



# Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılmak Üzere Osteon Benzeri Mikrotübül İskelelerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

## Fabrication and Characterization of Osteon Mimetic Microtubular Scaffolds for Bone Tissue Engineering Application

Emine Afra Demirci<sup>1</sup>, Ozan Karaman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Biyomedikal Teknolojiler Ana Bilim Dalı, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
afrademirci@gmail.com

<sup>2</sup> Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
ozan.karaman@ikc.edu.tr

**Özetçe—** Kemik doku mühendisliği alanında, yüksek mekanik dayanıma sahip, osteoprogenitör hücrelerin osteojenik farklılaşmasını indükleyici ve mikro ölçekte kompakt kemiğin yapısına biyobenzer kemik iskelelerinin üretim gereksinimi günümüzde halen devam etmektedir. Bu çalışma kapsamında, geniş kemik hasarlarının tedavisinde kullanım amaçlı, mineralize edilen nanolif tabakaları kullanılarak osteon yapısı benzeri 3B mikrotübül yapıda iskelelerinin geliştirilmiştir. Mikrotübül doku iskeleleri ile kemik dokunun nano ve mikro boyutta benzeri kemik iskelelerinin üretimi hedeflenmiştir.

**Anahtar Kelimeler —** Biyomedikal mühendisliği, Kemik doku mühendisliği, Elektro-eğirme, Nanolifler, Mikrotüpler, Biyomineralizasyon, Osteojenik farklılaşma, Mezenşimal kök hücre

**Abstract—**In the scope of bone tissue engineering, there has still been great amount of demand on designing biomimetic scaffolds that induces differentiation of osteoprogenitor cells by cell-matrix interaction at the nanoscale as well as mimicking micro assembly of compact bone while providing high mechanical strength. In this study, in order to use in the treatment of large bone defects, osteon mimetic 3D microtubular scaffolds were developed by using mineralized nanofiber sheets and characterized. The main goal for designing microtubular scaffolds is to mimic the nano and micro structures of bone tissue.

**Keywords —** Biomedical engineering, Bone tissue engineering, Electrospinning, Nanofibers, Microtubes, Biomaterialization, Osteogenic differentiation, Mesenchymal stem cells

### I. GİRİŞ

Kemik Doku nakli uygulamaları günümüzde kemik kanseri, iskelet travması ve enfeksiyona bağlı kemik kayıpları, kemik kırıkları ve doğuştan yüz ve kafatası kemiklerdeki biçimsel bozuklukların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Geniş kemik hasarları homogreft ve otogreft prosedürleri kullanılarak tedavi edilebilmesine karşın, immün sistem yanıtı oluşumu, doku alınan bölgede meydana gelen hasar ve sınırlı greft bulunabilirliği gibi sınırlayıcı faktörlerden dolayı [1-3], doku mühendisliği teknikleriyle geliştirilmiş 3 Boyutlu kemik greftlerinin kullanımına yönelik çalışmalar artmaktadır. Kemik dokusunun büyük bir çoğunluğunu oluşturan kemik ekstraselüler matrisi (KEM), hücrelerin tutunmasını sağlayan ve kemiğe esneklik kazandıran kolajen tip I (%35) ve kemiğe mekanik dayanım veren hidroksiapatit kristallerinden  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  (HA) (%65) oluşmaktadır. KEM, kemiğin uygun biyomekanik ve biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmek üzere nano ölçekte organize olmuş, organik ve inorganik materyalleri içeren nanokompozit bir yapıdır [4]. Mineralize kollojen nanolif tabakalarının organize olması ile mikrotübül osteon yapıları oluşmaktadır. Bu özellikler göz önüne alındığında tasarlanan kemik doku iskelelerinin KEM yapısına ve özelliklerine benzer yapıda, dayanıklı, sürdürülebilir, hücrelerin iskele içerisinden penetre olabilmeye ve çoğalmasına, besin ve oksijen iletimine izin verecek şekilde gözenekli yapıda olması tercih edilmektedir [5].

Elektro-eğirme yöntemi, KD matrisinde bulunan kolajen nanolif yapılarına benzer yapıda nanoliflerin üretimine izin veren bir yöntem olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır [6,7]. Nanolif kemik iskeleleri, hücrelerin



## Biyomalzeme 1

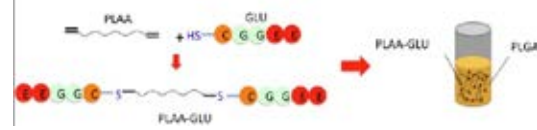
2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

tutunması ve üremesi için geniş yüzey alanı sağlaması ve KD yapısında bulunan kolajen fiberlere benzer yapıda olması sebebiyle KD mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Biyomineralizasyon yöntemi kullanılarak nanolif yapıların kalsiyum-fosfat (CaP) kristalleri ile kaplanması ile oluşan kompozit doku iskelelerinin, nanolif yapıların mekanik özelliği artırıcı yönde etki gösterdiği ve osteokonduktiviteyi artırarak kemik yapı oluşumunu desteklediği belirtilmiştir [8]. KD'de biyomineralizasyon glutamik asitce zengin amino asit dizilerinin oluşturduğu ekstraselüler matris proteinleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir [9]. Yapılan çalışmalarda 2 tekrarlı glutamik asit içeren peptid dizilerinin nanoliflere konjugasyonu sonucunda biyomineralizasyon yöntemi ile tutunan CaP kristallerin miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir [10]. Bu yöntem ile oluşturulacak osteon yapısı benzeri mikro ölçekte 3B mikrotübüler yapıya sahip farklı boyutlarda biyomimetik iskele üretiminin geniş kemik hasarlarının tedavisine kullanılabileceği düşünülmektedir.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

Mineralizasyonu indükleyici EEGGC peptid dizisi Rink Amide NovaGel reçenesi üzerinde sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan reçine ve tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Fmoc-korunmalı amino asit türevleri (1 eq), HOBt (Hidroksibenzotriazol) (2 eq) ve DIC (N,N'-Diisopropilcarbodiimitt) (1.1 eq) DMF (3 ml) içerisinde çözülürüpe reçineye eklenmiştir. Ardından, 0.05 M DMAP'tan (4-Dimetilaminopridin) 0.2 ml eklenip karışım 4-6 saat boyunca 30°C orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Reaksiyona girmemiş aminlerin amin gruplarının tayinini gerçekleştirmek için Kaiser testi yapılmıştır. Fmoc-koruma grubunun uzaklaştırılması için DMF içerisindeki %20'lik piperidin solüsyonu kullanılmıştır. Devamındaki amino asitler de aynı yöntem ile peptid dizisine eklenmiştir. Peptid dizisinin reçineden ayrılması için, reçine %95 TFA/ %2.5 TIPS/ %2.5 H2O karışımına iki saat boyunca bırakılmıştır. Soğuk eter kullanılarak ürünün çökmesi sağlanarak katı faz santrifüj yardımıyla ayrılmış ve dondurarak kurutma yöntemi ile liyofilize edilmiştir.

PLGA-PLAA-EEGGC karışımının hazırlanması için, peptid-PLAA polimer karışımı (2:1 molar oran) sodyum borat buffer (pH 8.5) -DMF (1:1 hacimsel oran) karışımında çözülürüpe oribtal karıştırıcıda 30°C 24 saat reaksiyona tabi tutulmuştur. Karışım distile suya karşı diyalize edilerek kalan karışım liyofilize edilmiştir. <sup>1</sup>H-NMR (Varian Mercury Plus 400, Palo Alto, CA, ABD) ölçümleri yapılarak peptid yapının polimere entegrasyonu kontrol edilmiştir.



Şekil 1. PLAA-GLU konjugasyonu ve nanolif üretim solüsyonunun hazırlanmasının şematik çizimi.

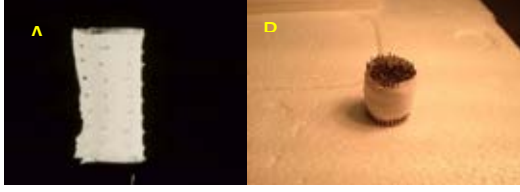
Kemik yapısındaki yönlendirilmiş nanoliflere biyobenzer yapıda nanolif üretimi için PLGA (Polilaktik-ko-glikolik asit 50:50) (%10 hacimsel oran) ve PLAA-CGGEE konjugatı (PLGA miktarının kütlece %1.5) heksafloropropanol içerisinde çözülürüpe elektro-eğirme solüsyonu hazırlanmıştır. Elektro-eğirme yöntemi için üretim parametreleri, 20kV voltaj değeri, 1.1ml/h enjektör itme hızı, 15 cm şırınga-toplayıcı arasındaki uzaklık ve döner silindirin toplayıcı hızı 2500 rpm olarak belirlenmiştir. Nanolif karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI Quanta 250 FEG, FEI Inc., OR, ABD) kullanılmıştır. yapının polimere entegrasyonu kontrol edilmiştir.

Nanolifler üzerinde biyomineralizasyon sürecini hızlandırmak için kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonunun 10 kat artırıldığı vücut sıvısı simülasyonunu (m10SBF) kullanılmıştır. Üretilen fiberler m10SBF içerisinde 24 saat inkübe edilmiştir. Mineralize edilmiş PLGA ve PLGA+PLAA-GLU (GLU) nanoliflerinin biyobozunumlarının belirlenmesi için örnekler yapay vücut sıvısı içinde (SBF, pH=7.4), 37°C'ta, çalkalayıcı etüvde inkübe edilerek her hafta örneklerin kuru ağırlıkları tartılarak takip edilmiştir. Mineralize edilmiş PLGA ve GLU nanoliflerin karakterizasyonu için SEM, EDS ve XRD ( Philips X'Pert PRO, Hollanda) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Mikrotüp demetlerinin üretimi için öncelikle 0.2 mm dış çapa sahip enjektör iğnesi kullanılarak nanolif tabakası alüminyum folyodan ayrılmadan düzenli dairesel por yapıları oluşturulmuştur. Daha sonra, farklı çapta mikrotüplerin elde edilmesi için 0.81, 0.45 ve 0.25 mm dış çapa sahip paslanmaz çelik enjektörler etrafında makro por oluşturulan nanolif tabakaları sarılarak birbirleriyle temas edecek şekilde demetler halinde önceden 80 °C ısıtılmış fırında 10 dakika boyunca tavlama işlemine tabi tutulmuştur. Isıl tavlama işleminden sonra enjektörler dikkatli şekilde çıkartılarak osteon benzeri mikrotüp demetleri elde edilmiştir.

## Biyomalzeme 1

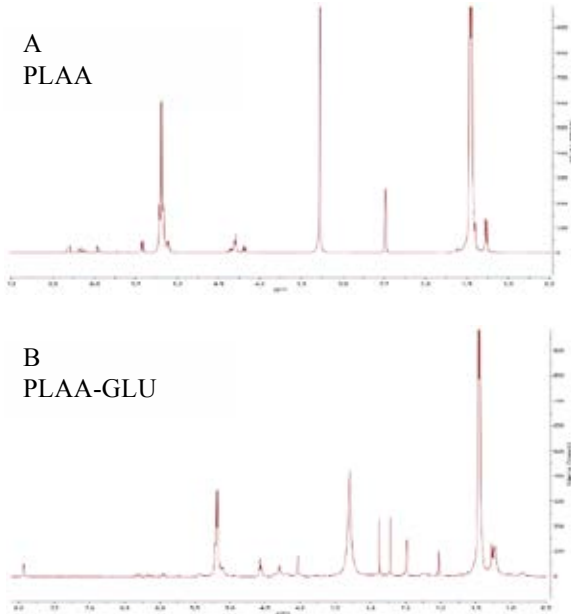
2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma



Şekil 2. (A)perfore edilmiş mineralize nanolif tabakasının enjektör sıringe etrafına sarılması, (B) mikrotüp demetlerinin üretimi için mikrotüplerin ısıtılma işlemine hazır hale getirilmesi.

### III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PLAA ve GLU peptid konjüge edilmiş GLU-PLAA'nın 1H-NMR spektrumu şekil 2A ve 2B'de gösterilmiştir. Elde edilen data MestReNova programı ile analiz edilerek pikler tanımlanmıştır. 2,16 ppm ve 4,56 ppm'deki pikler glutamik asit, 4,15 ppm'deki pik glisin ve 3,25 ppm'deki pik sistin aminoasitlerinin metilen ve methin hidrojen atomlarını betimlemektedir. 5,27 ve 8,04 ppm'deki pikler amine ve amit hidrojene atfedilmiştir. 6,04-6,48 ppm arasındaki pikler PLLA polimerinin akrilik ucundaki vinil hidrojenleri betimlemektedir. 1H-NMR sonuçları GLU peptidin PLAA'ya konjugasyonunu doğrulamaktadır.

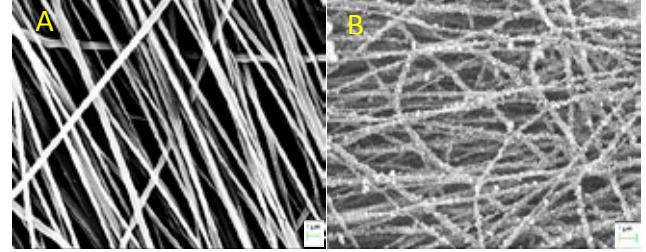


Şekil 3. A) PLAA 1H-NMR spektrumu, B) PLAA-GLU 1H-NMR spektrumu

Nanolif karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak fiberlerin yüzey morfolojisi ve çap dağılımları görüntülenmiştir. Lif çaplarının karakterizasyonu 100 nanolifin çapının NIH Scion ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) görüntü analiz programıyla incelenerek belirlenmiştir. Elde edilen nanolif çaplarının ortalama değeri 218±22 olarak hesaplanmıştır.

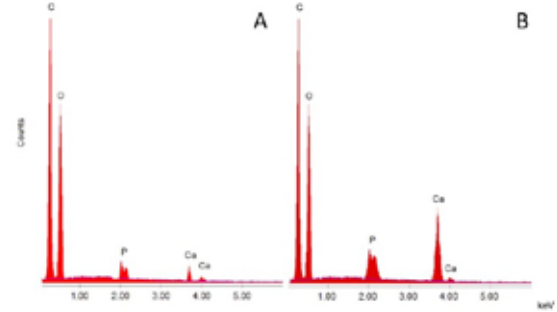
Biyomineralizasyon yöntemi sonrasında EDS analizi ile fiberlerin yüzeyindeki kalsiyum-fosfat (CaP) kristal dağılımı ile Ca ve P miktarlarına bakılarak

haritalandırması yapılmıştır. Biyomineralizasyonu gerçekleştirilen nanoliflerin SEM görüntüleri değerlendirildiğinde GLU örneklerinin üzerinde oluşan CaP çok daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. (A) mineralize edilmiş PLGA nanolif tabakalarının SEM görüntüsü, (B) mineralize edilmiş GLU nanolif tabakalarının SEM görüntüsü.

Ayrıca yapılan EDS analizinde PLGA+PLAA-GLU nanoliflerde biyomineralizasyon sonrasında Ca ve P pikleri elde edilmiş olup haritalama ile elde edilen Ca/P oranının (1.65) hidroksiapatit değerine (1.67) yakın olduğu belirlenmiştir. Mineralize edilmiş PLGA fiberlerinde Ca/P oranının (1,03) (Tablo 1) brushite Ca/P oran aralığında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. (A) mineralize edilmiş PLGA nanolif tabakalarının EDS analizi, (B) mineralize edilmiş GLU nanolif tabakalarının EDS analizi

Element (PLGA)	Ağırlık Konsantrasyonu (%)	Atom Konsantrasyonu (%)
C	51,42	62,24
O	39,61	33,31
Ca	4,53	2,26
P	2,88	2.19

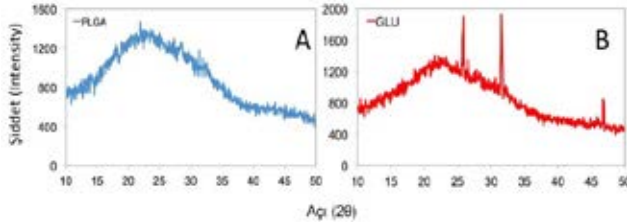
Element (GLU)	Ağırlık Konsantrasyonu (%)	Atom Konsantrasyonu (%)
C	44,32	51,04
O	27,17	28,27
Ca	16,03	12,88
P	12,48	7.81

Tablo 1. Mineralize edilmiş PLGA nanolif tabakalarının EDS analizi, mineralize edilmiş GLU nanolif tabakalarının EDS analizi

## Biyomalzeme 1

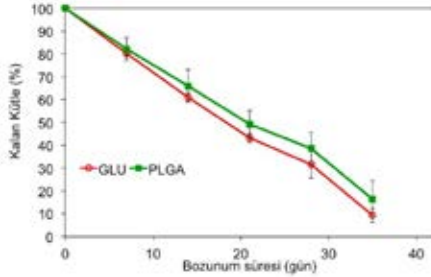
2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

Kristal karakterizasyonu için yapılan XRD analizinde GLU nanoliflerde hidroksiapatite karakteristik pikler ( $2\theta=(25,7-25,9),(31,5-31,8)$  ve  $(46,8-48,9)$ ) belirlenmiştir. XRD sonuçları GLU nanolifler üzerinde oluşan hidroksiapatit benzeri CaP kristallerinin oluşumunu doğrulamaktadır. PLGA nanoliflerde oluşan hidroksiapatit kristallerine özgülük pikler görülmemiştir. (Şekil 6)



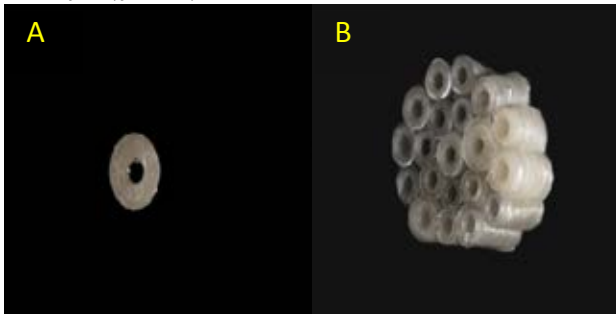
Şekil 6. (A) Mineralize edilmiş PLGA nanolif tabakalarının XRD analizi, (B) mineralize edilmiş GLU nanolif tabakalarının XRD analizi

Bozunuma süreleri incelendiğinde mineralize GLU ile PLGA nanoliflerinin arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Anlamlı fark olmasa da daha hızlı seyreden GLU nanoliflerin bozunumunun hem peptid konjugasyonu hem de mineralizasyonla artan hidrofilisiteye bağlı olduğu düşünülmektedir (Şekil 7).

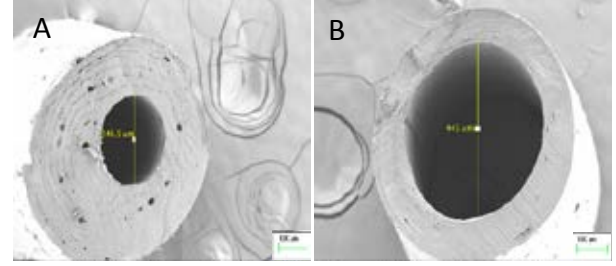


Şekil 7. Mineralize edilmiş PLGA ve PLGA+PLAA-GLU (GLU) nanolif tabakalarının biyobozunumu (Zaman dilimleri: 7,14,21, 28 ve 35 gün).

Mikrotübüler demetlerin oluşturulması için şekil hafızalı alaşım yöntemi kullanılmıştır. Isıl işlem öncesi birbirinden bağımsız mikrotüpler ısı tavlama sırasında kaynama yaparak yoğun mikrotübüler demet yapısı elde edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Üretilen mikrotüplerin kamera görüntüleri. (A) 0,45mm iç çaplı tekli mikrotüp, (B) 0,45mm iç çaplı 20 mikrotüpten oluşan osteon benzeri mikrotüp demetleri.



Şekil 9. Farklı iç çaplarda üretilen mikrotüplerin SEM görüntüleri. (A) 0,25 mm, (B) 0,46 mm

Çalışmanın bir sonraki basamağında üretilen mikrotüplerin mekanik dayanımlarının belirlenebilmesi ve mezenkimal kök hücrelerin (MKH) mikrotüp demetlerinin içine ekilerek osteojenik farklılaşması incelenecektir.

## IV. TEŞEKKÜR

Bu çalışma 214M268 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKÇA

- [1] C. J. Damien and J. R. Parsons, "Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications," *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, pp. 187-208, 1991.
- [2] J. D. Kretlow, S. Young, L. Klouda, M. Wong, and A. G. Mikos, "Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues," *Advanced Materials*, vol. 21, pp. 3368-3393, 2009.
- [3] E. Scheller, P. Krebsbach, and D. Kohn, "Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation," *Journal of oral reh* E. Scheller, P. Krebsbach, and D. Kohn, "Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation," *Journal of oral rehabilitation*, vol. 36, pp. 368-389, 2009.
- [4] J.-H. Jang, O. Castano, and H.-W. Kim, "Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, pp. 1065-1083, 2009.
- [5] P. X. Ma, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, pp. 184-198, 2008.
- [6] V. Beachley and X. Wen, "Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions," *Progress in polymer science*, vol. 35, pp. 868-892, 2010.
- [7] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review," *Tissue engineering*, vol. 12, pp. 1197-1211, 2006.
- [8] J.-P. Chen and Y.-S. Chang, "Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 86, pp. 169-175, 2011.
- [9] Q. Wang, X. Wang, L. Tian, Z. Cheng, and F. Cui, "In situ remineralization of partially demineralized human dentine mediated by a biomimetic non-collagen peptide," *Soft Matter*, vol. 7, pp. 9673-9680, 2011.
- [10] O. Karaman, A. Kumar, S. Moeinzadeh, X. He, T. Cui, and E. Jabbari, "Effect of surface modification of nanofibres with glutamic acid peptide on calcium phosphate nucleation and osteogenic differentiation of marrow stromal cells," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2013.