

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIRALI NANOÇUBUKLARLA BEZELİ KOLAJEN:JELATİN FİMLERİN
OSTEOBLAST DAVRANIŞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar ALPASLAN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

NİSAN 2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığımı onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 161711028 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Pınar ALPASLAN** 'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**SIRALI NANOÇUBUKLARLA BEZELİ KOLAJEN:JELATİN FİMLERİN OSTEOLAST DAVRANIŞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**" başlıklı tezi **04.04.2018** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN**
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof.Dr. Osman EROĞUL (Başkan)**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Doç. Dr. Lokman UZUN
Hacettepe Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Pınar ALPASLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIRALI NANOÇUBUKLARLA BEZELİ KOLAJEN:JELATİN FİMLERİN OSTEOBLAST DAVRANIŞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar ALPASLAN

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

Tarih: Nisan 2018

Yapılan etiyolojik çalışmalarda, diş implantlarının vücut tarafından ameliyat komplikasyonları, enfeksiyon, sigara kullanımı, ileri yaş ve aşırı yüklenme gibi nedenlerle reddedilme sıklığının dünya genelinde %10-20 arasında değiştiği belirtilmektedir. Bu yüksek reddedilme oranlarının altındaki temel neden maksilla ve mandibula ile implantın optimum seviyede bütünleşememesidir. Bu durumun oluşmasını engellemek için kullanılabilir yöntemlerden birisi de implant yüzeyinin doğal dokuya benzerliğinin sağlanmasıdır. Dişin periodontal ligament yapısında bulunan Sharpey fiberleri incelendiğinde bu yapıların alveolar kemiğe dik olarak uzandığı ve kemik ile diş arasındaki bağlantıyı sağladığı tespit edilmiştir.

Tezin ilk aşamasında Sharpey fiberlerini biyomimetik olarak taklit etmek için anodize alüminyum oksit (AAO) membranlar kullanılmıştır. İki aşamalı anodizasyon yöntemi ile üretilen ve kalıp olarak kullanılan AAO membranlardan, uygun konsantrasyon ve viskozitede kolajen:jelatin karışımından oluşan sıralı nanoçubuklarla bezeli yüzeyler elde edilmiştir. Kontrol grubu olarak düz silikon yongadan elde edilen ve nano yapıya sahip olmayan filmler ile nanoçubuk yapısına

sahip filmler, stabiliteleri ve mekanik özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Nanoçubuklarla bezeli filmlerin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yapılmıştır.

Elde edilen kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler üzerinde SAOS-2 hücre hattının tutunum, çoğalma ve mineralizasyon davranışı incelenmiştir ve TCP yüzey ile karşılaştırma yapılmıştır. Hücreler üzerindeki kalsiyum ve fosfatın kantitatif analizi için EDX yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda nanoçubuklarla bezeli filmler üzerinde hücre tutunumu yoksa nano yapının en fazla 24 saat; hücre tutunumu varsa en az 21 gün korunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, nanoçubuklarla bezeli filmlerin düz yapıdaki filmlere ve TCP yüzeye göre daha iyi tutunup çoğaldığı fakat daha az mineralize olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anodize alümina membran, Kolajen, Jelatin, Osteoblast, Kemik doku mühendisliği

ABSTRACT

Master of Science

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ORDERED COLLAGEN:GELATIN

NANOPILLAR FILMS ON OSTEOBLAST BEHAVIOUR

Pınar ALPASLAN

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Fatih BÜYÜKSERİN

Date: April 2018

The rejection rate of dental implants by human body for reasons such as surgery complications, infection, smoking, advanced age and overloading has changed by 10-20% around the world according to the etiological studies. The main reason behind these high reject rates is that the maxilla & mandible cannot integrate with the implant at an optimum level. One of the methods that can be used to prevent rejection is providing similarity of the implant surface to the natural tissue. When the Sharpey fibers in the periodontal ligament of the tooth were examined, it was found that these structures extended perpendicular to the alveolar bone and supplied the connection between the bone and the tooth.

The first part of this thesis demonstrates the utilization of AAO membranes to simulate Sharpey fibers biomimetically. Ordered nanopillared surfaces with appropriate concentration and viscosity collagen:gelatin mixture were obtained from the AAO membranes used as a mold and manufactured by the two-step anodization method. Flat films handled as a control group were acquired from smooth silicon

wafers and they were compared with nanopillar films in terms of their stability and mechanical properties. The characterization of nanopillar films was performed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM).

The adhesion, proliferation and mineralization behaviors of the SAOS-2 cell line on the collagen:gelatin nanopillar and flat films were investigated and compared with the TCP surface. The quantitative analysis of calcium and phosphate on cells were characterized by the EDX analysis. As a result of these studies, it was observed that if there is no cell adhesion on the nanopillar films, nano structure can be preserved for up to 24 hours. On the other hand, when there is cell adhesion, nanopillars are kept up for at least 21 days. In addition, it is understood that nanopillar films have better adhesion and proliferation than the flat films and TCP surface, but induce less mineralization.

Keywords: Anodic alumina membrane, Collagen, Gelatin, Osteoblast, Bone tissue engineering



TEŞEKKÜR

Tez alıőmam boyunca benden desteğini esirgemeyen, bana hep guvenen ve yol gosteren sevgili danışman hocam Doç. Dr. Fatih Bykserin'e,

Tez çalıőmamdaki mekanik test olmlerinde yardımcı olan Doç. Dr. Teyfik Demir ve ekibine,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca karőılıksız burs sağladığı için TOBB Ekonomi ve Teknoloji niversitesine,

İhtiyacım olduğunda hep yanımda olan Bykserin Araőtırma Grubu yelerine,

Bu süreçte ve daha öncesinde hep yanımda olan değerli arkadaőlarım Elif Candaő, Mervenaz őahin, Sinan Oflaz, Hamdi Tuna Yener ve Zeynep Mutlu'ya,

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de beni yalnız bırakmayarak sevgisi ve desteğiyle yanımda olan ve iyi ki hayatımda dediğim Onur Mehmet Ertürk'e,

Bu zamana kadar gösterdiğim baőarımın kaynağı olan, beni en iyi şekilde yetiőtiren ve maddi-manevi beni her alanda destekleyen canım anneme ve canım babama, canımdan çok sevdiğim biricik kardeőim Irmak'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR	xv
SEMBOL LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Anodize Alüminyum Oksit (AAO) Membranlar	2
1.2 Kemik Doku Mühendisliği	4
1.3 AAO Membranların Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanımı	5
1.4 Dental İmplantlar ve Dişin Yapısı.....	6
1.5 Amaç	8
2.AAO MEMBRANLARDAN NANOÇUBUKLARLA BEZELİ FİLM ELDESİ	9
2.1 Giriş.....	9
2.2 Deneysel Çalışmalar.....	11
2.2.1 Malzemeler.....	11
2.2.2 Yöntemler.....	11
2.2.2.1 AAO membranların üretimi ve karakterizasyonu.....	11
2.2.2.2 Nanoçubuklarla bezeli olan kolajen filmlerin üretimi ve karakterizasyonu.....	12
2.2.2.3 Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen-jelatin filmlerin üretimi ve karakterizasyonu.....	12
2.2.2.4 Üretilen kolajen-jelatin filmlerin stabilite çalışmaları.....	14
2.2.2.5 Üretilen kolajen-jelatin filmlerin mekanik testi.....	15
2.3 Sonuç ve Tartışmalar.....	16
3. NANOÇUBUKLARLA BEZELİ FİMLERİN DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI	29
3.1 Giriş.....	29
3.2 Deneysel Çalışmalar.....	30
3.2.1 Malzemeler.....	30
3.2.2 Yöntemler.....	30
3.2.2.1 SAOS-2 hücre hattının geliştirilmesi	30
3.2.2.2 SAOS-2 hücre hattının kolajen;jelatin filmler üzerinde inkübasyonu, proliferasyonu, canlılık ve tutunum analizleri.....	31
3.2.2.3 Kolajen;jelatin filmler üzerindeki SAOS-2 hücrelerinde mineralizasyon ve ALP aktivitesinin tayini.....	32
3.3 Sonuç ve Tartışmalar.....	35

4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	55



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Biyolojik moleküllerin ve maddelerin nanometre skalasındaki yeri.....	1
Şekil 1.2 : a) AAO membran üretim düzeneğinin şematik gösterimi, b) İlk anodizasyon sırasında elektrik alan ile oluşan büyüme (başlangıç) noktaları, c) İlk anodizasyon sonucu oluşan düzensiz por gösterimi, d) İkinci anodizasyon sonrasında elde edilen düzenli yapıdaki gözenekler.....	3
Şekil 1.3: Doğal dış-kemik ilişkisi ile implant-kemik ilişkisinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.1: Kolajen proteininin yapısı.....	10
Şekil 2.2 : Kolajen degradasyonunun şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.3: Üretilen AAO membranın a) gözenekleri açılmadan önce, b) gözenekleri açıldıktan sonraki SEM görüntüsü ve c) gözenekleri açıldıktan sonraki AFM görüntüsü.....	16
Şekil 2.4: ODTS a) kaplama öncesi ve b) kaplama sonrası AAO membran üzerindeki su damlasının görüntüsü.....	17
Şekil 2.5: Kolajen, jelatin ve farklı oranlardaki kolajen: jelatin çözeltilerinin toplam konsantrasyona karşı değişen indirgenmiş viskozite grafiği.....	18
Şekil 2.6: AAO membrandan elde edilen a) %0.7 PEGDGE ve b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin yüzeyden kaldırıldıktan sonraki SEM görüntüleri.....	19
Şekil 2.7: a) %0.7 PEGDGE ve b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin 1 saat %0.75 PEGDGE-izopropil alkol çözeltisinde bekletildikten sonraki SEM görüntüleri.....	19
Şekil 2.8: pH ayarlı kolajen:jelatin çözeltilerden elde edilen a) %0.7 ve b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin 3 boyutlu AFM görüntüleri.....	20

Şekil 2.9: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %4 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin SEM görüntüsü.....	20
Şekil 2.10: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %2 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin SEM görüntüsü.....	21
Şekil 2.11: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %2 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin üç boyutlu AFM görüntüsü.....	21
Şekil 2.12: Düz silikon yongadan elde edilen kolajen:jelatin filmin üç boyutlu AFM Görüntüsü.....	22
Şekil 2.13: PEGDGE ile çapraz bağlanan ve çapraz bağlı olmayan kolajen:jelatin filmlerin FT-IR spektroskopisi.....	23
Şekil 2.14: %2 yoğunluğunda %0.3 PEGDGE içeren kolajen:jelatin filmlerin a) 3 saat ve b) 24 saat DMEM içerisinde bekletildikten sonraki SEM görüntüsü.....	23
Şekil 2.15: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen-jelatin filmlerin zamana göre bozunma grafiği.....	25
Şekil 2.16: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen:jelatin filmlerin zamana göre şişme oranını gösteren grafik.....	26
Şekil 2.17: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen:jelatin filmlerin mekanik test sonucu elde edilen yük-uzama eğrileri.....	27
Şekil 3.1: SAOS-2 hücrelerinin 7 günlük süreç içerisindeki proliferasyon eğrisi.....	34
Şekil 3.2: Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler ile TCP yüzeydeki hücre canlılığının karşılaştırılması.....	35
Şekil 3.3: a) Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film, b) Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film ve c) TCP yüzey üzerindeki SAOS-2 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 3.4: SAOS-2 hücrelerinin farklı yüzeylerdeki mm ² başına düşen hücre sayısını gösteren grafik.....	37
Şekil 3.5: Alizarin kırmızısı ile boyanan kalsiyum nodüllerinin a) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film, b) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film ve c) TCP yüzey üzerindeki optik mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 3.6: Alizarin kırmızısı boyaması sonra optik okumada elde edilen absorbans değerleri.....	38

Şekil 3.7: Mineralizasyon çalışmasından sonra a) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film, b) nanoçubuklarla bezeli filmin EDX analizi, c) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film, d) nanoçubuklarla bezeli olmayan filmin EDX analizi, e) TCP yüzey üzerindeki hücrelerin SEM görüntüsü, f) TCP yüzeyin EDX analizi.....	40
Şekil 3.8: 21 gün mineralizasyon çalışması sonrası nano topografinin SEM görüntüsü.....	42
Şekil 3.9: Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler ile TCP yüzeydeki ALP aktivitesinin günlere göre dağılımı.....	43



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Kolajen:jelatin filmlerin yüzey pürüzlülük değerleri.....	22
Çizelge 2.2: Nanoçubuklarla bezeli olan kolajen-jelatin filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları ile 1., 3., 7., ve 10. günlerdeki kuru ağırlıkları.....	24
Çizelge 2.3: Nanoçubuklarla bezeli olmayan kolajen-jelatin filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları ile 1., 3., 7., ve 10. günlerdeki kuru ağırlıkları.....	24
Çizelge 2.4: Nanoçubuklarla bezeli kolajen:jelatin filmlerin zamana göre ortalama yüzdece şişme oranları.....	25
Çizelge 2.5: Nanoçubuklarla bezeli olmayan kolajen:jelatin filmlerin zamana göre ortalama yüzdece şişme oranları.....	26
Çizelge 2.6: Kolajen:jelatin filmlerin mekanik dayanımları.....	27
Çizelge 3.1: EDX analizine göre kolajen:jelatin filmler ve TCP yüzey üzerinde bulunan ortalama yüzdece element miktarı.....	40

KISALTMALAR

AAO	: Anodize Alüminyum Oksit
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope)
ALP	: Alkalın fosfataz
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BCA	: Bisinkoninik asit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM-F12	: 1:1 Dulbecco's modified Eagle medium & Ham's F-12 medium
EDC	: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDX	: Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre
MES	: 2-(N-morpholin)ethan sülfonik acid
NHS	: N-hidroksisüksinimid
ODTS	: Oktadesiltrimethoksisilan
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEGDGE	: Polietilenglikol diglisidileter
SAOS-2	: Sarkoma osteojenik
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electrone Microscope)
TCP	: Tissue Culture Polystyrene
WST-1	: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolyum tuzu

SEMBOL LİSTESİ

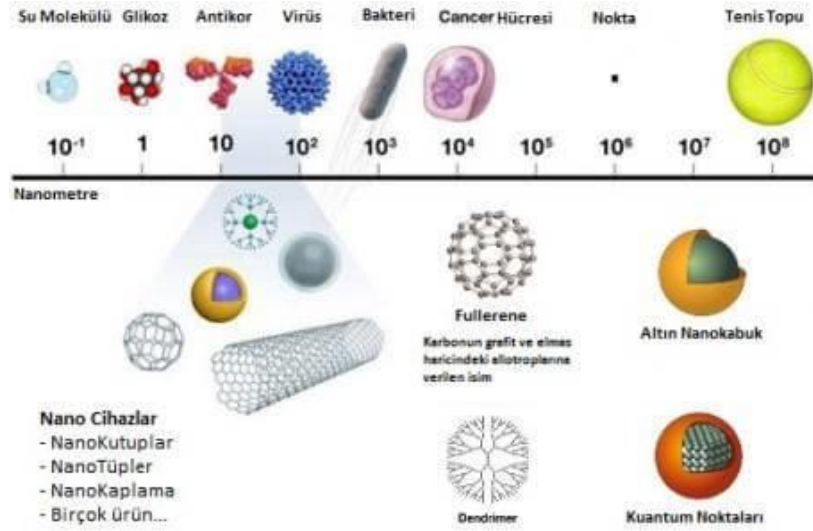
Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
g	Gram
mL	Mililitre
C	Konsantrasyon
t	Zaman
n_{spesifik}	Spesifik viskozite
mM	Milimolar
Cu	Bakır
N	Newton
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Kalsiyum fosfat

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, yeni özellik ve işlevlere sahip malzemeleri oluşturmak için nano ölçekte maddenin anlaşılması, kontrolü ve yeniden yapılandırılması olarak tanımlanmaktadır [1]. Nano ölçek ise genellikle atomik boyuttan 100 nm'ye kadar olan aralığı kapsamaktadır (Şekil 1.1). Nanoteknoloji ayrıca nanomalzemelerin ve nanoyapıların fiziksel özelliklerini araştırmaktadır.

Nanoteknolojinin alt bölümlerinden biri olan nanotıp, nanomalzemelerin tıp alanına dahil edilmesi olarak tanımlanmaktadır ve kimya, biyoloji, tıp, mühendislik ve malzeme bilimi alanlarının kesişim noktasında bulunmaktadır. Enfekte hücreler veya dokuların tedavi edilmesi için vücuda yerleştirilebilir tıbbi cihazların geliştirilmesinde de nanotıptan yararlanılmaktadır [2].



Şekil 1.1: Biyolojik moleküllerin ve maddelerin nanometre skalasındaki yeri [3].

Nanomalzemeler, nanotıpta özellikle biyomedikal teşhis, ilaç, protez ve implant alanlarında yaygın olarak uygulanmaktadır. Mevcut haldeki implantların yüzey özelliklerinin geliştirilmesinde, ilaç taşınımında enfeksiyonu azaltmada, kronik inflamasyonların önlenmesinde ve doku gelişiminin artırılmasında rol oynamaktadır. Nanometre veya mikron altı boyutundaki yüzey yapıları boyut, geometri ve içerik bakımından doğal dokuya olan benzerlikleriyle hücrel yanıtı hızlandırmaktadır. Bu kavram sayesinde nanotıpın birçok uygulama alanı rejeneratif tıp içerisinde mevcuttur. Nanopartikül ve doku mühendisliğinde kullanılan hücre iskelelerinin üretimi, dokuya özgü biyolojik cevap almak için geliştirilen nanoörüntüleme yöntemleri bu alanda bulunmaktadır. Özellikle, karbon nanotüpler, metal nanoparçacıklar (Ti, CoCr, Ti6Al4V, vb.), nano yapıya sahip seramikler (hidroksiapatit (HA), titanya, alüminyum oksit, çinko oksit, vb.) ve kompozit malzemeler eşsiz yüzey enerjileri sayesinde adsorpsiyonu ve hücre tutunumunu sağlayan proteinlerin (fibronektin, vitronektin) biyoaktivitesini düzenleyerek doku rejenerasyonunu artırmaktadır. Bilindiği gibi yüzey enerjisi hücre etkileşimleri için gerekli olan protein adsorpsiyonu ile yakından ilişkilidir ve implantlar üzerinde nanoyapılı yüzey özellikleri oluşturularak kolayca kontrol edilebilir [4].

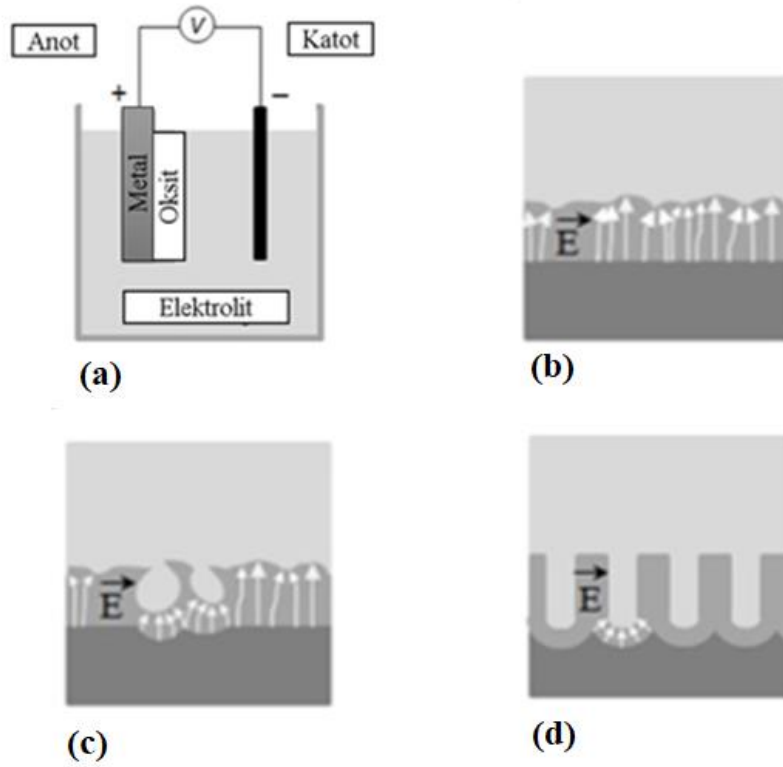
1.1 Anodize Alüminyum Oksit (AAO) Membranlar

Alüminyum metali Dünya kabuğunun yaklaşık %8'ini oluşturur; fakat oksijenle olan reaktivitesinden dolayı diğer malzemelerle birlikte bulunur. Boksit cevheri dünyada başta gelen alüminyum kaynağıdır. Karl Bayer, alüminyum oksiti (Al_2O_3) boksit cevherinden saflaştırmayı başarmıştır ve alüminyum oksit alüminyumun bilinen tek stabil oksit formudur [5].

Anodize alüminyum oksit membranlar anodizasyon yöntemi ile üretilen yaygın olarak kullanılan membranlardan bir tanesidir ve yüksek saflıktaki alüminyumun elektrokimyasal olarak temizlendikten sonra belirli bir voltaj ve sıcaklık altında anodize edilmesi sonucu elde edilir. Sıcaklık, anodizasyon süresi, voltaj, akım, elektrolit derişimi ve konsantrasyonu gibi parametrelerin değiştirilmesi ile bu membranlar üzerinde düzenli ve kontrol edilebilir por yapıları oluşturulabilir. Bu kontrol edilebilir por morfolojileri arasında gözenek çapı ve geometrisi, gözenekler arası mesafe ve membran kalınlığı gelmektedir [5].

Yüksek ve düzgün nano boyutta gözenekli AAO membranların üretimi için genellikle Masuda ve Fakuda tarafından geliştirilen iki aşamalı anodizasyon yöntemi kullanılmaktadır [6]. Anodizasyonun ilk aşamasında yüzeydeki elektrik alan normal bir dağılım göstermediğinden homojen olmayan ve düzensiz por yapıları meydana gelmektedir [7]. Anodizasyonun ileri

aşamasında elektrik alan dağılımı dengelenmekte ve düzensiz yüzeyin altında düzgün sıralı gözenekler büyümeye başlamaktadır. Homojen olmayan por yapısını ortadan kaldırmak için AAO membran asit çözeltisi içinde çözülür ve oksit tabaka ortadan kaldırılır, böylelikle ilk anodizasyon sırasında ortaya çıkan büyüme veya başlangıç noktaları ortaya çıkarılır. İlk anodizasyonla aynı koşullar altında gerçekleştirilen ikinci anodizasyon ile büyüme noktalarından itibaren düzenli ve homojen gözenekli yapı elde edilmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: (a) AAO membran üretim düzenine ilişkin şematik gösterimi, (b) İlk anodizasyon sırasında elektrik alan ile oluşan büyüme (başlangıç) noktaları, (c) İlk anodizasyon sonucu oluşan düzensiz por yapısının gösterimi, (d) İkinci anodizasyon sonrasında elde edilen düzenli yapıdaki gözenekler [7].

AAO membranlar aynı zamanda kendiliğinden organize olan, yüksek düzenli yapıya sahip, saydam, yalıtkan, kimyasal olarak stabil, biyoetkisiz ve biyoyumlu nanomalzemelerdir [8]. Bu özellikleri sayesinde AAO membranlar biyoteknoloji ve

tıp alanında biyofiltrasyondan biosensöre [9,10], implant kaplamadan ilaç taşınım sistemlerine ve doku mühendisliği için kullanılan hücre iskelelerine kadar pek çok alanda uygulamaya sahiptir [11-13]. AAO nanogözenekli membranlar tek başına kullanılmalarının yanı sıra altın ve platinyum nanoçubuklar gibi biyoyumlu nano yapılar için de kalıp olarak kullanılmaktadır [14,15].

1.2 Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, doku fonksiyonlarının işlevini devam ettirmek, onarmak, korumak, iyileştirmek veya dokunun yerini almak için biyolojik malzemelerin geliştirilmesinde mühendislik ve doğa bilimlerini kullanan disiplinler arası ve çok disiplinli bir alandır [16,17].

Doku mühendisliğinin ardındaki genel kavram vücudun mühendislik prensipleriyle bağlantılı olarak doku hasarına karşı verdiği doğal biyolojik tepkisini kullanmaktır. Hücre sinyalizasyonunun ve devamındaki fonksiyonlarının doku mühendisliğindeki rolü anlaşıldıkça çok işlevli biyoaktif iskeleler geliştirilmektedir. İdeal bir sentetik hücre iskelesi fizyokimyasal çevreyi biyomimetik olarak taklit etmeli, arzu edilen ve istenmeyen fizyolojik tepkileri de aktif olarak teşvik etmeli veya önlemelidir [18,19].

Kemik doku mühendisliği alanı yaklaşık 30 yıl önce başlamıştır ve yıllar içerisinde artan çalışmalarla beraber çok büyük gelişme sağlamıştır. Travma ya da kemik hastalıklarına bağlı olarak meydana gelen kemik kayıpları, bazı durumlarda vücut tarafından iyileştirilememekte ve hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu alan, klinik olarak kullanılan mevcut tedavilerin (sınırlı etkinlik, immün reddi ve patojen transferi) daha önce açıklanan sorunları ortadan kaldıracak alternatif tedavi seçeneklerine odaklanmaktadır. Kemik yapısı, kemik mekaniği ve doku formasyonunun anlaşılmasıyla yeni fonksiyonel kemik doku oluşumunu tetiklemeyi amaçlamaktadır [20].

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan iskele/biyomalzeme örnekleri birkaç önemli ortak özellikte birleşmektedir:

- Biyoyumlu yapısıyla doğal kemik ekstraselüler matriks ortamını taklit etmeli,
- Kemik doku matrisinin oluşumu için osteojenik hücreler olmalı,

- Hücreleri fenotipik olarak istenen tipte yönlendirmeye yardımcı morfojenik sinyaller bulundurmalıdır.

İmplantasyon sonrası, hücre iskelesi veya biyomalzeme osteojenik ya da vaskülojenik büyüme faktörlerini salarak konakçı dokuyu etkileyebilir. Böylelikle enfekte dokuda vaskülarizasyon ve kemik gelişimi sağlanabilir [20].

1.3 AAO Membranların Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Alüminyum oksit membranların biyomalzeme olarak kullanımı kemik ve diş doku mühendisliği, koroner stent implantları için tedavi edici yöntemlerin geliştirilmesi, sinir doku ve kas doku mühendisliği alanlarında araştırılmıştır [21-23]. Ortopedik protezler ve dental implantlar alüminyum oksit membranların yoğun olarak araştırılan potansiyel klinik uygulamaları arasında yer almaktadır. Ortopedik ve dental implantların başarısı implant ve kemik arasındaki sabitlemenin stabilitesine ve osseointegrasyona bağlıdır. Mevcut olan ortopedik biyomalzeme araştırmalarının amacı kontrollü, yönlendirilmiş ve hızlı iyileşmeyi sağlayan implantlar tasarlamaktır. Hızlı iyileşmeye ek olarak bahsi geçen implantların ara yüzey oluşturması için yeterli derecede biyomekanik özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu özelliklere sahip implant biyomalzemesi tasarlamak için kemik-malzeme arayüz etkileşiminin doğru bir biçimde anlaşılması ve aynı zamanda osseointegrasyonu destekleyici yeni malzemelerin geliştirilmesi gerekmektedir.

İnsan kemiği, makro yapıyı oluşturmak için nano boyuttaki organik ve mineral fazlardan oluşan gözenekli bir seramik yapıdır. Ekstrasellüler kemik matriksinde bulunan proteinlerin kolajen fibriller ile karşılaştırıldığında nano boyutta oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, kemik matriksinin önemli bir bileşeni olan kalsiyum fosfat, bileşimsel ve yapısal olarak nano yapıda bulunmaktadır. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında nano yapılı substratların kullanılması doğal dokudan ilham alındığının göstergesidir. Daha önceki çalışmalarda por çapı 100 nm olan oksitlenmiş seramik malzeme kullanımının kan akışının korunmasında ve kemik içi büyümede uygun olduğu gösterilmiştir, ancak son zamanlarda nano gözenekli AAO ile yapılan çalışmalar AAO'nun daha küçük gözeneklerinin kemik içi büyümeyi sağladığını ortaya çıkarmıştır [24-26].

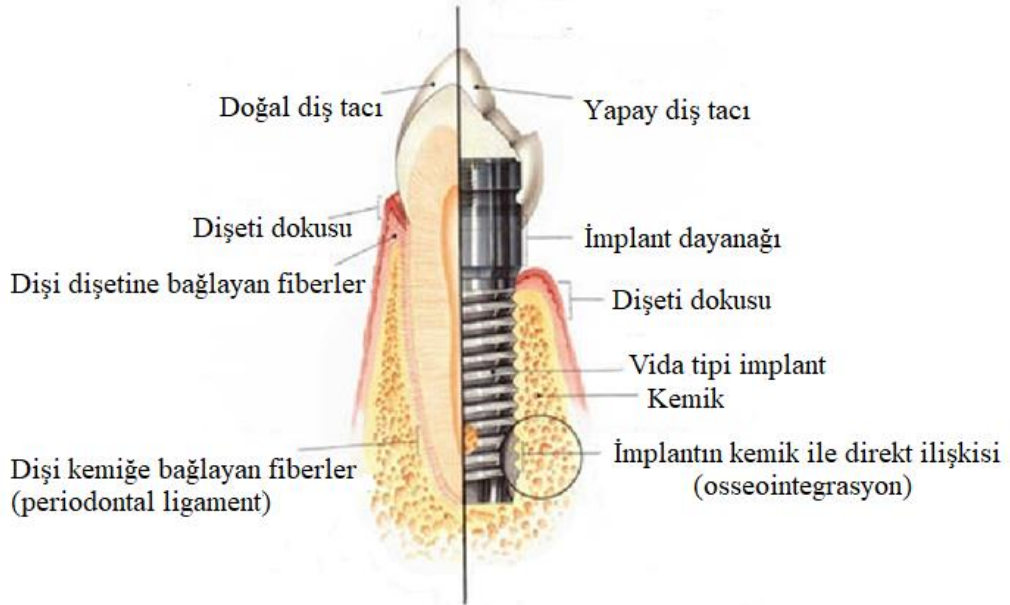
Magnezyum iyonlarının osteoblastik aktiviteyi artırarak kemik gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir [27,28]. Yapılan bir çalışmada geliştirilen magnezyum implantın hızlı degradasyona uğraması magnezyum iyonlarının kontrollü salımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kemik oluşumunu uyarmak için geliştirilen magnezyum implantların yüzeyi degradasyon oranını kontrol edebilmek için biyo-etkisiz, aşınmaya ve korozyona karşı dayanıklı olan AAO ile kaplanmıştır. Kaplama sonucunda magnezyum iyonlarının salımı kontrol edilmiş, korozyona karşı olan direnç ve biyolojik performans hem in-vivo'da hem de in-vitro'da artış göstermiştir [29].

Başka bir çalışmada ise titanyum implantın yüzeyi önce alümiyum metali ile kaplanmış daha sonra da fosforik asit içerisinde anodizasyon işlemi uygulanmıştır. Böylelikle titanyum implant üzerinde nano gözenekli alümina oluşturulmuş ve biyoaktif ajanlar porlara eklenerek implant özellikleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hücrelerin çoğalmasında ve tutunumda artış meydana geldiği ve implantın mekanik özelliklerinin geliştiği gözlemlenmiştir [30].

1.4 Dental İmplantlar ve Dişin Yapısı

Modern diş hekimliği, hastanın konuşma, sağlık, estetik gibi normal fonksiyonlarını karşılamadan yanı sıra stomatognatik sisteme bağlı gelişen yaralanma ya da hastalıkları gidermek ya da en az seviyeye indirmek üzerine kuruludur. Bu amacı gerçekleştirmek üzere ortaya çıkan dental implantlar, yaralanmalara, periodontal hastalıklara ya da başka nedenlere bağlı diş kaybı yaşayan insanlar için en uygun seçenek olarak görülmüştür. Yaşlanmaya bağlı diş kaybı, periodontal hastalıklar, çürüme, kullanılan protezlerin yetersizliği gibi birtakım sebepler yüzünden dünyada ve ülkemizde implant tüketimi her geçen yıl artmaktadır [31]. Metaller, özellikle titanyum ve alaşımları, mekanik özellikleri sayesinde implant uygulamalarında en sık kullanılan malzemelerdendir; fakat aşınmaya bağlı eklem kaybı, strese karşı sınırlı dayanıklılık ve kemik dokusuna olan limitli uyumluluk problemleri implant kullanımında revizyona gidilmesine yol açmıştır. İmplantlarla ilgili en sık karşılaşılan problemlerden birisi de implant olarak yerleştirilen biyomalzeme etrafında yeterli kemik doku oluşamamasıdır [32]. Bu durum kişinin kemik kalitesine, uygulanan ameliyat tekniğine bağlı olabildiği gibi kullanılan implant malzemesinin topografik, mekanik ve kimyasal özelliklerine de bağlıdır [33]. Bu problemleri aşmak ve hızlı bir iyileşme sağlamak için implant ve doku arayüzündeki etkileşimi anlayıp buna göre biyomalzeme geliştirmek büyük önem arz etmektedir.

Dişin yapısında bulunan periodontal ligament (PDL), diş ile alveolar kemiği birbirine bağlayan bir yapıdır (Şekil 1.3). Diğer ligamentlerden farklı olarak üzerinde bağışıklık sistemi hücreleri, kan damarları ve nörolojik bileşenleri taşır. Tüm bunların yanında PDL, üzerinde hem sementum oluşumuna olanak veren sementoblast hücrelerini hem de kemik rejenerasyonunda rol alan osteoblast hücrelerini bulundurur. Ayrıca bölgesel deformasyonun meydana geldiği yerdeki kemik ve sementum hasarlarını tamir eder. Osteoblast ve sementoblast hücrelerine ek olarak kolajen türlerinin salınımından sorumlu, multipotent PDL fibroblast hücreleri de bu ligament üzerinde yer alır.



Şekil 1.3: Doğal diş-kemik ilişkisi ile implant-kemik ilişkisinin şematik gösterimi [34].

Bulunduğu ortama bağlı olarak bu hücre hattı osteoblast, sementoblast, adiposit veya kondrosit hücrelere dönüşebilme yetisine sahiptir. Bu hücre hattı aynı zamanda dokulardaki yaşlı hücrelerin yıkımından da sorumludur [35]. PDL'nin bir kısmı da Sharpey fiberleri adı verilen kemik ve sementum arasında şok emici olarak görev yapan, kemik ve diş birbirine bağlayan özel yapılardan oluşur. Bu fiber ağı kemik ile diş arasında, diş yüzeyine dik ve birbirine genellikle paralel olarak konumlanmıştır. Ayrıca, kolajen bakımından son derece zengin ve düzenli bir yapıya sahiptir [36].

1.5 Amaç

Dental implantların uygulanmasındaki en büyük sorunlardan birisi osseointegrasyonun yeterince sağlanamamasıdır. Bu çalışmadaki amaç AAO membranların kalıp olarak kullanılmasıyla elde edilen nanoçubuk yapıdaki kolajen ve jelatin doğal proteinlerini içeren filmlerin sayesinde periodontal ligament ile alveolar kemik arasındaki arayüzü biyomimetik olarak taklit etmektir. Nanoçubuk yapıdaki filmler sayesinde hücre tutunumunun, çoğalmasının ve mineralizasyonunun artırılması ön görülerek potansiyel bir dental implant yüzey kaplaması geliştirmek amaçlanmaktadır.

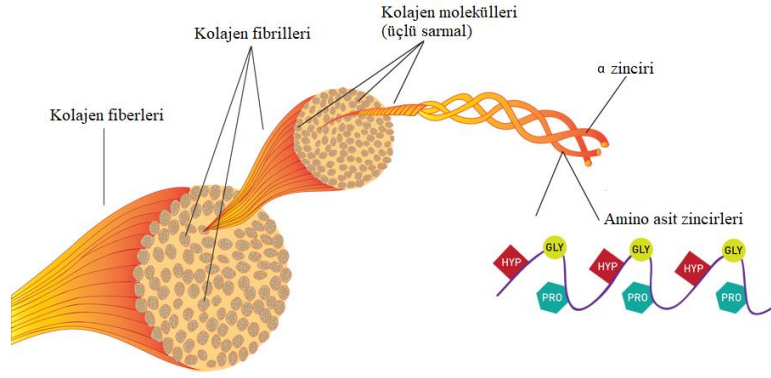


2. AAO MEMBRANLARDAN NANOÇUBUKLARLA BEZELİ FİLM ELDESİ

2.1 Giriş

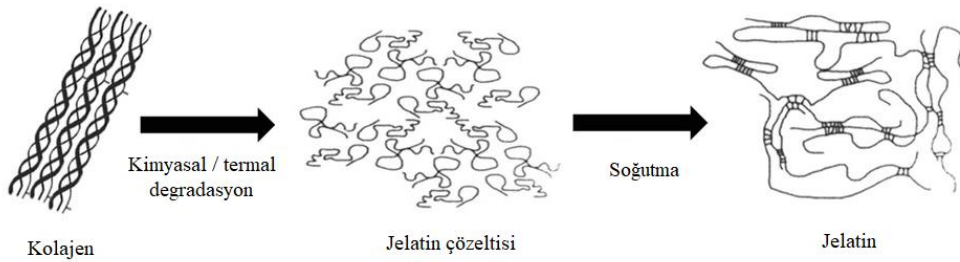
AAO membranlardan elde edilen nanoçubuk yapıdaki silikon, metal, metal oksit, seramik, organik ve polimer filmler biyosensör, doku mühendisliği, medikal tedavi, antibakteriyel malzeme ve DNA analizi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [37]. Grubumuzda yapılan bir çalışmada, polikarbonattan elde edilen nanoçubuk yapılar SERS substratı olarak kullanılmış ve sinyal şiddetini artırmaya yaramıştır [38]. Ayrıca, altından ve gümüşten elde edilen nanoçubuk yapıların elektrokimyasal tabanlı biyosensör olarak kullanımı araştırılmıştır [39]. Başka bir çalışmada ise demir oksit nanopartikülleri poli(n-izopropilakrilamit)'den oluşan nanoçubuk yapılar entegre edilmeye çalışılmış ve bunun sonucunda nanoçubuklara manyetik özellik kazandırılmak istenmiştir [40].

Bu çalışmada elde edilen nanoçubuklar ise doku mühendisliği çatısı altında karşılaşılan sorunlara çözüm olarak geliştirilmek istenmiştir. Çalışmada kullanılan biyoyumlu ve biyobozunur kolajen ve jelatin doğal polimerleri doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır [41,42]. Kolajen memeli vücudundaki proteinlerin %20-30'luk kısmını oluşturduğundan en temel protein olarak görülmektedir (Şekil 2.1). Biyobozunur ve biyoyumlu olmasının yanı sıra hemostatik oluşu, mekanik özellikleri, antijenik olmayan ve toksik olmayan yapısı kolajeni doku mühendisliğinde en çok kullanılan malzemelerden biri yapmıştır [43].



Şekil 2.1: Kolajen proteininin yapısı.

Jelatin, kolajenin kimyasal ya da termal degradasyonu ile elde edilen proteindir (Şekil 2.2). Tıpta kullanımına bakıldığında yara örtüsü, plazma genişletici vb. uygulamalarda görülmektedir. Antijenik olmaması, fazla hemostatik oluşu, kolajene göre çok daha ekonomik oluşu ve mekanik dayanımı jelatini doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir yere koymuştur [44].



Şekil 2.2: Kolajen degradasyonunun şematik gösterimi.

Literatürde kolajen ve jelatinden oluşan ve AAO membrandan elde edilen nanoçubuk yapılar bulunmamaktadır. Dişin yapısındaki periodontal ligamenti oluşturan öğelerden olan kolajen temelli Sharpey fiberleri biyomimetik olarak taklit edebilmek için bu çalışmada kolajen:jelatin içerikli doğal polimer filmler AAO ile nano seviyede biçimlendirilmiştir. Çalışmada tek başına kolajenin kullanılmamasının sebebi sadece kolajenden elde edilen filmlerin çok kırılkan olması ve film formunu tam yansıtamamasıdır. Bu çalışma kapsamında kullanılabilir fonksiyonel filmlerin üretimi amacıyla bulunduğu yapıya mekanik dayanım kazandırdığı bilinen jelatin biyomolekülü de kolajenle birlikte kullanılmıştır.

2.2 Deneysel Çalışmalar

2.2.1 Malzemeler

%99.999 saflıktaki Alüminyum folyo ve NHS Alfa Aesar firmasından; Hekzan, aseton, EDC, H₂SO₄, H₃PO₄, PEGDGE, Riboflavin, DMEM Sigma Aldrich firmasından; okzalik asit ve ODTs Acros Organics firmasından; CrO₃ Prolabo firmasından; İzopropilalkol Merck firmasından; Silikon yonga Micro Chemicals GmbH firmasından; PBS Biological Industries firmasından alınmıştır. Kolajen NeoCell Super Collagen markasından; Jelatin Halavet Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş'den elde edilmiştir. Deiyonize su (18.2 MΩ) Thermo Scientific Smart2pure sisteminden kullanılmıştır.

2.2.2 Yöntemler

2.2.2.1 AAO membranların üretimi ve karakterizasyonu

AAO membranların üretimi için yüksek saflıktaki Alüminyum folyolar (%99.999) 600 grid zımpara kağıdı ile mekanik olarak temizlendikten sonra distile su ve aseton ile soniklenerek yıkanmıştır. Ardından 90°C fırında kurutulan Al folyo ağırlıkça %90 H₃PO₄, %10 H₂SO₄, 20 g/L CrO₃ bileşenlerini içeren derişik asit çözeltisi içerisinde, 15 V potansiyel altında ve 65°C'de Pb katot varlığında elektrokimyasal olarak temizlenmiştir. Temizlenen Al folyolar 0.3M okzalik asit içerisinde ve çelik katot varlığında 5°C'de 50V potansiyel fark altında en az 7 saat boyunca anodize edilmiştir. Bu aşamada meydana gelen düzensiz yapıdaki alüminyum oksit tabaka 0.4M H₃PO₄ ve 0.2M CrO₃ bileşenlerinden oluşan kromik asit çözeltisi içerisinde 75°C'de çözülmüştür. İkinci anodizasyon aşaması ise ilk anodizasyon ile aynı koşullar altında yaklaşık 3 dakika boyunca gerçekleştirilmiş ve 300 nm kalınlığında düzgün ve sıralı gözeneklere sahip AAO membran elde edilmiştir. Son olarak AAO membranların gözenek çapı hacimce %5'lik H₃PO₄ çözeltisi ile 52 dakikada oda sıcaklığında 100 nm'ye genişletilmiştir. Oluşturulacak doğal polimer yapıdaki filmlerin yüzeyden kolaylıkla kaldırılabilmesi için por açma işlemi sonrasında 90°C'de fırında 30 dakika kurutulan membranlar hekzan içerisinde hazırlanan hacimce %0.066 ODTs çözeltisinde gece boyu bekletilmiştir. Kaplama sonrasında

AAO membranlar 90°C’de en az 4 saat boyunca kurutulmuştur. Üretilen AAO membranların karakterizasyonu SEM (ESEM, FEI, Quante 200) ve AFM (ez-AFM, Nanomagnetics Instruments) ile yapılmış, ayrıca temas açısı ölçümü (Attension modülü, KSV Instrument) de gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2 Nanoçubuklarla bezeli olan kolajen filmlerin üretimi ve karakterizasyonu

Üretilen kolajen filmlerin nanotopografisinin besi yeri ortamında ve sulu ortamlarda stabil olması için filmler üretilirken iki farklı çapraz bağlayıcı ile katkılandırılmıştır.

İlk olarak EDC/NHS çapraz bağlayıcı ikilisi kullanılmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan EDC/NHS karışımı MES tamponu (pH 5.5) içinde çözüldükten sonra su içerisinde hazırlanan ağırlıkça %1 kolajen çözeltisi içerisine eklenmiş ve 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında ODTS kaplı AAO membrana dökülmüş ve hem oda sıcaklığında hem de 50°C’de vakum altında çözücünün uzaklaşması için kurumaya bırakılmıştır [45,46]. Farklı bir yöntemde EDC/NHS karışımı su ve su:etanol çözücüleri içerisinde hazırlanarak aynı aşamalardan geçirilmiş ve film oluşturulmaya çalışılmıştır [47].

İkinci olarak kolajen yapıların stabilitesini sağlamak için kullanılan Riboflavin adlı başka bir çapraz bağlayıcı kullanılmıştır [48,49]. Su içerisinde hazırlanan ağırlıkça %1 kolajen çözeltisi farklı hacimlerde riboflavin ile karıştırılıp farklı süreler boyunca 365 nm dalga boyundaki ışığa tabi tutulmuş ve kolajenin çapraz bağlanarak film yapısı oluşturması beklenmiştir.

2.2.2.3 Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen-jelatin filmlerin üretimi ve karakterizasyonu

Kolajen filmlerin farklı çapraz bağlayıcılar varlığında tek başına stabil film olarak elde edilememesi nedeniyle yapılan literatür araştırması sonucunda kolajen:jelatin karışımı filmlerin bu çalışma için uygun mekanik özellikleri sağlayabileceği gözlemlenmiştir. Doğrudan çapraz bağlanmış bir kolajen film yerine peptid sekansları bakımından daha da zengin olan ve bu yüzden tutunum eğiliminin yüksek olacağı kolajen:jelatin karışımından meydana gelen yüzeylerin hücreler tarafından daha çok tercih edileceği düşünülmektedir [50]. Hazırlanan kolajen:jelatin çözeltisinin bileşenlerinin birbiri içerisinde çözünebilirliğinin takip edilmesi için literatürü takiben öncelikle viskozite çalışması (Brookfield Viscometer, DV-I Prime) yapılmıştır [51]. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda ve farklı oranlarda kolajen, jelatin ve kolajen:jelatin karışımları hazırlanmıştır. Kolajenin daha iyi çözünebilmesi amacıyla hacimce %0.1 sulu asetik asit çözeltisi kullanılmıştır.

Viskozite çalışmalarından elde edilen sonuca göre çalışmalara %4 konsantrasyonundaki 1:3 kolajen:jelatin oranı ile devam edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak farklı oranlarda hazırlanan EDC/NHS ve PEGDGE kullanılmıştır. Çapraz bağlanan kolajen:jelatin çözeltileri önce düz yüzey amacıyla kullanılan cam yüzeyler üzerine damlatılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur [52].

AAO membran üzerindeki çalışmalarda %0.3, %0.5, %0.7 ve %0.9 PEGDGE içeren %4'lük 1:3 kolajen:jelatin çözeltileri kullanılmıştır. Öncelikle stabiliteyi korumak için %0.7 ve %0.9 PEGDGE içeren çözeltiler AAO membrana damlatılmış ve gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Elde edilen filmler, stabiliteyi daha da artırmak adına izopropil alkol içerisinde hazırlanan %0.75 konsantrasyonundaki PEGDGE çözeltisinde 1 saat bekletilmiştir.

Literatür incelendiğinde PEGDGE çapraz bağlayıcısının pH arttıkça daha etkin olduğu gözlemlenmiştir [53] ve %0.7 ve %0.9 PEGDGE ile hazırlanan %4'lük 1:3 kolajen:jelatin çözeltisinin pH'ı 6.5 olarak ayarlanmıştır. Damlat kurut yöntemiyle AAO membrandan elde edilen filmler AFM ile karakterize edilmiştir. Başka bir çalışma olarak yine pH 6.5 olacak şekilde %0.3 ve %0.5 PEGDGE içeren çözeltiler hazırlanmış ve AAO membrana damlatılıp gece boyu kurutulmuştur, karakterizasyonları SEM ile yapılmıştır.

Optimizasyon açısından yapılan çalışmalar sonrası nanotopografiyi iyileştirmek için çapraz bağlayıcı konsantrasyonundan farklı olarak 1:3 kolajen:jelatin çözeltisinin yoğunluğu değiştirilmiş ve %4'ten %2'ye düşürülmüştür. %0.3 PEGDGE içeren çözeltiler AAO membrana ve silikon yongaya damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kontrol grubu olarak kullanılan nanoçubuklarla bezeli olmayan filmler ise düz silikon yongadan elde edilmiştir. Düz filmlerin karakterizasyonu AFM ile yapılmıştır. Ayrıca, iki film türünün de yüzey pürüzlülük değerleri karşılaştırılmıştır. Çapraz bağlayıcı katkılanırılan çözeltilerden elde edilen filmlerdeki stabilite fiziksel olarak gözlemlense de çapraz bağlayıcısının varlığı FT-IR ile de ölçülmüştür. FT-IR, organik, polimerik ve bazı durumlarda inorganik maddeleri tanımlamak için kullanılır. FT-IR testi, örnekleri taramak ve bağ özelliklerini gözlemlmek için kızılötesi ışığa dayanır. Bir dizi fonksiyonel grubu algılayabilen ve moleküler yapıdaki değişikliklere hassas olan duyarlı ve hızlı bir karakterizasyon yöntemidir. Her malzemenin IR spektroskopisi kendine özgü olduğundan malzemelerin kimyasal

kompozisyonu ve fiziksel durumu hakkında bilgi vererek malzemelerin ayırt edilmesini sağlar [54]. PEGDGE katkılı ve katkısız kolajen:jelatin filmler düz yüzeyde kurutulup elde edildikten sonra FT-IR (Mattson FTIR 1000) ölçümünde kullanılmıştır.

2.2.2.4 Üretilen kolajen-jelatin filmlerin stabilite çalışmaları

Elde edilen nanoçubuklarla bezeli filmlerin stabilite testleri hücre kültüründe kullanılan bir ortam olan DMEM içerisinde ve insan vücudunu taklit etmek amacı ile PBS (pH 7.4) içerisinde yapılmıştır. Düz filmlerin stabilitesi ise sadece PBS ortamında denenmiştir. Deneyin eşit koşullarda gerçekleştirilebilmesi için nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler aynı boyutta üretilmiştir.

AAO kalıptan elde edilen pH kontrollü %0.3 PEGDGE katkılı nanoçubuklarla bezeli filmler, nanotopografi kalıcılığını incelemek için 3 saat ve 24 saat boyunca DMEM içerisinde bekletilmiş ve sonrasında 40°C'de vakum fırınında 2 saat boyunca kurutulmuştur. Filmlerin ilk halinin ve DMEM içerisinde bekletildikten sonraki hallerinin karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır.

Literatür incelemeleri sonucunda doku mühendisliğinde kullanılan doku iskelelerinin ve filmlerin stabilite çalışmalarının 37°C'de PBS (pH 7.4) içerisinde de yapıldığı gözlemlenmiştir [55,56]. Buna dayanarak nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan %2'lik 1:3 kolajen-jelatin filmlerin stabilite çalışmaları 37°C'de PBS (pH 7.4) içerisinde 10 gün boyunca sürdürülmüş ve çalışma 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları ölçüldükten sonra filmler PBS içerisine daldırılmış ve 1., 3., 7., ve 10. günlerde PBS içerisinden alınıp distile su ile yıkandıktan sonra vakumda 50°C'de kurutulmuştur. Daha sonra son kuru ağırlıkları ölçülmüştür ve Eşitlik 2.1'e göre yüzdece kalan ağırlık hesaplanmıştır.

$$\text{Kalan ağırlık (\%)} = M_s / M_i * 100 \quad (2.1)$$

M_s : Son kuru ağırlık

M_i : Başlangıçtaki kuru ağırlık

Başka bir çalışma olarak nanoçubuklarla bezeli ve düz yapıdaki kolajen-jelatin filmlerin 37°C’de PBS içerisinde su tutma ve şişme oranları incelenmiştir [57,58]. Başlangıçta kuru ağırlıkları ölçülen nanoçubuk yapılı ve düz filmlerin 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat PBS içerisinde bekletildikten sonraki ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. PBS içerisinden alınan filmler filtre kağıdı yardımıyla fazla ıslaklıktan kurtarılıp tartılmıştır.

Ölçümler sonucunda Eşitlik 2.2 ile filmlerin zamana göre yüzde şişme oranını gösteren grafik oluşturulmuştur.

$$\% \text{ Şişme oranı} = [(M_s - M_i) / M_i] * 100 \quad (2.2)$$

M_s : Islak ağırlık

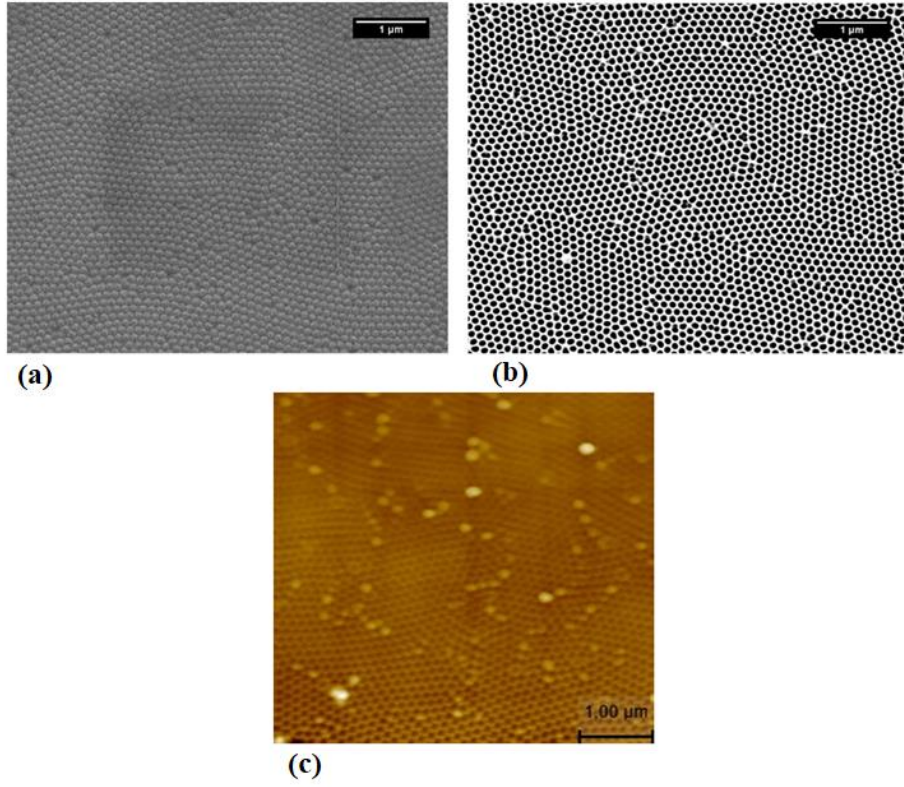
M_i : Başlangıçtaki kuru ağırlık

2.2.2.5 Üretilen kolajen-jelatin filmlerin mekanik testleri

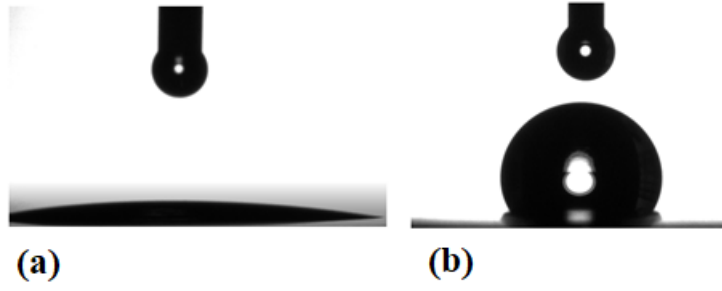
Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen;jelatin filmlere Instron cihazı ile çekme testi uygulanmıştır ve filmlerin mekanik dayanımları karşılaştırılmıştır [59]. Bir malzemenin gerilim altındaki davranışı tek yönlü çekme testi ile incelenir. Tek yönlü çekme testinde, numune bir ucundan sabitlenir ve diğer ucundan sadece uzunluğu doğrultusunda belirli bir yük miktarı uygulanarak gerinir. Yük miktarı kontrollü bir şekilde artırılarak numunede oluşan uzama miktarı ölçülür. Elde edilen kuvvet ve kuvvete bağlı uzama değerlerinden yola çıkılarak gerilim-gerinim (stress-strain) grafiği oluşturulur. Gerilim (stress), birim alana etki eden kuvvet miktarını ifade eder. Malzemenin kesit alanıyla ilişkilidir. Gerinim (strain) ise, malzemedeki toplam uzama miktarının malzemenin ilk uzunluğuna oranlanmasıyla elde edilir [60]. Bu aşamada gerçekleştirilen mekanik testlerde, 8.5 cm boyunda, 4 cm eninde üretilen nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler 0.5 mm/dk hızında çekilerek test edilmiştir.

2.3 Sonuç ve Tartışmalar

Çalışmanın ilk kısmında üretilen yaklaşık 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranın gözenek açma işlemine tabi tutulmadan önceki ve gözenekleri açıldıktan sonraki topografisi SEM ile karakterize edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Üretilen AAO membranın (a) gözenekleri açılmadan önce, b) gözenekleri açıldıktan sonraki SEM görüntüsü ve c) gözenekleri açıldıktan sonraki AFM görüntüsü.



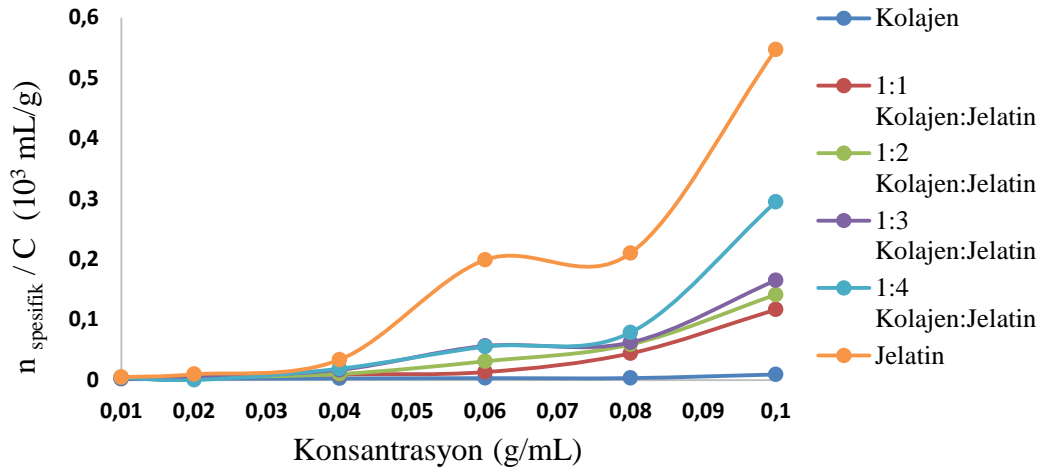
Şekil 2.4: ODTS (a) kaplama öncesi ve (b) kaplama sonrası AAO membran üzerindeki su damlasının görüntüsü.

Nanoçubuklarla bezeli kolajen filmin eldesi için yapılan çalışmalar sonucunda farklı oranlarda hazırlanan EDC/NHS içerikli filmler jel formunda kalmıştır ve hiçbiri yüzeyden kaldırılamamıştır. İkinci yöntemde kolajen çözeltisine eklenen farklı hacimlerdeki foto çapraz bağlayıcı Riboflavin 365 nm dalga boylu ışığa tabi tutulmuştur. Çözeltilerin 1 saatin sonunda jel formuna dönüştüğü gözlemlenmiş fakat film formu oluşmamıştır.

Hem filmlerin mekanik dayanımını hem de filmler üzerindeki hücre tutunumunu artırmak amacıyla hazırlanan kolajen:jelatin karışımındaki uygun oranı belirlemek için yapılan viskozite çalışması sonucunda karışımların viskozitesi saf kolajen ve saf jelatin çözeltilerinin viskozite değerleri arasında çıkmıştır. Çalışma için uygun oran 1:3 kolajen:jelatin olarak belirlenmiştir. 1:3 oranı ile hazırlanan çözeltinin hem saf kolajenle hem de saf jelatinle benzer viskozite özelliğine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.5).

%4'lük 1:3 kolajen:jelatin çözeltisinin farklı oranlardaki EDC/NHS ile çapraz bağlanması sonucunda istenilen yapıda film elde edilememiştir. EDC/NHS oranı arttıkça filmin ortasının kenarlarına göre daha jelimsi yapıda olduğu gözlemlenmiştir. EDC/NHS oranı azaldığında ise fiziksel stabilitenin korunmadığı görülmüştür. Buna karşın PEGDGE çapraz bağlayıcısı ile yapılan çalışmalarda ise fiziksel stabilitenin sağlandığı ve istenilen film formunun elde edildiği gözlemlenmiştir.

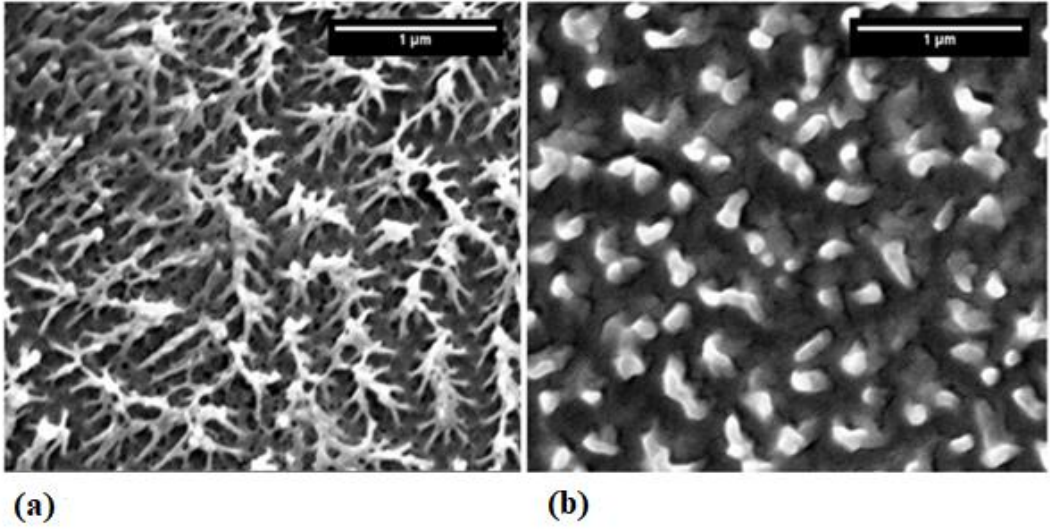
Çalışmalara %0.3, %0.5, %0.7 ve %0.9 PEGDGE içeren %4'lük 1:3 kolajen:jelatin çözeltileriyle devam edilmiştir. %0.7 ve %0.9 PEGDGE içeren filmler %0.75 konsantrasyonundaki PEGDGE-izopropil alkol çözeltilisinde bekletildikten sonra SEM ile karakterize edilmiş ve filmlerin fiziksel stabilitesinin arttığı; fakat AAO membran kalıbını tam olarak yansıtmadığı görülmüştür (Şekil 2.6).



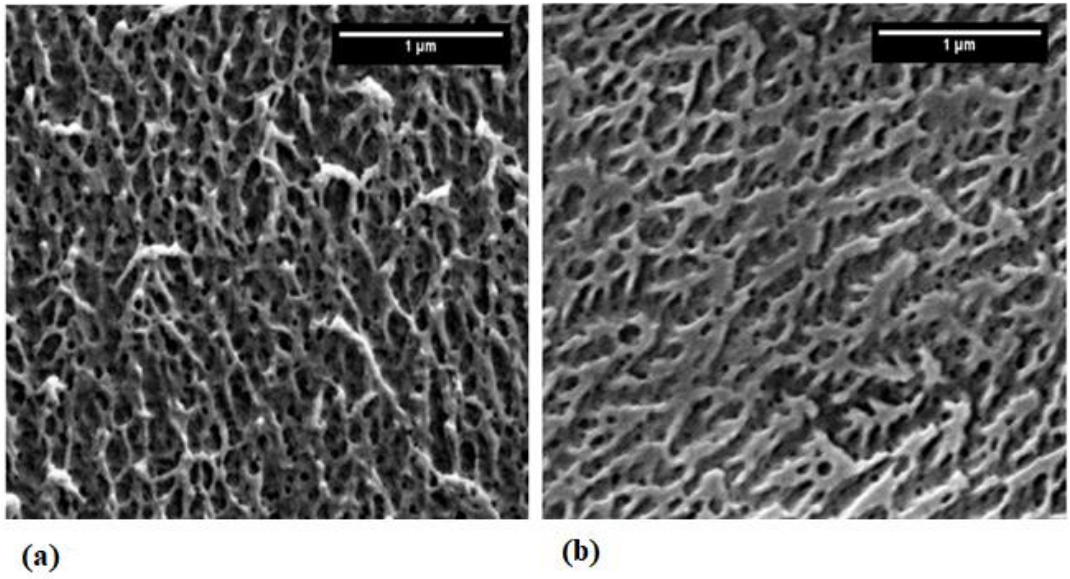
Şekil 2.5: Kolajen, jelatin ve farklı oranlardaki kolajen: jelatin çözeltilerinin toplam konsantrasyona karşı değişen indirgenmiş viskozite grafiği.

Filmleri fazladan çapraz bağlayıcı çözeltilisinde bekletmek serbest haldeki nanoçubukların amin grupları dolayısıyla birbirlerine bağlanmasına sebep olmuştur (Şekil 2.7). Ayrıca bu durumun filmlerin sertleşmesine, kırılkan yapıya yol açmasına ve başta şeffaf olan filmlerin renk değiştirerek beyazlamasına yol açtığı gözlemlenmiştir.

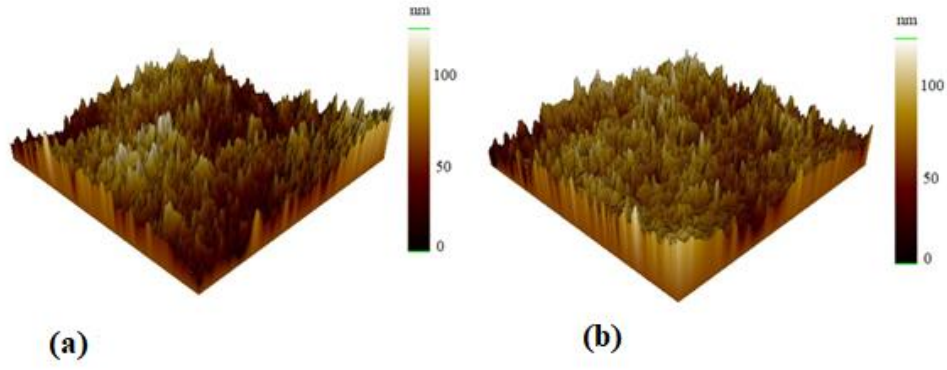
Sonraki aşamada pH'ı 6.5'e ayarlanan ve mekanik özellikleri artırmak için %0.7 ve %0.9 PEGDGE ile hazırlanan %4'lük 1:3 kolajen:jelatin çözeltilerden elde edilen filmlerin topografisi AFM ile incelenmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.6: AAO membrandan elde edilen (a) %0.7 PEGDGE ve (b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin yüzeyden kaldırıldıktan sonraki SEM görüntüleri.

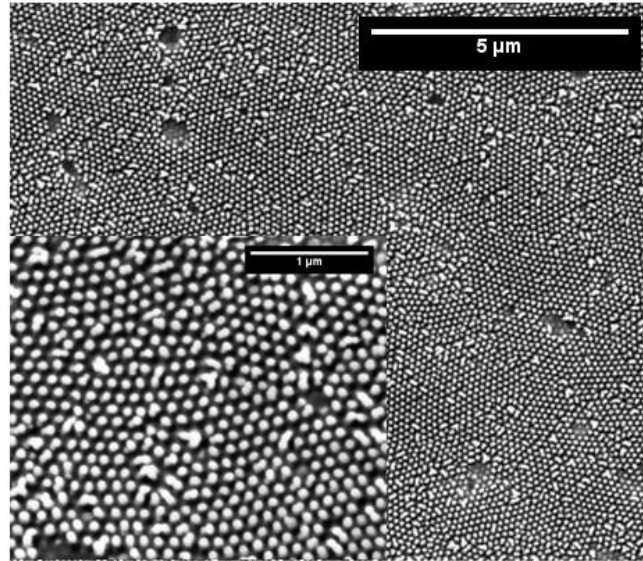


Şekil 2.7: (a) %0.7 PEGDGE ve (b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin 1 saat %0.75 PEGDGE-izopropil alkol çözeltisinde bekletildikten sonraki SEM görüntüleri.



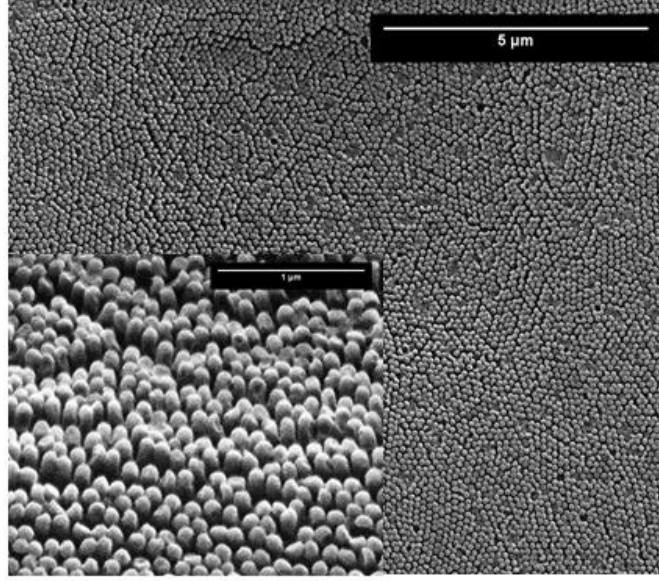
Şekil 2.8: pH ayarlı kolajen:jelatin çözeltilerden elde edilen (a) %0.7 ve (b) %0.9 PEGDGE içeren filmlerin 3 boyutlu AFM görüntüleri.

Elde edilen filmlerin 3 boyutlu AFM karakterizasyonları incelendiğinde nanoçubuklu topografinin filmlerde var olduğu görülmüş, fakat optimizasyon amacıyla tekrar çalışmaları yapıldığında aynı PEGDGE miktarına sahip filmler yüzeyden kaldırılamamıştır ve PEGDGE miktarını artırdıkça filmlerin beyazladığı ve git gide sertleştiği gözlemlenmiştir. %0.5 PEGDGE içeren çözeltilerden elde edilen filmlerin AAO kalıptan kaldırılmasında zorluk yaşanmış ve kurutma koşulları optimize edilememiştir. %0.3 PEGDGE içeren filmler ise yüzeyden kolaylıkla kaldırılmıştır (Şekil 2.9).

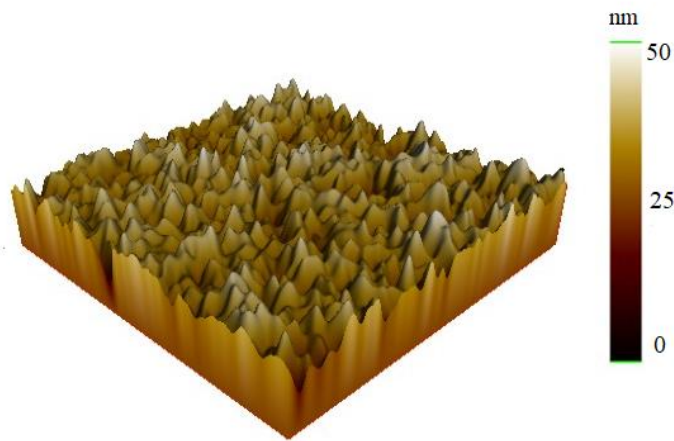


Şekil 2.9: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %4 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin SEM görüntüsü.

SEM görüntüleri incelendiğinde %0.3 PEGDGE içeren filmin AAO membran topografisine sahip olduğu, buna karşılık nanotopografiyi bütünüyle yansıtmadığı gözlemlenmiştir. Viskozite azaltılınca çözeltinin porların derinine indiği, yüzeyde birikmediği görülmüştür. Ayrıca elde edilen filmler daha rahat yüzeyden kaldırılmış ve önceki filmlere göre nanotopografiyi daha iyi yansıttığı SEM (Şekil 2.10) ve AFM (Şekil 2.11) ile teyit edilmiştir.

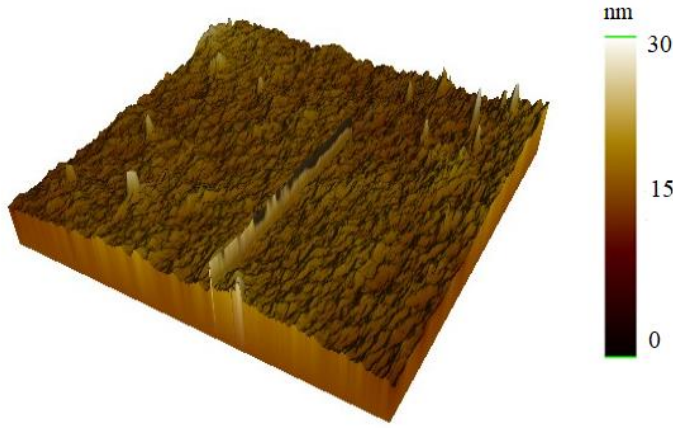


Şekil 2.10: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %2 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin SEM görüntüsü.



Şekil 2.11: pH kontrollü %0.3 PEGDGE içeren %2 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmin üç boyutlu AFM görüntüsü.

Düz silikon yongadan elde edilen kolajen:jelatin filmin AFM karakterizasyonu Şekil 2.12’de görüldüğü gibidir. Filmin üç boyutlu AFM görüntüsü incelendiğinde yüzey pürüzlülüğünün daha düşük olduğu, buna bağlı olarak da yüzeyin daha düz yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu durum yüzey pürüzlülük değerleri ile de desteklenmektedir (Çizelge 2.1).



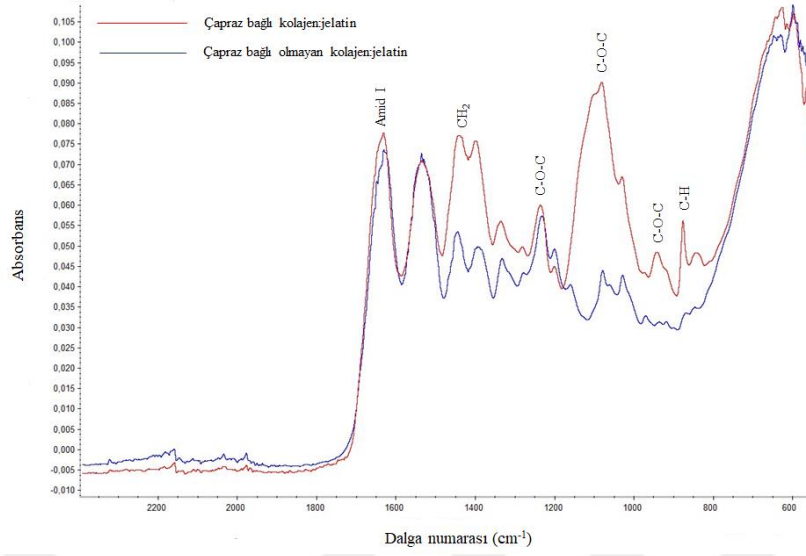
Şekil 2.12: Düz silikon yongadan elde edilen kolajen:jelatin filmin üç boyutlu AFM görüntüsü.

Çizelge 2.1: Kolajen:jelatin filmlerin yüzey pürüzlülük değerleri.

Kolajen:jelatin filmler	Pürüzlülük değeri (μm)
Nanoçubuklarla bezeli film	0.350
Düz film	0.028

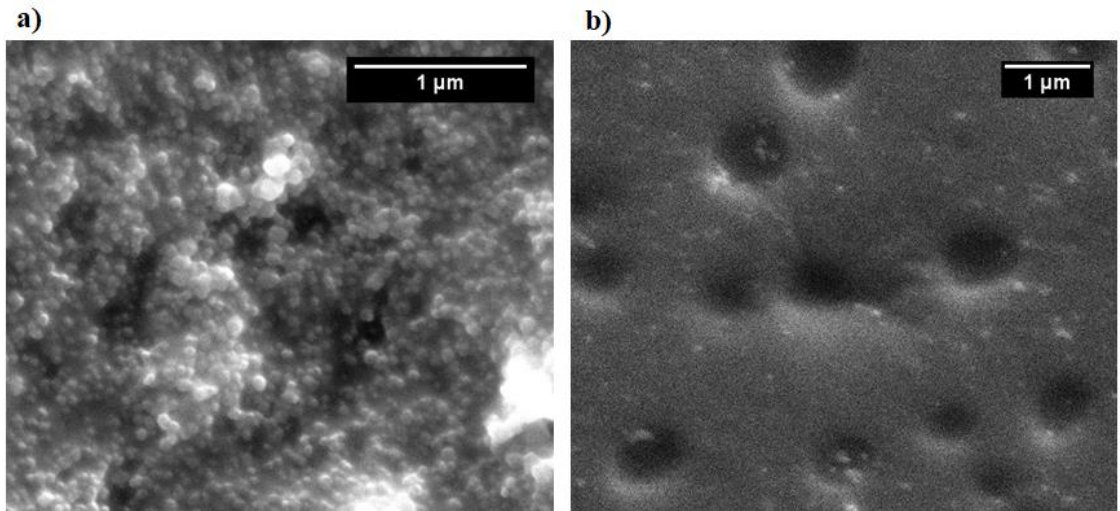
Film elde etme protokolünün optimizasyonu aşamasında yapılan tekrar çalışmaları da başarılı bir şekilde sonuçlanmış ve nanoçubuklu kolajen:jelatin filmler %2 yoğunlukla istenilen biçimde elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı varlığı, stabilite, mekanik test ve hücre kültürü çalışmalarına %0.3 PEGDGE içeren %2 yoğunluğundaki 1:3 kolajen:jelatin filmler ile devam edilmiştir.

Üretilen filmlerin stabilite çalışmaları öncesinde filmler sıvı çözeltilerde fiziksel olarak yapılarını korusalar da filmlerdeki çapraz bağlayıcı varlığı FT-IR ile de ölçülmüştür. Şekil 2.13 çapraz bağlanan ve bağlanmayan kolajen:jelatin filmlerin kimyasal yapısını göstermektedir. 1440 cm^{-1} dalga numarasında görülen ve kolajen-jelatinin varlığını gösteren CH_2 bağının absorpsiyonunda artış görülmüştür. 1082 cm^{-1} ve 943 cm^{-1} dalga numaralarına tekabül eden C-O-C fonksiyonel grupları PEGDGE'nin varlığını göstermektedir [52,61].



Şekil 2.13: PEGDGE ile çapraz bağlanan ve çapraz bağı olmayan kolajen:jelatin filmlerin FT-IR spektroskopisi.

Nanotopografi kalıcılığını incelemek amacıyla DMEM içerisinde 3 saat ve 24 saat bekletilen kolajen:jelatin filmler SEM ile karakterize edilmiştir. 3 saat DMEM’de bekletildikten sonra da nanoçubuk yapısının korunduğu gözlemlenmiştir. 24 saat bekletilme sonucunda ise filmin nanotopografik yapısının genel olarak bozunduğu ancak çok az ve kısa da olsa nanoçubuklara sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: %2 yoğunluğunda %0.3 PEGDGE içeren kolajen:jelatin filmlerin a) 3 saat ve b) 24 saat DMEM içerisinde bekletildikten sonraki SEM görüntüsü.

Elde edilen filmlerin 37°C’de PBS içerisinde stabiliteleri araştırılmıştır. Filmlerin PBS içerisine konmadan önceki ve PBS ortamından alınıp kurutulduktan sonraki ağırlıkları Çizelge 2.2 ve 2.3’te görüldüğü gibidir. Eşitlik 2.1’den yola çıkılarak hesaplanan yüzdece kalan ağırlığın zamana göre grafiği Şekil 2.15’te gösterilmiştir.

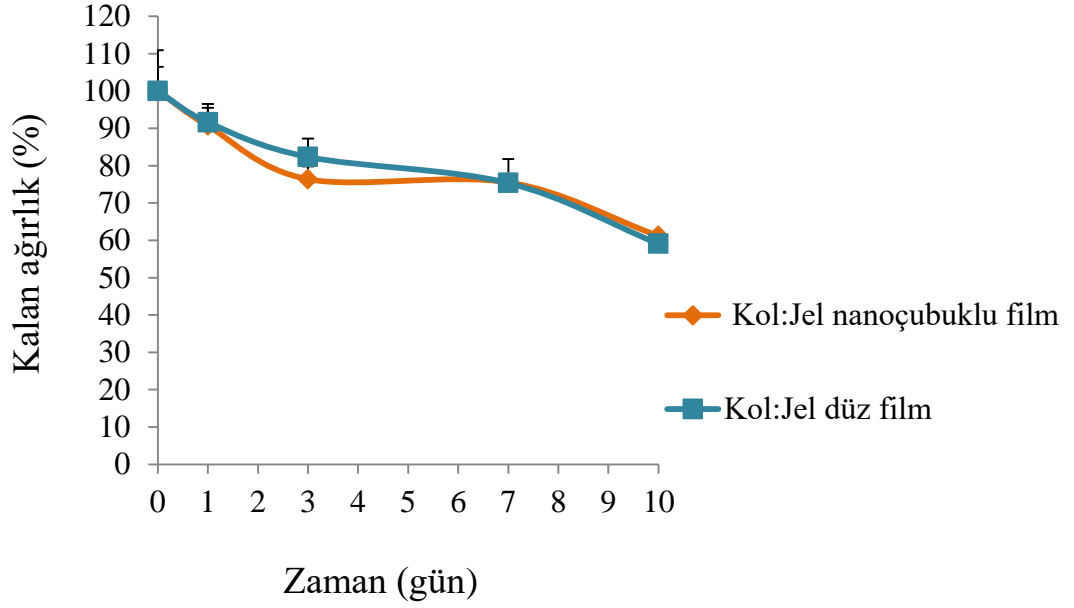
Çizelge 2.2: Nanoçubuklarla bezeli olan kolajen-jelatin filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları ile 1., 3., 7., ve 10. günlerdeki kuru ağırlıkları.

Zaman (gün)	Ortalama ilk kuru ağırlık (mg)	Ortalama son kuru ağırlık (mg)	Kalan ağırlık (%)	Standart sapma
1	7,9	7,16	90,83	± 10,92
3	7,9	6,03	76,37	± 4,82
7	7,9	5,96	75,57	± 3,39
10	7,9	4,83	61,26	±6,26

Çizelge 2.3: Nanoçubuklarla bezeli olmayan kolajen-jelatin filmlerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları ile 1., 3., 7., ve 10. günlerdeki kuru ağırlıkları

Zaman (gün)	Ortalama ilk kuru ağırlık (mg)	Ortalama son kuru ağırlık (mg)	Kalan ağırlık (%)	Standart sapma
1	7,16	6,56	91,61	± 6,47
3	7,16	5,90	82,32	± 4,93
7	7,16	5,40	75,34	± 4,92
10	7,16	4,23	59,06	±2,36

Şekil 2.15 incelendiğinde nanoçubuklu kolajen;jelatin filmlerin nanoçubuklu olmayanlara göre daha az ağırlığa sahip olduğu görülmüştür. Bu durumun filmlerin bozunma hızıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. İlk 3 günde nanoçubuklarla bezeli filmler yüksek yüzey alanına ve boşluklu yapıya sahip olduklarından düz filmlere göre daha hızlı bozunmaktadır. Genel çerçeveye bakılacak olursa, nanoçubuklarla bezeli filmlerdeki nanoyapı toplam ağırlığın çok az bir kısmını oluşturduğundan dolayı iki film türünün son kalan ağırlıklarının yaklaşık olarak aynı olduğu görülmektedir. 10 gün sonunda iki film türünün de kalan ağırlığının %60 olması bu filmlerin uzun süreli kullanılabilceğini göstermektedir.



Şekil 2.15: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen-jelatin filmlerin zamana göre bozunma grafiği.

Şişme testi sonucunda elde edilen kuru ve ıslak ağırlık ölçümleri Çizelge 2.4 ve 2.5'te gösterilmiştir. Alınan değerlerin ortalamalarına göre zamana göre yüzde şişme oranı grafiği oluşturulmuştur (Şekil 2.16).

Çizelge 2.4: Nanoçubuklarla bezeli kolajen:jelatin filmlerin zamana göre ortalama yüzdede şişme oranları.

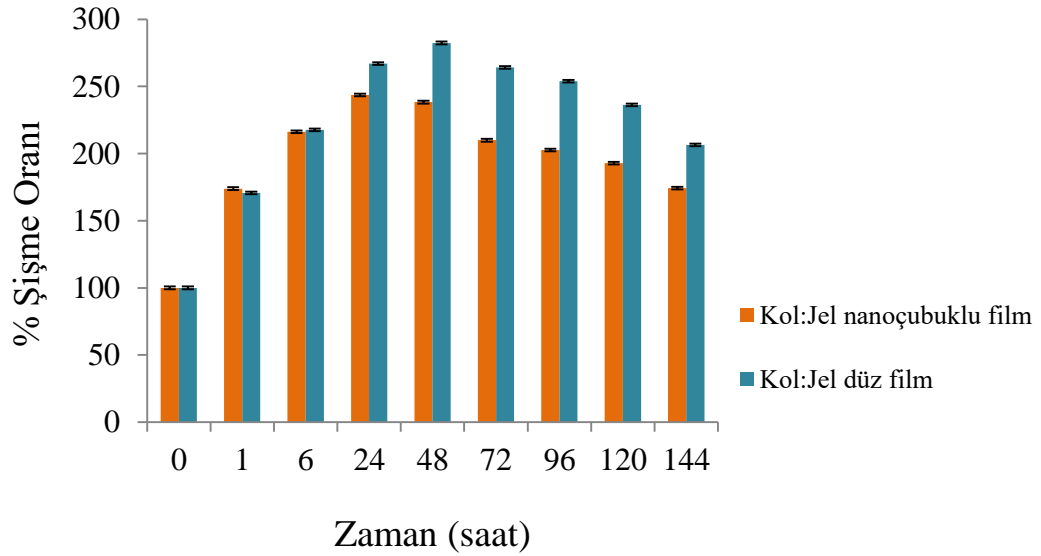
Zaman (saat)	Ortalama şişme oranı (%)	Standart sapma
1	173,8	± 24,55
6	216,2	± 6,18
24	243,6	± 9,62
48	238,2	±12,17
72	209,9	±12,69
96	202,7	±16,25
120	192,7	±15,53
144	174,3	±23,08

Grafik incelendiğinde her iki film tipi için de ilk kısımda şişmenin etkin olduğu ve film ağırlığının arttığı, ilerleyen aşamada ise her ikisinde de bozunmanın daha baskın bir etki gösterdiği, buna bağlı olarak ağırlığın zamanla azaldığı görülmüştür. Nanoçubuklarla bezeli film başlarda bozunmadığından dolayı yüksek yüzey alanı

sayesinde düz filme göre daha fazla şişme göstermiştir. Daha sonrasında ise nanoçubuklarla bezeli filmdeki bozunmanın, yine yüksek yüzey alanı nedeniyle (bkz. Şekil 2.13b), baskın faktör haline geldiği ve bu yüzden toplam ağırlığın 24 saat ve sonrası için düz filmin altında değerler gösterdiği düşünülmektedir.

Çizelge 2.5: Nanoçubuklarla bezeli olmayan kolajen:jelatin filmlerin zamana göre ortalama yüzdede şişme oranları.

Zaman (saat)	Ortalama şişme oranı (%)	Standart sapma
1	170,6	± 11,8
6	217,6	± 9,99
24	266,9	± 3,85
48	282,3	±8,09
72	264,1	±10,03
96	253,9	±8,85
120	236,2	±7,64
144	206,5	±9,61



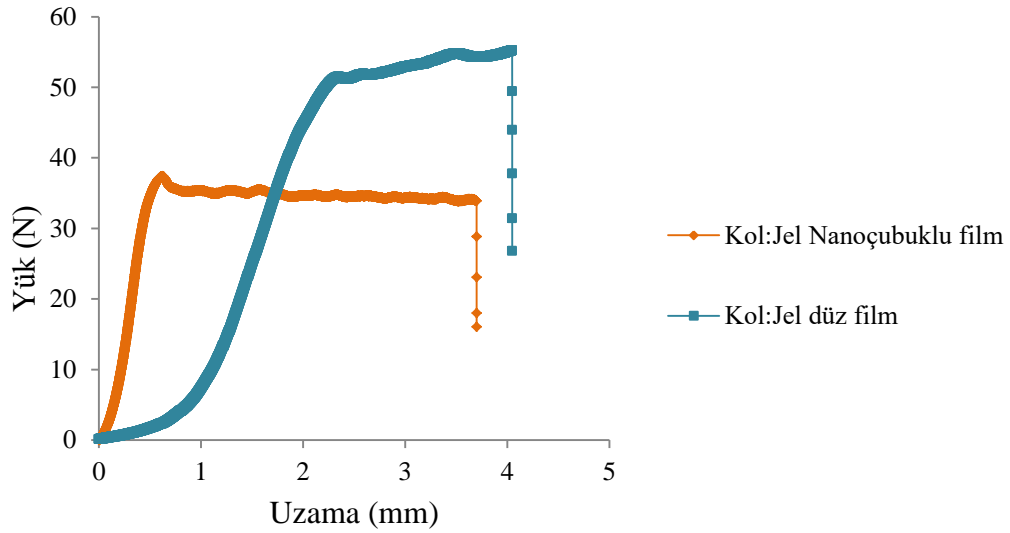
Şekil 2.16: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen:jelatin filmlerin zamana göre şişme oranını gösteren grafik.

Üretilen kolajen:jelatin filmlerin dayanımı çekme testi ile incelenmiştir. 0.5 mm/dk hızında çekilen filmlerin yükte ve uzamada kopma değerleri belirlenmiştir (Çizelge 2.6). Şekil 2.17'de nanoçubuklarla bezeli filmin düz filme göre daha az kuvvet altında koptuğu ve daha

az uzadığı görülmektedir. Nanoçubuk yapıların daha düşük mekanik dayanıma yol açan stres yoğunlaşma noktaları olduğundan dolayı daha az mekanik dayanıma sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nanoçubuklu yapıyı desteklemek için daha az polimer kütlesi vardır, bu durum da mekanik dayanımı azaltmaktadır [62].

Çizelge 2.6: Kolajen:jelatin filmlerin mekanik dayanımları.

Kolajen:Jelatin filmler	Ortalama yük dayanımı (N)	Uzama (mm)
Nanoçubuklarla bezeli film	$42,236 \pm 6,82$	$1,05 \pm 0,26$
Düz film	$55,823 \pm 1,61$	$2,90 \pm 1,47$



Şekil 2.17: Nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan kolajen:jelatin filmlerin mekanik test sonucu elde edilen yük-uzama eğrileri.



3. NANOÇUBUKLARLA BEZELİ FİLMLEİN DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI

3.1 Giriş

AAO membranlar biyosensör alanından biyomalzemelere kadar çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Bu çalışmalar arasında AAO'ların biyomalzeme olarak kullanımını kemik doku, sinir doku, bağ doku ve kas doku çalışmalarında bulmak mümkündür [63-66]. Buna rağmen, bu membranlardan üretilen nanoörüntülü polimer yüzeylerle doku mühendisliği çalışmaları görece kısıtlı miktardadır. Literatürde bulunan ve AAO membrandan elde edilen nanoçubuk yapıların biyolojik çalışmalardaki etkinliği yüzey alanını artırmak, hücre tutunumunu ve büyümesini iyileştirmek ve hücrelere başarılı bir şekilde penetre olmak ile sonuçlanmıştır [37].

Sinir hücreleriyle yapılan bir çalışmada, AAO membrandan elde edilen polimer nanoçubuk yapıların üzerinde nano topografi olmayan yapılara göre 1 hafta sonunda sinir hücrelerinin daha iyi tutunduğu ve daha fazla nöritlere sahip olduğu gözlemlenmiştir [67].

Hücre tutunumunun yanı sıra nanoçubuk yapıları filmlerin hücre gelişiminde de etkili olduğu görülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada, fare sinir kök hücreleri nanoçubuk yapıları üzerindeki yerlerini algılayabilmiş ve nanoçubukların aralarına tutunup yerleşerek hücre-yüzey temas alanını artırmışlardır [68].

Nanoçubuk yapıları yüksek yüzey alanı, hücre tutunumunu kolaylaştırma gibi özelliklerinden dolayı doku mühendisliğinde gün geçtikçe önemli bir yere sahip olmaktadır. Bu projede, çalışılan kolajen:jelatin filmlerden elde edilen nanoçubuklar sayesinde kemik hücrelerinin yüzeye daha iyi tutunacağı ve daha iyi mineralize olacağı öngörülmüştür.

3.2 Deneysel Çalışmalar

3.2.1 Malzemeler

Micro BCA protein test kiti ve DAPI boyası Thermo Scientific firmasından; ProtinEX Gene All firmasından; β -gliserofosfat, Tripsin-EDTA, Tripan mavisi, Alizarin kırmızısı, Kolajen Tip-1, Penisilin-streptomisin, Fetal calf serum, DMEM ve ALP kiti Sigma Aldrich firmasından; PBS(10X) Amresco firmasından; L-glutamin Gibco firmasından; WST-1 kiti Cayman Chemical firmasından alınmıştır.

3.2.2 Yöntemler

3.2.2.1 SAOS-2 hücre hattının geliştirilmesi

SAOS-2 hücre hattı insan kemik dokusundan elde edilen yapışkan epitelyal kanser hücre hattıdır. Çalışmada bu hücre hattının kullanılmasının sebebi kemik dokusunu taklit etmek ve bu hücrelerin hızlı çoğalma yetenekleri sayesinde çalışmaları hızlandırmaktır. Filmlerin osteoblast hücreleri üzerindeki etkisini incelemek için SAOS-2 (ATCC® HTB-85™) osteoblastik hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir. Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 37°C'de su banyosunda çözdürülmüştür ve cryo tüpün içinde bulunan dimetil sülfoksiti inhibe etmek için çözülen hücreler üzerine besi yeri eklenmiştir. Hücreleri çöktürerek elde etmek için 9000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır Hücrelerin çöktüğü gözlemlendikten sonra süpernatant atılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Üzerine SAOS-2 hattı için hazırlanan besi yeri (%10 fetal calf serum, %1 200mM Glutamin, %1 Penisilin (10,000 unit) / streptomisin (10 mg/mL) ve DMEM F-12) eklenip 75 cm²'lik flaska hücreler aktarılmıştır [69]. Hazırlanan besi yeri, kullanılmadan önce bakteri kontaminasyonunu engellemek için 0,22µm por büyüklüğündeki filtreden geçirilip steril edilmiştir. 37°C'de, %5 CO₂ ortamında hücreler inkübe edilmiştir ve hücrelerin büyümeye devam etmesi için her 3 günde bir besi yeri değişimi yapılmıştır. Flask %80 doluluğa ulaştığı zaman hücreler tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılıp birkaç flaska pasajlanmıştır.

3.2.2.2 SAOS-2 hücre hattının kolajen:jelatin filmler üzerinde inkübasyonu, proliferasyonu, canlılık ve tutunum analizleri

Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan yüzeyler üzerinde hücre davranışlarını gözlemlemede yapılacak testlerin sürelerini belirlemek amacıyla proliferasyon eğrisi oluşturulmuştur. Proliferasyon testi için, flaskta çoğaltılan hücreler tripsin yardımıyla yüzeyden kaldırılmıştır. Tripsin yardımıyla yüzeyden kaldırılan hücreler 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine besi yeri eklenmiştir. Pipetaj işlemi yapıldıktan sonra çözeltinin ufak bir kısmı 1:1 oranında ölü hücreleri boyayan Tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Hemositometre yardımıyla toplam hücre sayısı belirlenmiş ve proliferasyon eğrisinde kullanılacak hücre sayısına göre çözülden alınacak miktar hesaplanmıştır. Proliferasyon eğrisi 1., 2., 3., 4., ve 7. gün baz alınarak oluşturulmuştur.

Proliferasyon eğrisinin çıkarılmasında WST-1 kiti kullanılmıştır. Stabil tetrazolyum tuzu WST-1, esas olarak hücre yüzeyinde meydana gelen kompleks bir hücresel mekanizma ile çözünebilir bir formazana dönüşür. Bu biyo-uyarılma büyük ölçüde canlı hücrelerde NAD(P)H'nin glikolitik üretimine bağlıdır. Canlı hücrelerin sayısındaki artış, hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazların genel aktivitesinde bir artışa neden olur. Enzim aktivitesindeki bu artış, kültürdeki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkili olan formazan kristali miktarında bir artışa yol açar. Ne kadar çok formazan kristali oluşursa hücre o kadar canlı demektir [70]. Bu çalışmada 96 kuyuluk plakada çalışılmış ve kuyu başına 1×10^4 hücre ekimi yapılmıştır. Kuyular 5 tekrarlı çalışılmış ve her iki yöntemde de kuyulara hücre ekilmeden önce hücre tutunumunu kolaylaştırmak için kuyulara kolajen kaplama yapılmıştır. Kolajen kaplama çözeltisi 5 ml PBS içerisine 90 µl kolajen tip-1 eklenmesiyle oluşturulmuş ve çözelti kuyulara eklendikten sonra yarım saat bekletilip çekilmiştir. WST-1 kit yönteminde belirlenen günler sonunda kuyulara 10'ar µL WST-1 kit solüsyonundan konulmuş ve 2 saat inkübatörde bekletilmiştir. 2 saat sonucunda spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alınmıştır [71].

Hücrelerin filmler üzerindeki canlılığını incelemek amacıyla 48 kuyulu plakaya 5 tekrarlı olarak yerleştirilen nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler üzerine kuyu başına 2.5×10^4 hücre ekimi yapıp, toplam hacim 0.5 mL olacak şekilde besi yeri eklenmiştir. Kontrol grubu olarak TCP yüzey kullanılmıştır. Besi yeri içerisinde 2 gün süren inkübasyon sonucunda her bir kuyuya canlılık testinde kullanılan WST-1 solüsyonundan 10 μ L eklenmiştir. SAOS-2, yapışkan hücre hattı olduğundan dolayı kuyulara solüsyon eklendikten sonra hücreler 2 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra besi yeri ve solüsyonun olduğu sıvı ortam 96 kuyuluk plakaya aktarılmış ve spektrofotometrede 450 nm'de absorbans değerleri okutulmuştur [71]. Okutulan değerlerin ortalaması ve standart sapması alınarak yüzde canlılık hesaplanmıştır.

Hücre tutunumunu incelemek için ise 24 kuyuluk plakalara 5 tekrarlı olarak yerleştirilen nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler üzerine kuyu başına 1.8×10^4 sayıda hücre ekilmiş ve hücrelerin üzerine toplam hacim 1 mL olacak şekilde besi yeri eklenmiştir. Kontrol grubu olarak TCP yüzey kullanılmıştır. Besi yeri içerisinde 2 gün süren inkübasyon sonucunda hücrelerin tutunumunu gözlemlemek için hücrelerin çekirdeğini boyayan DAPI boyası kullanılmıştır. DAPI, tercihen çift iplikli DNA'yı boyayan mavi bir floresan nükleik asit boyasıdır. Her 3 baz çifti için bir boya molekülüne sahip DNA'nın AT (Adenin-Timin) bölgelerine bağlanır. DAPI'nin çift iplikli DNA'ya bağlanması floresanda yaklaşık 20 kat artış sağlar. Floresan emisyonu doğrudan mevcut DNA miktarı ile orantılıdır [72]. Hücreler DAPI ile boyanmadan önce üzerlerindeki besi yeri çekilmiş ve otoklavlanmış su ile hazırlanan %4'lük gluteraldehit çözeltisi içinde 30 dakika boyunca bekletilerek yüzeye sabitlenmiştir. Fiksasyon sonrasında gluteraldehit çözeltisi çekilmiş ve PBS içerisinde hazırlanan DAPI boyası son konsantrasyon 5 mg/mL olacak şekilde 1 mL hacimde her kuyuya eklenmiştir. Hücreler boya çözeltisinde 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra boya çekilmiş ve yüzeyler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta görüntüleme yapılmıştır. Ayrıca birim alana düşen hücre sayısı da hesaplanmıştır.

3.2.2.3 Kolajen:jelatin filmler üzerindeki SAOS-2 hücrelerinde mineralizasyon ve ALP aktivitesinin tayini

Kolajen:jelatin filmler üzerindeki SAOS-2 hücrelerinin mineralizasyonunu gözlemlemek için 48 kuyuluk plakalara 3 tekrarlı olarak yerleştirilen filmler üzerine 4×10^4 hücre ekimi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak TCP kullanılmıştır. Mineralizasyonu incelemek için toplam süre 21 gün olarak belirlenmiştir [73,74]. 1 gün inkübasyon sonrasında normal besi yeri, 10

mM β -gliserofosfat, 50 μ g/mL askorbik asit ve 10 nM deksametazon içeren mineralizasyon besi yeri ile değiştirilmiş ve 3 günde bir bu mineralizasyon besi yeri yenilenmiştir. 21. gün sonunda hücrelerin oluşturduğu kalsiyum nodüllerini gözlemlemek için filmler ve TCP yüzeyler Alizarin kırmızısı (40 mM, pH 4.2) ile boyanmıştır [75]. Boyama aşamasından önce hücreler gluteraldehit çözeltisinde 30 dakika bekletilerek yüzeylere fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra 3 kere steril distile su ile yıkanan hücreler Alizarin kırmızısı boya çözeltisinde 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Boya çekildikten sonra tekrar steril distile su ile yıkanan yüzeyler optik mikroskopta görüntülenmiştir.

Ayrıca, alizarin kırmızısı boyaması için kantitatif analiz de yapılmıştır [76]. Kolajen:jelatin filmler boyayı tuttuğundan dolayı bu analizde öncelikle filmler ve TCPS üzerindeki hücreler tripsin-EDTA yardımıyla yüzeyden kaldırılıp santrifüj tüpüne aktarılarak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücreler %4 gluteraldehit çözeltisi ile yüzeye sabitlenmiş ve sonrasında Alizarin kırmızısı (40 mM, pH 4.2) boya çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak için steril saf su ile yıkama sonrasında hücrelere bağlanan boyayı çıkarmak için %10 asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen boya çözeltisinden 100 μ L alınmış ve 405 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

Alizarin kırmızısı boyamasından farklı olarak EDX yöntemi ile de kalsiyum nodüllerinin nicel analizi yapılmıştır [77]. Ayrıca hücrelerin üzerindeki kalsiyum nodüllerinin SEM görüntüsü de alınmıştır. Hücreler, SEM'de görüntülenmeden önce serumsuz besi yeri içerisinde hazırlanan %4'lük gluteraldehit çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletilerek yüzeye sabitlenmiştir. Daha sonra ortamdaki suyun uzaklaştırılması için hücreler sırasıyla %20, %40, %60 ve %80 etanol çözeltilerinde ikişer dakika bekletilmiştir. En son %98 etanol çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra hücreler üzerinden sıvılar çekilmiş ve yüzeyler 10 nm altın-paladyum kaplandıktan sonra SEM ile görüntülenip nitel ve nicel analiz yapılmıştır.

ALP aktivitesi kemik oluşumu sırasında osteoblastik süreci takip etmekte kullanılan bir tür enzim aktivite testidir. ALP aktivitesinin ölçümü temelde p-nitrofenilfosfatın p-nitrophenole ve inorganik fosfata dönüşümünün takibi olduğundan bu analiz kolorimetrik bir ürün olan p-nitrofenolün absorbans ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir ve bunun için ALP Dedeksiyon Kiti kullanılmıştır [78]. Hücreler

48 kuyuluk plakadaki kolajen:jelatin filmler ve TCP yüzey üzerine 2.5×10^4 yoğunluğunda ekilmiş ve 1,3,7 ve 10 günlük süreler için inkübe edilmiştir. Normal besi yeri 1.günden itibaren mineralizasyon besi yeri ile değiştirilmiştir ve mineralizasyon besi yeri 3 günde bir yenilenmiştir.

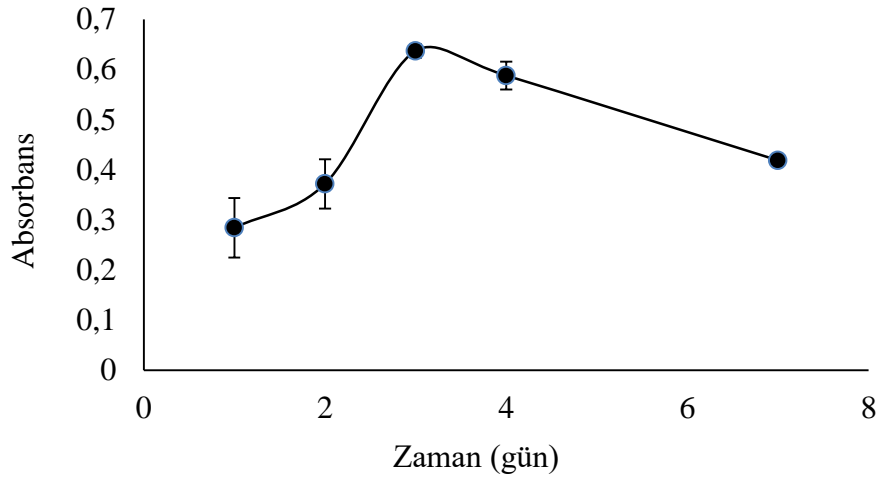
Yüzeyler üzerinden tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılan hücreler 2500g'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve buzda bekletilmiş PBS ile bir kere yıkanmıştır. Aynı koşullarda hücreler tekrar çöktürüldükten sonra süpernatant atılmış ve ProtinEX solüsyonu ile hücreler proteinlerine ayrıştırılmıştır. 5 dakika buz içerisinde inkübe edilen hücreler 4°C'de 16.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Proteinleri içeren süpernatantlar alınmış ve toplam protein miktarını belirlemek için BCA protein analiz kiti uygulanmıştır. BCA Protein testi, Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesini, alkali bir ortamda, bisinkoninik asit ile Cu^{+1} 'in yüksek hassasiyetli ve seçici kolorimetrik saptaması ile birleştirir. İlk adımda, alkali ortamda protein ile bakır şelatlanarak açık mavi bir kompleks oluşturur. Biüre reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyonda, üç veya daha fazla amino asit kalıntısı içeren peptitler, sodyum potasyum tartarat içeren bir alkali ortamda bakır iyonları olan renkli bir şelat kompleksini oluşturur. Renk gelişim reaksiyonunun ikinci aşamasında, bisinkoninik asit (BCA), birinci adımda oluşturulan indirgenmiş bakır katyonu ile reaksiyona girer. Yoğun mor renkli reaksiyon ürünü, iki BCA molekülünün bir bakır iyon ile şelasyonundan kaynaklanır. BCA / bakır kompleksi suda çözünürdür ve artan protein konsantrasyonları ile 562 nm'de güçlü bir doğrusal absorpsiyon sergiler [79].

BCA testi ile hücrelerdeki toplam protein miktarı belirlendikten sonra ALP aktivite analizi için örneklerden 20 μL alınmış ve 20 μL p-nitrofenil fosfat eklenerek 96 kuyuluk plaka içerisinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 405 nm'de optik yoğunluk ölçülmüş ve sonuçlar belirli zamandaki toplam protein miktarı için normalize edilmiştir.

Bütün deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için yapılan istatistiksel analizler Student t-test ile gerçekleştirilmiştir. Student t-test sonucu ortaya çıkan p değeri 0.05'den küçük olduğunda gruplar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.

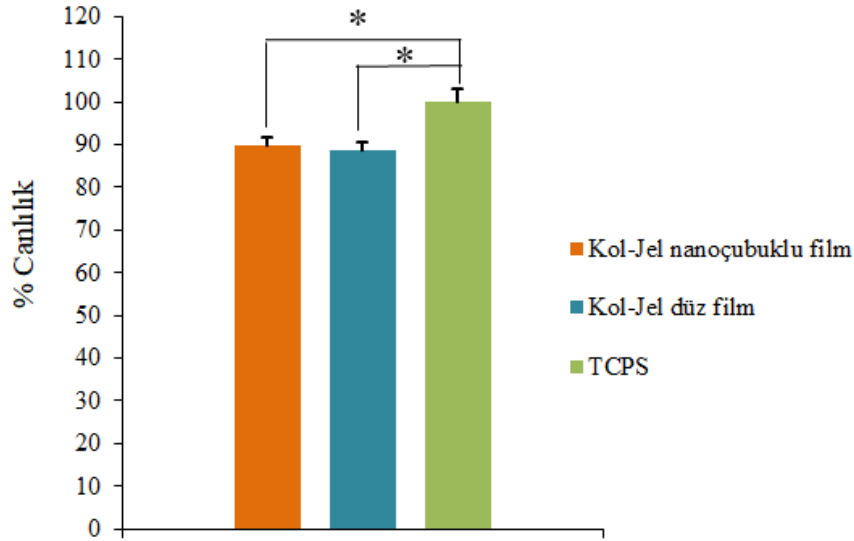
3.3 Sonuç ve Tartışmalar

Hücrelerin filmler ve TCP yüzey üzerindeki canlılık ve tutunumunu araştırmak için öncelikle hücrelerin çoğalma eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 3.1). Alınan sonuçlara göre hücreler 3.günün sonunda maksimum çoğalma sınırına ulaşmış, 3.günden sonra hücrelerin sayısında alan yetersizliğine ya da besi ortamının tüketilmesine bağlı azalma meydana gelmiştir. Bu yüzden canlılık ve tutunum testlerinin maksimum 3 günde tamamlanmasına karar verilmiştir. Test süresi uzun tutulursa hücre ölümünün filmler etkisiyle mi yoksa alan yetersizliği vb. etmenler dolayısıyla mı kaynaklandığının anlaşılamayacağı öngörülmüştür.



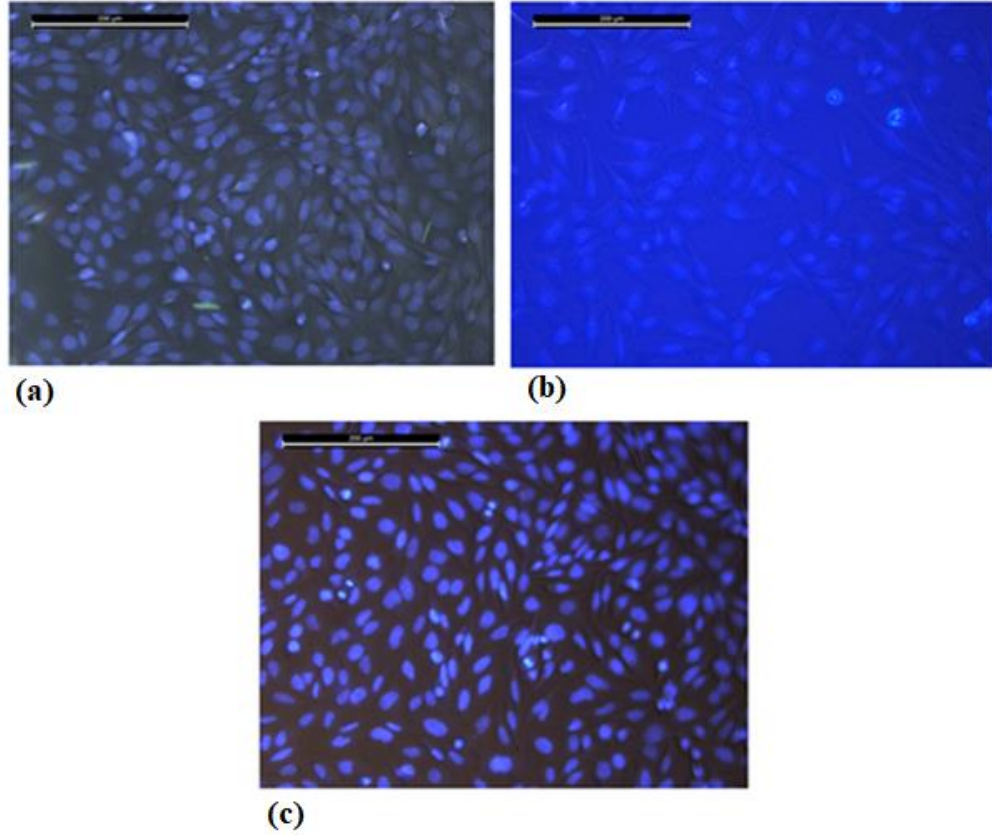
Şekil 3.1: SAOS-2 hücrelerinin 7 günlük süreç içerisindeki proliferasyon eğrisi.

Proliferasyon eğrisine göre canlılık testinin 2 gün süren inkübasyon sonucunda yapılması uygun bulunmuştur. SAOS-2 hücrelerinin filmler üzerindeki canlılığı WST-1 kiti ile incelenmiştir. 2 saatlik inkübasyon sonucunda alınan absorbans değerleri hücre canlılığıyla doğru orantılı olarak değişmektedir. TCP yüzeydeki canlılık %100 kabul edilmiştir ve buna göre kolajen:jelatin filmler üzerindeki yüzde canlılık hesaplanmıştır. Şekil 3.2 incelendiğinde kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmlerdeki canlılık TCP yüzeydeki canlılıktan daha düşük çıkmıştır ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Canlılığın TCP yüzeye göre düşük çıkmasında kolajen:jelatin filmlerin stabilitesini sağlamada kullanılan PEGDGE çapraz bağlayıcısının az miktarda da olsa besi ortamına salınma ihtimalinin etkili olduğu düşünülmektedir. Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler üzerinde ise canlılık %90'a yakın çıkmıştır ve bu iki film türü arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu seviyede canlılık değerleri genel olarak biyomalzemenin hücrelere toksik olmadığı yönünde değerlendirilmektedir [80].

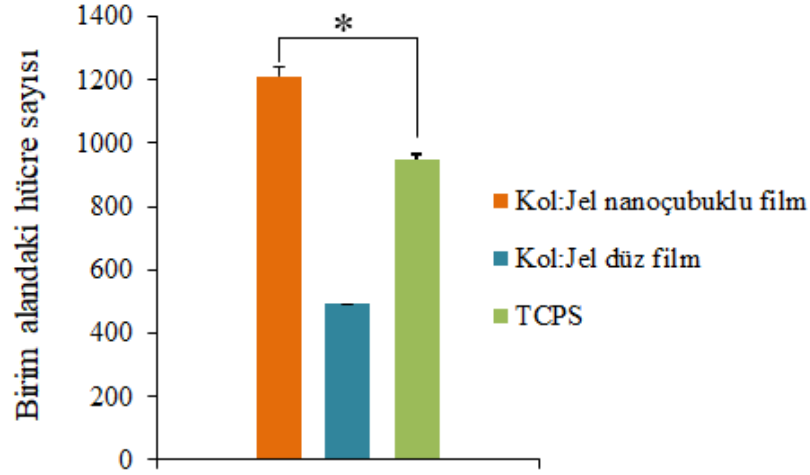


Şekil 3.2: Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler ile TCP yüzeydeki hücre canlılığının karşılaştırılması. (*p < 0.05)

Filmler üzerindeki hücre tutunumu da proliferasyon eğrisinden yola çıkılarak 2 gün inkübasyon sonucunda incelenmiştir (Resim 3.1). Tutunum sonuçları incelendiğinde kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli filmin TCP yüzeyden ve nanoçubuklarla bezeli olmayan filmden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Birim alana düşen hücre sayısı incelemesi de bu durumu desteklemektedir (Şekil 3.3). Elde edilen bu tutunum sonuçları, literatürde nanotopografik yüzeylerde gözlemlenen üstün hücre tutunum verileriyle paralellik arz etmekte ve nanoçubuklarla bezeli kolajen:jelatin yüzeylerin hücre tutunumunu, aynı içerikteki düz yüzeye ve TCPS kontrole göre daha etkin sağladığını göstermektedir.



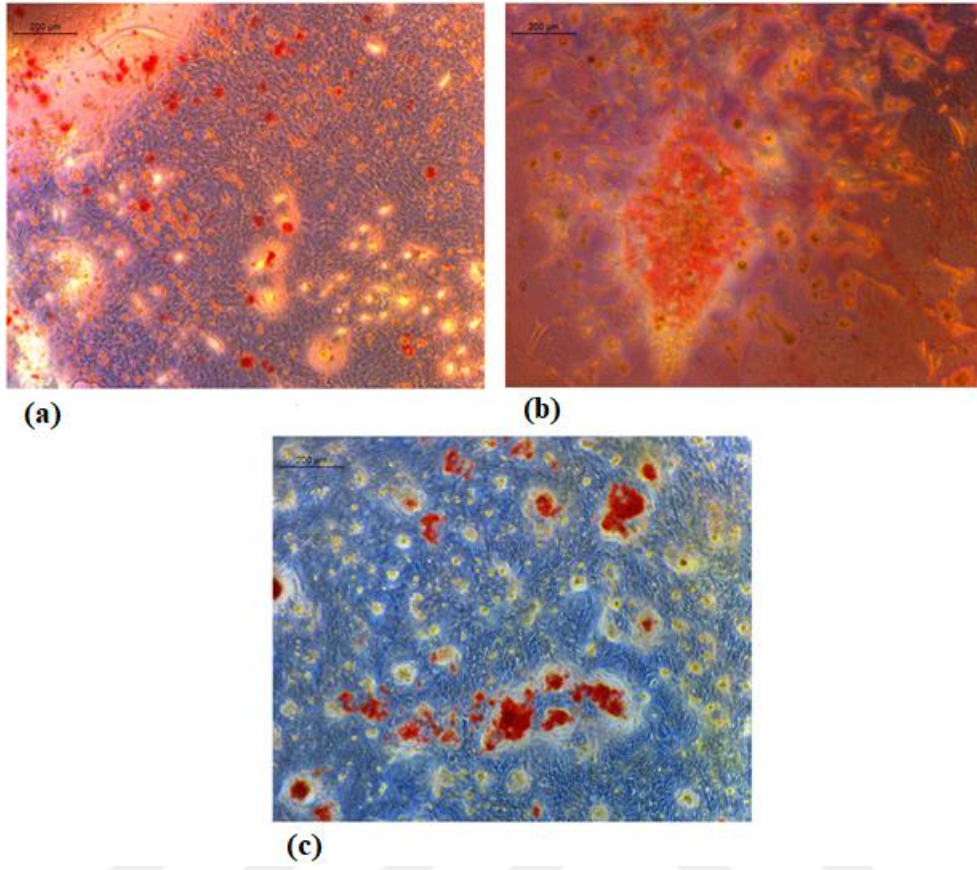
Şekil 3.3: (a) Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film, (b) Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film ve (c) TCP yüzey üzerindeki SAOS-2 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.



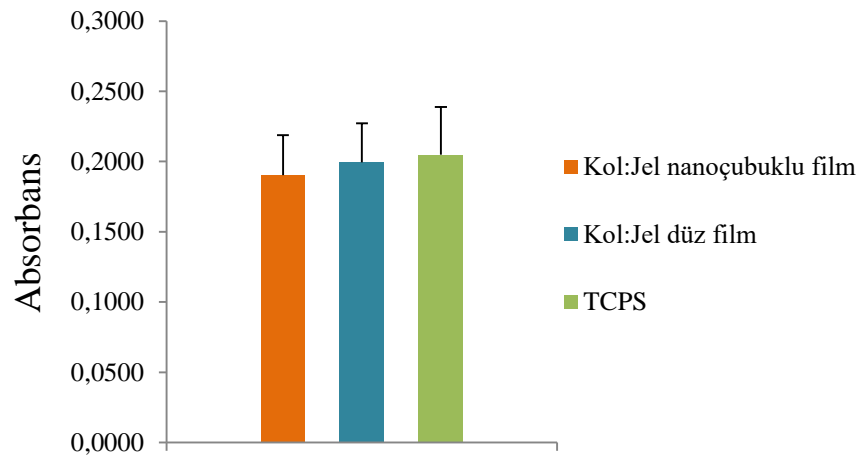
Şekil 3.4: SAOS-2 hücrelerinin farklı yüzeylerdeki mm² başına düşen hücre sayısını gösteren grafik. (*p<0.05)

Filmler üzerindeki hücre mineralizasyonunu gözlemek amacıyla yapılan Alizarin kırmızısı boyaması sonrası elde edilen optik görüntüler Şekil 3.5'teki gibidir. Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan filmdeki mineralizasyon nanoçubuklarla bezeli olan filme göre daha fazladır ve bu filmdeki kalsiyum nodülleri daha büyüktür. TCP yüzeydeki mineralizasyon ise kolajen:jelatin filmler üzerindeki mineralizasyondan daha yüksek çıkmıştır.

Optik görüntüyü nicel olarak da analiz etmek için yapılan absorbans okumaları sonrasında da paralel bir şekilde TCP yüzeyin kolajen:jelatin filmlerden daha fazla absorbansa sahip olduğu, kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli filmin ise en düşük absorbansa sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.6). Fakat, kolajen:jelatin filmler ve TCP yüzey arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmamıştır.



Şekil 3.5: Alizarin kırmızısı ile boyanan kalsiyum nodüllerinin (a) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film, (b) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film ve (c) TCP yüzey üzerindeki optik mikroskop görüntüsü.

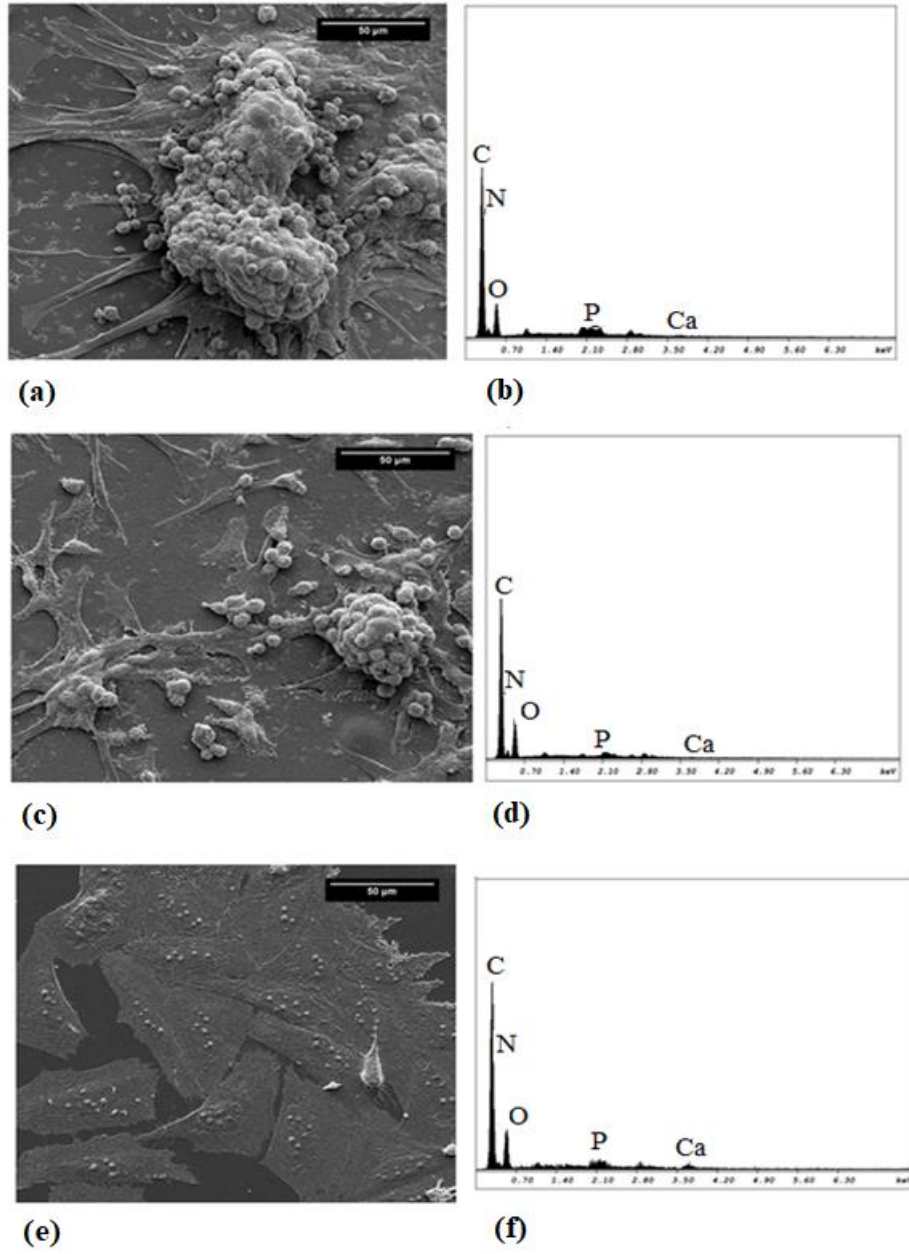


Şekil 3.6: Alizarin kırmızısı boyaması sonra optik okumada elde edilen absorbanans değerleri.

Hücreler üzerindeki mineralizasyonun nicel analizi EDX ile yapılmıştır. SEM ile görüntü alınan bölgeden elemental kompozisyon incelemeleri yapılmıştır (Şekil 3.7). Kolajen:jelatin filmlerin SEM resimlerinde belirgin olarak görünen küresel formların $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kristalleri olduğu düşünülmektedir. Üç farklı substratın SEM görüntüleri EDX detektörü ile analiz edildiğinde her üçü üzerinde de Ca ve P varlığı belirlenmiştir. Her bir film tipi için 3 bağımsız örnek kullanılarak yapılan nicel EDX incelemeleri, alizarin kırmızısı boyaması sonucunda olduğu gibi kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan filmler nanoçubuklarla bezeli olanlara göre daha fazla kalsiyum bulundurduğunu ortaya koymaktadır. TCP yüzeydeki kalsiyum yüzdesi ise diğer filmlere göre daha yüksek çıkarak alizarin kırmızısı optik okuma sonuçlarını desteklemiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1: EDX analizine göre kolajen:jelatin filmler ve TCP yüzey üzerinde bulunan ortalama yüzdece element miktarı.

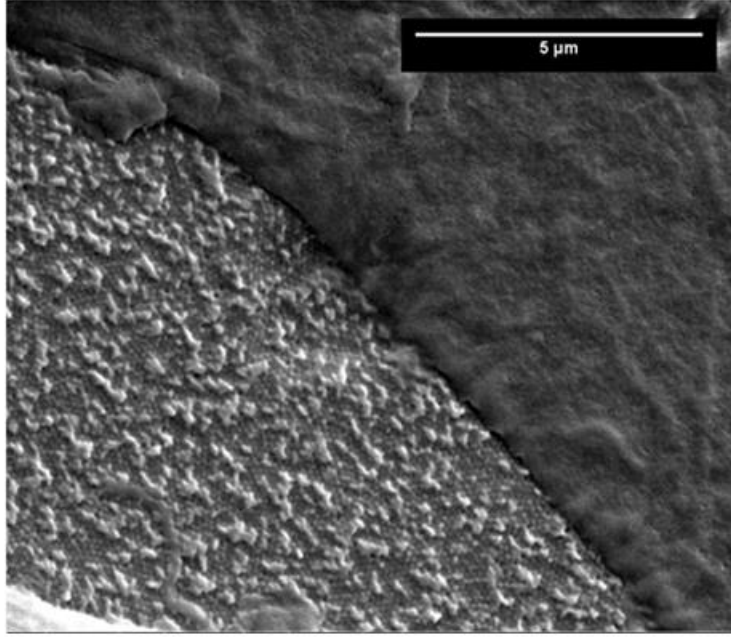
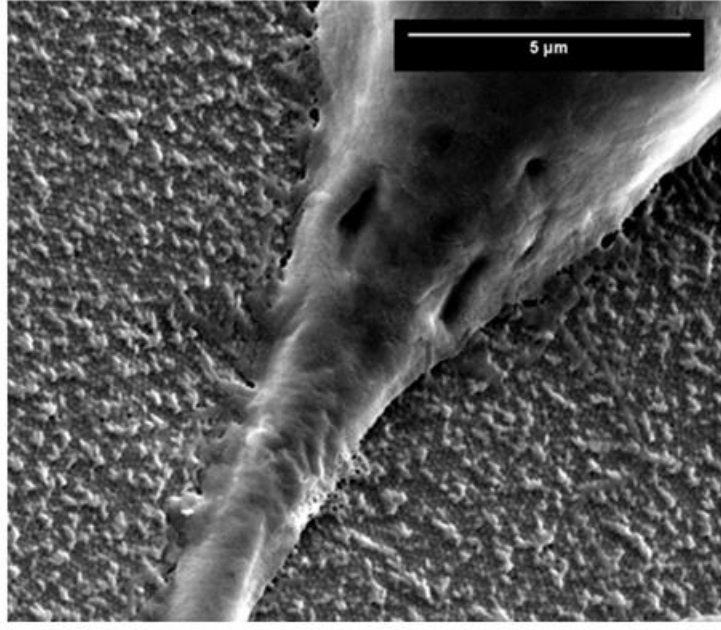
Örnek	Elementel kompozisyon (%)					
	C	N	O	P	Ca	Ca/P oranı
Kol:Jel nanoçubuklu film	56.61	12.48	25.34	2.44	2.38	0.97
Kol:Jel düz film	56.27	11.54	27.16	2.51	2.51	1.002
TCPS	63.28	10.13	28.8	3.84	5.21	1.35



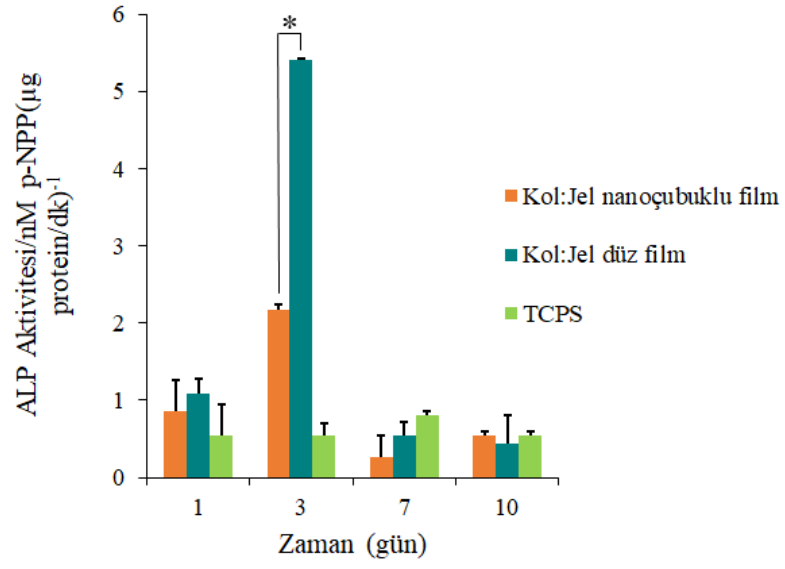
Şekil 3.7: Mineralizasyon çalışmasından sonra (a) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli film, (b) nanoçubuklarla bezeli filmin EDX analizi, (c) kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan film, (d) nanoçubuklarla bezeli olmayan filmin EDX analizi, (e) TCP yüzey üzerindeki hücrelerin SEM görüntüsü, (f) TCP yüzeyin EDX analizi.

Hücrelerin SEM görüntüleri daha yüksek büyütmede incelendiğinde stabilite çalışmalarında 1 günde kayb olduğu gözlenen nanoçubuk yapıların, 21 günlük mineralizasyon çalışması sonrasında korunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8). Bu durum hücrelerin filme tutunduğu zaman nanoçubuk yapılarının stabilitesini devam ettirdiğinin göstergesidir. Bunun sağlanmasında hücrelerin yaklaşık 4-6 saat içinde gerçekleşen yüzey tutunumlarının etkili olduğu öngörülmektedir [81,82]. Ekstraselüler matriksteki hücrel etkileşimler integrin adı verilen yüzey reseptörleri ile gerçekleşmektedir. Başka bir ekstraselüler matriks proteini olan fibronektin ise çeşitli fonksiyonlarıyla beraber hücreler için bağlanma bölgelerine sahiptir [83,84]. Kolajen:jeatin nanoçubuklarla bezeli filmin ECM'i taklit ederek hücrelerdeki integrin ve fibronektin gibi proteinlerin yüzeye yapışmasını sağladığı ve alt tabakada bulunan nano yapının çözünmesini engellediği düşünülmektedir.

Kemik mineralizasyonunda önemli rol oynayan ALP aktivitesinin incelenmesi sonucunda Şekil 3.9'daki grafik elde edilmiştir. Kolajen:jeatin filmler için en yüksek ALP aktivitesi 3.günde gözlenirken, TCP yüzey için 7.günde gözlenmiştir. 3.gündeki ALP aktivitesi kolajen:jeatin nanoçubuklarla bezeli olmayan filmlerde en yüksektir. Nanoçubuklarla bezeli olan film ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. Diğer günlerdeki ALP aktivitelerinde üç yüzey arasında anlamlı fark çıkmamıştır. ALP, mineralizasyonun ilk belirteçlerindedir ve ALP sentezinden sonra mineralizasyonun gerçekleşmesi için belirli bir süre geçmektedir. Yaptığımız hücre mineralizasyon çalışmaları 14. güne kadar gözlemlenebilir mineralizasyonun varlığının teyitinin çok zor olduğunu göstermiştir ve mineralizasyon deneyleri (Alizarin, SEM, EDX) bu yüzden literatürle paralel olarak 21. gün sonunda gerçekleştirilmiştir. ALP aktivitesinin 3. günün sonunda temel artışı göstermesi ve bunun düz kolajen:jeatin filmlerde en çok görülmesi bu filmlerde ilerleyen aşamada daha çok mineralizasyon oluşması beklentisini doğrulamaktadır. Nanoçubuklu filmlere göre daha etkin mineralizasyon sonuçları bunu teyit edici niteliktedir ve TCPS kontrol üzerinde de benzer seviyedeki mineralizasyon, alizarinin nitel ve nicel çıktıları ve de SEM/EDX dataları ile gösterilmiştir.



Şekil 3.8: 21 gün mineralizasyon çalışması sonrası nano topografinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.9: Kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler ile TCP yüzeydeki ALP aktivitesinin günlere göre dağılımı.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anodize alüminyum oksit membranlar yüksek saflıktaki alüminyumun anodize edilmesi sonucu elde edilen altıgen şeklinde por yapısına sahip malzemelerdir. Por çapı, por derinliği, porlar arası mesafe gibi fiziksel özelliklerinin ayarlanabilmesi, yüksek yüzey alanına sahip oluşu, biyouyumlu ve biyoetkisiz olması AAO membranların biyomedikal mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğini artırmıştır. Son zamanlarda, AAO membranların ve AAO membranlardan elde edilen biyomalzemelerin doku mühendisliğinde kullanımı artış göstermiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde AAO membrandan kolajen ve jelatinden oluşan nanoçubuk yapıların elde edilmesi üzerinde durulmuştur. Kolajen;jelatin nanoçubuklarla bezeli filmler damlat-kurut yöntemiyle elde edilmiştir. Birbirine paralel ve yüzeye dik nanoçubuklarla dekore bu filmlerin üretiminde PDL'de bulunan Sharpey fiberlerinden biyoesinlenilmiştir. Kolajen;jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan filmler ise silikon yonga üzerine damlatılıp kurutulmuş oluşturulmuştur. Filmlerin stabilitesini sağlamak için çözeltiler çapraz bağlayıcı ile katkılandırılmış ve filmlerdeki çapraz bağlayıcı varlığı FT-IR ile incelenmiştir. Filmlerdeki nanoçubuk yapıların 3 saat ve 24 saat süreli besi yeri içindeki stabiliteleri SEM ile karakterize edilmiştir. 3 saat sonunda nanoçubuk yapıların erimeye başladığı, 24 saat sonunda ise tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir.

PBS içerisinde yapılan şişme testi sonucunda ilk saatlerde her iki film için şişmenin etkili olduğu ve nanoçubuklarla bezeli filmlerin yüksek yüzey alanı sayesinde daha çok şiştiği gözlemlenmiştir. İlerleyen zamanlarda filmlerdeki bozunmanın daha baskın olması nedeniyle ağırlıklarının da azaldığı görülmüştür. Nanoçubuklarla bezeli filmlerdeki bozunma yüksek yüzey alanı nedeniyle düz filme göre daha hızlı gerçekleşmiştir. 10 gün sonunda filmlerdeki kalan ağırlığın yaklaşık %60 olması filmlerin uzun süreli kullanıma elverişli olduklarının göstergesidir. Filmlerin tek

yönlü çekme testi ile mekanik dayanımları karşılaştırıldığında nanoçubuklu filmlerin düz filmlere göre daha az uzamada ve yükte koptuğu gözlemlenmiştir. Nanoçubukların stres bölgeleri oluşturarak mekanik dayanımı azalttığı düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, ilk bölümde elde edilen kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli filmler üzerinde kemik hücrelerinin tutunumu, canlılığı ve mineralizasyonu araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak nanoçubuklarla bezeli olmayan filmler ve TCP yüzey kullanılmıştır. Hücre testleri sonucuna göre, en fazla canlılık TCP yüzeyde görülürken nanoçubuklarla bezeli olan ve olmayan filmler arasında anlamlı fark görülmemiştir ve bu filmler % 90 ın üzerinde kabul edilebilir canlılık verilerine sahiptir. Tutunum çalışmalarında ise nanoçubuklarla bezeli filmler üzerindeki hücre tutunumu kontrol gruplarına göre çok daha yüksek çıkmıştır ve kontrol grupları ile istatistiksel olarak anlamlı farka sahiptir. Filmlerdeki ALP aktivitesi incelendiğinde 3.günde kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli olmayan filmler ile diğer yüzeyler arasında anlamlı fark görülmüştür ve bu filmler üzerindeki ALP aktivitesi oldukça yüksek çıkmıştır. Düz yüzey üzerindeki yüksek ALP aktivitesinin ilerleyen günlerde daha çok mineralize olması beklenmiştir ve mineralizasyon çalışmaları toplamda 14 ve 21 gün olarak yapılmıştır, fakat 14.gün sonunda gözle görülebilir mineral nodüllerinin tespiti yapılamamıştır. Literatürü takiben 21. günün sonunda Alizarin kırmızısı ile boyama, EDX ve SEM analizleri ile mineralizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Yapılan 21 günlük mineralizasyon çalışmaları sonucunda düz yüzeyin sahip olduğu mineralizasyon nanoçubuklu filmlere göre daha etkindir. TCPS kontrol üzerinde de düz yüzey ile benzer seviyedeki mineralizasyon, alizarinin nitel ve nicel çıktıları ve de SEM/EDX dataları ile gösterilmiştir, fakat yüzeyler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 21 gün mineralizasyon çalışması sonucu SEM ile daha yüksek büyütmede karakterize edilen nanoçubuklu filmlerin yüzey topografisinin hücrelerdeki yüzey bağlanma proteinleri sayesinde korunduğu düşünülmektedir.

Dental implant sonrası osseointegrasyonu artırmak için geliştirilen ve literatürde bulunmayan, AAO kalıplardan elde edilen kolajen:jelatin nanoçubuklarla bezeli filmlerin hücre tutunumunu artıracak çalışmalarda potansiyel implant kaplama yüzeyi olarak kullanılması ön görülmektedir. Artan hücre tutunumu, normal ECM'de bulunan büyüme faktörleri gibi proteinlerle desteklenerek aynı anda hem üstün hücre tutunumu hem de mineralizasyon potansiyeli olan filmlerin üretimi daha etkin osteointegrasyona sahip implantlar için

planlanmaktadır. Örneğin, bu tarz protein salımı yapan filmlerle ilgili deri doku çalışmalarımız aktif olarak devam etmektedir.

AAO membranlar ve anodizasyon yöntemleri kemik doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Klinik çalışmalarda kullanılan titanyum alaşımlı implantlar osseointegrasyonu artırmak için oksit tabakalarla kaplanmaktadır. Fakat bu durum uzun ömürlü olmamakla beraber yüksek başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Gelecek çalışmalarda osseointegrasyonu artırmak için nano gözenekli AAO membranların titanyum implant yüzeyi kaplaması olarak kullanılması ön görülmektedir. Yüksek yüzey alanı, biyouyumluluk, ayarlanabilir fiziksel özellikleri sayesinde AAO membran ile kaplanan implantlar üzerinde farklı anodizasyon elektrolitine bağlı olarak hücre tutunumunun, farklılaşmasının ve mineralizasyonunun gelişeceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] NSTC, **The National Nanotechnology Initiative** – Strategic Plan, December 2007. Executive Office of the President of the United States; 2007.
- [2] **Varadan, V.K., Chen, L., Xie, J.**, Nanomedicine Design and Applications Of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems. *Wiley Publication*, (2008).
- [3] **National Cancer Institute, Bethesda, USA**, nano.cancer.gov
- [4] **Webster, T.J., Chun, Y.W.**, (2009). The Role of Nanomedicine in Growing Tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 37(10), pp. 2034–2047.
- [5] **Poinern, G.E.J., Ali, N., Fawcett, D.**, (2011). Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development. *Materials*, 4, pp. 487-526.
- [6] **Masuda, H., Fukuda, K.**, (1995). Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science*, 268(5216), p. 1466.
- [7] **Lee, W., Park, S. J.**, (2014). Porous Anodic Aluminum Oxide: Anodization and Templated Synthesis of Functional Nanostructures. *Chemical Reviews*, 114 (15), pp. 7487-7556.
- [8] **Gultepe, E., Nagesha, D., Sridhar, S., Amiji, M.**, (2010). Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), pp. 305–315.
- [9] **Huang, Z., Zhang, W., Yu, J., Gao, D.**, (2007). Nanoporous alumina membranes for enhancing hemodialysis. *Journal of Medical Devices*, 1(1), pp. 79–83.
- [10] **Kumeria, T., Kurkuri, M.D., Diener, K.R., Parkinson, L., Losic, D.**, (2012). Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), pp. 167–173.
- [11] **Briggs, E.P., Walpole, A.R., Wilshaw, P.R., Karlsson, M., Palsgard, E.**, (2004). Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(9), pp. 1021– 1029.
- [12] **Gong, D., Yadavalli, V., Paulose, M., Pishko, M., Grimes, C.A.**, (2003). Controlled molecular release using nanoporous alumina capsules. *Biomedical Microdevices*, 5(1), pp. 75–80.

- [13] Norman, J.J., Desai, T.A., (2006). Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering*, 34(1), pp. 89–101.
- [14] Bruggemann, D., Michael, K.E., Wolfrum, A., Offenhausser, B., (2012). Adhesion and survival of electrogenic cells on gold nanopillar array electrodes. *International Journal of Nano and Biomaterials*, 4(2), pp. 108–127.
- [15] Antohe, V.A., Radu, A., Matefi-Tempfli, M. et al., (2009). Nanowire-templated microelectrodes for high-sensitivity pH detection. *Applied Physics Letters*, 94(7), pp. 073118–073120.
- [16] Langer, R., Vacanti, J.P., (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, pp.920–926.
- [17] Khademhosseini, A., Vacanti, J.P., Langer, R., (2009). Progress in tissue engineering. *Scientific American*, 300(5), pp. 64–71.
- [18] Mistry, A.S., Mikos, A.G., (2005). Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 94, pp.1–22.
- [19] Kretlow, J.D., Mikos, A.G., (2007). Review: mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng.*, 13, pp.927–938.
- [20] O’Keefe, R.J., Mao, J., (2011). Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic-an overview. *Tissue Eng Part B*, 17(6); pp.389–392.
- [21] Losic, D., Simovic, S. (2009) Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(12), pp.1363–1381.
- [22] Sedel, L. (2000) Evolution of alumina-on-alumina implants: a review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 379, pp.48–54.
- [23] Bruggemann, D., (2013). Nanoporous aluminium oxide membranes as cell interfaces. *Journal of Nanomaterials*, 2013, pp.1-18.
- [24] Popat, K.C., Swan, E.E.L., Mukhatyar, V. et al., (2005). Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response. *Biomaterials*, 26, pp.4516–4522.
- [25] La Flamme, K.E. et.al., (2007). Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation. *Biomaterials*, 28(16), pp.2638–2645.
- [26] Swan, E.E.L. et.al., (2005). Fabrication and evaluation of nanoporous alumina membranes for osteoblast culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 72(3), pp.288–295.
- [27] Song, G., (2007). Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys. *Corrosion Science*, 49(4), pp.1696-1701.
- [28] Boccaccini, A.R., Hoppe, A., Guldal, N.S., (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), pp.2757-2774.

- [29] Wong, H.M., Zhao, Y. et.al., (2013). In vivo stimulation of bone formation by aluminum and oxygen plasma surface-modified magnesium implants. *Biomaterials*, 34, pp.9863-9876.
- [30] Walpole, A.R., Briggs, E.P., Karlsson, M., Palsgard, E., Wilshaw, P.R., (2003). Nano-porous Alumina Coatings for Improved Bone Implant Interfaces. *Materials Science & Engineering Technology*, 34(12), pp.1064-1068.
- [31] Oshida, Y., Tuna, E., Aktören, O., Gençay, K., (2010). Dental Implant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, pp.1580-1678.
- [32] Christenson, E., Anseth, K. et.al., (2006). Nanobiomaterial Applications in Orthopedics. *Journal of Orthopaedic Research*, 25, pp.11-22.
- [33] Puleo, D., Nanci, A., (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20, pp.2311-2321.
- [34] Center for implant and reconstructive dentistry, <http://dentalimplants.uchc.edu>.
- [35] Lee, S.M., Zhang, Q., Le, A., (2014). Dental Stem Cells: Sources and Potential Applications. *Current Oral Health Reports*, 1, pp.34-42.
- [36] Weiner, S., Wagner, H., (1998). The material bone: Structure mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science*, 28, pp.271-298.
- [37] Gudur, A., Ji, H.F., (2016). Bio-Applications of Nanopillars. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), pp.1-10.
- [38] Celik, M., Altuntas, S., Buyukserin, F., (2018). Fabrication of nanocrater-decorated anodic aluminum oxide membranes as substrates for reproducibly enhanced SERS signals. *Sensors and Actuators B*, 255, pp. 2871–2877.
- [39] Anandan, V., Rao, Y.L., Zhang, G., (2006). Nanopillar array structures for enhancing biosensing performance. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1), pp.73–79.
- [40] Giussi, J.M., Bilderling, C., et.al., (2018). Thermo-responsive PNIPAm nanopillars displaying amplified responsiveness through the incorporation of nanoparticles. *Nanoscale*, 10, pp.1189–1195.
- [41] Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., Cao, Y., (2008). Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatric Research*, 63, pp. 492-496.
- [42] Hoque, M., Nuge, T., Yeow, T., et.al., (2015). Gelatin Based Scaffolds For Tissue Engineering. *Polymers Research Journal*, 9(1), pp.1935-2530.
- [43] Lee, C., Singla, A., Lee, Y., (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, pp.1–22.
- [44] Choi, Y., Hong, S., et.al., (1999). Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials*, 20, pp.409-417.

- [45] Yang, C., (2012). Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. *Bulletin of Materials Science*, 35(5), pp.913-918.
- [46] Wissink, M.J.B., Beernink, R., et al., (2001). Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 22, pp.151-163.
- [47] Nam, K.; Kimura, T., Kishida, A., (2008). Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromolecular Bioscience*, 8, pp.32-37.
- [48] Hwang, H. S. and Kim, M. S., (2013). Ultraviolet-visible light spectral transmittance of rabbit corneas after riboflavin/ultraviolet-A (365 nm) corneal collagen cross-linking. *Molecular Vision*, 19, pp. 2113-2123.
- [49] Rich, H., Odlyha, M., et al., (2014). Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, pp.11-21.
- [50] Grover, C. N., Gwynne, J. H., Pugh, N., Hamaia, S., Farndale, R. W., Best, S. M., Cameron, R. E., (2012). Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. *Acta Biomaterialia*, 8 (8), pp.3080-3090.
- [51] Ye, Y. C.; Dan, W. H.; Zeng, R.; Lin, H.; Dan, N. H.; Guan, L. B. and Mi, Z. J., (2007). Miscibility studies on the blends of collagen/chitosan by dilute solution viscometry. *European Polymer Journal*, 43(5), pp.2066-2071.
- [52] Ozelik, B., Brown, K.D., Blencowe, A., Daniell, M., Stevens, G. W., Qiao, G.G., (2013). Ultrathin chitosanpoly(ethylene glycol) hydrogel films for corneal tissue engineering. *Acta Biomaterials*, 9(5), pp.6594-6605.
- [53] Vargas, G., Acevedo, J.L., López, J., Romero, J., (2008). Study of cross-linking of gelatin by ethylene glycol diglycidyl ether. *Materials Letters*, 62, pp.3656–3658.
- [54] Amir, R.M., Anjum, F.M., et al., (2013). Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), pp.1018–1023.
- [55] Zhuang, C., Tao, F., Cui, Y., (2016). Properties of gelatin films cross-linked by N-hydroxysuccinimide-activated furandicarboxylic acid (NHS-FDCA). *Polymer Bulletin*, 73, pp.1565–1580.
- [56] Zhuang, C., Tao, F., Cui, Y., (2015). Anti-degradation gelatin films crosslinked by active ester based on cellulose. *Royal Society of Chemistry*, 5, pp.52183–52193.
- [57] Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22, pp.763-768.
- [58] Grover, C.N., Cameron, R.E., Best, S.M., (2012). Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10, pp.62-74.

- [59] Bera, S., Köse, G.T., Hasırcı, V., (2005). Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials*, 26, pp.1977–1986.
- [60] American Society for Testing Materials (2001). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In: Annual Book of ASTM Standards, No. D882- 01, Philadelphia, PA, USA.
- [61] Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., Petibois, C., (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, pp.829–837.
- [62] Leong, M.F., Chian, K.S., Mhaisalkar, P.S., Ong, W.F., Ratner, B.D., (2009). Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(4), pp.1040-1048.
- [63] Parkinson, L.G., Giles, N.L., Adcroft, K.F., Fear, M.W., Wood, F.M., Poinern, G.E., (2009). The potential of nanoporous anodic aluminium oxide membranes to influence skin wound repair. *Tissue Engineering Part A*, 15(12), pp.3753–3763.
- [64] Elisseeff, J., Ferran, A., Hwang, S., Varghese, S., Zhang, Z., (2006). The role of biomaterials in stem cell differentiation: applications in the musculoskeletal system. *Stem Cells Dev.*, 15(3), pp.295–303.
- [65] Li, W.J., Tuli, R., Okafor, C., et al., (2005). A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26(6), pp.599–609.
- [66] Manso, M., Ogueta, S., Herrero-Fernández, P., Vázquez, L., Langlet, M., Garcia-Ruiz, J.P., (2002). Biological evaluation of aerosol-gel-derived hydroxyapatite coating with human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 23(19), pp.3985–3990.
- [67] Moyen, E., et.al., (2016). Nanostructured conducting polymers for stiffness controlled cell adhesion, *Nanotechnology*, 27.
- [68] McNamara, L.E., Sjöström, T., Burgess, K.E., Kim, J.J., Liu, E., et al., (2011). Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies. *Biomaterials*, 32, pp.7403- 7410
- [69] Zhua, X., Chena, J., Scheidlera, L., Reichlb, R., Gerstorfera J., (2004). Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*, 25, pp.4087-4103.
- [70] Berridge, W.M., et.al., (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, pp.15-19.
- [71] Cayman Chemical, WST-1 Cell Proliferation Assay Kit.
- [72] Kapuscinski, J., Szer, W., (1979). Interactions of 4', 6- diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 6, pp.3519.

- [73] Galowa, A.M., Reblb, A., Koczanc, D., Bonka, S.M., Baumanna, W., Gimsaa, J., (2017). Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, pp.17–25.
- [74] Bialoruckia, C., Subramaniana, G., Elsaadanya, M., Ayan, E.Y., (2014). In situ osteoblast mineralization mediates post-injection mechanical properties of osteoconductive material. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 38, pp.143–153.
- [75]Kocabey, S., Ceylan, H., Tekinay, A.B., Guler, M.O., (2013). Glycosaminoglycan mimetic peptide nanofibers promote mineralization by osteogenic cells. *Acta Biomaterialia*, 9, pp.9075–9085.
- [76] Ciapettia, G., Ambrosio, L., et.al., (2003).Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, 24, pp.3815–3824.
- [77] Liu, G., Pastakia, M., Fenn, M.B., Kishore¹, V., (2016). Saos-2 cell-mediated mineralization on collagen gels: Effect of densification and bioglass incorporation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(5), pp.1121-1134.
- [78]Bayram, C.; Demirbilek, M.; Yalcin, E.; Bozkurt, M.; Dogan, M.; Denkbas, E., (2014). Osteoblast response on co-modified titanium surfaces via anodization and electrospinning. *Applied Surface Science*, 288:143-8
- [79] Thermo Fisher Scientific, BCA Protein Assay Kit.
- [80] Mateti, S., Wong, C.S., Liu, Z., et.al., (2018). Biocompatibility of boron nitride nanosheets. *Nano Research*, 11(1), pp.334–342.
- [81] Rizzi, S.C., Heath, D.J., Coombes, A.G., Bock, N., Textor, M., Downes, S., (2001). Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(4), pp.475-486.
- [82] Ni, S., Li, C., Ni, S., Chen, T., Webster, T.J., (2014).Understanding improved osteoblast behavior on select nanoporous anodic alumina. *International Journal of Nanomedicine*, 9, pp.3325–3334.
- [83] Miyamoto, S., Katz, B.Z., Lafrene, R.M., Yamada, K.M., (1998). Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857, pp.119-29.
- [84] Brown, N.H., (2000). Cell]cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm, *Matrix Biology*, 19, pp.191-201.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Pınar ALPASLAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.11.1993 / ANKARA
E-posta : p.alpaslan93@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği
- **Yüksek lisans** : 2018, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, Tam burslu

YABANCI DİL: İngilizce (İyi)
İspanyolca (A2)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Alpaslan, P.**, Altuntas, S., Buyukserin F., 2017. Fabrication and cellular investigation of biomimetic collagen-gelatin nanopillar films, Proceedings of ICONAN 2017: International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology, September 25-27, Barcelona, Spain.
- **Alpaslan, P.**, Altuntas, S., Buyukserin F., 2017. Fabrication and cellular investigation of biomimetic collagen-gelatin nanopillar films, Proceedings of MRS 2017 FALL: Materials Research Society, November 26-December 1, Boston, Massachusetts, ABD.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Alpaslan, P.**, Altuntas, S., Buyukserin, F., 2015. A Comparison of Different Shape Silica Nanoparticles, Proceedings of European Biotechnology Congress, May 07-09, Bucharest, Romania.
- Karahaliloğlu, Z., Kilicay, E., **Alpaslan, P.**, Hazer, B., Denkbas, E., 2017. Enhanced Antitumor Activity Of Epigallocatechin Gallate– Conjugated Dual

Drug-Loaded Polystyrene–Polysoyaoil– Diethanol Amine Nanoparticles for Breast Cancer Therapy, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1-25.

- Kilicay, E., Karahaliloğlu, Z., **Alpaslan, P.**, Hazer, B.,Denkbas, E., 2017. In vitro Evaluation of Antisense Oligonucleotide Functionalized Core-Shell Nanoparticles Loaded with α -Tocopherol Succinate, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1762-1785.

