluşturabilen alternatif hidrofobik ve iyonik hidrofilik amino asitleriyle bilinen RADA16-I peptidine benzeyen bir diğer üyesi ise KLDL dizisinin 3 tekrarından oluşan KLD12 peptitidir [53].



Şekil 1.9 A) EAK16-I B) RADA16-I C) KLD12 [50, 54]

### 1.3.1.3 Peptit amfifiler

Peptit amfifiler, bir hidrofobik alkil zincirine bağlı hidrofilik peptit sekanslarına sahip bir molekül sınıfıdır. Peptit amfifilerin kimyasal yapısı dört bölgeden oluşur: (1) uzun bir hidrofobik alkil kuyruk; (2) hidrofilik  $\beta$ -tabaka peptit dizileri; (3) bir bağlayıcı olarak yüklü amino asitler; (4) biyoaktif epitop. Diğer bir ana peptit amfifiler sınıfı, kısa bir peptit sekansı içeren ve genellikle N-terminal kapatma grubu olarak fluorenil-9-metoksikarbonil (Fmoc) grubunu kullanan aromatik peptit amfifilerdir. Suda çözündüğünde, hem alkil kuyruklarının hidrofobik etkileşimleri hem de  $\beta$ -tabaka yapısındaki amino asitler arasında hidrojen bağlanması, protein kendiliğinden yapılanmasına benzer olan peptit amfifilerin kendiliğinden yapılanma işlemini yürütür [50, 52, 53].



Şekil 1.10 Amfililik peptit motifi [48]

### 1.3.2 Biyoaktif fonksiyonel epitoplar

Kendiliğinden yapılanan peptit hidrojelleri, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak mükemmel biyouyumluluk ve biyobozunurluk gösterse de, biyomedikal alanlardaki uygulamaları için hücre yapışmasını ve integrin bağlanmasını arttırmak gerekir. Biyoaktif fonksiyonel epitoplar, hücre dışı matris proteinlerinden ekstraktine bağlanma yeteneklerinden dolayı ekstre edilmiştir. Bu epitopların küçük boyutu, monte edilen peptit dizisine çok az etkisi nedeniyle tercih edilir. Örneğin, hücre-hücre ve hücre dışı matris etkileşimini kollajen türevi RGD ve DGEA epitoplarının bağlanmasıyla arttırılabilir. Laminin ve fibronektin gibi glikoproteinler de hücre dışı matrisde önemli bileşenlerdir ve hücre göçü, yapışması ve farklılaşmasından sorumludurlar. Laminin'den türetilen IKVAV, hücre yapışmasını, farklılaşmasını ve nörit dışı büyümeyi destekleyebilen en çok çalışılan epitoplardan biridir. Bir başka laminin türevi epitop YIGSR'nin, sadece nörit dışı büyümeyi değil aynı zamanda endotel hücre yapışmasını destekleme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir [55]. EEEEE epitopu hidroksiapatit kristalleri ile iyonik etkileşime girerek hidrojel yapısına tutunduğu, mekanik özelliklerinde anlamlı bir artışa neden olduğu ve modifiye edilen hidrojellerin osteojenik farklılaşmayı tetiklediği gözlenlemiştir [56].

## 2. DENEYLER

### 2.1 KYPH Sentezi ve Karakterizasyonu

#### 2.1.1 Peptit sentezi

Sentezde kullanılan tüm kimyasallar AAPTEC'ten (Louisville, KY, ABD) satın alınmıştır. KLDLKLKLDL (KLD), KLD-EEGGC ve KLD-EEEEEE peptitleri, 9-florenilmetoksikarbonil (Fmoc) kimyası kullanılarak 4-Metilbenzhidrilamin (MBHA) reçinesi (0.67 mmol / g yükleme kapasitesi) üzerinde sentezlenmiştir. Fmoc korumalı amino asit (2 eşdeğer), 1-[bis(dimetilamino)methilen]-1*H*-benzotriazolium 3-oksit heksaflorofosfat (2 eşdeğer; HBTU) ve N, N-diizopropiletilamin (3 eşdeğer; DIEA) kullanılarak amino asitler dimetilformamid (DMF) içinde 8 saat bekletilerek eklenmiştir. Fmoc koruma grubu, 30 dakika boyunca DMF'de % 20 piperidin kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Her bir amino asit ilavesi ve korumanın kaldırılması reaksiyonu, ninhidrin testi ile izlenmiştir. Peptit dizisinin sentezi tamamlandıktan sonra, peptit dizisini reçineden ayırmak için reçine % 2.5 deiyonize su % 95 TFA (trifloroasetik asit) % 2.5 TIPS (triizopropilsilan) karışımına 2 saat boyunca bırakılmıştır. Daha sonra çözelti soğuk dietil etere (-20 °C) aktarılmıştır. 4 °C 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Dietil eter uzaklaştırıldıktan sonra katı kısım deiyonize suda çözdürülerek gece boyunca -80 °C'de bekletilmiştir. Elde edilen katı, dondurularak kurutma yoluyla liyofilize edilmiştir. Tüm peptitler, elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağına sahip kütle spektrometrisi (Agilent 6530 Q-TOF) ile donatılmış hazırlayıcı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Agilent 1260 Quaternary LC) kullanılarak saflaştırılmıştır [57].

### **2.1.2 KYPH sentezi**

%1 oranında KLD, KLD-EEEE (KLD-O1) ve KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojellerinin (100 deiyonize suda 1 mg KLD) hazırlanması için, 1 mg peptit ilk önce deiyonize su içinde çözülmüştür. Karışım 30 dk inkübe edildikten sonra kendiliğinden yapılan peptit hidrojel (KYPH), hücre büyümesi ortamı (pH 7.4) ilave edilerek 2 saat inkübasyon işleminin ardından sentezlenmiştir. Kullanılan tampon, Dulbecco'nun 25 mM HEPES ((4- (2-hidroksietil) -1-piperazininetansülfonik asit)) içeren fetal sıgır serumu (FBS) içermeyen Modifiye Kartal Ortamı (DMEM) hücre kültür ortamıdır. Aynı prosedür kütle jelleri ile % 0.5 ve % 2 hazırlamak için de kullanılmıştır.

### **2.1.3 KYPH biyobozunumu**

Hidrojellerin in vitro bozunumu fosfat tamponlu salin (PBS) (pH~7.4) içerisinde 37° C'de tamamen bozunum gerçekleşene kadar uygulanmıştır. Kısaca, 0.8 mm çapında disk şeklindeki hidrojeller liyofilize edilerek, tartıldıktan sonra 100 rpm'de sıcaklık kontrollü orbital çalkalayıcıda sürekli olarak çalkalanmıştır. Belli zaman aralıklarında hidrojeller liyofilize edilip, tartılarak kütle kayıpları hesaplanmıştır.

### **2.1.4 Mekanik test**

Farklı epitoplar ile modifiye edilmiş 0.5%, 1% ve 2% konsantrasyonlardaki hidrojellerin reolojik özellikleri ve elastik modülü (Hibrid Reometre Discovery HR-2, TA Instruments, New Castle, DE) 0.5 mm aralık mesafesi, 10 rad/s frekans ve 0.1% kayma gerinimi parametrelerinde ölçüm gerçekleştirilmiştir.

### **2.1.5 Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi**

KYPH'ler, taramalı elektron mikroskopisi (SEM; Carl Zeiss Mikroskopu, Almanya) ile 20 mA'da 60 saniyelik altın muamelesinden sonra 3 kV'lık bir hızlanma voltajında görüntülenmiştir. (QUORUM; Q150 RES; Doğu Sussex; Birleşik Krallık). Görüntülerdeki ölçek çubukları SEM yazılımından elde edilmiş ve hidrojellerin ortalama lif büyüklüğü IMAGEJ yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

### **2.1.6 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi**

KYPH'lerin yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak incelenmiştir. AFM analizi 0.5%, 1% ve 2% konsantrasyonlardaki solüsyonlar hazırlanarak her bir örnekten 1 µL mika tabla üzerine koyularak jelleşmesi sağlanmasının ardından örnekler 5 saat kurutulmuştur. Kurutulan örnekler silikon kantilever kullanılarak 65 kHz rezonans frekansında görüntülenmiştir.

### **2.2 MKH Kültivasyonu ve Çoğaltımı**

Hücreler, DMEM besi ortamı, %10 FBS, 4ng/ml bFGF 100 U/ml penisilin, ve 100 mg/ml streptomisin içeren primer besiyeri içinde standart polistren hücre kültür kaplarına ekilerek, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İki günde bir besi ortamı değiştirilen kültürler %90 yoğunluğa ulaştığında %0,25 tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak uygun pasaj oranında pasajlanmıştır. Her pasaj evresinde hücreler ilgili pasajda yeterli stok oluşturabilmek için dondurma vasatları içerisinde kontrollü bir şekilde dondurularak sıvı azot tankında (Thermo Scientific, Bio-cane 47) -196°C'de stoklanmıştır.

### **2.3 KYPH İçerisine Enkapsüle Edilen MKH'in Canlılık Analizleri**

Hücre sağkalımının belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) kiti ve canlı/ölü hücre boyama işlemi kullanılmıştır. MTT testi canlı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Standart kültür kapları ve iskeleler içerisinde enkapsüle hücrelerin bölünme etkinlikleri ekimden 7, 14, 21 ve 28 gün sonra kullanılmış besiyerleri çekildikten sonra hücreli yüzeyler üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besiyeri eklenmiş ve hücreler karanlıkta kalacak şekilde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üç saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekilerek yüzeyler üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) eklenip oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm'de çalkalanarak kristallerin çözülmesi sağlandıktan sonra çoklu taramalı plaka okuyucu UV spektrofotometrede (Biotek, Epoch 2) 575 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri elde

edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri aynı MTT protokolü yardımıyla elde edilmiş her bir hücre hattı için ayrı ayrı oluşturulmuş belli sayıdaki hücrelerin çoklu kültür kaplarına ekilip MTT testleri yapılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak test gruplarından elde edilen absorbans değerleri hücre sayısı değerleriyle ilişkilendirilmiştir.

KYPH içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin canlı/ölü hücre oranlarının görüntülenerek belirlenmesi için canlı/ölü hücre tayini testi yapılmıştır. Hücre enkapsüle edilen hidrojel yapıları hücre kültürü vasatından uzaklaştırılarak üç kez PBS (5 dakika) ile yıkanmıştır. Daha sonra bunlar 2 µL kalsein-AM (canlı hücreyi yeşile boyar) ve 4 µL etidiyumhomodimer-1 (EthD-1) (ölü hücreyi kırmızıya boyar) içeren 1 mL kalsein-AM/EthD-1 çözeltisi içerisinde ışıktan uzak bir şekilde 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında hidrojeller PBS (3X, 5 dakika) ile yıkanarak, hücreler görünür hale getirilmiş ve görüntüler üç boyutlu hidrojel yapısının görüntülenmesini sağlayan konfokal mikroskop (Andor Revolution, Spin-Disk 500) kullanılarak elde edilmiştir.

## **2.4 KYPH'de MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması**

Osteojenik farklılaşma çalışmalarında kütlece %0,5, %1 ve %2'lik KYPH kullanılmıştır. MKH hücreleri tripsinize edilmiştir, steril PBS ile yıkanmıştır ve 25mM HEPES tamponu ekli DMEM besiyeri içerisinde  $5 \times 10^6$  hücre/mL olacak şekilde yeniden süspansiyon edilmiştir. Daha sonra 300 µL hücre süspansiyonu yine 300 µL kütlece %0,5, 1 ve 2'lik peptit içeren solüsyonlar ile pH 7.4'de olacak şekilde karıştırılmıştır. Hidrojel oluşumu için solüsyon steril PTFE kalıp içerisine dökülerek jelleşme sağlandıktan sonra cork borer yardımıyla 8 mm çapında örnekler kesilerek 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 24 saat DMEM besiyeri ile kültive edildikten sonra osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. Osteojenik besiyeri primer besiyerine 100 nM deksametazon, 50 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserolfosfat ilave edilerek hazırlanmıştır. Hücreler, düzenli vasat değişimi yapılarak, dört hafta süre ile belirtilen besi ortamı içerisinde kültive edilmiştir. Bütün denemelerde 3. ile 5. pasaj arası hücreler kullanılmıştır. Bu çalışmadaki deney grupları KLD, KLD-EEGGC (KLD-O1), KLD-EEEEEE (KLD-O2) ve Biogelx (pozitif kontrol) olmuştur.

7, 14, 21 ve 28. günlerde hidrojeller PBS ile durulanmış ve örneklerin lizatları PBS'de % 0.2 triton ile 10 mM Tris kullanılarak elde edilmiştir. Numune lizatları, DNA içeriği, alkalen fosfataz (ALPaz) aktivitesi ve kalsiyum içeriğinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Her bir grubun DNA içeriği, ALPaz aktivitesi ve kalsiyum içeriği sırasıyla DNA Quantification Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD), QuantiChrom ALPaz testi (Bioassay Systems, Hayward, CA, ABD) ve QuantiChrom Calcium testi (Bioassay Systems, Hayward, CA, ABD) ile ölçülmüştür. [57].

Kısaca, bisBenzimide H 33258 solüsyonu hazırlanmış ve 96 oyuklu bir plaka içerisinde numunelere eklenmiştir. Floresans ölçümü için (360 nm dalga boyunda uyarılmış), 460 nm emisyon dalga boyunda bir spektrofotometre (BioTek, Winooski, VT, ABD) kullanılmıştır. ALP kiti kullanılarak, ALP aktivitesi, 405 nm'de alkalın çözeltisindeki p-nitrofenilfosfat (pNPP) ile değerlendirilmiştir. İlk olarak örneklerin lizatlarından 50 µl 96 oyuklu plakaya aktarıldı. Daha sonra toplam miktar 200 µl olacak şekilde üzerine reaksiyon solüsyonu (5 mM magnezyum asetat ve 10 mM pNPP) eklendi. Optik yoğunluk çoklu plaka okuyucuda (BioTek, Winooski, VT, ABD) 405 nm'de başlangıçta ve 4. dakika sonunda ölçülmüştür. Örneklerin kalsiyum içeriği, çalışma çözeltisinin 150 µl'sine süspansiyonun 50 µl'si ilave edilerek ölçülmüştür. İnkübasyondan sonra, 612 nm'deki optik yoğunluk, referans kalsiyum çözeltileri ile çizilen bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak eşdeğer  $Ca^{2+}$  miktarıyla ilişkilendirildi. Her bir örneğin toplam mineralizasyonunun belirlenmesi, ölçülen kalsiyum içeriğinden elde edildi. Ölçülen ALP aktiviteleri ve kalsiyum içerikleri, her bir zaman noktasında DNA içeriğine bölünerek hücre miktarlarına normalize edilmiştir.

## 2.5 İstatiksel Analiz

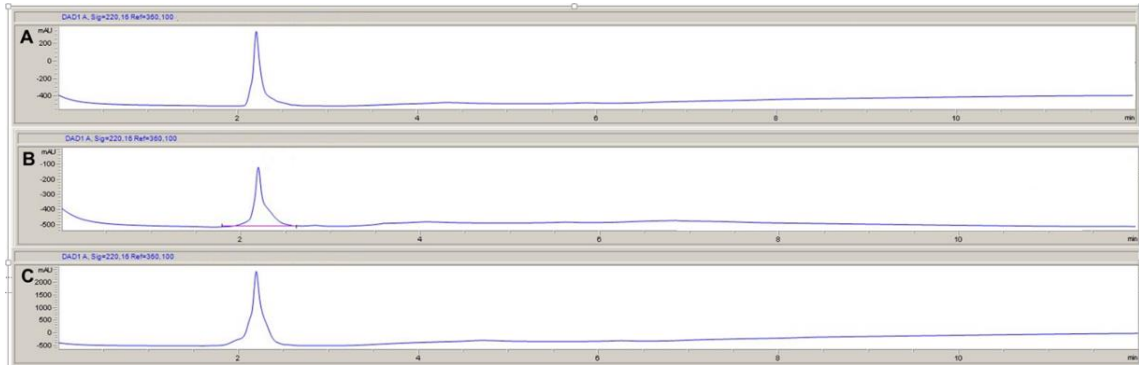
Bütün deney gruplarından en az üçer örnek test edilmiş (n=3) ve tüm deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen tüm sonuçların ortalama değerleri, standart sapmaları ve standart hata değerleri rapor edilmiştir. Gruplar arasındaki ikili ilişkiler Student t-test metodu kullanılarak yapılmış ve  $p<0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



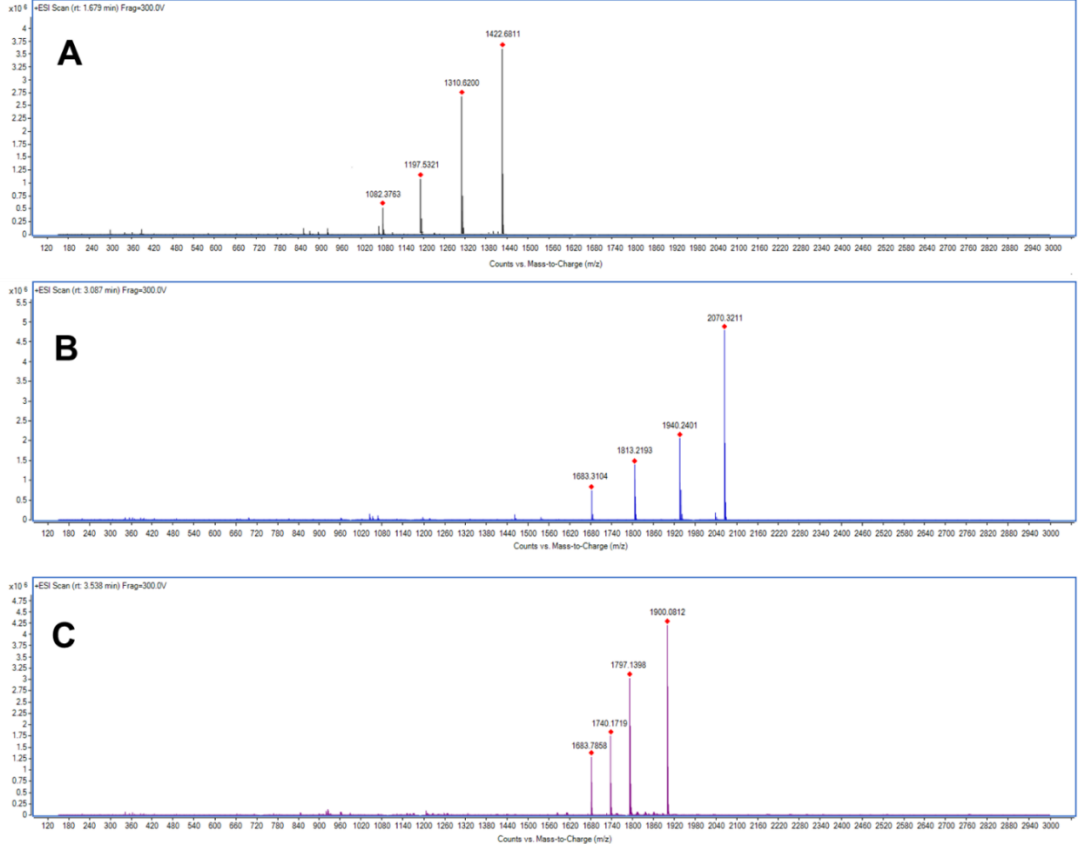
### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 KYPH Sentezi ve Karakterizasyonu

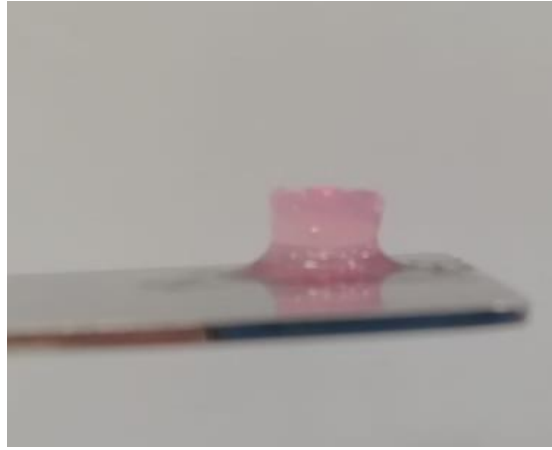
Sentezlenen peptit dizileri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Agilent Technologies, Agilent 1200) ile saflaştırılıp, karakterizasyonu kütle spektrometresi (LC/Q-TOF-MS) kullanılarak EGE MATAL - E.Ü. Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile yapılmıştır. KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 peptitlerinin kütle spektrumları, elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı içeren kütle spektrometresi (Agilent 6530 Q-TOF) ile karakterize edilmiştir. Sıvı kromatografi ve kütle spektrumları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 belirtilmiştir.



**Şekil 3.1** A) KLD, B) KLD-EEEE (KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojellerinin sıvı kromatogram spektrumu



**Şekil 3.2** A) KLD, B) KLD-EEEEEE(KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojenlerinin kütle spektrumları

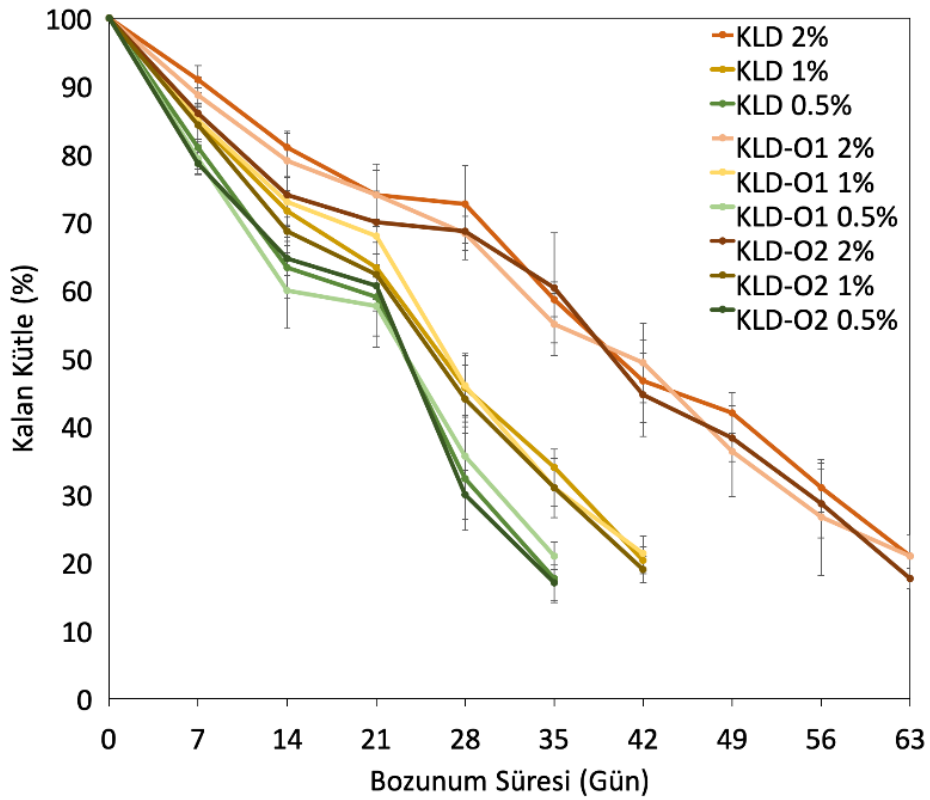


**Şekil 3.3** Üretilen kendiliğinden yapılan peptid hidrojel

**Tablo 3.1** Sentezlenen KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 peptitlerin gözlenen ve hesaplanan moleküler ağırlığı

İsim	Sekans	Hesaplanan	Gözlemlenen
KLD	KLDLKLDLKLDL	1425,78	1422,68
KLD-O1	KLDLKLDLKLDL-EEEEEE	2071,35	2070,32
KLD-O2	KLDLKLDLKLDL-EEGGC	1901,26	1900,08

KLD, KLD-EEEEEE (KLD-O1) ve KLD-EEGGC (KLD-O2) peptitleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi sonuçlarında görüldüğü üzere başarı ile üretilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Peptitlerin gözlemlenen moleküler ağırlıkları Tablo 3.1 ile gösterilmiştir.

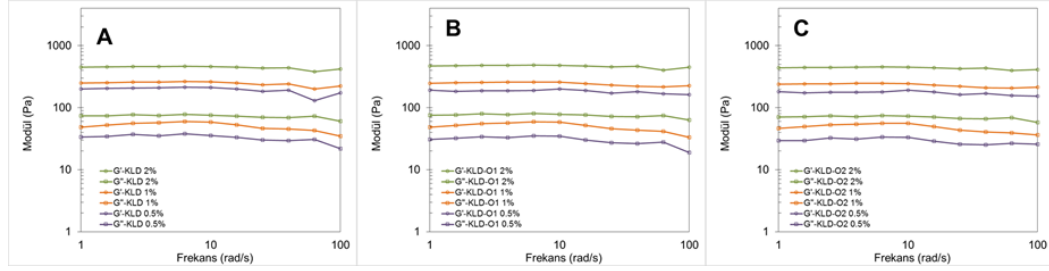


**Şekil 3.4** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (%2, %1 ve %0,5) A) KLD, B) KLD-EEEEEE (KLD-O1), C) KLD-EEGGC (KLD-O2) hidrojellerinin zamana göre bozunum miktarları

Hidrojellerin biyobozunumlarının belirlenmesi için örnekler yapay vücut sıvısı içinde (SBF, pH=7,4), 37°C'de etüvde inkübe edilmiş olup yedi gün aralıklarla bozunma ortamından çıkarılmış ve sıvısı çekildikten sonra ağırlık kaybı tartılarak incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hidrojellerin bozunma süresi arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Konsantrasyon artışının bozunum süresinin arttırdığı tespit edilmiş olup 35 gün sonucunda %0.5, 42 gün sonucunda da %1'lik ve 63 gün sonunda hidrojin bütünleşik karakteristiğini kaybederek bozunduğu tespit edilmiştir. Anlamlı fark olmasa da hem daha hızlı seyreden hidrojel bozunumunun eklenen epitoplara bağlı olarak artan hidrofilitateye bağlı olduğu düşünülmektedir (Şekil 3.4). Doku iskelelerinin degradasyon sürecinin rejenerasyon zaman aralığında olması doku gelişimini etkileyen faktörlerdendir [58, 59].

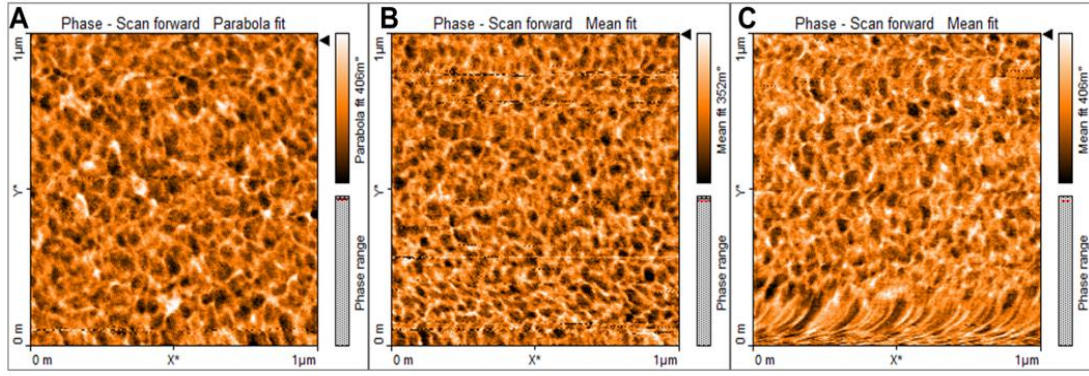
Farklı epitoplar ile modifiye edilmiş %0.5, %1 ve %2 konsantrasyonlardaki hidrojellerin reolojik özellikleri ve elastik modülü İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, disk şeklinde üretilen hidrojellerin reolojik analizleri 0.5 mm aralık mesafesi, 0,1-10 rad/s frekans aralığında ve %0.1 kayma gerilimi parametrelerinde ölçüm gerçekleştirilmiştir [60]. Peptit çözeltilerinin makroskopik özelliğini karşılaştırmak için reoloji ölçümleri alınmıştır. Farklı yoğunluktaki KLD ve osteojenik epitop içeren peptit çözeltileri reolojik olarak jel özellik göstermiştir (Şekil 3.5). Depolama modülü ( $G'$ ) ve kayıp modülü ( $G''$ ) arasındaki geçiş noktası (crossover point), benzer konsantrasyondaki her bir peptit için aynı frekanslarda meydana gelmiştir. Maksimum depolama modülü, tüm çözeltiler için 1000 Pa'nın altında kalmıştır.  $G'$  ve  $G''$ , frekansın bir fonksiyonu olarak nispeten sabit kalmıştır ve peptit çözeltilerin yoğunluğu arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. Reoloji analizinde; %2 KLD solüsyonunun depolama modülünün ( $G'$ ) 400-500, kayıp modülünün değeri ( $G''$ ) 70-90 Pa arasında, %1 KLD solüsyonunun depolama modülünün ( $G'$ ) 215-260 Pa arasında, kayıp modülünün değeri ( $G''$ ) 30-60 Pa arasında ve %0,5 KLD solüsyonunun depolama modülünün ( $G'$ ) 120-215 Pa arasında ve kayıp modülünün değeri ( $G''$ ) 20-40 Pa arasında olduğu gözlemlenmiştir. Aynı yoğunluklardaki KLD-01 ve KLD-02 hidrojelleri ise KLD ile yaklaşık olarak aynı değerlere sahip olup eklenen epitopların jellerin reolojik özelliklerinde anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlenmiştir. Liu ve ark. KYPH'in reolojik test sonuçlarında depolama modülünü 500-600 Pa aralığında bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada ise Lesley ve ark. depolama

modülünü ~700 Pa olarak elde etmişlerdir. Ayrıca her iki çalışmada da bulunan sonuçlara göre yoğunluk arttıkça  $G'$  ve  $G''$  değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalarda elde edilen KYPH'nin reolojik sonuçlarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir [61-63]. Mekanik özellikleri geliştirilen hidrojenlerin osteojenik farklılaşmayı destekleyerek kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı daha önce yapılan çalışmalar raporlanmıştır [64, 65].



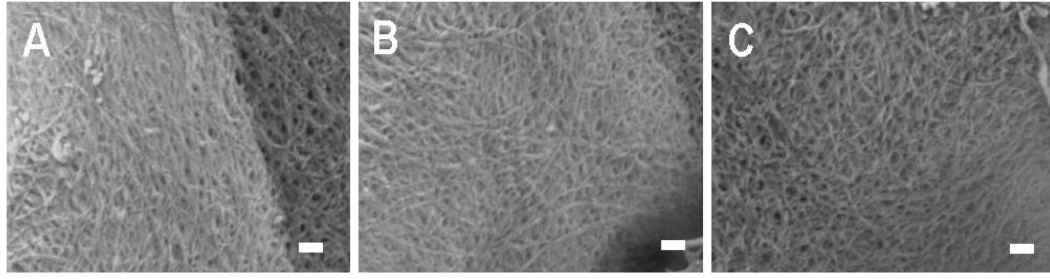
**Şekil 3.5** Kütlece %0.5, %1 ve %2'lik A) KLD , B) KLD-EEEEEE (KLD-O1) ve C) KLD-EEGGC(KLD-O2) peptit hidrojenlerinin depolama modülü ( $G'$ ) ve kayıp modülü ( $G''$ ) karşılaştırılması.

Geliştirilen KYPH'nin degradasyon ve reolojik özellikleri değerlendirildiğinde uzun degradasyon sürecine bağlı olarak kemik oluşumu sürecinde etkin mekanik destek sağlayabilecek %2'lik KLD, KLD-O1 ve KLD-O2'nin osteojenik farklılaşma çalışmalarında kullanılması kararlaştırılmıştır. Bu bağlamda %2 konsantrasyonda KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojenleri SEM ve AFM kullanılarak İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında hizmet alımı yapılarak incelenmiştir. AFM analizi için %2 konsantrasyonlardaki peptit solüsyonu hazırlanmış ve her bir örnekten 1  $\mu$ L alınıp 19  $\mu$ L deiyonize su ile karıştırılmıştır. Örnekler mika tabla üzerine yayılarak jelleşmesi sağlandıktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler silikon kantilever kullanılarak 65 kHz rezonans frekansında görüntülenmiştir.



**Şekil 3.6** A) %2 KLD, B) %2 KLD-EEEE (KLD-O1), C) %2 KLD-EEGCG (KLD-O2) hidrojenlerinin AFM görüntüleri

SEM analizi öncesinde örnekler 20 mA'de 30 saniye altın kaplama işlemine tabi tutulmuş ve vakum altında 8 kV voltaj değerinde gerçekleştirilmiştir.



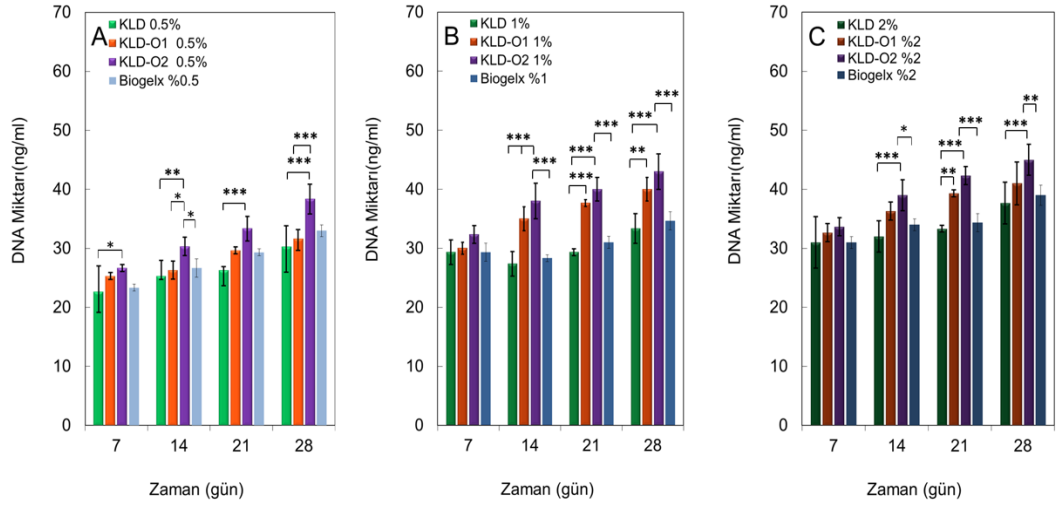
**Şekil 3.7** A) %2 KLD , B) %2 KLD-O1, ve C) %2 KLD-O2 hidrojenlerinin SEM görüntüsü, Ölçek çubuğu 200nm'dir.

AFM ve SEM analizi sonuçları değerlendirildiğinde kendiliğinden yapılanan peptit yapılarının nanofiber yapıları oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca KLD dizisine eklenen osteojenik epitoplara kendiliğinden yapılanma prosesini olumsuz etkilememiş bu örneklerde de nanofiber oluşumu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak, Wang ve ark. yaptıkları çalışmada başka kendiliğinden yapılanan peptit dizisine (RADA) ekledikleri fonksiyonel epitoplara kendiliğinden yapılanma prosesini etkilemediğini raporlamışlardır [66].

### 3.2 KYPH'de MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması

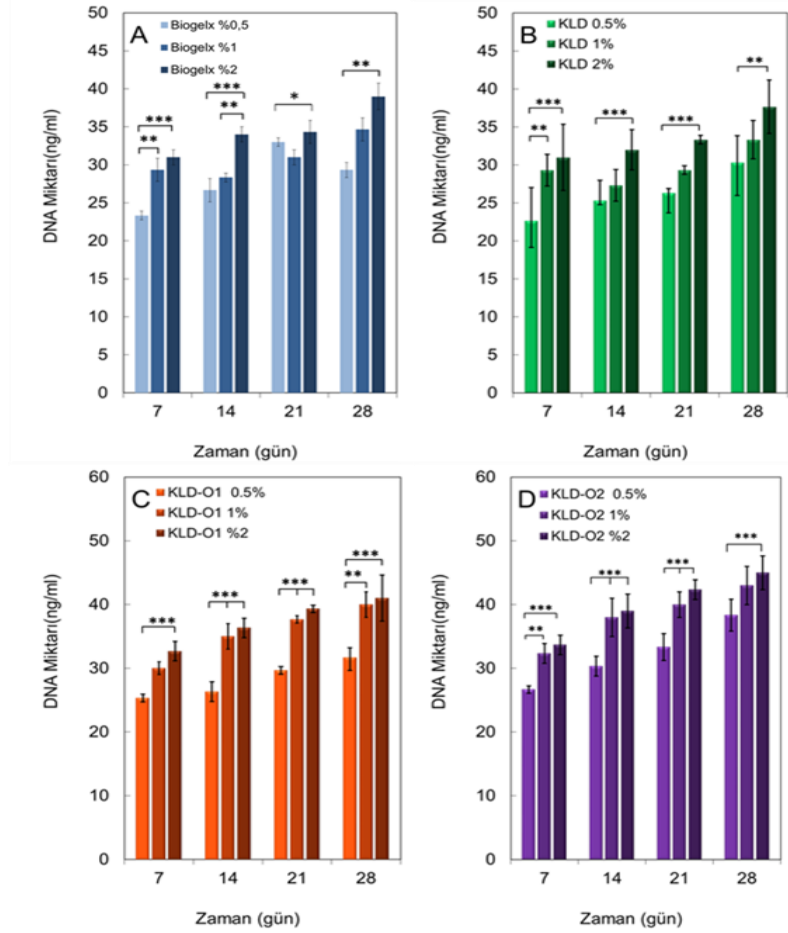
MKH'lerin osteojenik farklılaşması, tutunma, çoğalma, farklılaşma, olgunlaşma ve mineralizasyonu içeren karmaşık bir süreçtir. Osteojenik farklılaşma, kemik hücre dışı matrisi benzeri peptit dizileri tarafından yönlendirilebilir ve bu nedenle doku iskelelerine osteoindüktif özellik kazandırılması kritik öneme sahiptir. Osteojenik farklılaşmayı değerlendirmek için kullanılacak en önemli parametreler hücre

büyümesi, ALP aktivitesi, kalsiyum miktarıdır. Bu çalışmada, MKH'lerin peptit hidrojelleri içerisindeki osteojenik farklılaşması 28 gün boyunca DNA miktarı, ALP aktivitesi ve kalsiyum miktarı ölçülerek belirlenmiştir. DNA içeriği hem MTT analizine ek olarak hücre sayısının belirlenmesi hem de ALP ve kalsiyum miktarının normalize edilmesi amacı kullanılmıştır. Ölçülen ALP aktiviteleri ve kalsiyum içerikleri her bir zaman noktasında DNA içeriğine bölünerek normalize edilmiştir. Bu aşamada, MKH'ler KLD, KLD-O1, KLD-O2 ve ticari olarak temin edilen Biogelx peptit hidrojellerinin %0,5, %1 ve %2 konsantrasyonlarını içeren örneklerle enkapsüle edildikten sonra 7, 14, 21 ve 28 gün boyunca kültüve edilmiştir. Biogelx ürünü Strathclyde Üniversitesi teknoparkında kurulan şirket tarafından 2016 yılında ticarileşerek hücre kültürü ve biyomürekkep olarak 3B biyobasım uygulamalarında kullanılan doğal hücre dışı matrisi taklit edebilen sentetik bir peptit hidrojeldir [67-69]. Her kültür zamanının sonunda hücrelerin DNA içeriği ölçülmüştür. DNA miktar analizi her bir zaman diliminde hücre enkapsüle edilen peptit hidrojellerin serumsuz besi yeri ile yıkanmasının ardından hücre içi DNA'nın hücre dışına çıkartılması için hücre parçalama (lisis) solüsyonu (PBS içerisinde %0,2 Triton ve 10 mM Tris) ile inkübe edilmiştir. Hücre lisis solüsyonu DNA miktar tayin kiti ve ilgili protokol kullanılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir [70]. Sonuç grafiklerinde hem farklı peptit konsantrasyonlarının hem de farklı epitoplarla dekore edilmiş peptit hidrojellerin aynı konsantrasyonlarda karşılaştırmalı DNA miktarı, ALP aktivasyonu ve Kalsiyum miktar analizine etkisi incelenmiştir.



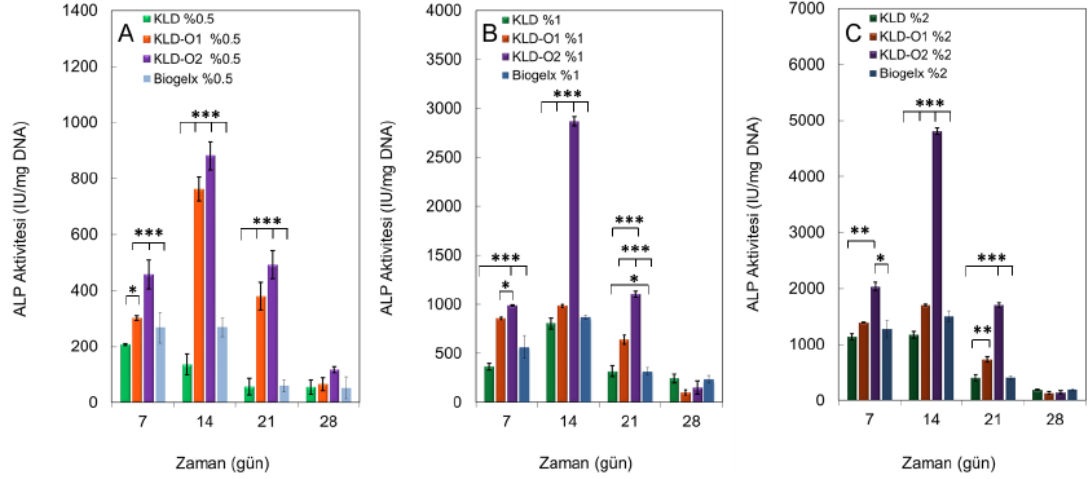
**Şekil 3.8** (A)%0,5 (B)% 1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra DNA miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )].





**Şekil 3.9** %0,5, %1 ve %2 konsantrasyonlardaki Biogelx(kontrol) (A), KLD (B), KLD-O1 (C), KLD-O2 (D) hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüre edildikten sonra DNA miktarı. [anlamli farklar one-way ANOVA [Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )].

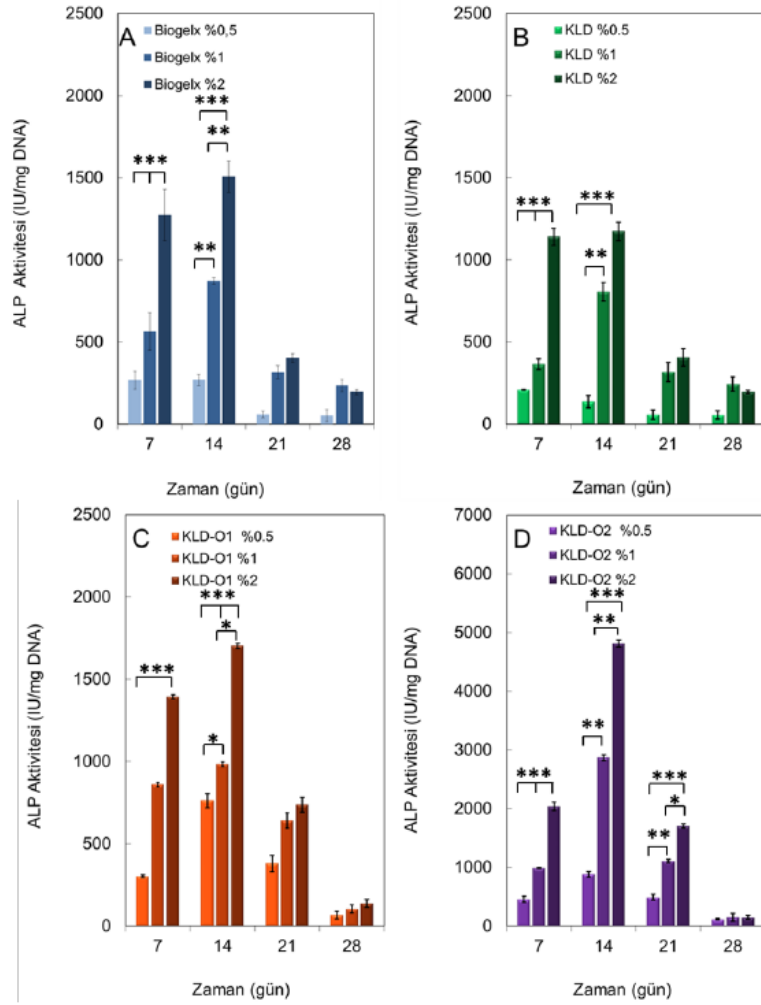
DNA miktar sonuçları analiz edildiğinde, KLD-O2'nin 28 günlük inkübasyon süresi boyunca KLD, KLD-O1 ve Biogelx'e kıyasla MKH'lerin proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdığını göstermiştir (Şekil 3.8). Bu sonuç, glutamik asitin integrin bağlama motifi içindeki varlığı ve etkili rolü ile ilişkili olabileceğinden artan glutamik asit sayısının hücre proliferasyonunu indüklediğini göstermektedir. Pulido ve ark, integrinlerin doğrudan g1 zinciri kuyruğundaki bir glutamik aside bağlandığını göstermiştir ve bu durum glutamik asitin hücre tutunmasındaki etkinliğini açıklar niteliktedir [71]. Ayrıca artan hidrojel konsantrasyonu da hücre tutunmasına ve çoğalmasına önemli ölçüde katkı sağlamıştır(Şekil 3.9).



**Şekil 3.10** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra alkalın fosfataz aktivitesi.

[anlamli farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)].

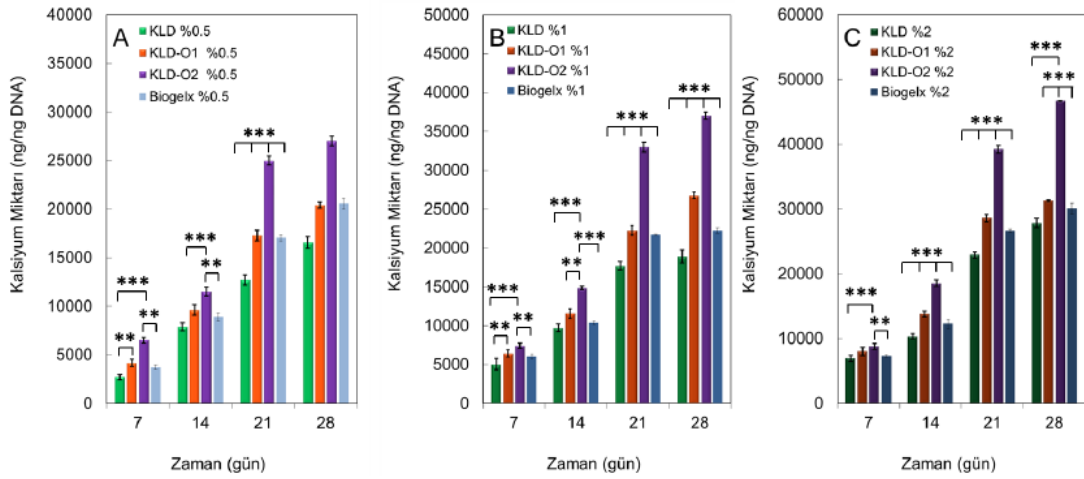
%0,5, %1 ve %2 konsantrasyonlardaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerine enkapsüle edilen MKH'in osteojenik farklılaşmalarının osteojenik markerı olan ALP aktivitesinin analiz sonuçları ilgili grupların toplam DNA miktarına oranlanarak normalize edilerek sırasıyla şekil 3.10 A, B ve C 'de gösterilmiştir. ALP aktivitesinin bütün gruplarda 14. günde en yüksek seviyeye ulaştığı 21. ve 28. günlerde düşüşe geçtiği gözlenmiştir. KLD-O2 grubundaki hidrojeljellerin içine enkapsüle edilen MKH'nin ALP aktivitesi diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksektir (p<0,001). Biogelx, KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin aynı grupların farklı konsantrosyanlarının ALP aktivite analizleri şekil 3.11 A, B, C ve D'de gösterilmiştir. En yüksek ALP aktivitesinin bütün grupların %2 konsantrasyonunda gözlendiği, artan konsantrasyonun ALP aktivitesinde artışa sebebiyet verdiği görülmektedir. Daha önceki sonuçlarla tutarlı olarak, ALP aktivitesinin 7. günden 14. güne yükseldiği ve daha sonra daha uzun inkübasyon süresine bağlı mineralleşmeyle azalmaya başlamıştır. 14. günde %2 konsantrasyona sahip KLD-O2'nin ALP aktivitesi (IU/ng DNA) (4810,25±56,49), %2 konsantrasyondaki KLD-O1'den (1735± 30,00), KLD'den (1173,27 ±57,10) ve pozitif kontrol olarak kullanılan Biogelx'ten anlamlı olarak daha yüksektir (p<0,001).



**Şekil 3.11** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra alkalın fosfataz aktivitesi. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)].

Kalsiyum birikimi osteojenik farklılaşmada olgunlaşma aşamasının bir göstergesidir. Bu sebeple MKH'lerin kalsiyum içeriğini zamanla arttırmaları beklenmektedir. Kalsiyum birikimi mineralizasyon aşamasının bir göstergesidir ve bunun için MKH'lerin kalsiyum içeriğini arttırmaları beklenmektedir. Tüm gruplarda kültivasyon süresi arttıkça kalsiyum miktarında artış gözlenmiştir (Şekil 3.12). Ancak bazal besi yerinde kültüve edilen MKH'lerde beklendiği gibi herhangi bir şekilde ALP aktivasyonunda ve kalsiyum miktarında artış gözlenmemiştir. Hücrelerin çoğalabildikleri ancak farklılaşma yol izine girmedikleri tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda da nanolif tabanlı doku iskelesi üzerine ekilen MKH'ların bazal besi yerinde kültivasyonu sonrası hiçbir osteojenik markerda artış görülmediği raporlanmıştır [70]. Farklı konsantrasyonlardaki Biogelx, KLD, KLD-O1 ve KLD-

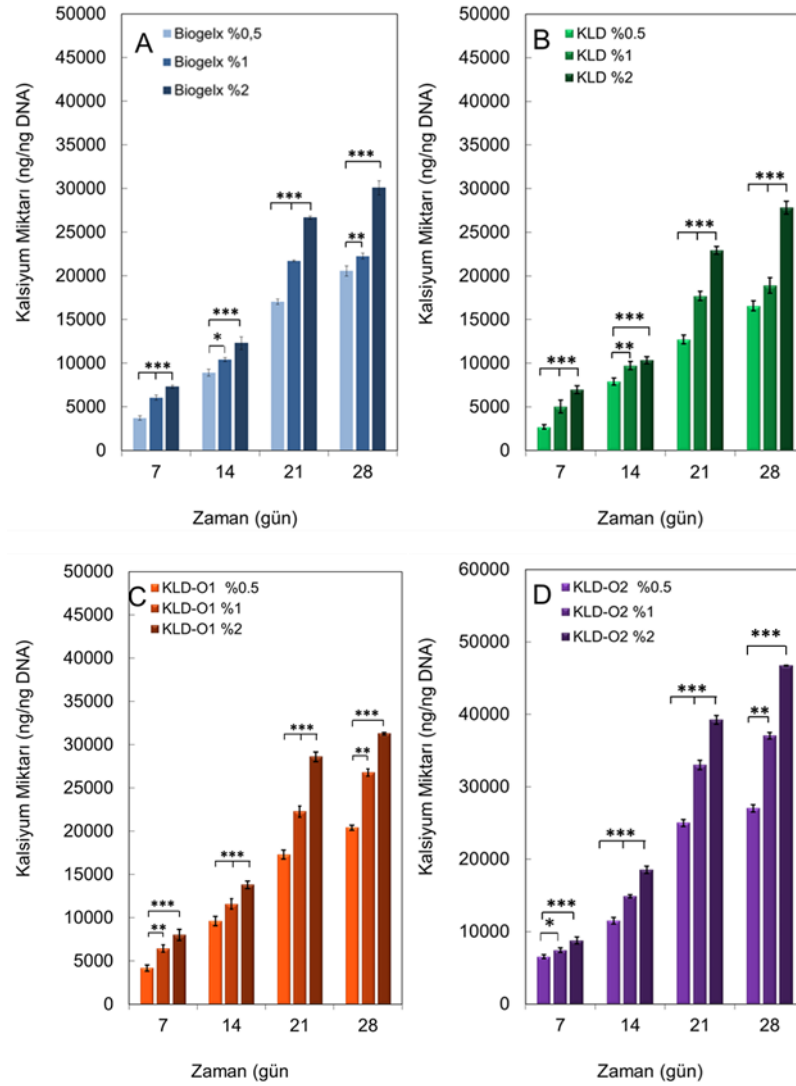
O2 hidrojellerine ekilen MKH'in kalsiyum miktarı %2 lik konsantrasyon gruplarında anlamlı derecede yüksek seviyeye ulaşmış ve 28. günde en yüksek değere ulaşmıştır. Ayrıca gruplar birbirleri ile kıyaslandığında KLD-O2 (%2) 7 (8780±450), 14 (18500±493), 21 (39200±597) ve 28 (46700±49,6) gün kalsiyum seviyesi KLD, KLD-O1 ve Biogelx grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek değerler elde edilmiştir. KLD üzerine ekilen hücreler en düşük kalsiyum içeriğine sahiptir, bu da hücrelerin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha fazla olgunlaşmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar, KLD-O2 grubunun erken evrelerinde bile mineralleşmenin keskin bir şekilde artmış kalsiyum içeriğinin, MKH'nin osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde hızlandığını göstermektedir.



**Şekil 3.12** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra kalsiyum miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)].

MKH enkapsüle edilmiş KLD, KLD-O1, KLD-O2 ve Biogelx gruplarının inkübasyon süresi boyunca kalsiyum içeriği (ng Ca/ng DNA) tutarlı bir şekilde yükselmiştir. Maksimum kalsiyum miktarı %2'lik gruplarda gözlemlenmiştir (Şekil 3.13). 28 gün sonundan %2'lik KLD-O2, KLD-O1, KLD ve Biogelx sırasıyla 46699,66 ± 741, 31261,73 ± 141, 27815,37 ± 49.7 ve 30082,04 ± 819'ye ulaşmıştır. Sonuçlar, kalsiyum içeriğinin, tüm zaman noktalarında KLD-O2'nin KLD-O1, KLD ve Biogelx'ten anlamlı derecede (p<0,001) daha yüksek olduğunu ve 28. günde maksimum noktaya ulaştığını göstermiştir (Şekil 3.12 C). KLD peptid hidrojel içerisine enkapsüle edilen hücreler en düşük kalsiyum içeriğine sahiptir. Bu durum

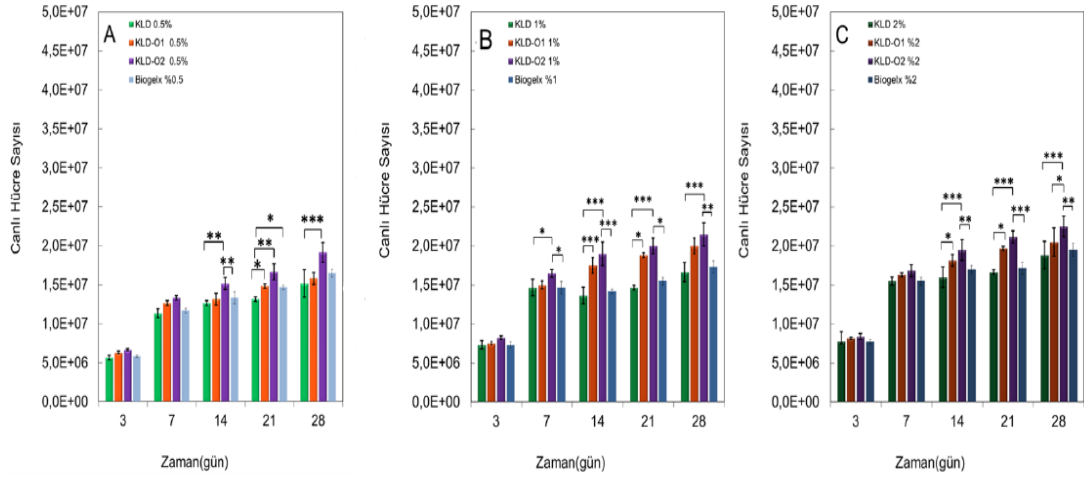
hücrelerin tekrarlı glutamik asit (GLU) epitopu içeren gruplara kıyasla olgunlaşmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar, GLU konjugasyonunun, kültürün erken evrelerinde bile mineralleşmesinin önemli ölçüde arttırdığını ve artan kalsiyum fosfat içeriğinin, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde hızlandırdığını göstermektedir. Yapılan daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi GLU peptit sekansı osteojenik farklılaşmayı etkin bir şekilde arttırdığı raporlanmıştır [72].



**Şekil 3.13** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojellerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra kalsiyum miktarı. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)].

### 3.3 KYPH İÇERİSİNE ENKAPSÜLE EDİLEN MKH'İN CANLILIK ANALİZLERİ

Hücre sağkalımının belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) kiti ve canlı/ölü hücre boyama işlemi kullanılmıştır. MTT testi canlı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Standart kültür kapları ve iskeleler içerisinde enkapsüle hücrelerin bölünme etkinlikleri ekimden 3, 7, 14, 21 ve 28 gün sonra kullanılmış besiyerleri çekildikten sonra hücreli yüzeyler üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besiyeri eklenmiş ve hücreler karanlıkta kalacak şekilde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üç saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekilerek yüzeyler üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm'de çalkalanarak kristallerin çözülmesi sağlandıktan sonra çoklu taramalı çoklu plaka okuyucu UV spektrofotometrede (Biotek, Epoch 2) 575 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri elde edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri aynı MTT protokol yardımıyla elde edilmiş her bir hücre hattı için ayrı ayrı oluşturulmuş belli sayıdaki hücrelerin çoklu kültür kaplarına ekilip MTT testleri yapılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak test gruplarından elde edilen absorbans değerleri hücre sayısı değerleriyle ilişkilendirilmiştir.

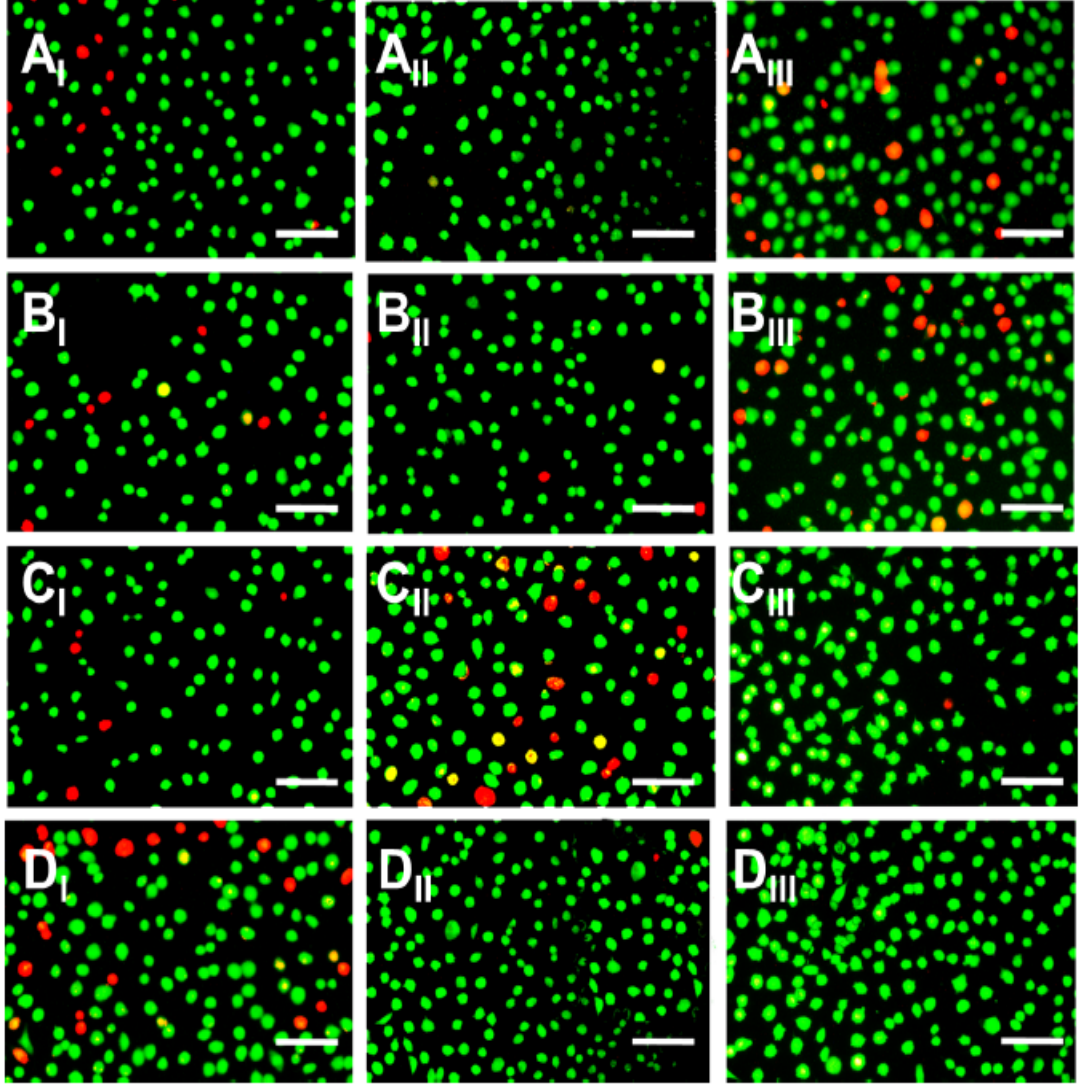


**Şekil 3.14** (A)%0,5 (B)%1 (C)%2 konsantrasyonlarındaki Biogelx (pozitif kontrol), KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 hidrojenlerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 28 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültürasyon sürecinde zamana bağlı MTT analiz sonuçları. [anlamlı farklar one-way ANOVA [Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir, (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )].

Canlı hücre sayısı, hücreler enkapsüle edildikten sonraki 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde MTT analizi yardımı ile değerlendirilmiştir. Şekil 10'da gösterildiği gibi, kontrol grupları, osteojenik epitop eklenen (O1 ve O2) gruplara kıyasla daha az hücre sayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir. 28.günde %2 konsantrasyona sahip KLD-O2, KLD-O1, KLD ve Biogelx hücre sayıları karşılaştırıldığında KLD-O2 grubunun diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda hücre sayısında artış gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlar epitopların hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığını ve tekrarlayan amino asit dizilerinin hücre çoğalması üzerinde olumlu etkisinin olduğu göstermektedir. Aynı zamanda canlı/ölü oranı ve DNA miktarıyla tutarlı olarak artan konsantrasyon ve biyomekanik karakteristik hücre çoğalmasını pozitif yönde etkilediği görülmektedir.

Peptit hidrojenler içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin canlı/ölü hücre oranlarının görüntülenerek belirlenmesi için 3. günde canlı/ölü hücre tayini testi yapılmıştır. Hücre enkapsüle edilen hidrojel yapıları hücre kültürü vasatından uzaklaştırılarak ve üç kez PBS (5 dakika) ile yıkanmıştır. Daha sonra bunlar 2  $\mu$ L kalsein-AM (canlı hücreyi yeşile boyar) ve 4  $\mu$ L etidyumhomodimer-1 (EthD-1) (ölü hücreyi kırmızıya boyar) içeren 1 mL kalsein-AM/ EthD-1 çözeltisi içerisinde ışıktan uzak bir şekilde 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında hidrojenler PBS (3X, 5 dakika) ile yıkanarak, hücreler görünür hale getirilip ve görüntüler üç boyutlu hidrojel yapısının

görüntülenmesini sağlayan konfokal mikroskop (Andor Revolution, Spin-Disk 500) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.15).



**Şekil 3.15** %0,5 %1, %2 konsantrasyonlarındaki A) Biogelx (pozitif kontrol), B) KLD, C) KLD-O1 D) KLD-O2 hidrojenlerinin içine enkapsüle edilen MKH'nin 3 gün boyunca osteojenik besi yerinde kültüve edildikten sonra canlı/ölü hücre oranları. Yeşil renk canlı hücreleri, kırmızı renk ise ölü hücreleri ifade etmektedir. Ölçek çubuğu 100µm'yi gösterir.

Elde edilen canlı/ölü hücre sonuçlar değerlendirildiğinde hiçbir grubun sitotoksik etki yaparak ciddi oranda ölüme sebebiyet vermediği görülmüş olup canlılık oranı en yüksek görünen grubun %2'lik KLD-O1 ve KLD-O2 olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hidrojinin artan biyomekanik karakteristiğine bağlı olarak canlılık oranlarında artış olduğunu göstermektedir. Bu konu da MKH hücrelerinin karakteristik olarak yüksek mekanik özellikli hidrojenlerde canlılık ve aktivitesinin artması ile ilişkilendirilebilir [73].



## 4. SONUÇLAR

Özetle, KLD, KLD-O1 ve KLD-O2 peptitler başarı ile sentezlenmiş, elde edilen peptitler farklı oranlarda hazırlanarak kendiliğinden yapılanma prosesi tamamlanmıştır. Uygulanan reolojik testlerin sonuçlarına bakıldığında farklı yoğunluktaki KLD ve osteojenik epitop içeren peptit çözeltileri reolojik olarak jel özellik göstermiştir. Aynı konsantrasyondaki peptitlerin depolama modülü ( $G'$ ) ve kayıp modülü ( $G''$ ) arasındaki geçiş noktası (crossover point) aynı frekanslarda meydana gelmiş ve konsantrasyon arttıkça  $G'$  ve  $G''$  değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kendiliğinden yapılan peptitlerin nanofiber yapıları oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca KLD dizisine eklenen epitopların kendiliğinden yapılanma prosesini olumsuz etkilememiş ve bu örneklerde de nanofiber oluşumu gözlemlenmiştir. Yapılan hücre canlılık testlerinde ise hiç bir grubun sitotoksik etki yaratmadığı saptanmıştır. Osteojenik farklılaşma için değerlendirilen ALP aktivitesi ve kalsiyum miktarının diğer gruplara kıyasla KLD-O2 grubunda ve KLD-O2 grubunda da %2'lik konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda tekrarlı glutamik asit epitopu içeren grupların kültürün erken evrelerinde bile mineralleşmesinin önemli ölçüde arttırdığını ve artan kalsiyum fosfat içeriğinin, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde hızlandırdığını göstermektedir. Daha etkin kemik rejenerasyonu için sentetik iskelelerin biyoaktivitesinin arttırılmasının önemini vurgulayan çok sayıda çalışma vardır. Bu bulguların, araştırmacıların kemik iyileşme süreçlerini iyileştirmek için kliniğe çevrilecek daha iyi biyomimetik iskeleler tasarımlarına yardımcı olacağına inanılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Porter, J.R., T.T. Ruckh, and K.C. Popat, Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress*, 2009. **25**(6): p. 1539-1560.
2. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 2012. **40**(5).
3. Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 2008. **3**(Supplement 3): p. S131-S139.
4. Dimitriou, R., et al., Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*, 2011. **9**(1): p. 66.
5. Nakashima, K. and B. de Crombrughe, Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *TRENDS in Genetics*, 2003. **19**(8): p. 458-466.
6. Balagangadharan, K., S. Dhivya, and N. Selvamurugan, Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 2017. **104**: p. 1372-1382.
7. Rizzo, D.C., *Fundamentals of anatomy and physiology*. 2015: Cengage Learning.
8. Young, M.F., Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis international*, 2003. **14**(3): p. 35-42.
9. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006. **8**: p. 455-498.
10. Sommerfeldt, D. and C. Rubin, Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, 2001. **10**(2): p. S86-S95.
11. Jiang, Y., et al., Recombinant human parathyroid hormone (1–34)[teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003. **18**(11): p. 1932-1941.
12. Smit, T.H., A. Odgaard, and E. Schneider, Structure and function of vertebral trabecular bone. *Spine*, 1997. **22**(24): p. 2823-2833.
13. Safadi, F.F., et al., Bone structure, development and bone biology, in *Bone pathology*. 2009, Springer. p. 1-50.
14. Martini, F., *Anatomy and Physiology'2007 Ed.* 2006: Rex Bookstore, Inc.
15. Buckwalter, J. and H. Mankin, Instructional course lectures, the American Academy of orthopaedic surgeons-articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *JBJS*, 1997. **79**(4): p. 612-32.
16. Florencio-Silva, R., et al., Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015. **2015**.

17. Marks Jr, S.C. and S.N. Popoff, Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 1988. **183**(1): p. 1-44.
18. Dirckx, N., M. Van Hul, and C. Maes, Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2013. **99**(3): p. 170-191.
19. Hekimsoy, Z., Osteocytes-The Known and Unknown Osteositler-Bilinenler ve Bilinmeyenler.
20. Downey, P.A. and M.I. Siegel, Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical therapy*, 2006. **86**(1): p. 77-91.
21. Dempster, D.W. and L.G. Raisz, Bone physiology: bone cells, modeling, and remodeling, in *Nutrition and Bone Health*. 2015, Springer. p. 37-56.
22. Hill, P., Bone remodelling. *British journal of orthodontics*, 1998. **25**(2): p. 101-107.
23. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(33): p. 25103-25108.
24. Kini, U. and B. Nandeesh, Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism, in *Radionuclide and hybrid bone imaging*. 2012, Springer. p. 29-57.
25. Little, N., B. Rogers, and M. Flannery, Bone formation, remodelling and healing. *Surgery (Oxford)*, 2011. **29**(4): p. 141-145.
26. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. Sunderland, MA.
27. Mackie, E., L. Tatarczuch, and M. Mirams, The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *The Journal of endocrinology*, 2011. **211**(2): p. 109-121.
28. Ortega, N., D.J. Behonick, and Z. Werb, Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology*, 2004. **14**(2): p. 86-93.
29. Bilezikian, J.P., L.G. Raisz, and T.J. Martin, *Principles of bone biology*. 2008: Academic press.
30. Ghiasi, M.S., et al., Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone reports*, 2017. **6**: p. 87-100.
31. Remedios, A., Bone and bone healing. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 1999. **29**(5): p. 1029-1044.
32. Oryan, A., S. Monazzah, and A. Bigham-Sadegh, Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences*, 2015. **28**(1): p. 57-71.
33. Claes, L., S. Recknagel, and A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012. **8**(3): p. 133.
34. Pina, S., J.M. Oliveira, and R.L. Reis, Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Advanced Materials*, 2015. **27**(7): p. 1143-1169.

35. LogithKumar, R., et al., A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, 2016. **151**: p. 172-188.
36. Levi, B., B. Péault, and A.W. James, Bone tissue engineering and regeneration. *BioMed research international*, 2014. **2014**.
37. Polo-Corrales, L., M. Latorre-Esteves, and J.E. Ramirez-Vick, Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2014. **14**(1): p. 15-56.
38. Hench, L.L. and J.M. Polak, Third-generation biomedical materials. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1014-1017.
39. Baroli, B., Hydrogels for tissue engineering and delivery of tissue-inducing substances. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2007. **96**(9): p. 2197-2223.
40. Fedorovich, N.E., et al., Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue engineering*, 2007. **13**(8): p. 1905-1925.
41. Jabbari, E., Bioconjugation of hydrogels for tissue engineering. *Current opinion in biotechnology*, 2011. **22**(5): p. 655-660.
42. Zhao, W., et al., Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013. **88**(3): p. 327-339.
43. Drury, J.L. and D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
44. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 2001. **101**(7): p. 1869-1880.
45. Sharma, A., et al., Self-Assembling Peptides-Notion and Medical Applications: A.
46. Hansen, P.R. and A. Oddo, Fmoc solid-phase peptide synthesis, in *Peptide Antibodies*. 2015, Springer. p. 33-50.
47. Loo, Y., et al., Self-assembled proteins and peptides as scaffolds for tissue regeneration. *Advanced healthcare materials*, 2015. **4**(16): p. 2557-2586.
48. Li, Y. and Y. Cao, The physical chemistry for the self-assembly of peptide hydrogels. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2018. **36**(3): p. 366-378.
49. Li, J., et al., Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications. *Soft matter*, 2019. **15**(8): p. 1704-1715.
50. Yanlian, Y., et al., Designer self-assembling peptide nanomaterials. *Nano Today*, 2009. **4**(2): p. 193-210.
51. Habibi, N., et al., Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. *Nano today*, 2016. **11**(1): p. 41-60.
52. Lu, J. and X. Wang, Biomimetic Self-Assembling Peptide Hydrogels for Tissue Engineering Applications, in *Biomimetic Medical Materials*. 2018, Springer. p. 297-312.

53. Petkau-Milroy, K. and L. Brunsveld, Supramolecular chemical biology; bioactive synthetic self-assemblies. *Organic & biomolecular chemistry*, 2013. **11**(2): p. 219-232.
54. Kisiday, J., et al., Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(15): p. 9996-10001.
55. Chen, J. and X. Zou, Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications. *Bioactive materials*, 2019. **4**: p. 120-131.
56. Sarvestani, A.S., X. He, and E. Jabbari, Osteonectin-derived peptide increases the modulus of a bone-mimetic nanocomposite. *European Biophysics Journal*, 2008. **37**(2): p. 229-234.
57. Karaman, O., et al., Synergistic effect of cold plasma treatment and RGD peptide coating on cell proliferation over titanium surfaces. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 2018. **15**(1): p. 13-24.
58. Zhang, H., L. Zhou, and W. Zhang, Control of scaffold degradation in tissue engineering: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2014. **20**(5): p. 492-502.
59. Akalp, U., S.J. Bryant, and F.J. Vernerey, Tuning tissue growth with scaffold degradation in enzyme-sensitive hydrogels: a mathematical model. *Soft matter*, 2016. **12**(36): p. 7505-7520.
60. Barati, D., et al., Time dependence of material properties of polyethylene glycol hydrogels chain extended with short hydroxy acid segments. *Polymer*, 2014. **55**(16): p. 3894-3904.
61. Li, R., et al., Self-assembled N-cadherin mimetic peptide hydrogels promote the chondrogenesis of mesenchymal stem cells through inhibition of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Biomaterials*, 2017. **145**: p. 33-43.
62. Liu, J., et al., Functionalized self-assembling peptide improves INS-1  $\beta$ -cell function and proliferation via the integrin/FAK/ERK/cyclin pathway. *International journal of nanomedicine*, 2015. **10**: p. 3519.
63. O'leary, L.E., et al., Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. *Nature chemistry*, 2011. **3**(10): p. 821.
64. Gulseren, G., et al., Alkaline phosphatase-mimicking peptide nanofibers for osteogenic differentiation. *Biomacromolecules*, 2015. **16**(7): p. 2198-2208.
65. Ozeki, M., et al., Differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a self-assembling peptide hydrogel: in vitro and in vivo studies. *Journal of biomaterials applications*, 2011. **25**(7): p. 663-684.
66. Wang, X.-m., Q. Lin, and A. Horii, Screening of functionalized self-assembling peptide nanofiber scaffolds with angiogenic activity for endothelial cell growth. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2011. **21**(2): p. 111-116.

67. Alakpa, E.V., et al., Tunable supramolecular hydrogels for selection of lineage-guiding metabolites in stem cell cultures. *Chem*, 2016. **1**(2): p. 298-319.
68. Jayawarna, V., et al., Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl–dipeptides. *Advanced Materials*, 2006. **18**(5): p. 611-614.
69. Miller, A., Peptide based hydrogels in the study of mesenchymal stem cells for the purposes of regenerative medicine. 2015, University of Glasgow.
70. Karaman, O., et al., Effect of surface modification of nanofibres with glutamic acid peptide on calcium phosphate nucleation and osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2016. **10**(2): p. E132-E146.
71. Pulido, D., S.-A. Hussain, and E. Hohenester, Crystal structure of the heterotrimeric integrin-binding region of laminin-111. *Structure*, 2017. **25**(3): p. 530-535.
72. Onak, G., et al., Aspartic and Glutamic Acid Templated Peptides Conjugation on Plasma Modified Nanofibers for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study. *Scientific reports*, 2018. **8**(1): p. 17620.
73. Naito, H., et al., The effect of mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation on the mechanical properties of engineered bone-like tissue. *Tissue Engineering Part A*, 2011. **17**(17-18): p. 2321-2329.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı : Oğuzhan  
Soy Adı : GÖKMEN  
Doğum Tarihi : 25.03.1994  
E-posta : [gokmennoguzhann@gmail.com](mailto:gokmennoguzhann@gmail.com)

Telefon (GSM): 0 (541) 344 24 19

Sürücü Belgesi: B

## Eğitim

**İlköğretim:** Cumhuriyet İlköğretim Okulu / Kırşehir (2008)

**Lise:** Burdur Bucak Mehmet Cadıl Anadolu Öğretmen Lisesi (2012)

**Lisans:** Namık Kemal Üniversitesi / Çorlu Mühendislik Fakültesi/ Biyomedikal Mühendisliği Bölümü (2017)

**Yüksek Lisans:** İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyomedikal Teknolojileri Ana Bilim Dalı (2019)

## Yetenekler

- Microsoft Office
- Python
- LabView
- Proteus
- MATLAB

## Kişisel İlgi Alanları Ve Başarılar

### *Kişisel İlgi Alanları:*

- Tenis
- Futbol
- Gitar
- Bisiklet

## Stajlar

- Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi (13.07.2015-07.08.2015)

- KORDON TIP SAĞLIK ARAÇ VE GEREÇLERİ İTHALAT SAN.VE TİC.LTD.ŞTİ. (25.07.2016-03.09.2016)

### **Projeler**

- Tıbbi Malzemelerin Sterilizasyonunda Kullanım Potansiyeline Sahip Yeni Tip Polimer Jel Dozimetrelerin Üretimi (**Tübitak 2209A destekli**).
- Dental implantların osseointegrasyon süresinin hızlandırılması amaçlı çok işlevli kendiliğinden yapılanan peptithidrojel geliştirilmesi ve etkinliğinin in vitro ve in vivo değerlendirilmesi (**Tam zamanlı yüksek lisans bursiyeri**)

### **Yayınlar**

- Günnur Onak, Oğuzhan Gökmen, Ozan Karaman “Self-Assembled Peptide Hydrogel for Accelerating the Osseointegration Period of Dental Implants” (2019 TERMIS- EU – Rodos/Yunanistan)
- Günnur ONAK, Belgin YURTSEVEN, Oğuzhan GÖKMEN, Ozan KARAMAN “Comparison the Effect of RGD Peptide Conjugation on Titanium Discs with Different Methods on Cell Adhesion and Proliferation” (TIPTEKNO 2018-- Magosa,/KKTC)