

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN SİLİSYUM İLE MODİFİYE EDİLMİŞ AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Hilal Deniz YILMAZ

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN SİLİSYUM İLE MODİFİYE EDİLMİŞ AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Hilal Deniz YILMAZ
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: 05/08/2020

Tez Danışmanı:
Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

Hilal Deniz YILMAZ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **05/08/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Kemik Doku Mühendisliği İçin Silisyum ile Modifiye Edilmiş Ayva Çekirdeği Müsilajının Sentezi ve Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN ……
Başkan

Doç. Dr. Uğur CENGİZ ……
Üye

Doç. Dr. Fadime KIRAN …….
Üye

Doç. Dr. Pelin KANTEN
Müdür V.
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Sıra No: ……

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Hilal Deniz YILMAZ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN' a ve çalışma süresince her türlü bilimsel, teknik desteği sağladıkları ve çalışmama değer kattıkları için Doç. Dr. Uğur CENGİZ, Doç. Dr. Fadime KIRAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet CEYLAN' a,

Laboratuvar ortamında ve günlük hayatımda düşünceleri ve yardımlarıyla bana destek olan çok değerli çalışma arkadaşlarım Fatma CAL, Burak KARACA, Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU, Tuğçe KURT, Elif Beyza DEMİRAY, İbrahim SAY ve Ekin ŞİMŞEK' e,

Sunulan tezin düzenlenmesinde ve bu çalışmadan çıkacak olan yayının derlenmesinde tecrübeleri ve fikirleriyle bana destek olan Evren ERTEN' e,

Çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için yürütülen analizlerde değerli bilgi birikimlerini ve zamanlarını benimle paylaştıkları için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, sayın Eda KESKİN' e, sayın Doç. Dr. Hüseyin AYVAZ' a, sayın Arş. Gör. Başar KARACA' ya,

Hayatımın her evresinde bana destek olan biricik annem Filiz Çağlayan YILMAZ' a, akademik hayatımda dahil olmak üzere bana tecrübesi ve bilgi birikimi ile mentörlük yapan değerli babam Emin YILMAZ' a ve canım kardeşim Ahmet Cem YILMAZ' a bana olan destekleri için tüm içtenliğim ile sonsuz şükranlarımı arz ederim.

Dünya sağlık örgütünün Mart 2020 tarihinde covid-19 virüsü için pandemi ilan etmesi ile beraber ülkemiz ve tüm dünyada seyreden salgın maalesef pek çok kişinin hayatını kaybetmesine ya da çeşitli sağlık sorunları yaşamasına neden olmuştur. Ancak bu süreç tüm insanlığa bir kez daha bilimin, biyomühendisliğin, biyoteknolojik araştırma ve üretime dair yatırımlarının ne denli önemli olduğunu göstermiştir. Bir biyomühendis olarak tez dönemimin böyle bir zamana denk gelmesi kişisel olarak bana alanımdaki çalışmaların ne kadar önemli olabileceğini göstermiştir. Bu süreç boyunca tez araştırmalarımı tamamlayabilmemde bana destek olan herkese teşekkürlerimi sunarım.

Hilal Deniz YILMAZ

Çanakkale, Ağustos 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

3B	Üç boyutlu
AÇJ	Ayva çekirdeği jeli
Si-AÇJ	Silika ile modifiye ayva çekirdeği jeli
ATR-FTIR	Zayıflatılmış toplam yansıtmalı-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
^{29}Si-MAS-NMR	Silisyum nükleer manyetik rezonans spektrometresi
XRD	X-ışını difraktometresi
TGA	Termogravimetrik analiz
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskop
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi
BET	Brunauer-Emmett-Teller analizi
BJH	Barratt-Joyner-Halenda
HK	Histokimyasal
İHK	İmmünohistokimyasal
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
KDM	Kemik doku mühendisliği
DM	Doku mühendisliği
HDM	Hücre dışı matriks
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler
MTT	3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-Difeniltetrazolium Bromür
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Fe	Demir
Mg	Magnezyum
Ti	Titanyum
Ta	Tantalyum
Ni	Nikel
Ca	Kalsiyum
Mn	Manganez
HA	Hidroksiapatit
TCP	Trikalsiyum fosfat

PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit
PLGA	Poli (laktik asit-ko-glikolik asit)
PCL	Polikaprolakton
PVA	Polivinil alkol
Na	Sodyum
K	Potasyum
Cu	Bakır
Zn	Çinko
TiO_2	Titanyum dioksit
SiO_2	Silisyum dioksit
N_2O	Azot protoksit
CaO	Kalsiyum oksit
P_2O_5	Fosfor pentoksit
$SiCl_4$	Silikon tetraklorit
TEOS	Tetraetil ortosilikat
PO_4^{-3}	Fosfat
$Si(OH)_4$	Silisik asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	Genel Olarak Güvenilirdir Sertifikası
γ-Fe_2O_3	Maghemit
OH^-	Hidroksil
RB	Remazol siyah
Cd(II)	Kadminyum
GPTMS	Glikodoksi propil trimetoksisilan
EDC	N-etilkarbodiimid hidroklorür
NHS	N-hidroksisüksinimid
MES	2- (N-morfolino) etansülfonik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
V	Hacim
m	Kütle
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
2B	İki boyutlu

DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fötal sığır serumu
P/S	Penisilin/streptomisin
UV	Ultraviyole
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
G	G-kuvveti
P	Basınç
NaN_3	Sodyum azid
NAD(P)H	Adenin dinükleotit fosfat
Au	Altın
Pd	Paladyum
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HIER	Isı ile indüklenmiş antijen geri kazanım tekniği
OPN	Osteopontin
ON	Osteonektin
OK	Osteokalsin
ALP	Alkalen fosfataz
H&E	Hematoksilen ve eozin
$Na_2S_2O_3$	Sodyum tiyosülfat
pureZOL™	Fenol ve guanidinyum tiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi
RNAaz	Ribonükleaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
T_m	Erime sıcaklığı
Ct	Eşik döngü sayısı
NK	Negatif kontrol
COL1A1	Kollajen tip 1 A 1
rTEOS	Re-aktive edilmiş TEOS
RUNX2	Runx transkripsiyon faktör 2
°C	Derece Santigrat

°K	Derece Kelvin
µl	Mikro litre
nm	Nanometre
n	Eleman sayısı
w/w	Kütlece oran
X	Büyütme oranı
Ag_3PO_4	Gümüş fosfat

ÖZET

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN SİLİSYUM İLE MODİFİYE EDİLMİŞ AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Hilal Deniz YILMAZ
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

05/08/2020, 114

Kemik travmaları ve osteoporoz gibi yaşa bağlı kemik hastalıklarının tedavisi için geliştirilen kemik greftleri incelendiğinde biyolojik olarak aktif, üç boyutlu (3B) matrikslerin tasarımı ve üretiminin önemli bir yere sahip olduğu anlaşılacaktır. 3B doku ikamelerinin üretimi ile ilgili yapılan son çalışmalar bitki bazlı polimerlerin değerli biyokimyasal özellikleri, sürdürülebilirliği ve ekonomik bir kaynak olması nedeniyle avantajlı ve tercih edilen biyomalzemeler olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada bir bitkisel polisakkarit çeşidi olan ayva çekirdeği jeli (AÇJ), silika ile modifiye edilerek (Si-AÇJ) kemik doku mühendisliği (KDM) uygulamaları için 3B gözenekli yapılar inşa edilmiştir. Hibrit malzemenin oluşturulması için mikrodalga destekli sol-jel yöntemi kullanılmıştır ve gözenekli formda yapıların üretimi için dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır. Bu nedenle üretilen 3B yapılar "kriyojel" olarak isimlendirilmiştir. Geliştirilen materyaller reolojik testler, zayıflatılmış toplam yansıtmalı-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre (ATR-FTIR) analizi, katı hal silisyum nükleer manyatik rezonans spektrometre (^{29}Si-MAS-NMR) analizi, X-ışını difraktometresi (XRD), termogravimetrik kalorimetre analizi (TGA), taramalı kalorimetre analizi (DSC), mekanik basma dayanımı testleri, porozite testleri, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobi (FE-SEM) görüntüleri, enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDX) ve elemental haritalama analizi, şişme ve yüzey ıslanabilirlik testleri, Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi, Barratt-Joyner-Halenda (BJH) analizi ve biyobozunurluk testleri ile detaylı olarak karakterize edilmiştir.

Ayrıca üretilen kriyojeller 7, 14 ve 21 gün boyunca *in vitro* hücre kültürü koşullarında hücreler ile etkileştirilerek hücre canlılık testleri yapılmıştır. Böylece malzemenin *in vitro* biyouyumluluğu ve toksisitesi incelenmiştir. Malzeme üzerindeki osteojenik farklılaşma süreci yapılan histokimyasal (HK) ve immünohistokimyasal (İHK) boyamalar ile gözlemlenip gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi ile incelenmiştir.

Yapılan analizlerin sonuçlarına göre genel olarak Si-AÇJ kriyojellerinin AÇJ ile oluşturulan kriyojellerden daha yüksek yüzey alanına sahip olduğu, mekanik ve termal dayanımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen *in vitro* deneylerin sonuçlarına göre, Si-AÇJ kriyojellerinde osteogenez ile ilintili genlerin AÇJ kriyojellerine göre daha erken dönemde ve daha fazla ifade edildiği anlaşılmıştır. Tüm bu sonuçlara dayanarak, Si-AÇJ kriyojellerinin KDM uygulamaları için yeni ve önemli bir hibrit malzeme olarak literatüre kazandırıldığı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Ayva Çekirdeği Jeli, Mikrodalga Destekli Sol-Jel Reaksiyonu, TEOS, Kriyojel, Kemik Doku Mühendisliği

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SI-MODIFIED QUINCE SEED MUCILAGE BASED BIOSCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Hilal Deniz YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Institute of Graduate Education

Master of Science Thesis in Bioengineering and Material Engineering

Advisor: Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

05/08/2020, 114

When the bone grafts developed for the treatment of bone diseases such as bone traumas and age-related osteoporosis were examined, it would be observed that the design and production of biologically active, three-dimensional (3D) matrixes take an critical importance. The recent studies about the production of 3D tissue substitutes were revealed that the plant-based polymers are advantageous and preferred biomaterials due to their valuable biochemical properties, sustainability, and being economic sources.

In this study, the quince seed gel (QSG), a type of herbal polysaccharide, was modified with silica nanoparticles (Si-QSG) and 3D porous structures were constructed for bone tissue engineering (BTE) applications. The microwave-assisted sol-gel method was used to create hybrid material and the freeze-drying method was used for the production of porous structures. For this reason, the obtained 3D structures were named as "cryogel". The developed structures were characterized in-depth via rheological tests, attenuated total reflective-Fourier transform infrared spectrometer (ATR-FTIR) analysis, solid-state silicon nuclear magnetic resonance spectrometer (^{29}Si-MAS-NMR) analysis, X-ray diffractometer (XRD), thermogravimetric calorimeter analysis (TGA), scanning calorimeter analysis (DSC), mechanical compressive strength tests, porosity tests, field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) images, energy dispersive X-ray spectrometry (EDX) and elemental mapping analyses, swelling and surface wettability tests, the Brunauer-Emmet-Teller analysis (BET), Barratt-Joyner-Halenda (BJH) analysis and biodegradability tests.

In addition, the cryogels were interacted with the cells under *in vitro* cell culture conditions for 7, 14, and 21 days, and the cell viability tests were performed. Thus, the *in*

vitro biocompatibility and toxicity of the material were investigated. The osteogenic differentiation on the material was monitored by the histochemical (HC), immunohistochemical (IHC) staining, and analysed by the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

According to the results from the analyses, the Si-QSG cryogels were generally have a higher surface area than QSG formed cryogels and they have a higher mechanical and thermal resistance. Also, the results of the *in vitro* experiments showed that the osteogenesis related genes were expressed earlier and denser in Si-QSG cryogels. Based on all of these results, it is thought that the Si-AÇJ cryogels may present to the literature as a new and important hybrid material for BTE applications.

Keywords: Quince Seed Gel, Microwave Assisted Sol-Gel Reaction, TEOS, Cryogel, Bone Tissue Engineering

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET ix
ABSTRACT xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xvi
TABLOLAR DİZİNİ xviii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1. İnsan Kemik Dokusu ve Anatomisi 4
1.2. Kemik Matriksi ve Kemik Hücreleri 6
1.3. Kemik Greftleri ve DM Yaklaşımı 8
1.4. Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler 13
1.5. Biyomalzemeler İçin Yenilenebilir Doğal Kaynaklar 20
1.6. Biyomedikal Bir Meyve Olarak Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) 23
1.7. AÇJ ve Biyomedikal Uygulamaları 26
1.8. Silisyum Elementi ve KDM Uygulamaları 28
1.9. Biyomedikal Uygulamalarda Sol-Jel Metodu ve Kriyojel Yapılar 31
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 38
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 43
3.1. Materyal 43
3.2. Yöntem 43
3.2.1. Ayva Çekirdeği Jelinin Üretimi ve Liyofilizasyon İşlemi 43
3.2.2. AÇJ Temelli 3B Kriyojel Yapılarının Üretimi 44
3.2.3. Si-AÇJ Hibrit Materyalinin Oluşturulması ve Kriyojel Üretimi 45
3.2.4. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerin Çapraz Bağlanması 47
3.2.5. AÇJ ve Si-AÇJ Yapılarının Karakterizasyonu 48
3.2.6. Si-AÇJ Hidrojellerinin Reolojik Davranışının İncelenmesi 49
3.2.7. Zayıflatılmış Toplam Yansıtmalı – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre Analizi (ATR-FTIR) 50

3.2.8. Katı Hal Silisyum Nükleer Manyetik Rezonans Spekstoskopisi (^{29}Si-CP-MAS NMR) 50
3.2.9. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD) 50
3.2.10. Malzemelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri 50
3.2.11. Kriyojellerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi 51
3.2.12. Kriyojellerin Porozitelerinin Belirlenmesi 51
3.2.13. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskop Analizi (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS) 51
3.2.14. Şişme Testi 52
3.2.15. Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi 52
3.2.16. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri 52
3.2.17. Biyobozunurluk Testi 52
3.2.18. Hücre Kültürü Uygulaması ve Kriyojellerin *in vitro* Canlılık Testi 53
3.2.19. Hücrelendirilmiş Kriyojel Yapılarının Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama) 58
3.2.20. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler 58
3.2.21. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi 60
3.2.22. İstatistiksel Analiz 66
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 67
4.1. Hibrit Materyallerin Üretiminin Optimizasyonu 67
4.2. Si-AÇJ Hidrojellerinin Reolojik Özellikleri 69
4.3. Fizikokimyasal Karakterizasyon: ATIR- FTIR, ^{29}Si-CP-MAS NMR ve XRD Analizleri 71
4.4. Termal Karakterizasyonlar: TGA ve DSC Analizleri 75
4.5. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerinin Mekanik Özellikleri 78
4.6. Kriyojellerinin Gözeneklilik ve Islanabilirlik Özellikleri 79
4.7. Kriyojellerinin Spesifik Yüzey Alanı Ölçümü 81
4.8. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerin Biyobozunurluk Özellikleri 82
4.9. Kriyojellerin *In Vitro* Değerlendirilmesi: Hücre Canlılık Testi 83
4.10. FE-SEM Analizi ve Hücrelerin Kriyojel Yapıları Üzerindeki Morfolojileri 85
4.11. Osteojenik Farklılaşmanın Takibi: HK ve İHK Boyamalar 87
4.12. Osteogenez ilişkili genlerin ekspresyonu: RT-qPCR Analizi 89
BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER.....92
KAYNAKLAR.....95
ÖZGEÇMİŞ..... I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. İnsan kemiğinin temsili hiyerarşik yapısı (Burr ve Allen, 2013) 5
Şekil 2. Sağlıklı bir insan kemik yapısının bileşenleri (Burr ve Allen, 2013) 6
Şekil 3. Kemik iliği ve kemik matriksi hücre çeşitleri (Qadura ve diğerleri, 2018) 7
Şekil 4. Kemik matriks hücreleri (McGuire, 2020) 8
Şekil 5. DM uygulamaların dayandığı temel unsurlar (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013) . 11
Şekil 6. Hücre kültürü plastiği yüzeyindeki fibroblastik morfolojideki iAMKH'leri 12
Şekil 7. PubMed verilerine göre 1993-2020 mayıs tarihleri arasındaki KDM alanıyla ilgili yayınlanan çalışmaların sayısı (PubMed, 2020) 13
Şekil 8. KDM iskelelerinde bulunması gereken özellikler, yapısal özellikler, kullanılan hammadde ve içeriği, temel üretim metotları ve KDM'nin amaçları (Roseti ve diğerleri, 2017) 15
Şekil 9. DM alanında en sık kullanılan doğal kaynaklı polisakkaritler ve bu materyaller ile yayımlanan makalelerin yıllara göre dağılımı (Tchobanian, Van Oosterwyck, ve Fardim, 2019) 20
Şekil 10. Yenilenebilir doğal materyallerin DM uygulamalarında kullanımı (Nguyen ve Camci-Unal, 2020) 21
Şekil 11. Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) çiçeği ve meyvesi (Sabir ve diğerleri, 2015) ... 24
Şekil 12. Ayva yapısında bulunan organik asitler (Sabir ve diğerleri, 2015) 25
Şekil 13. Silisyum elementinin KDM alanındaki olası kullanım şekilleri (Eivazzadeh-Keihan ve diğerleri, 2020) 29
Şekil 14. Biyocam (45S5) materyali ve yüzeyinde meydana gelen değişimler (Ayotte, Steven, Velez, 2016) 30
Şekil 15. Sol-jel metodu ile silika nanopartiküllerin sentezi (S.-W. Ha, Weitzmann, ve Beck, 2013) 32
Şekil 16. TEOS ile alkali ortamda gerçekleşen sol-jel reaksiyonu ve nanopartiküllerin zincirleme büyümesi (Masalov, Sukhinina, Kudrenko, ve Emelchenko, 2011) 33
Şekil 17. Silika nanopartiküllerin biyomedikal alanda kullanım zaman çizelgesi ve bu konu hakkında yayımlanan çalışmaların yıllara göre dağılımı (Chen, Chen, ve Shi, 2013) 35
Şekil 18. Sol-jel metodu ile 3B hibrit yapıların elde edilmesi (Zhao ve diğerleri, 2018) 37
Şekil 19. Ayva meyvesi (*Cydonia Oblonga* Mill) ve jel üretilmek üzere ayıklanan ayva çekirdekleri 43
Şekil 20. Ayva çekirdeklerinden jel ekstraksiyonu ve liyofilizasyon işlemi 44
Şekil 21. TEOS solüsyonunun asit katalizörlü ortamda hidrolizi ve rTEOS eldesi 45
Şekil 22. Hibrit Si-AÇJ jel yapılarının elde edilmesi 46
Şekil 23. Çapraz bağsız AÇJ, Si-AÇJ ve çapraz bağlanmış Si-AÇJ kriyojel yapıları 48
Şekil 24. Si-AÇJ hidrojellerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesi 49
Şekil 25. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin biyogüvenlik kabini içinde UV (254 nm) ışınlar ile sterilizasyonu 54
Şekil 26. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin hücre kültürü well-plate dizilimleri 56
Şekil 27. Hücre canlılığı testi. (a) MTT reaktifinin mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi (b) Hücre kültürü periyodunun 7., 14. ve 21. günlerinde MTT testleri yapılan AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri 57
Şekil 28. mRNA izolasyon protokolü (a) AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA eldesi (b) Kontrol grubu olarak kullanılan P7'de dondurulmuş iAMKH'lerin mRNA izolasyon aşamaları 62
Şekil 29. RT-qPCR yapılacak genlerin uygun T_m değerlerine göre yerleştirilmiş plaka tasarımları (GAPDH: gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, ALP: alkalen fosfataz, RUNX2:

runx transkripsiyon faktör 2, OK: osteokalsin, ON: osteonektin, OPN: osteopontin, COL1A1: kollajen tip 1 A1, NK: negatif kontrol)....65
Şekil 30. Si-AÇJ hibrit materyalinin üretiminin optimizasyonu. Farklı AÇJ ve rTEOS konsantrasyonlarının denenmesi....68
Şekil 31. Si-AÇJ hibrit tozunun farklı baz konsantrasyonlarında çözündürülerek elde edilen 3B yapıların morfolojik olarak incelenmesi....69
Şekil 32. Si-AÇJ jellerinin reolojik frekans taraması....70
Şekil 33. Si-AÇJ hidrojellerinin reolojik sıcaklık taraması....71
Şekil 34. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapıların ATR-FTIR spektrumları....72
Şekil 35. Si-AÇJ hibrit yapısının bağlarının temsili gösterimi....73
Şekil 36. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının ^{29}Si-CP-MAS NMR spektrumları....73
Şekil 37. Si-AÇJ kriyojel yapıları ve 30000X büyütmedeki FE-SEM görüntüsü (Ölçek çubuğu 100 nm'yi göstermektedir. Sarı ok yüzey üzerinde homojen dağılmış nano silika partikülleri göstermektedir)....74
Şekil 38. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının XRD spektrumları. (*) XRD taramasında elde edilen en yüksek sinyal şiddetini işaret etmektedir....75
Şekil 39. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının TGA ve DTG spektrumları....76
Şekil 40. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının DSC spektrumları. (*) Bozunma eğrisindeki maksimum pik değerlerini göstermektedir....77
Şekil 41. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapılarının FE-SEM kesit görünümleri ve por çapları. (a) AÇJ kriyojeli por çapı ve 2500X büyütmedeki görünümü. (b) Si-AÇJ kriyojeli por çapı ve 2500X büyütme altındaki görünümü. (Ölçek çubuğu por çaplarının gösterildiği resimlerde 100 µm'yi; 2500X büyütmenin olduğu resimlerde 10 µm'yi belirtmektedir.)....80
Şekil 42. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin temas açısı cihazı ölçüm görüntüleri (kırmızı oklar su damlatılmasıyla beraber kriyolojel yapısındaki değişimleri göstermektedir)....81
Şekil 43. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin 7 ve 14 günlük periyotta biyobozunurluk değerleri. (*: $p<0,05$; ♀: $p>0,05$)....82
Şekil 44. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin 7, 14 ve 21 günlük hücre kültürü işleminin sonunda yapılan hücre canlılığı (MTT) testi sonuçları. (*: $p<0,05$; ♀: $p>0,05$)....84
Şekil 45. FE-SEM ile çekilmiş iAMKH'lerin 7, 14 ve 21. günlerde kriyojel yapıları üzerindeki morfolojileri. (a) AÇJ kriyojeli üzerindeki hücrelerin 7, 14 ve 21. gündeki görünümleri. (b) Si-AÇJ kriyojeli üzerindeki hücrelerin 7, 14 ve 21. gündeki görünümleri. (Ölçek çubuğu 10 µm'yi göstermektedir. Kırmızı ok hücresel yapıyı, sarı ok matriks yapısını göstermektedir)....85
Şekil 46. Hücre kültürü periyodunun sonunda AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin elemental haritalaması ve FE-SEM EDX analizleri. (a) Hücreli AÇJ kriyojeli yüzeyi ve EDX analizi. (b) Hücreli AÇJ kriyojeli P ve Ca elemental haritası. (c) Hücreli Si-AÇJ kriyojeli yüzeyi ve EDX analizi. (d) Hücreli Si- AÇJ kriyojeli P ve Ca elemental haritası. (Ölçek çubuğu 5 µm'yi göstermektedir. Kırmızı ok osteojenik hücresel yapıları, sarı ok Ca ve P içeren hidroksiapatit benzeri kristal yapıları göstermektedir)....86
Şekil 47. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinde osteojenik farklılaşmanın HK ve İHK boyamalar ile incelenmesi (Ölçek çubukları 100 µm'yi göstermektedir.)....88
Şekil 48. Kriyojellerideki RT-qPCR analizine göre hesaplanan osteokalsin (OK), osteopontin (OPN), osteonektin (ON), kollajen tip 1 A1 (COL1A1), runx transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) ve alkalen fosfataz (ALP) genlerinin ekspresyon seviyeleri....91

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 Kemik doku hasarı tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemik biyomalzemeleri ve bu biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları (Pereira ve diğerleri, 2020) 10
Tablo 2 İnsan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücrelerin pozitif ve negatif belirteçleri (Can, 2013) 13
Tablo 3 KDM'nde kullanılan bazı sentetik polimerler ve özellikleri 17
Tablo 4 Yenilenebilir biyomalzemeler, uygulama alanları, sundukları avantaj ve dezavantajları 22
Tablo 5 Taze ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) meyvesinin kimyasal bileşenleri (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016a; T.Erdoğan, T.Gönenç, 2012) 25
Tablo 6 Ayva çekirdeği bileşenleri (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016) 26
Tablo 7 cDNA sentez kiti bileşenleri (BIORAD kat. No #1708890) 62
Tablo 8 RT-qPCR'da kullanılan ileri ve geri primerler, gen dizilimleri ve boyutları (Kang ve diğerleri, 2013; Knippenberg ve diğerleri, 2007; Yanai ve diğerleri, 2019) 63
Tablo 9 Mekanik Basma Testi 78
Tablo 10 Kriyojellerin gözeneklilik ve ıslanabilirlik özellikleri 79
Tablo 11 BET-BJH analiz sonuçları 81

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Malzeme bilimindeki ilerlemeler, yeni nesil fonksiyonel biyomalzemelerin geliştirilmesini ve üretilmesini sağlayarak doku mühendisliği (DM) çalışmalarının medikal uygulamalardaki başarısını arttırmıştır. Literatürdeki doku mühendisliği çalışmaları incelendiğinde, doğal ve hibrit biyomalzemelerin sahip olduğu üstün biyouyumluluk özellikleri, hücre dışı matriks (HDM) yapısını taklit edebilme yetenekleri, ekonomik ve sürdürülebilir nitelikte kaynaklar olmaları nedeniyle sıkça tercih edilen materyaller olduğu görülmektedir (Ratner ve Hoffman, 2013; Tchobanian, Van Oosterwyck, ve Fardim, 2019). Doğal biyomalzemelerin medikal ve endüstriyel alanlarda kendine geniş bir kullanım alanı bulması, doğal biyomalzemelerin yakın bir zamanda sentetik kökenli malzemelerin yerini alabileceğini düşündürmektedir (Mozammil Hasnain, Hasnain, ve Nayak, 2019). Deniz süngerleri, yumurta kabukları (Arslan ve diğerleri, 2017; Wu ve diğerleri, 2019), meyve posası (Yates ve diğerleri, 2017), hücrelerinden arındırılmış bitki veya hayvan dokuları (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016; Gershlak ve diğerleri, 2017), denizanası kollajeni (Derkus ve diğerleri, 2016) ve insan saçı keratini (Arslan ve diğerleri, 2017) gibi pek çok farklı nitelikte organik biyomalzeme, çeşitli modifikasyonlar sonucunda DM uygulamalarının değişik alanlarda oldukça başarılı sonuçlar verecek şekilde kullanılmışlardır.

Fonksiyonel biyomalzemelerin çeşitli medikal ve endüstriyel alanda kullanımı, insan sağlığını ve toplum refahını arttıracak gelişimlere yol açmış ve toplumların ortalama ömür beklentisini arttırmıştır (A. Kumar, Srivastava, ve Jain, 2010). Ancak uzayan insan ömrü ve yaşlanan nüfus beraberinde kemik rahatsızlıkları gibi önemli sağlık problemlerinin toplumdaki seyrinde artışa neden olmuştur. Örneğin, klinik olarak Dünya genelinde sadece bir yıl içinde ortalama 2 milyon kemik greftleme işlemi yapılmaktadır ve bu oran gelişmiş ülkelerde her geçen yıl artmaktadır (Bohner, 2010; Dang ve diğerleri, 2018). Klinik olarak kemik rekonstrüksiyon işlemlerinde altın standart "otogreftleme işlemi" olarak kabul edilmesine rağmen; sahada yaşanan donör eksikliği, tekrarlanan ameliyat gereksinimleri, enfeksiyon tehdidi ve hastanın immünojenik yanıt geliştirebilme riskleri gibi pek çok dezavantajın bulunması kemik doku mühendisliği (KDM) uygulamaları gibi yeni nesil alternatif çözüm arayışlarına neden olmuştur (Barati ve diğerleri, 2019; Lichte ve diğerleri, 2011). Günümüzde KDM uygulamaları için pek çok farklı sentetik, doğal veya hibrit kökenli

biyomalzeme geliştirilmiştir. Bu malzemelerin bir kısmı klinik olarak kullanımda olup bir kısmı *in vitro* veya *in vivo* test aşamasındadır.

Kemik hasarlarında konvansiyonel olarak kullanımda olan materyaller genel olarak metaller, sentetik polimerler ve seramik temelli malzemelerdir (Campana ve diğerleri, 2014; Lichte ve diğerleri, 2011). Bu tür malzemelerin mekanik özellikleri üzerinde istenilen şekilde kontrol sağlanabilmekte ve kemik dokusu içinde uzun süreli dayanıklılık sergileyebilmektedir. Ancak, fizyolojik koşullarda düşük emilim ve statik davranış göstermeleri nedeniyle, hasarlı dokuda neo-kemik oluşumunu olumsuz şekilde etkileyebilmektedirler (Erten ve Arslan, 2018). Ayrıca bu tür malzemelerin biyolojik olarak canlı dokularca tanımlanamaması ve zamanla korozyona veya bozunmaya uğraması sonucunda ortaya toksik yan ürünlerin çıkması beraberinde çeşitli sağlık problemlerinin gelişmesine de yol açabilmektedir (Y. Zhang ve diğerleri, 2019). Diğer bir yandan polisakkaritler, fizyolojik ortamda sergilediği hücre duyarlı bozunma kinetikleri ve biyoaktif bileşenleri nedeniyle kemik doku tamiri için avantajlı biyomalzemeler olarak kabul edilmektedir. Doğada en sık karşılaşılan polimer çeşidi olmaları, biyouyumlu olmaları ve hücrelerde çeşitli biyolojik yolakların uyarılmasını sağlayan biyoaktif özellikleri nedeniyle polisakkaritler, doğal polimerler arasında ön plana çıkmaktadır (Iravani ve Varma, 2019; Khan ve Ahmad, 2013). Polisakkaritlerin doğadaki engin çeşitliliği arasında KDM uygulamalarında en çok tercih edilen türleri genel olarak hyalüronik asit, kondroitin sülfat, heparin, aljinat ve kitosan polimerleridir (Bose, Roy, ve Bandyopadhyay, 2012; Gümüşderelioğlu ve Aday, 2011; H. D. Kim ve diğerleri, 2017). Ancak hyalüronik asit, kondroitin sülfat ve heparin gibi hayvan-kaynaklı polisakkaritlerin hastalık unsurlarını taşıma riski bulunmaktadır ve bazı hastalarda immünojenisiteye (host-tepkisi) neden olmaktadır (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013). Aljinat ve kitosan gibi biyopolimerler ise literatürde KDM uygulamalarında sıkça kullanılan doğal kaynaklı malzemelerdendir. Ancak bu malzemelerin, kemik dokusu için uzun vadede yeterli stabilite gösterememeleri ve mekanik olarak düşük dayanıma sahip olmaları sayılabilecek en temel dezavantajlarından biridir (Croisier ve Jérôme, 2013; K. Y. Lee ve Mooney, 2012).

Öte yandan bitkiler alemi, sahip olduğu sonsuz sayılabilecek çeşitlik sayesinde biyomedikal uygulamalar için pek çok farklı nitelikte polimeri araştırmacılara sunmaktadır. Günümüzde bitkisel salgıların kendisi veya içerisindeki etken maddelerin özütlenmesiyle geliştirilmiş birçok ilaç, biyo-sensör ve tıbbi malzeme bulunmaktadır. Son zamanlarda, sahip oldukları biyoaktif özellikleri, doğadan ucuz yollu ve kolayca elde edilebilmeleri gibi avantajları nedeniyle bitkisel jeller (müsilaj) ve zamklar biyomedikal araştırmalarda dikkat

çeken başlıklardan biri haline gelmiştir (Mozammil Hasnain, Hasnain, ve Nayak, 2019). Bu anlamda ayva çekirdeği (*Cydonia oblonga* Mill) jeli de yeni nesil polimerlerin biyomedikal alanda kullanımına önerilebilecek nitelikte doğal bir polisakkarit kaynağıdır. Evrimsel süreç boyunca ayva çekirdekleri hücre canlılığını sürdürebilmek ve patojenlerden korunabilmek için oldukça yüksek hidrofilik özellik gösteren polisakkarit temelli özel bir salgı (jel) geliştirmiştir. Geleneksel Türk ve İran tıbbında ayva çekirdeklerinden elde edilen bu jel yapısı hasta kişilere verilerek bağırsak düzenleyici, öksürük şurubu ve yara merhemi olarak çeşitli medikal uygulamalarda kullanılmıştır. Günümüzde AÇJ ile yapılan bilimsel analizler neticesinde AÇJ'nin anti-inflamatuar (Shinomiya, Hamazu, ve Kawara, 2009), anti-hemolitik (Magalhães ve diğerleri, 2009) ve rejeneratif (Hemmati ve diğerleri, 2012) özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Jelin bulunduğu ortamdaki farklı pH ve iyon uyaranlarına karşı duyarlı yapıda oluşu, çekirdek gibi besin artıklarından elde edilmesi ve dolayısıyla çevreci, sürdürülebilir ve ekonomik bir kaynak olması nedeniyle AÇJ biyomedikal uygulamalar için umut vadeden yeni nesil biyomalzemeler arasında nitelendirilebilir (Hussain, Muhammad, Haseeb, ve Tahir, 2019; Izadyari Aghmiuni, Heidari Keshel, ve Sefat, 2020).

AÇJ ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020), DM uygulamaları için AÇJ polimerinden 3B gözenekli yapılar elde edilmiş ve insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH) ile etkileştirilerek malzemenin biyouyumluluğu test edilmiştir. Malzemenin biyouyumlu karakter göstermesinin yanında, hücre canlılığını ve proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiş, morfolojisinin oldukça gözenekli ve lifsi yapıda olduğu ve malzemenin yüksek seviyede sıvı tutma kapasitesinin olduğu tespit edilmiştir. Ancak polimerin aşırı hidrofilik yapıda olması, 3B AÇJ yapıları üzerlerine ekilen kök hücrelerin malzemeye yeteri kadar tutunamamasına neden olmuştur ve hücrelerin birbirlerine tutunarak malzeme içinde küresel formlar oluşturduğu belirtilmiştir (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020). AÇJ biyopolimerinin avantajlı özelliklerinin, KDM uygulamaların da kullanılabilmesi için AÇJ'nin mekanik özelliklerinin ve aşırı hidrofilik yüzey özelliklerinin kemik morfolojisini taklit edecek şekilde birtakım iyileştirilmelerin yapılması gerekmektedir. İnorganik silika moleküllerinin AÇJ yapısına entegrasyonu, bu sorunun üstesinden gelmek için uygun bir çözüm sunabilir.

Silisyum, insan vücudunda üçüncü sırada bulunan bir eser elementtir. Bağ doku, kıkırdak doku ve kemik dokusunda kollajen liflerinin üretimi için gerekli olan silisyum, sinir ve sindirim sisteminde de düzenleyici olarak görev alan bir iz elementtir (Arora ve Arora, 2017). Silisyum elementinin biyolojik dokularla uyumlu oluşu ve osteoindüktif özellikler

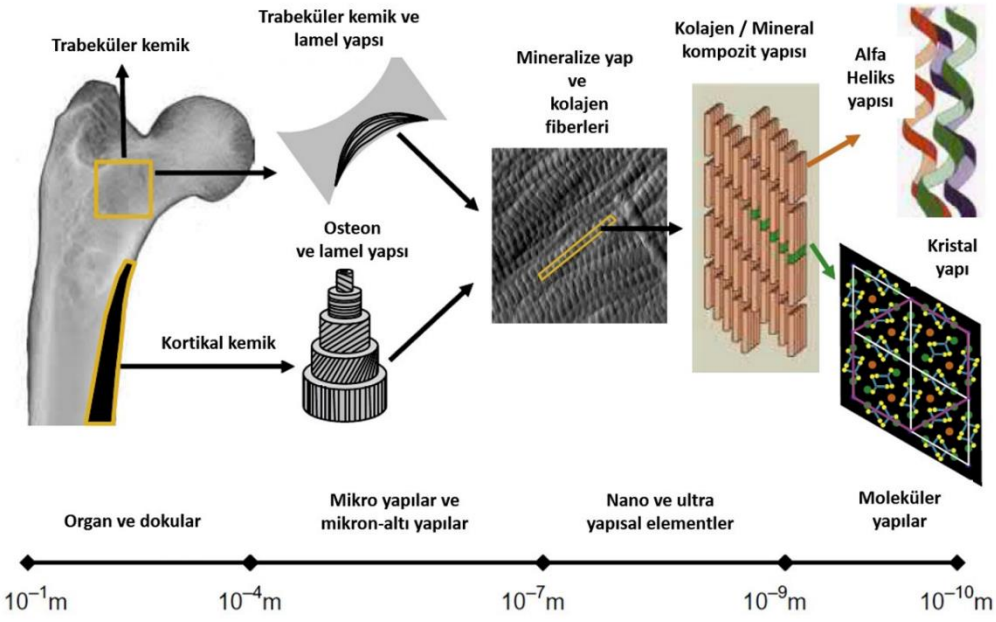
sergilemesi, pek çok farklı KDM uygulamalarında (kemik çimentosu, biyocam) kullanılmasına yol açmıştır (Boccardi, Liverani, ve Boccaccini, 2019; S. W. Ha, Viggeswarapu, Habib, ve Beck, 2018). Sol-jel metodu ile silika-doğal polimer hibritlerinin inşası, silisyum elementinin malzeme bilimindeki bir başka önemli uygulamasıdır. Bu yöntem sayesinde, doğal polimerin sunduğu avantajlar (biyouyumluluk, biyoaktiflik, esneklik) ve inorganik silika moleküllerinin sağladığı yararlar (mekanik dayanım, osteoindüktif etkiler) tek bir hibrit yapıda birleştirilebilmektedir (S. Zou ve diğerleri, 2008).

Bu tez çalışmasında KDM uygulamaları için AÇJ polimeri inorganik silika molekülleri ile modifiye edilerek 3B hibrit biyomalzemeler üretilmiştir. Böylece AÇJ polimeri ve silika moleküllerinin osteobiyolojik özellikleri birlikte değerlendirilmiştir. Üretilen hibrit materyal, AÇJ polimerinin silika ile modifikasyonu sonucu oluştuğu için "Si-AÇJ" olarak isimlendirilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışması neticesinde, hibrit Si-AÇJ materyali hazırlamak için literatüre yeni ve uygulamada kolaylık sağlayan, mikrodalga destekli bir sol-jel reaksiyon yöntemi sunulmuştur. KDM uygulamalarında kullanılmak üzere gözenekli yapıların oluşturulması için dondurarak kurutma tekniğini kullanılmıştır ve bu nedenle oluşturulan 3B gözenekli yapılar "kriyojel" olarak isimlendirilmiştir. Üretilen hibrit malzemenin gerekli tüm fizikokimyasal ve yapısal karakterizasyon analizleri gerçekleştirilerek tez içerisinde ilgili başlıklarda ayrıntılarıyla sunulmuştur. Ayrıca, hibrit Si-AÇJ materyalinden ve kontrol grubu olarak kullanılan AÇJ polimerinden elde edilen kriyojel yapıları iAMKH ile 7, 14 ve 21 günlük periyotlar boyunca hücre kültürü ortamında inkübe edilerek malzemenin *in vitro* testlerle osteobiyolojik performansı incelenmiştir. Üretilen malzemenin hücresel canlılığına, hücre proliferasyonuna ve osteojenik farklılaşmaya olan etkisi 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) testleri, HK ve İHK boyama yöntemi ve qRT-PCR analizi yoluyla hücresel ve moleküler seviyede incelenmiştir.

1.1. İnsan Kemik Dokusu ve Anatomisi

Kemik dokusu bağ dokudan özelleşerek oluşmuş bir doku türüdür. Birçok farklı doku tipiyle etkileşim halinde olan kompleks bir yapıya sahip olan kemik dokusu vücutta bulunan en sert doku çeşididir. Kemikler, ortalama bir insan vücut ağırlığının yaklaşık %14'ünü oluşturur (D.G.Steele, 1988). Kemiklerden oluşan iskelet yapısı, vücut hareketlerimizin temelini oluşturur ve iç organlarımızı dış etkenlerden korur, özellikle uzun kemikler hematopoez (kan hücreleri üretimi) için gerekli biyolojik unsurları barındırır, kalsiyum (Ca) ve fosfat (PO_4^{-3}) gibi mineralleri depolayarak elektrolitlerin homeostazını korur (Amini,

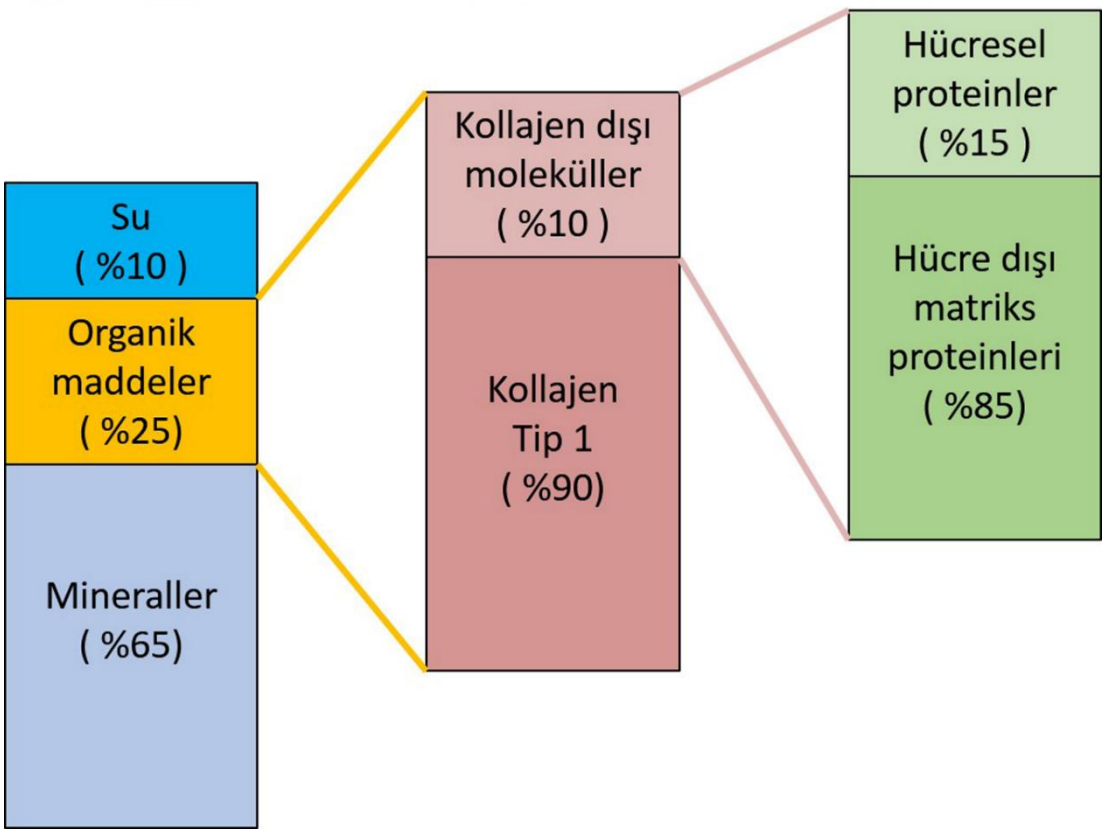
Ami R., Laurencin, Cato T., Nukavarapu, 2013). Dinamik bir yapıya sahip olan kemik dokusu, sürekli bir yapım ve yıkım döngüsü içindedir. Vücudun değişik kısımlarında bulunan kemikler arasında ufak yapısal farklılıklar olabileceği gibi (uzun, yassı, kısa ve düzensiz kemikler) kemik dokusu temel olarak birbirine benzer unsurlardan oluşur. Bağ doku türevli bütün yapılar gibi kemik dokusu da kendi içinde fraktal benzeri bir örüntü içerir ve nanometre seviyesinden mikrometre seviyesine kadar hiyerarşik bir düzen içindedir. Kemiğin hiyerarşik yapısı incelendiğinde makroskopik seviyede en dıştan içeriye doğru sırasıyla: kemik zarı (periost), sert kemik (kompakti kortikal kemik), süngerimsi kemik (trabeküler kemik) ve kemik iliğinden (kırmızı ve sarı) oluştuğu görülür. Süngerimsi kemik doku mikroskobik seviyede incelendiğinde ise içerisinde "Havers kanalları" adı verilen nörovasküler bir sistemin olduğu görülecektir. Kemik boyunca uzanan Havers kanalları lameller kemik yapısıyla çevrilidir ve bu yapılara "osteon" birimleri denir. Osteonlar, kan damarları, sinirler ve konsantrik lamel tabakaları ile çevrili lenfatikler taşıyan merkezi bir kanaldan oluşur ve osteon yapıları birbirlerine periferik "Volkmann kanallarıyla" bağlıdır. Bu yapılar kemiğin dinamik biyolojik süreci içinde besin, oksijen ve atık materyallerin taşındığı özelleşmiş sistemleridir. Ultra ve nano ölçekte kemik dokusuna bakıldığında alfa heliks sarmallar oluşturan kollajen fibrillerden ve kristal mineral tabakalarından oluştuğu görülür (Burr ve Allen, 2013). Şekil 1'de kemik yapısının hiyerarşik organizasyonu özetlenmiştir.



Şekil 1. İnsan kemiğinin temsili hiyerarşik yapısı (Burr ve Allen, 2013)

1.2. Kemik Matriksi ve Kemik Hücreleri

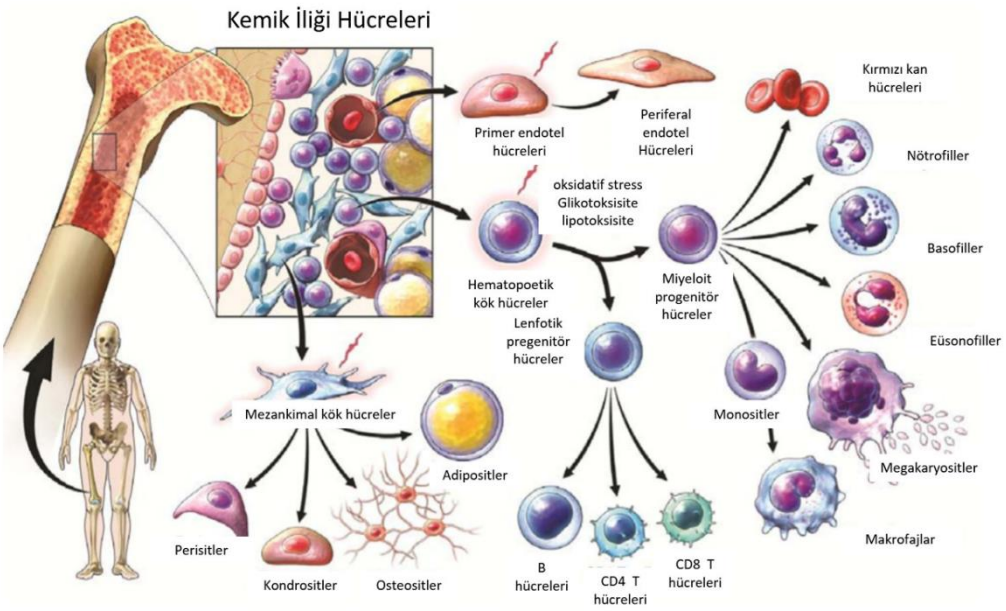
Kemik dokusunun yaklaşık olarak %65'i inorganik yapıdadır ve minerallerden (hidroksiapatit kristalleri ve diğer kalsiyum mineralleri) oluşur, %20-25'lik kısım ise organik bileşenlerden oluşur ve organik kısmın da %90'ını kollajen liflerinden (özellikle tip1 kollajen) oluşur. Mineral yapılar kemiğe mukavemet ve sertlik kazandırırken, kollajen lifleri kemik dokusuna elastikiyet sağlar (Burr ve Allen, 2013). Böylece kemik dokuları (örneğin kortikal kemik dokusu) 150-200 MPa seviyesinde basınç altında kırılmadan dayanım gösterebilir (Rho, Kuhn-Spearing, ve Zioupos, 1998). Kemik dokusundaki organik bileşenlerin sadece %10'u hücresel yapılara aittir. Şekil 2'de ortalama sağlıklı bir kemik yapısının bileşenleri yüzde oran cinsinden gösterilmiştir.



Şekil 2. Sağlıklı bir insan kemik yapısının bileşenleri (Burr ve Allen, 2013)

Kemik hücreleri, kemik yapısının diğer unsurlarına kıyasla oldukça az bir miktarını oluşturur ancak kemik gelişimi ve kemik hasarlarının giderilmesinde etkin rol alırlar. Kemik dokusu (uzun kemikler) süngerimsi kemik doku içerisindeki ilik yapısı nedeniyle pek çok farklı hücre çeşidini bir arada barındırır. Temel olarak kemik dokusundaki hücre çeşitliliği hematopoetik kökenli hücreler ve hematopoetik kökenli olmayan hücreler şeklinde iki başlık altında incelenebilir.

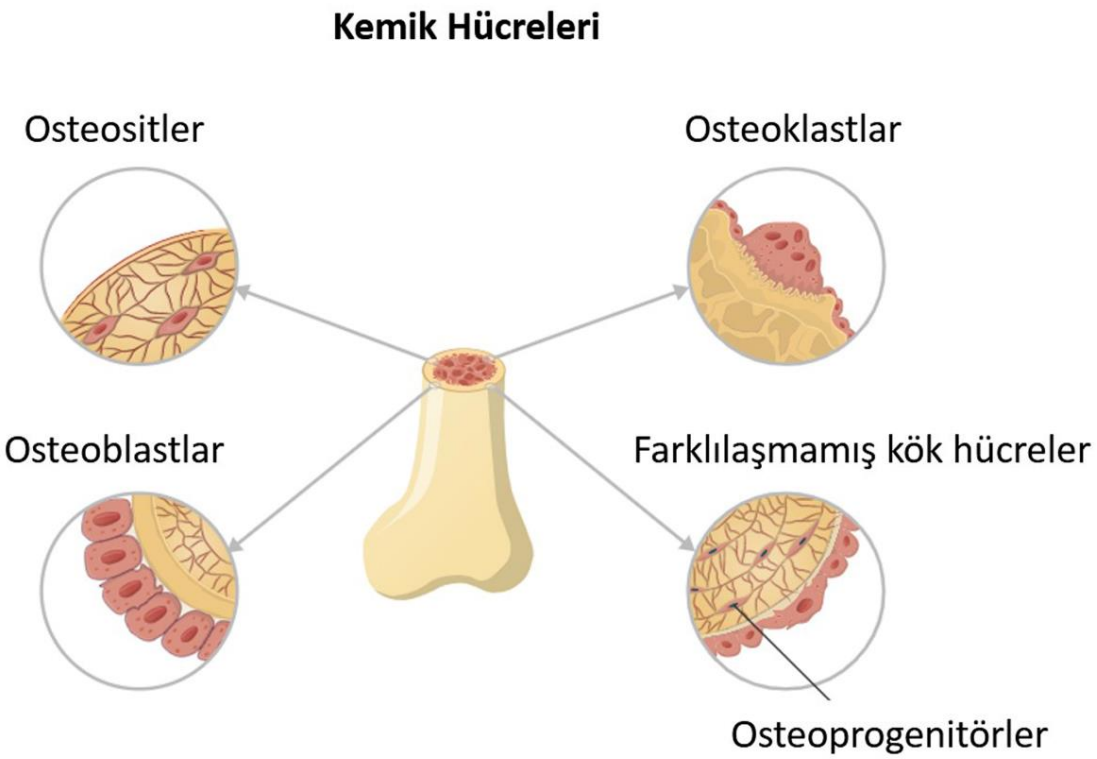
Hematopoetik kökenli hücreler kendi içinde miyaloit kökenli ve lenfatik kökenli hücreler olarak ikiye ayrılırlar. Miyoloit kökenli hücreler monositler, makrofajlar, megakaryositler, eritrositler, nötrofiller ve osteoklastlar gibi değişik türde hücrelere farklılaşırlar. Lenfotik kökenli hematopoetik hücrelerden ise immün sistemi hücrelerinin (B, T ve CD8 hücreleri gibi) oluştuğu bilinmektedir (Qadura ve diğerleri, 2018). Şekil 3'de kemik iliği yapısı ve içerdiği hücresel çeşitlilik gösterilmiştir.



Şekil 3. Kemik iliği ve kemik matriksi hücre çeşitleri (Qadura ve diğerleri, 2018)

İlik yapısından bağımsız olarak kemik dokusunda hematopoetik kökenli olmayan hücreler (mezenkimal kök hücre kökenli) de vardır. Bu hücreler: osteoblastlar, osteositler ve osteoprogenitör hücreler olarak sıralanabilir. Osteoblastlar kollajen üreten ve kalsiyum bağlayan proteinleren oluşan hücre dışı matriks salgılayarak yeni kemik dokusunun oluşturulmasında (kemik rejenerasyonu) görev alan hücrelerdir. Kübik bir morfolojiye sahip osteoblastlar ardışık mitoz bölünmeler geçirerek yeni osteoblastları oluşturur ve daha çok hücre dışı matriksin sentezlenmesini sağlarlar. Salgılanan hücre dışı matriks ortamda bulunan kalsiyum bileşenlerini tutar ve zamanla kalsifiye bir nişin oluşmasına neden olurlar. Mineralce zengin ortamın içinde kalan osteoblastların bazıları modifikasyona uğrayarak "osteosit" adı verilen özelleşmiş kemik hücrelerine dönüşürler. Osteositler kemik matriksinde lakün adı verilen boşluklarda bulunur ve osteoblastlardan gelen hücre dışı sinyallere göre kemik matriksinin mineral kompozisyonunu düzenlerler. Osteo progenitör hücreler mezenkimal kök hücrelerden farklılaşmış ve osteoblastları oluşturma yetisine sahip öncül hücre çeşididir. Kemik komponetlerinin durumuna göre asimetrik bölünerek yeni

osteoblastları oluşturabilirler (Bellido, Plotkin, ve Bruzzaniti, 2019; Burr ve Allen, 2013). Osteoklast hücreleri ise kemik matriksinin temel hücrelerinden biri olmasına rağmen hematopoetik kökenli bir hücre çeşididir. Makrofaj hücreleri ile aynı türden köken alır. Mevcut eski kemik yapısını yıkarak yeni kemik dokusunun sentezlenmesini sağlar. Osteoklastlar, osteoblastlar ile beraber kemik matriks bileşenlerini düzenleyerek kemik hemostazını korurlar (Burr ve Allen, 2013). Şekil 4'de kemik matriksini oluşturan hücre çeşitleri verilmiştir.



Şekil 4. Kemik matriks hücreleri (McGuire, 2020)

1.3. Kemik Greftleri ve DM Yaklaşımı

Kemik dokusu dinamik bir biyolojiye sahiptir ve kendisini yenileme potansiyeli vardır. Ancak, farklı kemik türlerine göre değişmekle birlikte 2,5-3 cm ve üzerindeki boyutlarda meydana gelen kemik hasarları "kritik boyutlu hasar" olarak nitelendirilir ve kemik dokusu bu tür hasarları tek başına tamir edememektedir. Klinikte bu gibi vakalarda kemik ikameleri (greftler), kullanılmaktadır (Schemitsch, 2017).

Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2050 yılına kadar 60 yaş üzeri kişi sayısının toplumdaki oranının %22'lere kadar yükselebileceğini belirtilmektedir (Kashirina, Yao, Liu, ve Leng, 2019). Uzayan insan ömrü ve yaşlanan nüfus ile birlikte kemikle ilgili

rahatsızlıkların ve kritik boyut kemik travmalarının klinikteki seyri de artış göstermektedir. Her yıl ortalama 2 milyon hasta kemik travmaları nedeniyle çeşitli kemik greftleri ile tedavi görmektedir ve sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kemik greftleri için yıllık 2,5 milyar dolarlık harcama yapılmaktadır (Mishra ve diğerleri, 2016). Kemik greftlerinin pazar payı incelendiğinde yıllık %10'luk bir pazar büyümesi ile birlikte yıllık ortalama 1 milyar ABD doları ciro elde edildiği belirtilmektedir. 1 g kemik greftinin ortalama fiyatı 100 ABD dolarına yakın olduğu için, kemik greftlerinin yıllık üretimi ortalama olarak 10 ton civarında kalmaktadır (Bohner, 2010).

Kritik boyutlu kemik hasarların tedavisinde klinik olarak altın standart otogreftleme işlemi olarak bilinir. Otogreftler, hastanın kendi sağlıklı dokusundan alınıp vücudunda hasarlı olan bölgeye aktarılan doku parçaları olarak nitelendirilirler. Kemik sorunlarının tedavisi için hastalarında en çok kullanılan otogreft kemik kaynakları iliak kemik, fibula veya kaburga kaynaklı kemiklerinden oluşmaktadır (Delloye, Cornu, Druez, ve Barbier, 2007). Otogreftleme işlemi her ne kadar altın standart olarak kabul edilse de hastaya yapılan bir seri ekstra ameliyatlar, ameliyatların neden olduğu ağrılar ve rahatsızlıklar (morbite), enfeksiyon riskleri, hastanın hareket kabiliyetindeki ve yaşam kalitesindeki düşüş gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır (Kashirina, Yao, Liu, ve Leng, 2019). Kadavralardan elde edilen allogreft kemiklerin veya insan dışı canlılardan elde edilen kemik dokuların (ksenogreftler) kemik tedavisi kullanımı alternatif yöntemler olarak sayılabilir. Ancak yaşanan donör kıtlığı, greftin hastalık taşıma ihtimali ve hasta içine naklinden sonra meydana gelebilecek olası immün reddediş ve beraberinde gelişen enfeksiyon durumu risklerinden dolayı allogreft ve ksenogreft uygulamaları klinikte pek tercih edilen yöntemler değildir (Amini, Ami R., Laurencin, Cato T., Nukavarapu, 2013).

Kemik hasarlarının tedavisinde kemik kaynaklı greftlerin dışında metal, seramik ve/veya sentetik polimer gibi materyaller de çeşitli formlarda kullanılmaktadır. Hasarlı veya eksik kemik dokusunun yerine ikame edebilecek veya kemik iyileşmesini destekleyecek fonksiyona sahip pek çok farklı biyomalzemeler geliştirilmiştir (Pereira ve diğerleri, 2020). Tablo 1'de kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan biyomalzemeler, bu malzemelerin kullanımda sunduğu avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir.

Tablo 1
Kemik doku hasarı tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemik biyomalzemeleri ve bu biyomalzemelerin avantaj ve dezavantajları (Pereira ve diğerleri, 2020)

Biyomalzemeler	Avantajları	Dezavantajları
Otogreftler	Osteoindüktif Allojenik değil Doku uyumu	Sınırlı kaynak Donör morbitesi Ameliyat kaynaklı ağrılar Enfeksiyon riski
Allogreftler	Osteoindüktif Donör morbitesinin olmaması	Yetersiz damarlaşma Hastalık bulaşma riski Düşük donör sayısı Etik kaygılar Greft reddi
Ksenogreftler	Görece ekonomik Donör morbitesinin olmaması Osteoindüktif	Hastalık taşıma riski Greft reddi Az sayıda uygun greftin bulunması Yetersiz damarlaşma
Metaller	Güçlü mekanik dayanım Kişileştirilmiş imalat	Korozyon ve toksik yan ürünler Biyoinert olması Yetersiz damarlaşma
Seramikler	Biyouyumlu Güçlü mekanik dayanım Kişileştirilmiş imalat	Kırılganlık Düşük elastikiyet Yetersiz damarlaşma
Sentetik Polimerler	Kişileştirilmiş imalat Uygun mekanik özellikler Düşük elastik modülüs	Yetersiz damarlaşma Fizyolojik koşullarda zaman içinde bozunma sonucu toksik yan ürünler oluşturma riski

Klinikte kemik doku hasarı tedavisi için devam etmekte olan majör ihtiyaçlar, araştırmacıları yeni nesil tedavi yaklaşımları geliştirmeye itmiştir. DM uygulamaları bu anlamda kemik hasarlarının tedavisi için yeni nesil çözüm yöntemleri geliştirebilecek önemli bir bilim alanıdır.

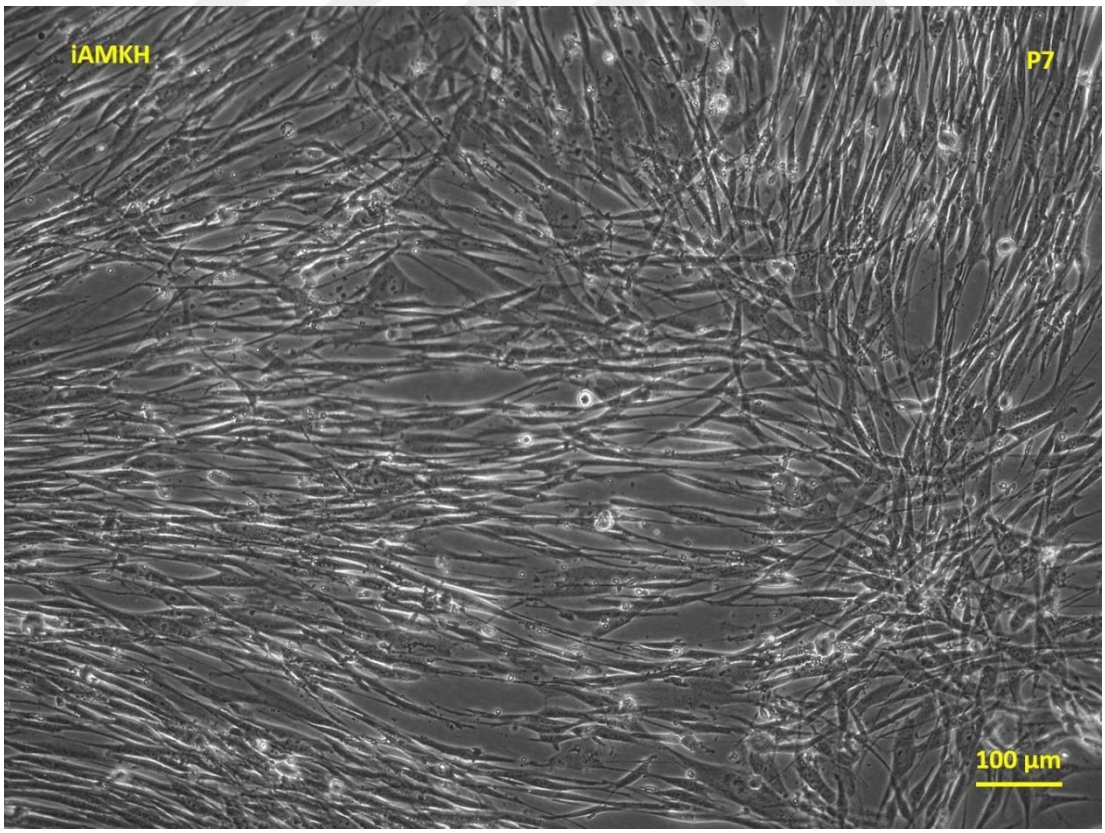
DM, 1990'ların başında Dr. Langer ve öğrencisi Dr. Vacanti tarafından hasarlı veya eksik biyolojik dokuları iyileştiren, dokunun yerine geçen veya biyolojik dokunun işlevini sürdürmesini sağlayan ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik prensiplerini ve yaşam bilimlerinin temellerini bir arada kullanan disiplinler arası bir araştırma alanı olarak tanımlamışlardır (R Langer ve Vacanti, 1993). DM yaklaşımı yapay doku ve organ ikamelerin üretimini hedeflediği için 3 temel biyolojik unsura dayanır, bu ögeler: dokuyu yeniden oluşturacak hücreler (kök hücreler, öncül hücreler, primer hücreler vb.), hücre büyüme faktörleri (sitokinler ve diğer uyaranlar) ve gerçek dokuyu taklit edebilme yetisine sahip biyouyumlu biyomalzemeler şeklinde ifade edilebilir (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013). Geçtiğimiz 30 yıllık süreç boyunca bilim insanları bu amaç için pek çok farklı fonksiyonel biyomalzeme geliştirmiştir ve yapay kan damaları, karaciğer, pankreas, mesane, kornea, kıkırdak ve kemik gibi pek çok farklı biyolojik dokuların ikameleri üretilmeye çalışılmıştır (Robert Langer ve Vacanti, 2016). Şekil 5'te DM yaklaşımının dayandığı 3 temel unsur özetlenmiştir.



Şekil 5. DM uygulamaların dayandığı temel unsurlar (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013)

DM uygulamalarında hedeflenen dokuya spesifik farklılaşmış hücreler kullanılabileceği gibi, progenitör hücreler veya kök hücreler de kullanılabilir. Yapılan tez çalışmasında iAMKH'leri (Şekil 6) kullanılmıştır. iAMKH, mezenkimal kök hücre çeşidi oldukları için yağ doku hücrelerine (adiposit), kemik doku hücreleri (osteoblast, osteosit) ve

kıkırdak doku hücrelerine (kondrosit) farklılaşma potansiyeline sahiptir (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016). 2 boyutlu hücre kültüründe fibroblastik morfoloji sergileyen yağ doku kökenli mezenkimal kök hücreler, kemik iliği kökenli kök hücrelerden sonra literatürde en sık kullanılan mazankimal kök hücre kaynaklarıdır. İnsan yağ dokusunun kan damarlarınca zengin stroma (stromal vascular fraction) tabakasından elde edilirler. Lipoemilim veya lipotomi metoduyla izole edilen yağ dokusundan çeşitli enzimatik muameleler (kollajenaz tip I, II) ve saflaştırma işlemleri sonucu (santrifüj, mikro-filtrasyon, yıkama) elde edilen hücre kitlesi Tablo 2'de belirtilen iAMKH spesifik yüzey markörleri ile akış sitometresi sisteminde ayrıştırılırlar. Yağ doku kökenli mezenkimal hücreler de diğer mezenkimal kök hücre türleri gibi hücre kültü plastiğine adezyon göstererek yüzeye tutunma davranışı gösterirler ve hücre kültürü koşullarında 2-3 gün içerinde ikilenme süresine (doubling time) sahiptir (Can, 2013). Literatürde iAMKH'ler ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin başarılı bir şekilde kıkırdak doku hücrelerine (Stromps ve diğerleri, 2014), kemik doku hücrelerine ve yağ doku hücrelerine farklılaştığı görülmüştür (J. Zou ve diğerleri, 2017).



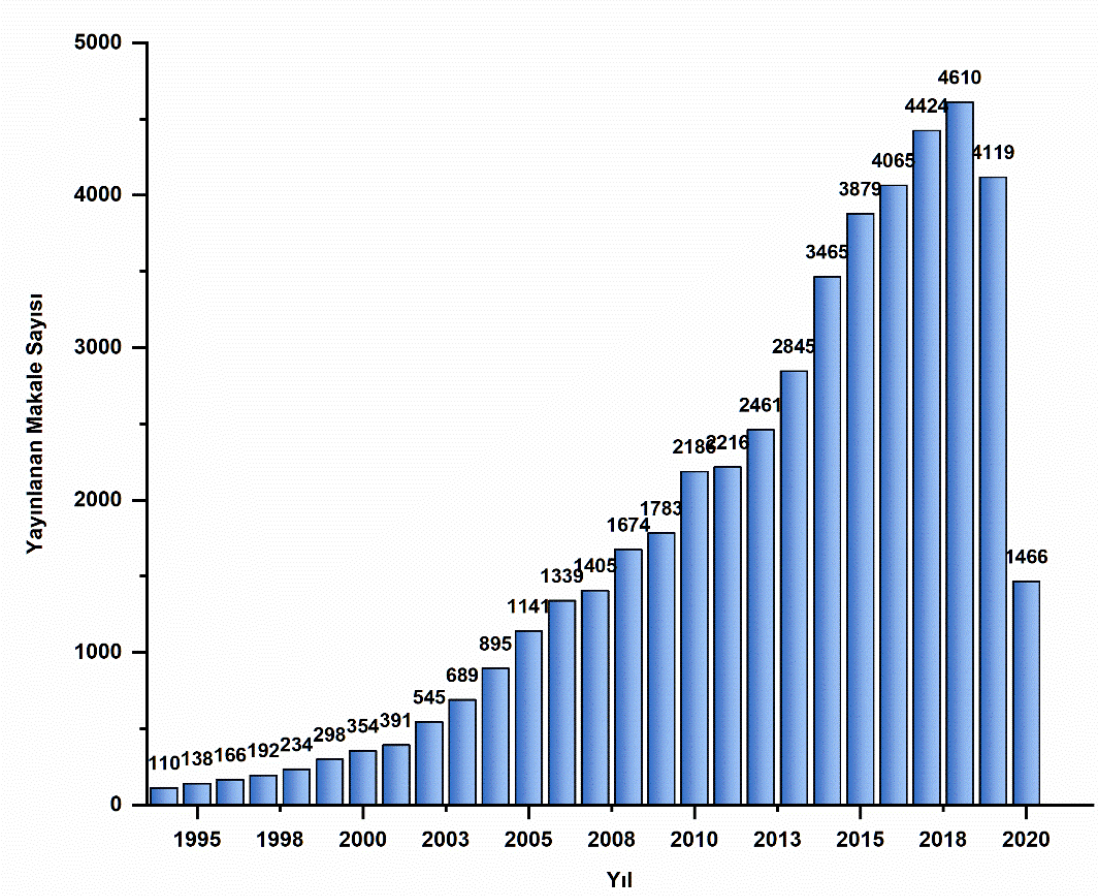
Şekil 6. Hücre kültürü plastiği yüzeyindeki fibroblastik morfolojideki iAMKH'leri

Tablo 2
İnsan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücrelerin pozitif ve negatif belirteçleri (Can, 2013)

iAMKH Belirteçleri	
Pozitif Belirteçler	Negatif Belirteçler
CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD 166, HLA I	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79α, CD133, CD144

1.4. Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler

KDM alanındaki çalışmalar DM bilim dalı çatısı altında yaklaşık 30 yıllık bir geçmişe sahiptir. PubMed veri tabanında yayınlanan çalışmalar incelendiğinde, KDM ile ilgili 1993 yılından 2020 yılı mayıs ayına kadar artan bir şekilde çok sayıda araştırma ve incelemelerin gerçekleştirildiği görülmektedir (Şekil 7).



Şekil 7. PubMed verilerine göre 1993-2020 mayıs tarihleri arasındaki KDM alanıyla ilgili yayınlanan çalışmaların sayısı (PubMed, 2020)

KDM yaklaşımı, klinikte mevcut olarak kullanılan tedavilerin yetersiz veya eksik kaldığı yönlerde alternatif tedavi seçenekleri oluşturmayı hedeflemiştir. Gerçek kemik dokusunun yapı ve fonksiyonlarını taklit edebilecek klinikte kullanılabilir ikamelerin geliştirilebilmesi için KDM alanında mühendislik teknikleri, temel bilimler ve klinik bilgilerinin bir arada kullanılması gerekmektedir. Genel prensip olarak KDM'nin dayandığı birkaç ortak hedef vardır. Bunlar:

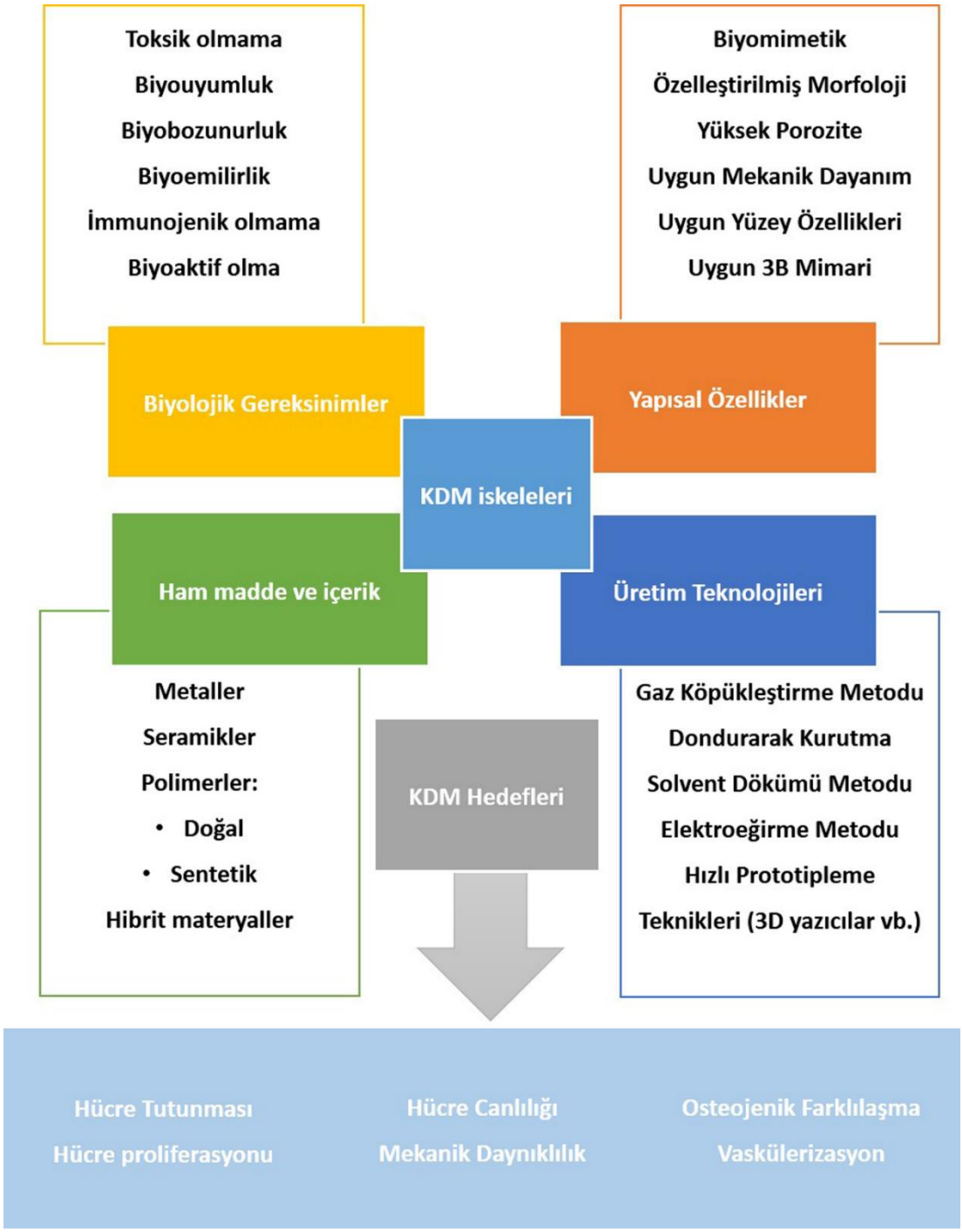
(1) Doğal kemik HDM'sini taklit edebilecek biyouyumlu 3B yapıların inşası,

(2) Yeniden kemik dokusunu oluşturacak osteojenik hücrelerin kullanımı,

(3) Hücrelerin gerçek kemik dokusundaki gibi morfojenik sinyaller alarak kemik hücresine ait fenotipik ve genotipik davranışların elde edilmesi,

(4) Oluşturulan doku içerisinde hücrelerin besin ve atıklarını aktarabileceği vasküler yapının elde edilebilesi şeklinde özetlenebilir (Amini, Ami R., Laurencin, Cato T., Nukavarapu, 2013).

Şekil 8'de ideal bir KDM materyalinin sahip olması gereken özellikler, yapısal nitelikleri, olası içeriği, üretim teknikleri ve hedefleri özetlenmiştir.



Şekil 8. KDM iskelelerinde bulunması gereken özellikler, yapısal özellikler, kullanılan hammadde ve içeriği, temel üretim metotları ve KDM'nin amaçları (Roseti ve diğerleri, 2017)

Kemik dokusu için geliştirilen 3B yapılarda demir (Fe), magnezyum (Mg), titanyum (Ti), tantalyum (Ta), nikel (Ni) ve bu metallerin kendi içinde veya kalsiyum (Ca), manganez (Mn) gibi elementler ile olan alaşımları KDM'nde sıkça kullanılan bazı metal biyomalzemelerdir (Ghassemi ve diğerleri, 2018; Qu, Fu, Han, ve Sun, 2019; Y. Zhang ve diğerleri, 2019). Demir metali yaklaşık 210 GPa'lık bir elastik modülüs değeri ile oldukça

sert ve dayanıklı bir malzeme olmasına rağmen *in vivo* implantasyonlarda sistemik toksisiteye ve enflamasyon gelişmesine neden olduğu yapılan bazı çalışmalarda raporlanmıştır (Peuster, 2001). Magnezyum ve magnezyum alaşımları ise biyoemilirliği, biyouyumluluğu ve uygun mekanik özellikleri nedeniyle KDM uygulamaları için uygun bir metal biyomalzeme olarak görülmektedir. Ancak Mg bileşiklerin fizyolojik koşullarda korozyona dayanıklı olamaması nedeniyle 3B yapılarda yeterli seviyede porozite sağlanamamaktadır (Li, Gu, Lou, ve Zheng, 2008). Titanyum elementi ise oldukça hafif ve dayanıklı bir malzemedir ve biyouyumlu özellik gösterir ancak biyobozunur değildir ve implant edildiği bölgede yeni kemik oluşumunu desteklemediği bilinmektedir (Ghassemi ve diğerleri, 2018). Ti elementi biyolojik yapılarca tanımlanamadığından klinik kullanımda genelde yüzeyi biyomololeküllerle modifiye edilmesi gerekmektedir. Yayınlanan bazı çalışmalarda Ti elementinin kemik gelişimin inhibe edebildiği gösterilmiştir (Das, Balla, Bandyopadhyay, ve Bose, 2008; Goodman ve diğerleri, 2006). Tantalyum elementi incelendiğinde ise kemik dokusunun elastik modülüsü ile birbirine oldukça yakın olduğu görülür bu nedenle KDM uygulamalarında ve diz ameliyatlarında sıkça kullanılan bir metal biyomalzemedir. Ancak *in vivo* uygulamalarda implant edildiği yerde neredeyse hiç biyobozunmaya uğramaz ve bu nedenle implantı çıkartmak için ikinci ameliyatın yapılmasını gerektirir (Alvarez ve Nakajima, 2009; Shimko ve diğerleri, 2005).

Metal biyomalzemeler genel olarak sağlam, dayanıklı ve biyouyumlu yapıdadırlar. Ancak KDM uygulamaları için özellikle *in vivo* kullanımda, malzeme ile gerçek kemik dokusu arasındaki sertlik farkından dolayı zaman içinde implant edildiği bölgede kemik rezorpsiyonuna neden olabilir ve kemik rejenerasyonu sürecini inhibe edebilirler (Kao ve Scott, 2007; Stevens ve diğerleri, 2008).

Seramikler KDM uygulamalarında sıkça kullanılan bir diğer çeşit biyomalzemelerdir. Kemik dokusunun yaklaşık %65'inin minerallerden oluştuğu göz önüne alındığında seramik materyallerin kemik dokusuna benzerliği avantaj sağlamaktadır. Kalsiyum fosfat seramikleri: hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) ve bu bileşiklerin kombinasyonları KDM uygulamalarında sıkça kullanılan biyomalzemelerdendir (Ghassemi ve diğerleri, 2018). Biyoseramiklerle yapılan KDM çalışmalarının sonuçlarına göre seramik malzemeler sağladığı yüzey özellikleri ve biyoaktif yapıları nedeniyle osteojenik rejenerasyonu desteklerken, seramik yapıların kırılgan olması ve elastikiyetinin düşük olması *in vivo* çalışmalardaki başarıyı olumsuz etkileyebilmektedir (Samavedi, Whittington, ve Goldstein, 2013).

Polimerler KDM uygulamalarında genel olarak istenilen formlarda kalıplanabilmesi, malzeme gözenekliliğin ayarlanabilmesi, biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle oldukça tercih edilen malzeme çeşitleridir. Kullanılan polimerler temel olarak sentetik ve doğal kökenli polimerler olarak iki ana başlıkta incelenebilirler. Sentetik polimerlere: polilaktik asit (PLA), poliglikonik asit (PGA), poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL) ve polivinil alkol (PVA) örnek olarak verilebilir. Sentetik polimerlerin istenen formda ve konsantrasyonda üretilebilmeleri, biyouyumlu ve mekanik olarak dayanıklı olmaları onlara *in vitro* ve klinik kullanımda avantaj sağlar. Ancak bazı sentetik polimerlerin biyolojik ortamda bozunma kinetiklerinin oldukça yavaş olması, bozunma sonucu toksik yan ürünler açığa çıkartması ve biyoaktif özellik göstermemesi gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır. KDM'de kullanılan bazı sentetik polimerler Tablo 3'te özetlenmiştir (Ghassemi ve diğerleri, 2018; Qu, Fu, Han, ve Sun, 2019).

Tablo 3
KDM'nde kullanılan bazı sentetik polimerler ve özellikleri

Sentetik Polimer	Avantajları	Dezavantajları	Referans
PLA	FDA tarafından onaylı	Yetersiz hücre adezyonu	(Koob ve diğerleri, 2011) (Zaky ve diğerleri, 2017)
PGA	FDA tarafından onaylı Biyouyumlu	Yetersiz hücre adezyonu	(Qu, Fu, Han, ve Sun, 2019)
PLGA	FDA tarafından onaylı	Yetersiz hücre adezyonu	(Shao ve diğerleri, 2016)
PCL	FDA tarafından onaylı	Yavaş bozunma kinetiği	(S. H. Ahn, Lee, ve Kim, 2011)
PVA	Mekanik olarak dayanıklı	Biyozunur değil Toksik yan ürünler	(Ghassemi ve diğerleri, 2018)

Doğal polimerler KDM uygulamalarında biyouyumlu, biyoaktif ve biyobuzunur gibi avantajlı özellikleriyle son dönemlerde tercih edilen malzemelerdendir. Literatürdeki KDM çalışmaları incelendiğinde kollajen, fibrin, aljinat, ipek, hyalüronik asit ve kitosan

polimerlerinin en çok kullanılan doğal materyaller olduğu görülecektir (Bose, Roy, ve Bandyopadhyay, 2012).

Kollajen memeli canlıların HDM'sinde en çok bulunan polimer çeşidi olup enzimatik işlemlerle biyolojik dokulardan kolay bir şekilde izole edilebilmektedir. Tip I kollajen çeşidi insan vücudunda osteoblastlar tarafından salgılanan ve kemik gelişiminin ileri aşamalarında mineralize hale gelerek kemik matriksini oluşturan ana organik bileşen olduğu için, kollajen polimeri KDM çalışmaları için uygun bir biyopolimer olarak nitelendirilmiştir (Sanchez, Arribart, ve Giraud Guille, 2005). Kollajen değişik teknikler kullanılarak, nanofiber üretiminde, gözenekli iskelelerin üretiminde veya jel ilaç taşıyıcı kapsüllerin üretiminde kullanılan bir polimerdir. Biyouyumlu doğasına rağmen mekanik olarak zayıf dayanım gösterdiği için KDM uygulamalarında kollajen polimerin çeşitli kimyasal ajanlarla modifikasyon işlemlerden geçmesi gerekmektedir (S.-H. Lee ve Shin, 2007; Pereira ve diğerleri, 2020).

Fibrin, kan ve serumda bulunan kanın pıhtılaşmasında görev alan protein yapılı bir polimerdir. Literatürde kraniyal implant modellerinde fibrin polimeri kemik morfojenik protein (BMP) taşıyıcısı olarak kullanıldığı görülmüştür (Arnander ve diğerleri, 2006). İnsan vücudunda pıhtı oluşturacak şekilde evrimleşen lifsi fibrin protein yapıları, günümüzde KDM uygulamalarında farklı biyoaktif moleküller ile birlikte enjekte edilebilir kemik tutkalı olarak da kullanılmaktadır (S.-H. Lee ve Shin, 2007).

Aljinik asit veya diğer adıyla aljinat, kahverengi deniz yosunlarının hücre duvarlarından elde edilen anyonik bir polisakkarit çeşididir. Biyouyumlu doğası ve kolay jel elde edilebilir yapısı nedeniyle pek çok farklı (mikro taşıyıcı, jel, gözenekli iskeleler) KDM uygulamasında kullanılan doğal bir polimerdir (K. Y. Lee ve Mooney, 2012). Ancak düşük mekanik dayanımı, kararsız stabilitesi ve anyonik doğası nedeniyle iyonik ortamlardaki kararsızlığı aljinat için sayılabilecek en temel dezavantajlar arasındadır (David, Day, ve Shikanov, 2016).

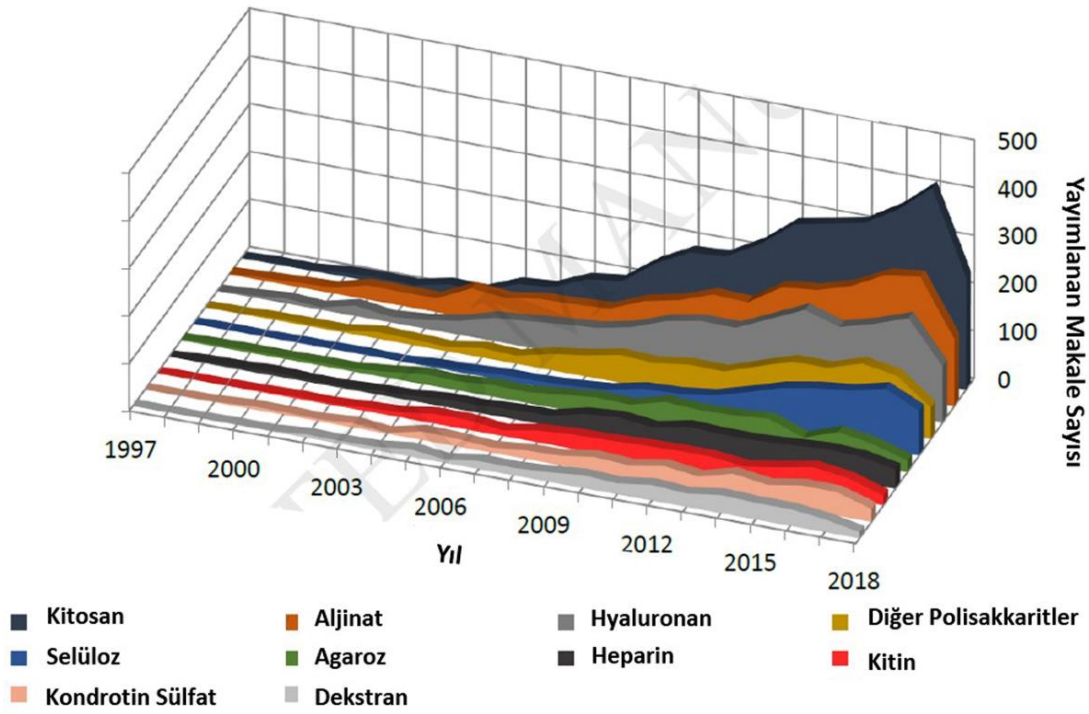
KDM alanında bir diğer en sık kullanılan doğal polimer ise ipektir. Dut ipek böcekleri (*bombyx mori*) tarafından koza oluşturmak için üretilen ipek polimeri ve örümcek (*argiope argentata* ve *latrodectus hesperus*) ipeği sahip olduğu üstün mekanik özelliklerinden (450-1850 MPa kopma dayanımı, ultra hafif ve elastik yapı vb.) dolayı dikkat çekmektedir (Agnarsson, Kuntner, ve Blackledge, 2010; Wen ve diğerleri, 2010). Literatürdeki bazı çalışmalara göre ipek materyali birtakım antijenik reaksiyonları tetikleyebilmektedir. Ancak ipek materyalinin kompozitlerinin kullanımı bu sorunu aşmak için geliştirilen yaklaşımlardan biridir. İpek temel olarak iki protein bileşenden oluşmaktadır. Bunlar: ipek

serin ve ipek fibroin proteinleridir. İpek serin mekanik olarak düşük dayanıma sahiptir, ancak mitojenik özellikleri nedeniyle kemik rejenerasyonunu tetikleyebilmektedir. Bu nedenle KDM uygulamalarında ipek serin yapısı ve ipek serinin kompozitleri kullanılmaktadır (Kashirina, Yao, Liu, ve Leng, 2019).

Anyonik bir glikozaminoglikan olan hyalüronik asit, biyouyumluluğu ve jel yapısı nedeniyle KDM uygulamalarda kullanılan bir doğal polimerdir. Yara iyileşmesi, anti-inflamatuvar etkileri, biyobozunurluğu ve hücre içi sinyal yolaklarını uyaran doğası nedeniyle farklı biyomedikal uygulamaları mevcuttur. Ancak bu polimerlerin sulu ortamda ani ve kontrolsüz çözünmesi kemik rejenerasyon süreci için yetersiz gelmektedir (Cui ve diğerleri, 2015).

Kitin, kabuklu eklembacaklıların, deniz hayvanlarının dış iskeletinde ve mantarların hücre duvarında bulunan organik bir polimerdir. Deasetilasyona uğratılarak kitosan adı verilen polisakkarit yapısı elde edilir. Kitosan, antimikrobiyal ve osteorejeneratif özellikleri nedeniyle birçok KDM uygulamalarında nanofiber yapımında, gözenekli iskelerin yapımında kullanılan bir doğal polimerdir (Jeong Park ve diğerleri, 2000). Hücre tutunmasını, farklılaşmasını sağlayıp biyouyumlu yapı göstermesine rağmen oldukça düşük mekanik dayanıma sahiptir. Bu nedenle KDM uygulamalarında genellikle HA, biyocam vb. biyoseramiklerle bereber kullanılır (LogithKumar ve diğerleri, 2016).

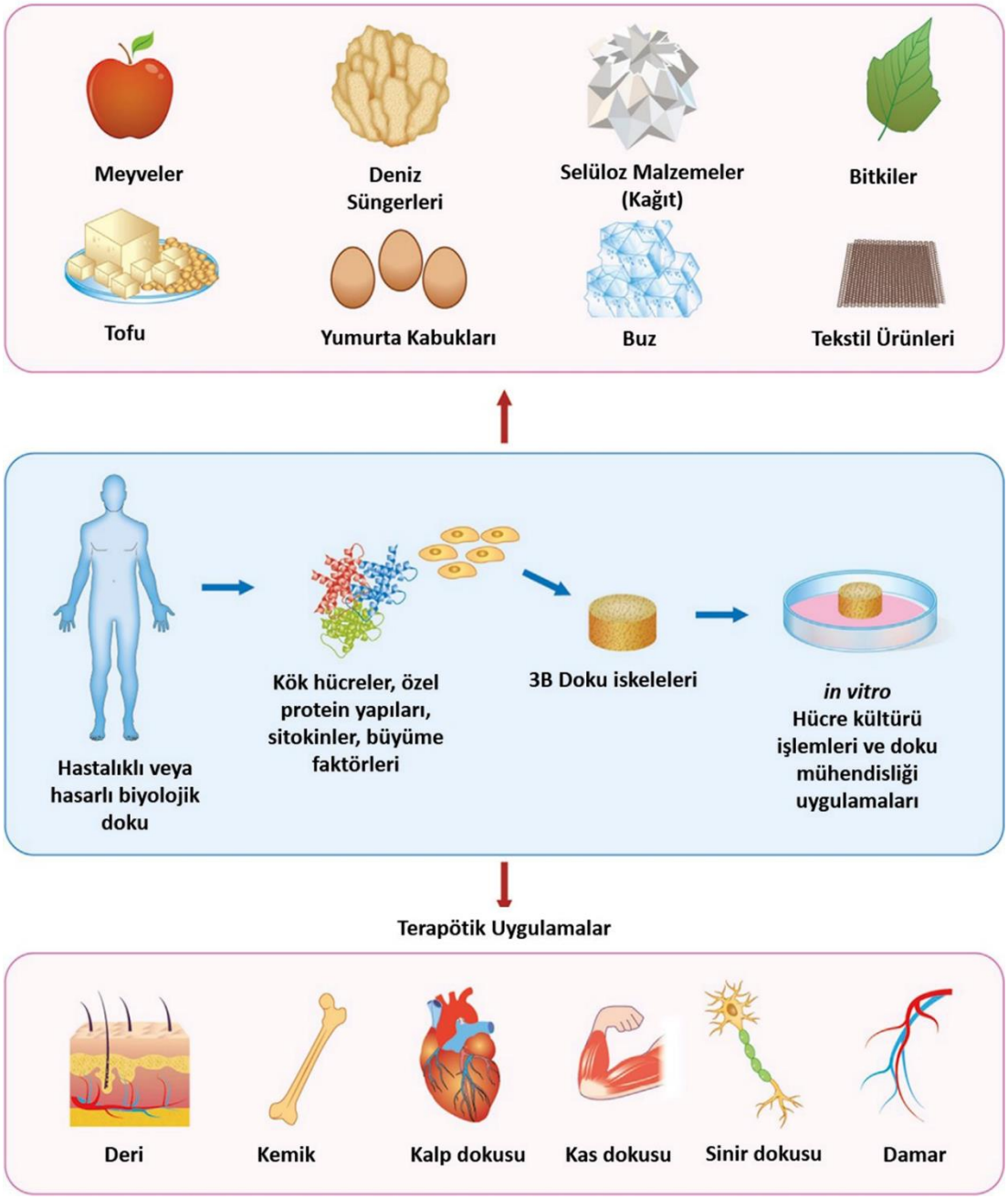
Kollajen, hyalüronik asit ve fibrin gibi materyaller biyolojik olarak kemik matriksini taklit edebilme, kemik rejenerasyonunu uyarabilme gibi özellikleri bulunmasına rağmen, memeli kökenli materyaller olması onların çeşitli patojenleri potansiyel olarak taşıyabilmelerine ve klinikte kullanımında insan vücudunda immünojeniteye neden olmalarına yol açabilmektedir. Aljinat ve kitosan gibi biyomalzemeler ise KDM uygulamalarında uzun bir süredir kullanılan ve hala geliştirilmekte olan polisakkaritlerdir. DM olanında son 20 yıldan beri en çok kullanılan polisakkaritler materyallerden olan kitosan ve aljinat hakkında çok sayıda çalışmanın yayımlanmış olduğu görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. DM alanında en sık kullanılan doğal kaynaklı polisakkaritler ve bu materyaller ile yayımlanan makalelerin yıllara göre dağılımı (Tchobanian, Van Oosterwyck, ve Fardim, 2019)

1.5. Biyomalzemeler İçin Yenilenebilir Doğal Kaynaklar

Yapay dokuların ve doku ikamelerinin daha biyouyumlu ve ekonomik yöntemlerle oluşturulabilmesi için DM alanındaki bilim insanları yenilenebilir, ekonomik ve fonksiyonel yeni biyomalzemelerin arayışı içerisine girmiştir. Mevcut olarak kullanımda olan malzemelerin iyileştirilmesinin yanı sıra, doğada, günlük yaşantımızda rastladığımız biyomalzeme kaynaklarının biyomedikal alanda kullanımı yenilenebilir kaynaklardan ucuz, etkili ve katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmeye çalışılması son zamanlardaki önemli DM ve malzeme bilimi araştırma konularındandır. Bitki veya hayvan dokuları, deniz canlıları, selüloz türevleri, kumaş gibi tekstil ürünleri, buz, yumurta kabuğu, meyve çekirdeği veya posası gibi pek çok geri dönüşüm materyalleri 3B doku matrikslerinin üretiminde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 10). Tablo 4'te yenilenebilir biyomalzemelerin kullanım alanları ile sundukları avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir.



Şekil 10. Yenilenebilir doğal materyallerin DM uygulamalarında kullanımı (Nguyen ve Camci-Unal, 2020)

Tablo 4
Yenilenebilir biyomalzemeler, uygulama alanları, sundukları avantaj ve dezavantajları

Biyomalzemeler	Avantajları	Dezavantajları	Uygulama Alanları	Referanslar
Desellürize bitki dokuları	Doğal damar ağı Biyo-fonksiyonlaştırma için kimyasal modifikasyonlara açık yapı 3D morfolojiler için uygun geometrik yapı	*In vitro* biyouyumluluk ve *in vivo* performanslarının detaylı olarak incelenmesi gereklidir	*In vitro* hastalık modelleri Kalp damar modelleri	(Gershlak ve diğerleri, 2017)
Yumurta kabukları	Yüksek kalsiyum karbonat içeriği Sürdürülebilir, ucuz kaynak	Saflaştırma işlemi için standardize protokolleri yok	KDM uygulamalarında 3B doku matrikslerinin yapımı	(Wu ve diğerleri, 2019)
Meyve posaları (elma)	Geri dönüştürülebilir, kolay ulaşılabilir kaynak Ekonomik Toksik olmayan yapı	Saflaştırma işlemi için standardize protokolleri yok	Yara iyileştirici ve osteo kondrojenik uyarıcı biyoaktif doku iskeleleri	(Yates ve diğerleri, 2017)
Selüloz atıklar	Düşük maliyetli Sürdürülebilir Biyouyumlu Gözenekli Kolay şekil verilebilir yapı	Sulu ortamlarda düşük mekanik dayanım Selüloz yapısından dolayı biyobozunur olmama	*In vitro* hastalık modeleri yönlendirilmiş hücre büyümesi ve mineralizasyon	(S.-H. Kim ve diğerleri, 2015)
Buz	Suyun moleküler yapısının bilinmesi yapı Ucuz maliyet Kolay üretim	Dondurma işlemi üzerinde optimizasyon gereklidir	Anziotropik kemik yapılarının üretimi Buzun primer kalıp olarak kullanılması	(Wang ve diğerleri, 2019)
Tekstil ürünleri	Geri dönüşüm ürünü Atık değerlendirme Farklı mekanik ve morfolojik seçenekler	Düşük biyobozunurluk	*In vitro* hastalık modelleri Yara örtüleri 3D DM iskele yapımı	(Gomes, Mano, Queiroz, ve Gouveia, 2015)
Deniz süngeri	Yüksek gözeneklilik Esneklik Maliyetsiz	Sinterleme, ısıtma, soğutma, dezenfeksiyon işlemleri	Primer iskele	(Granito, Custódio, ve Rennó, 2017)
Tofu ve soya ürünleri	Yüksek protein içeriği Gözenekli yapı Biyobozunur	*In vivo* biyouyumluluğu ve biyolojik performansı belirlenmemiştir	Yara örtüsü Biyoglass kompozitleri 3B süngerimsi yapılar	(S. Ahn ve diğerleri, 2018; D. Ji ve diğerleri, 2017)

1.6. Biyomedikal Bir Meyve Olarak Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller)

Dünya üzerinde pek çok kişi hastalıkların tedavisi için şifalı olduğunu düşündüğü bitkisel ürünleri veya aroma terapi yollarını denemektedir. Bu nedenle, bilim çevrelerinin toplum sağlığının korunması için kullanılan bu ürünlerin gerçek niteliğini ortaya çıkarması ve faydalı olanların belirlenip detaylı analizlerinin yapması gerekmektedir. Özellikle bitkilerle yapılan araştırmalar bazı bitkilerden elde edilen özütlerin, salgıların ve ürettikleri sekonder metabolitlerin önemli bir kısmının farmasötik etkilerinin olduğunu göstermiştir (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016a). Gerçekleştirilen tez çalışmasında ayva meyvesinin (*Cydonia Oblonga* Miller) çekirdekleri kullanıldığı için, bu bölümde genel olarak ayva meyvesinin, yaprağının ve çekirdeğinin içeriği, farmasötik etkileri ve biyomedikal kullanım alanları tartışılmıştır.

Ayva, gülgiller familyasına ait olup köken olarak batı Asya ve trans-Kafkasya bölgesinde (Türkiye, İran, Azerbaycan, Türkmenistan, güneybatı Rusya, Ermenistan) yetişen bir meyvedir. Antik çağlarda Himalaya dağlarının çevrelediği doğu ülkelerinde bulunan ayva bitkisi, daha sonra batıya doğru yayılım göstererek Avrupa kıtasında da yetişmeye başladığı tespit edilmiştir. Günümüzde ayva bitkisi dünya genelinde (Asya, Avrasya, Avrupa, Amerika ve Afrika kıtalarında) bir dağılım göstermektedir. Ayva üretiminde dünyada ilk sırada ülkemiz bulunmaktadır. Tüm dünyadaki ayva meyvesi popülasyonunun yaklaşık olarak %25' i Türkiye kökenli olup ve kalan yüzdelik kısmı Çin, İran, Arjantin ve Fas ülkeleri kendi aralarında bölünerek oluşturmaktadır (Sabir ve diğerleri, 2015). Ayva bitkisi monotipik bir türdür, çok gövdeli bir çalı veya ufak ağaç olarak yetişir. Tüylü tomurcuk, yaprak ve meyve yüzeyine sahiptir. Yaprakları yaklaşık 5 cm çapında ve 10 cm uzunluğunda oval şekillidir. Bitkinin çiçekleri beyaz renkli olup 5 petal yaprağa ve çoklu ovül yapısında alt yumurtalıklara sahiptir. Kuzey yarımkürede yaklaşık olarak nisan ayı ortalarında çiçeklenen ayva bitkisi ekim ayına doğru 8-10 cm çapında oval sarı renkte olgun ayva meyvelerini oluşturur (Şekil 11).



Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) çiçeği



Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) meyvesi

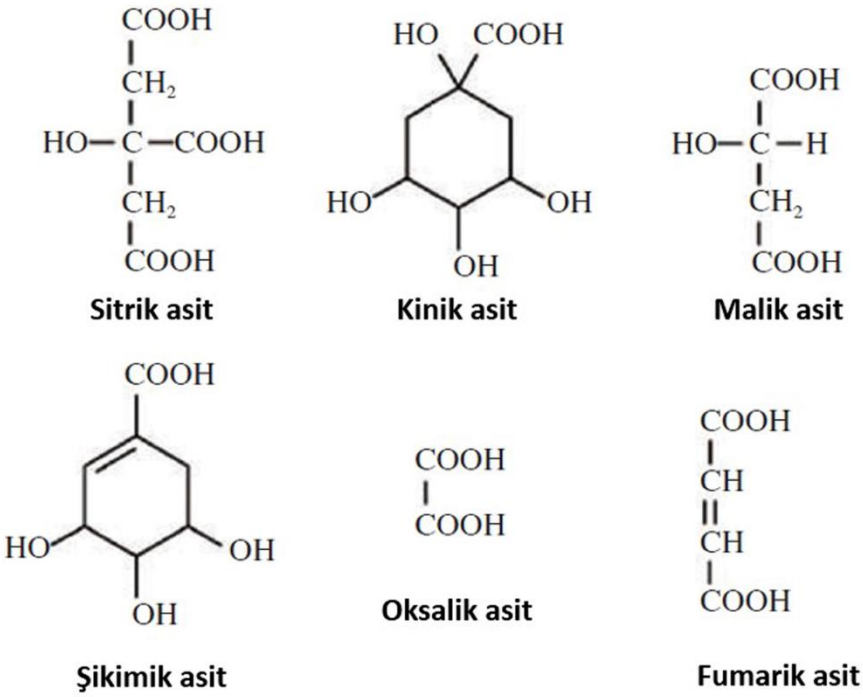
Şekil 11. Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) çiçeği ve meyvesi (Sabir ve diğerleri, 2015)

Geleneksel tıp uygulamalarında ayva meyvesi antiseptik, hepatoprotektif ve anti-enflamatuar olarak; ishal, dizanteri, karaciğer bozuklukları, lökore, hemoptizi, uterus kanamaları ve yaraların tedavisinde, tohumları ise kabızlık, dizanteri, öksürük, boğaz ağrısı, bronşit ve bağırsak koliklerinin tedavisinde kullanılmıştır (Duke, 1990). Ayva meyvesi kendi arasındaki cinsleri ve yetiştiği toprağın özelliklerine bağlı olmakla beraber ufak değişiklik gösteren kimyasal içeriğe sahiptir. Ayva bitkisinin meyvesi, kabuğu, yaprakları, çekirdekleri ve çekirdek jeli farklı miktar ve nitelikte organik ve fenolik bileşikler içerir. Genel olarak ayva meyvesinde en çok aldobiouronik asit, selüloz ve ksiloz şekerlerinin bulunduğu, az miktarda *L*-arabinoz olduğu da literatürde gösterilmiştir (Sabir ve diğerleri, 2015). Majör olarak *4-O*-metil-*D*-glikono-*D*-ksilan hidrofilik polisakkaritini içeren ayva bitkisinin, yapraklarında sorbitol ve metil-*α*-*D*-galaktoz varlığı da tespit edilmiştir (A. P. Oliveira ve diğerleri, 2008). Klorojenik asitin (5-*O*-kafeoilkinik asit), ayvanın meyve kısmında en çok bulunan fenolik bileşen olduğu tespit edilirken kabuk kısmında ise en çok rutin (küersetin *3-O*-rutinosit) fenolik bileşeninin bulunduğu belirtilmiştir (Silva ve diğerleri, 2006). Tablo 5'te ayva meyvesinin temel kimyasal bileşenleri özetlenmiştir.

Tablo 5
Taze ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) meyvesinin kimyasal bileşenleri (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016a; T.Erdoğan, T.Gönenç, 2012)

Taze Ayva Meyvesi Kimyasal Bileşenleri (100 g için)					
Genel İçerik		Mineral İçeriği		Vitamin İçeriği	
Enerji	176 kJ	Na	9,2 mg	Retinol	5,5 µg
Protein	0,6 g	K	189 mg	Karoten	0,03 mg
Asit	0,9 g	Ca	66 mg	Tiyamin	30 µg
Karbohidrat	9,1 g	Fe	10 mg	Riboflavin	30 µg
Su	86,9 g	P	1,1 mg	Niasin	0,2 mg
Kül	0,6 g	Cu	0,006 mg	Askorbik asit	13 mg
Fiber	1,9 g	Zn	0,013 mg		
		Mn	0,02 mg		

Ayva bitkisinin yaprakları, diğer kısımlara nazaran daha yüksek miktarda kinik asit içerir. Ancak ayva meyvesi ile kıyaslandığında daha düşük miktarda malik asit ve kinik asit içerir ve daha yüksek miktarda sitrik, oksalik, fumarik ve şikimik asit içerirler. Şekil 12'de ayva meyvesi ve yapraklarında en çok bulunan organik asitlerin yapıları gösterilmektedir.



Şekil 12. Ayva yapısında bulunan organik asitler (Sabir ve diğerleri, 2015)

1.7. AÇJ ve Biyomedikal Uygulamaları

Ayva meyvesi içerisinde uzunluğu ortalama 5-7 mm arasında değişen damla şekilli kırmızımsı kahve rengi kabuklu çok sayıda çekirdek içerir. Bu çekirdeklerin suda bekletilmesi veya etanol gibi solventler ile muamele edilmesi sonucunda çekirdekler ortama yapışkan, renksiz ve kokusuz kıvamlı bir jel salgılar. Geleneksel tıp uygulamalarında ayva çekirdeğinden elde edilen bu jelin yaralarda kanamayı durdurucu, deriyi nemlendirici ve sindirim sistemini düzenleyici etkilerinin olduğu görülüp açık yaraların tedavisinde, sindirim sistemini etkileyen rahatsızlıklarda (ishal, dizanteri, kabızlık), boğaz ağrısı ve bronşit gibi rahatsızların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016).

Ayva çekirdeklerinin içeriği incelendiğinde temel olarak Tablo 6'da özetlendiği şekilde farklı fenolik bileşiklerden, organik asitlerden ve şeker türevlerinden oluştuğu görülecektir.

Tablo 6
Ayva çekirdeği bileşenleri (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016)

Ayva Çekirdeği Bileşenleri	
Fenolik maddeler	D-(-)-kinik asit ve türevleri, apigenin, stellarin, 6-C-pentozil-8-C-glikozil krizoliol
Şekerler	L-arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, D-glikoz
Yağ asitleri	Palmitik asit, linoleik asit, steraik asit, oleik asit, eikosanoik asit
Taninler	β- daukosterol
Tormentik asit	Ursolik asit

Ayva çekirdekleri ve AÇJ ile yapılan bir çalışmada, çekirdek salgısının dermatit bakterilerine karşı (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococus aureus* ve *Staphylococcus epidermis*) antibakteriyal etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Alizadeh, Rahnema, Semnani, ve Hajizadeh, 2013).

Hamed ve ark. yaptığı çalışmaya göre solvent ekstraksiyon metoduyla elde edilen AÇJ, gümüş nanopartiküller ile birlikte yanık deri lezyonlarının tedavisinde ve *Aspergillus niger* fungal enfeksiyonlarına karşı antifungal krem olarak kullanmışlardır. Fareler üzerinde yapılan deneyde topikal olarak uygulanan ayva jelini içeren kremin konvansiyonel olarak kullanılan mupirocin kremden daha etkili iyileşme sonuçları verdiği belirtilmiştir (Alizadeh, Rahnema, Semnani, ve Ajalli, 2014).

2019 yılında yapılan bir çalışmaya göre, ayva jelinin titanyum dioksit (TiO_2) ve silisyum oksit (SiO_2) nanopartikülleriyle oluşturulan hibrit filmlerin, gıda zehirlenmelerine sebep olan *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Salmonella tyhimurium* ve *Escherichia coli* O157:H7 mikroorganizmaları üzerinde antibakteriyel etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Agar disk difüzyon ve sıvı (broth) mikro-dilüsyon deneyleri sonucunda ayva jeli katkılı filmlerin antibakteriyel özelliklerinin sadece TiO_2 veya SiO_2 partiküllerini içeren filmlerden daha iyi performans sergilediği gözlemlenmiştir (Shahbazi ve Moosavy, 2019).

Geleneksel tıp uygulamalarında ayva jelinin yara iyileştirici olarak kullanıldığı bilinmektedir. AÇJ'nin rejeneratif özelliklerinin deneysel olarak ortaya konulabilmesi için Hemmati ve ark. (Hemmati ve diğerleri, 2012) tavşanlar üzerinde *in vivo* incelemelerde bulunmuştur. Bunun için sağlıklı tavşanların tüysüz derileri üzerinde T-2 toksini uygulanarak deri lezyonları oluşturulmuştur. 100 µg T-2 toksini, 12 µL metanol çözeltisi çözündürülerek elde edilen toksin solüsyonu tavşanların derileri üzerinde 24 saatlik aralıklarla 2 gün boyunca damlatılmıştır. Uygulamanın 8. gününde tavşanların derilerinde şiddetli eritem ve iltihaplanma oluştuğu gözlemlenmiştir. Derilerinde yara meydana getirilen tavşanların lezyonlarının üzerine %5, 10 ve 15'lik (mg/mg) konsantrasyonda AÇJ uygulanmıştır ve %10'luk ve %15'lik AÇJ içeren solüsyonların uygulandığı tavşanlarda derinin tamamen iyileştiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada ayva jelinin yarayı iyileştirme mekanizması T-2 toksinin bozduğu protein sentezini, deri ile T-2 toksini arasında tampon oluşturarak toksinin etkisini inhibe ettiği, bölgede bulunan deri hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada AÇJ'nin antioksidan etkilerinin olduğu da vurgulanmıştır (Ashraf, Muhammad, Hussain, ve Bukhari, 2016; Hemmati ve diğerleri, 2012).

Şimşek ve ark. 2020 yılında yayımladığı bir çalışmada ise ayva çekirdeğinden elde edilen jel ile 3B doku iskeleleri oluşturulmuştur. Elde edilen yapıların sıvı tutma kapasiteleri ve gözenekliliği ölçülmüş ve malzemenin oldukça yüksek değerlerde poroziteye (%83,43 ± 2,84) ve sıvı tutma kapasitesine (%13677,50 ± 388,82) sahip olduğu belirlenmiştir. Oluşturulan gözenekli yapılar DM uygulamalarında kullanımındaki uygunluğu için iAMKH'ler ile *in vitro* hücre kültürü koşulları altında 10 gün boyunca test edilmiştir. Yapılan hücre canlılık testleri sonucunda ayva jelinin biyouyumlu bir malzeme olduğu ve hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020).

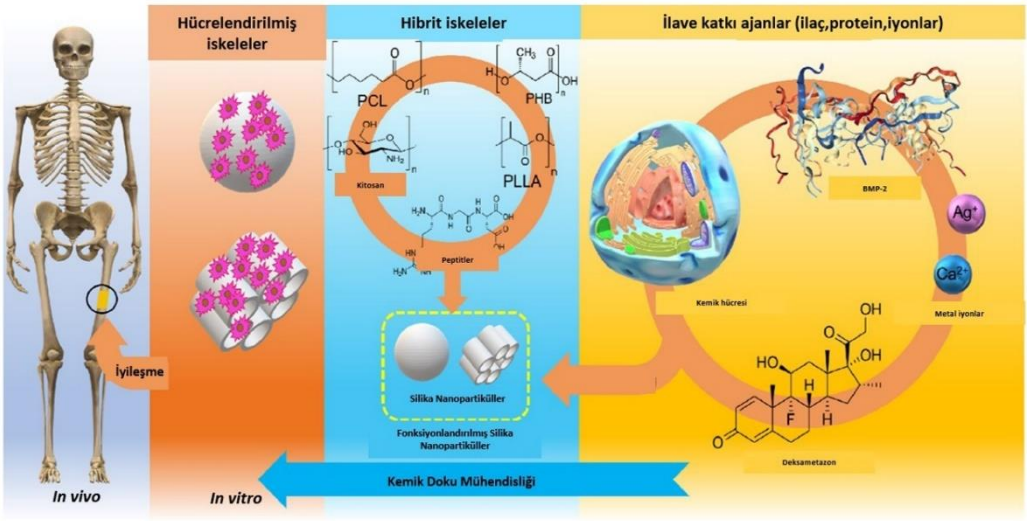
Yapılan tez çalışmasında AÇJ bahsedilen biyokimyasal özellikleri, meyvenin atık çekirdeklerinden elde edilmesi gibi ucuz ve kolay ulaşılabilir bir biyomalzeme olması gibi

çeşitli avantajları nedeniyle KDM uygulamaları için üretilecek 3B yapılarda kullanılacak ana materyal olarak belirlenmiştir. Ancak AÇJ polimerinin aşırı hidrofilik yüzey özellikleri ve nispeten düşük mekanik dayanımının kemik dokusu ikamesi üretiminde sorun yaratmaması için, biyouyumlu ve kemik dokusu için osteorejenerasyonu uyardığı bilinen silika molekülleri ile AÇJ polimeri modifiye edilmiştir.

1.8. Silisyum Elementi ve KDM Uygulamaları

Silisyum yerkürede (%27,7) en çok bulunan elementlerden biridir. Elektronik, optik, termodinamik, kozmetik ve biyomedikal gibi pek çok farklı alanda aktif olarak kullanılan silisyum elementi nispeten ucuz sayılabilecek inorganik bir materyaldir (Royal Society of Chemistery, 2020). İnsan vücudunda bulunan iz elementler incelendiğinde silisyum elementini demir ve çinkodan sonra üçüncü sırada yer aldığı görülecektir. Ortalama olarak 1-2 g silisyum elementi bulunan insan vücudunda, günlük beslenme ile 20-50 mg kadarlık silisyum mineralleri alımı gerçekleşir (Jugdaohsingh, 2007).

İnsan vücudunda silisyum elementi en çok kemik ve bağ dokuda bulunur. Kemik yapısı içinde özellikle glikozaminoglikan yapılarına bağlı halde görülen silisyum, bağ doku ve kemik dokunun HDM'inde bulunan proteinlerinin sentezinde görevli enzimlerin kofaktörü olarak görev yapmaktadır (Arora ve Arora, 2017). Silisyum elementi biyomedikal alanda toz, jel, 3B gözenekli iskele ve implantlar gibi pek çok değişik formlarda kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde; KDM için geliştirilmiş çok sayıda silika nano partiküllerinin, silika içeren mikro ve nano ilaç taşıyıcı sistemlerin, silika ve kalsiyum fosfat kompozitlerinin, biyocam yapıların, silika ve polimer hibritlerinin (kollajen, jelatin vb. doğal polimerler) üretilmiş olduğu görülmektedir (Shadjou ve Hasanzadeh, 2015) (Şekil 13).



Şekil 13. Silisyum elementinin KDM alanındaki olası kullanım şekilleri (Eivazzadeh-Keihan ve diğerleri, 2020)

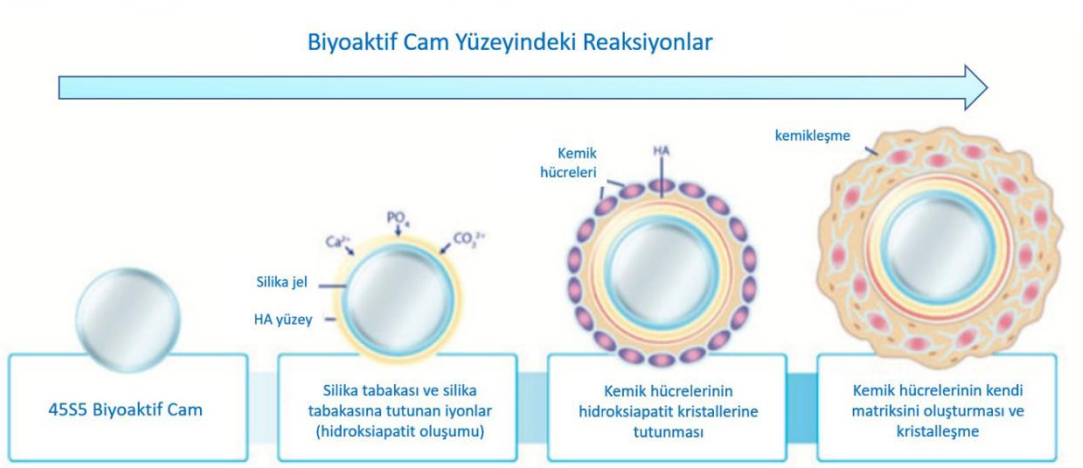
Carlisle ve ark. 1980 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, silika moleküllerinin civcivlerin tibia kemik matriks yoğunluğunu arttırdığını ve hayvanlara verilen silika konsantrasyonuna bağlı olarak prolil hidroksilaz enzim aktivitelerinde artış olduğunu ve daha çok kollajen sentezlendiğini belirtmiştir (Carlisle, 1972).

2007 yılında yayımlanan bir çalışmaya göre insan osteoblast hücreleri silika içeren nano-küreleri ile *in vitro* koşullar altında muamele edildiğinde, hücrelerde HDM sentezinin arttığı, alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin sentezinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Feng ve diğerleri, 2007). Aynı sene içerisinde Zou ve ark. yayınladığı *in vivo* koşullarda tamamlanan bir diğer çalışmada ise silika molekülleri HA kristalleri kemik grefti halinde koyunun kemiğine nakledilmiş ve osteojenik iyileşme gözlemlenmiştir. Silika içeren greftler sadece HA kristallerinin uygulandığı greftlerden daha yüksek miktarda ALP sentezi ve hücresel aktivite sergilemiştir (S. Zou ve diğerleri, 2008).

Martinez ve ark. KDM iskelelerin inşası için silisyum doplanmış jelatin materyalinden 3B yazıcılar yardımıyla gözenekli yapılar elde etmiştir. Oluşturulan yapıların mekanik özelliklerinin insan trabeküler kemiği ile benzer nitelikler sergilediği belirtilen çalışmada, silisyum içeren yapıların pre-osteblastik hücrelerin osteoblast hücrelerine daha çok farklılaştığı gözlemlenmiştir (Martínez-Vázquez ve diğerleri, 2015)

Silisyum molekülleri kemik doku tamirinde kullanılan bir diğer önemli formu da biyocam yapılarıdır. Biyocam terimi ilk olarak 1960'ların sonunda Dr. Lary Hench tarafından geliştirilmiş bir biyomalzemedir (Hench, 2006). Kemik dokusuyla uyumlu olan biyocam malzemesi, içerdiği kalsiyum, magnezyum, fosfor ve potasyum gibi

bileşenlerinden dolayı osteokonduktif etki gösterir. Bu nedenle KDM uygulamalarında sıkça kullanılan bir malzeme çeşididir (Rahaman ve diğerleri, 2011). Biyocam malzemelerin de içerdiği mineral kompozisyonu veya yüzey kaplamalarına göre değişik çeşitleri bulunmaktadır. Boccardi ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada 45S5 kompozisyonuna sahip biyocamın (%24,5 azot protoksit (N_2O), %24,5 kalsiyum oksit (CaO), %6 fosfor pentoksit (P_2O_5) ve %45 SiO_2) yüzeyi biyoaktif silika nanopartikülleri ile kaplandığında terapötik fonksiyonunun arttığı ve ortama salınan silisyum iyonları ile osteoblastların kemik matriksi sentezlemek için gerekli olan gen bölgelerinin aktifleştiği belirtilmiştir (Boccardi, Liverani, ve Boccaccini, 2019). Şekil 14'te fizyolojik ortama bırakılan bir biyocam materyali yüzeyinde zamana bağlı gerçekleşen değişimler temsili olarak gösterilmiştir.



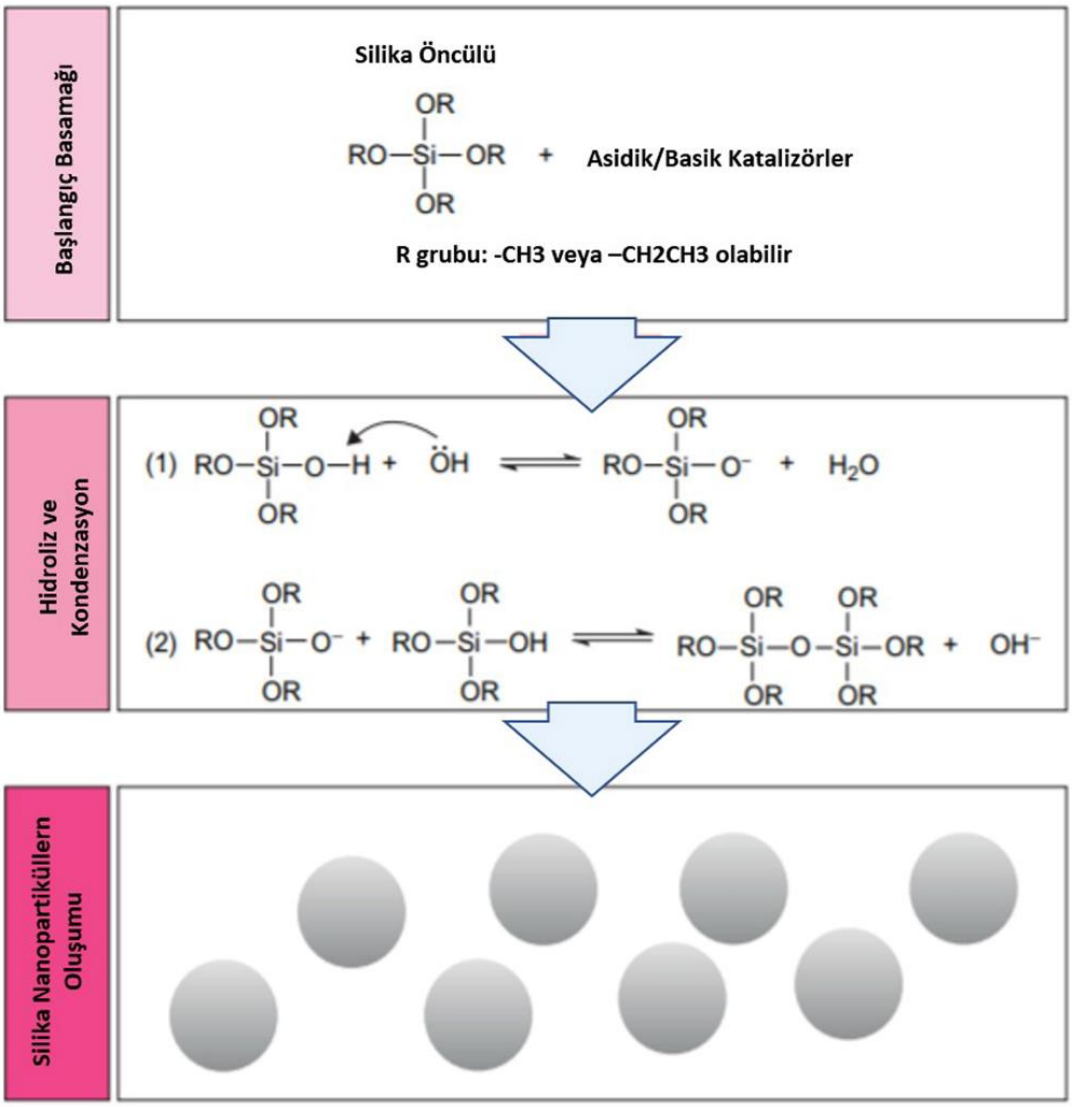
Şekil 14. Biyocam (45S5) materyali ve yüzeyinde meydana gelen değişimler (Ayotte, Steven, Velez, 2016)

Silika ile zenginleştirilmiş HA ve silika içeren biyocam yapılarının kemik doku ile etkileşimde sergilediği performansları genel olarak silisyum içermeyen formalarına göre daha yüksek bulunmuştur (Arora ve Arora, 2017). Silisyum moleküllerinin hibrit yapılarda sağladığı mukavemet, nano partikül yapıları sayesinde 3B iskelelerde yüzey alanını arttırması, silisyumun düşük sitotoksisiteye sahip olması ve hücrelerin hem proliferasyonunu hem de osteojenik farklılaşmasını uyarması silisyum bileşiklerinin KDM uygulamalarında kullanımı sağlayan önemli faktörlerdir (Eivazzadeh-Keihan ve diğerleri, 2020). Yapılan tez çalışmasında silisyum bahsedilen biyouyumlu, biyoaktif ve osteojenik farklılaşmayı desteklemesi gibi özellikleri nedeniyle AÇJ biyopolimerinin yüzey modifikasyonu için kullanılmıştır. Silisyum ile modifikasyon işlemi sol-jel adı verilen metot ile gerçekleştirilmiştir.

1.9. Biyomedikal Uygulamalarda Sol-Jel Metodu ve Kriyojel Yapılar

Sol-jel teknolojisi malzeme biliminde sıkça kullanılan ve silisyum elementinden farklı nitelikte fonksiyonel malzemeler üretilebilmesini sağlayan bir metottur. Silisyum atomları ile camsı bir matriks yapısı oluştururken yapının içerisine istenilen inorganik, organik veya biyolojik moleküllerin katılmasına izin veren sol-jel metodu, diğer kimyasal tekniklere göre nispeten daha düşük sıcaklıklarda çalışan ve düşük maliyetli kabul edilen bir yöntemdir. (Gupta ve Kumar, 2008).

Sol-jel yöntemiyle üretilen malzemelerin tarihi 1640'lara kadar gitmektedir. Van Helmont silikat materyalini alkali koşullar altında çözdürerek silika jeli oluşturduğunda elde ettiği şeffaf jeli "su camı" olarak isimlendirmiştir, bugün Van Helmont'un elde ettiği yapının bir sol-jel ürünü olduğunu bilmekteyiz (Ciriminna ve diğerleri, 2013). 1846 yılında ise Joseph Ebelmen, silikon tetraklorit ($SiCl_4$) bileşiği ve etanol karışımından şeffaf bir solüsyon elde etmiştir. Elde ettiği yapıyı incelediğinde tetraetil ortosilikat (TEOS) kimyasalını sentezlediği anlaşılmıştır. TEOS solüsyonunu oda koşullarında beklettiğinde ise cam benzeri şeffaf bir jel elde ettiğini belirtmiştir (Lei ve diğerleri, 2020). Dr. Ebelmen'in elde ettiği yapıya bugün mikro gözenekli "kserojel" yapıları adı verilmektedir. Sol-jel terim olarak ise ilk kez Dr. Graham tarafından 1864 yılında literatüre sunulmuştur (Graham, 1877). Dr. Kistler ise 1931 yılında, silisyum dioksit (SiO_2) bileşiğinden süper kritik kurutma tekniği ile ultra hafif ve termal yalıtımı yüksek gözenekli 3B yapılar elde ederek "aerojel" kavramını literatüre kazandırmıştır (Kistler, 1931). 1968 yılında ise Dr. Stöber, daha sonra Stöber metodu olarak da bilinecek olan, eş boyutlarda silika nanopariküllerin üretilebildiği bir çeşit sol-jel metodu geliştirmiştir. Metoda göre silika öncülü TEOS solüsyonu, bazik ortamda su ve etanol varlığında reaksiyona girerek nanoboyutta gözenekli silika küreciklerin (5-200 nm) oluşmasını sağlar. Yapılan çalışmada ortamın pH'ı, su ve alkol miktarının değiştirilerek farklı boyutlarda nanopartiküllerin elde edilebileceği belirtilmiştir (Pathmamanoharan, 1988; Stöber, Werner, Fink, 1968). Şekil 15'te sol-jel yöntemi ile silika nanopartiküllerin sentezi özetlenmiştir (Şekil 15).

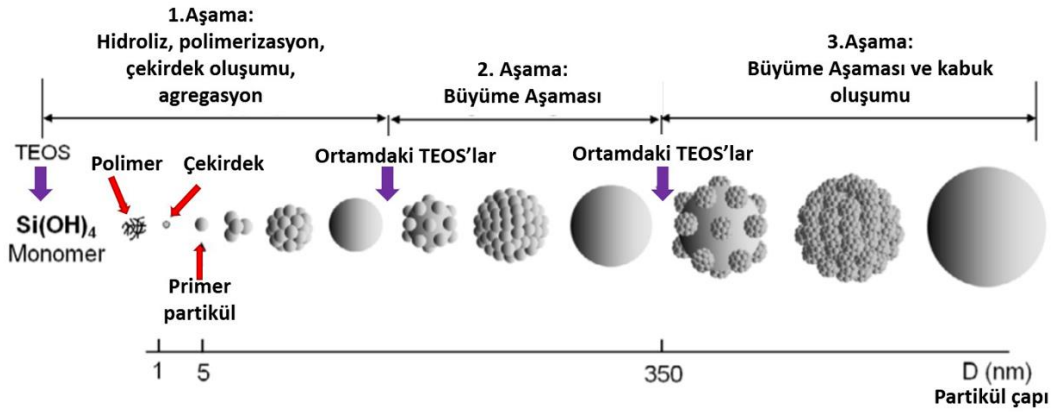


Şekil 15. Sol-jel metodu ile silika nanopartiküllerin sentezi (S.-W. Ha, Weitzmann, ve Beck, 2013)

Sol-jel metodunda kullanılan silika öncülleri incelendiğinde en çok TEOS prekürsörünün tercih edildiği görülmeltedir. TEOS, diğer silika öncüllerine göre nispeten daha kontrol edilebilir ve yavaş reaksiyon verdiği için çoğu sol-jel reaksiyonunda kullanılan bir kimyasaldır. TEOS ile gerçekleştirilen sol-jel metodunda sadece reaksiyon koşulları ile oynanarak (pH, sıcaklık, katalizörler) elde edilen yapıların morfolojik özellikleri kolayca değiştirilebilir (Owens ve diğerleri, 2016).

Silika tek başına aşırı reaktif özellikler sergilemediği için sol-jel reaksiyonlarında genellikle asit veya baz katalizörlü sulu ortamlarda gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalara göre asit katalizörlü ortamlarda TEOS'un hidrolizi daha hızlı gerçekleşir ancak kondenzasyon tepkimeleri daha uzun sürer ve sonucunda oluşan yapının zircirler arası boşluğu nispeten daha fazladır ve transparan formda 100 nm ve altındaki boyutlarda nanoparçacıklar elde

edilir. Baz katalizörlü ortamlarda gerçekleşen sol-jel reaksiyonlarında ise hidroliz basamağı yavaş tamamlanır ancak kondenzasyon aşaması oldukça hızlıdır. Zincirleme büyüme şeklinde ilerleyen baz katalizörlü sol-jel reaksiyonundan elde edilen partiküller, asit katalizörlü yöntem ile elde edilen partiküllere göre daha büyük boyutlarda (>100 nm) oluşur. Bu nedenle polimer/silika nanopartikül hibrit yapılarının oluşturulmak istenen çalışmalarda genellikle asit katalizörlü ortam tercih edilir (Hajji ve diğerleri, 1999; S. Zou ve diğerleri, 2008). Şekil 16'da TEOS prekürsöründen bazik katalizörlü ortamda zincirleme büyüme ile nanokürelerin oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 16. TEOS ile alkali ortamda gerçekleşen sol-jel reaksiyonu ve nanopartiküllerin zincirleme büyümesi (Masalov, Sukhinina, Kudrenko, ve Emelchenko, 2011)

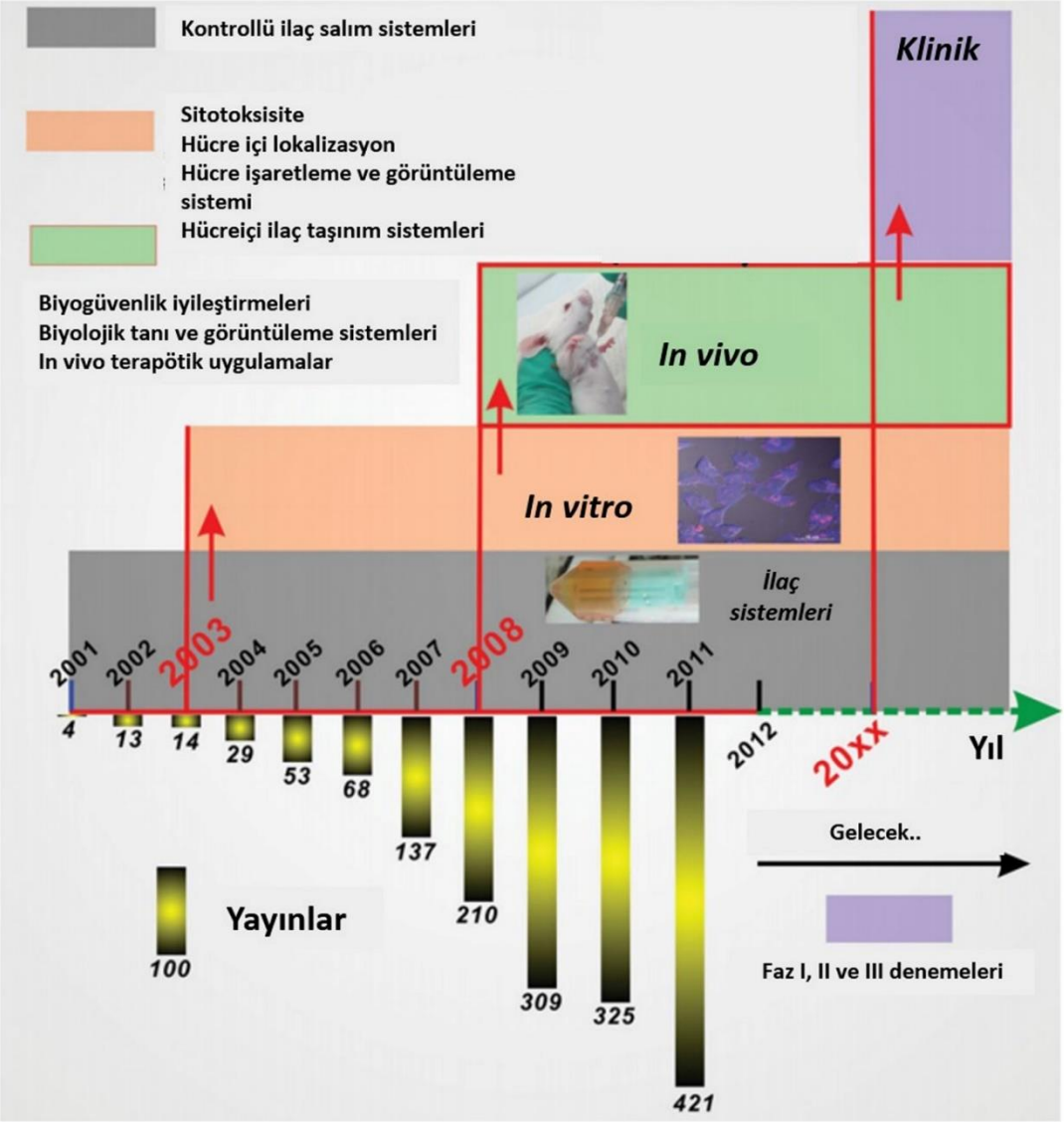
Sol-jel tekniği geliştirildiği günden günümüze kadar pek çok farklı amaç için modifiye edilmiş ve kullanılmıştır. Yapılan tez çalışmasında literatüre ilk kez mikrodalga destekli sol-jel metodu kazandırılmış, böylece reaksiyonun oda koşullarında tamamlanma süreci 24 saatten fazlayken mikrodalga destekli sistem sayesinde 120 sn.'ye inmiştir.

Sol-jel metodu sayesinde üretilen silika materyalleri günümüzde fiber optik sistemler, elektro-optik cihazlar, kromatografik kolonların yüzeyleri, nanokrital yarı iletken yapılar, dalgaboyu ayarlanabilir lazerler, kimyasal sensörler, güneş kremleri, savunma ve uzay teknolojilerinde üretilen aerojel yapıları gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Yapılan tez çalışmasında sol-jel metodu KDM uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilen kriyojellerin üretimi için uygulandığından, bu bölümde sol-jel metodunun biyomedikal alandaki bazı kullanım alanlarına değinilmiştir. Sol-jel tekniğinin nispeten düşük sıcaklık ve atmosferik basınç altında kolayca gerçekleşen reaksiyon çeşidi olması, ürünlerinin biyouyumlu özellik sergilemesi, çevre kirliliğine yol açmaması gibi özellikleri onu biyomedikal uygulamalarda kullanım için avantajlı kılan özelliklerdir (Gupta ve Kumar,

2008). Sol-jel metodu sayesinde organik/inorganik hibrit yapılar oluşturularak organik materyalin sunduğu esneklik, biyouyumluluk, biyoaktiflik ve işlenebilirlik gibi avantajlar, inorganik silisyum elementinin sağlayacağı mekanik ve termal stabilite ile birlikte değerlendirilmiş olacağı için hibrit materyal üretiminde sol-jel metodu sık uygulanan bir yöntemdir (S. Zou ve diğerleri, 2008).

Hibrit materyallerin sol-jel ile üretimi için organik moleküllerin silika solüsyonu içinde çözdürülüp hibrit jel yapısı elde edilebildiği gibi, sol-jel reaksiyonu ile elde edilmiş gözenekli silika jel yapısı daha sonradan organik bileşenleri içeren solüsyona daldırılması yolu ile de elde edilebilir (Gupta ve Kumar, 2008).

2010 yılında silika molekülünün biyolojik dokularda kullanımı ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından "Genel olarak Güvenlidir (GRAS)" onayı almıştır ve o tarihten günümüze kadar silika partikülleri kozmetik ve gıda alanı dahil olmak üzere pek çok üründe katkı olarak kullanılmaktadır (Tang, Li, ve Chen, 2012). 2000 yılında, silika temelli biyocamların, normal 45S5 biyocamlar gibi klinikte kullanımı onaylanmıştır (Lei ve diğerleri, 2020). Sol-jel ile üretilen ve "Cornell Noktaları" olarak da bilinen silika nanopartiküllerin insan melenoma ve malign beyin tümörlerinin klinik olarak görüntülenmesinde kullanımı için 2010 yılında, sentinal lenf nodlarının görüntülenmesi için 2014 yılında FDA tarafından onay alınmıştır (Chen, Chen, ve Shi, 2013). Son olarak, 2020 yılının ilk aylarında DelSiTech isimli firma kronik hepatit-B tedavisi için geliştirmiş olduğu sol-jel tekniği sayesinde antiviral ilacin uzun süreli salınımını sağlayacak gözenekli silika kapsüller geliştirmiştir. Araştırma şu an klinik faz çalışmaları aşamasındadır (DelSiTech Ltd., 2020). Şekil 17'de sol-jel yöntemi ile oluşturulan nano silika partiküllerin biyomedikal alanda kullanımı ve yıllara göre bu alanda yayımlanan çalışmaların sayısı gösterilmiştir.



Şekil 17. Silika nanopartiküllerin biyomedikal alanda kullanım zaman çizelgesi ve bu konu hakkında yayımlanan çalışmaların yıllara göre dağılımı (Chen, Chen, ve Shi, 2013)

Şekil 17'de de görüleceği gibi sol-jel ürünlerinin biyomedikal alandaki kullanımı her geçen yıl giderek artış göstermektedir. Silika nanopartikülleri sahip olduğu yüksek özgül yüzey alanı ve biyouyumlu olması nedeniyle özellikle kontrollü ilaç salım sistemlerinde tercih edilen bir materyal olmalarını sağlamıştır. İlacın film yüzeyini oluşturan silika tabakasının gözenek boyutu ve kalınlığının ayarlanması, ilaç difüzyonun hız ve süresini kontrol edebilmek için kullanılan ana yaklaşımlardan biridir (Haddow, James, ve Van Noort, 1996).

Sol-jel ürünü silika nanopartiküllerin biyomedikal alanda sıkça kullanıldığı bir diğer alan da görüntüleme sistemleridir. Silika nanopartikülleri içine enkapsüle edilmiş manyetik, foto-termal veya lüminesans nitelikte materyaller sayesinde hücre içi ve hücre dışı

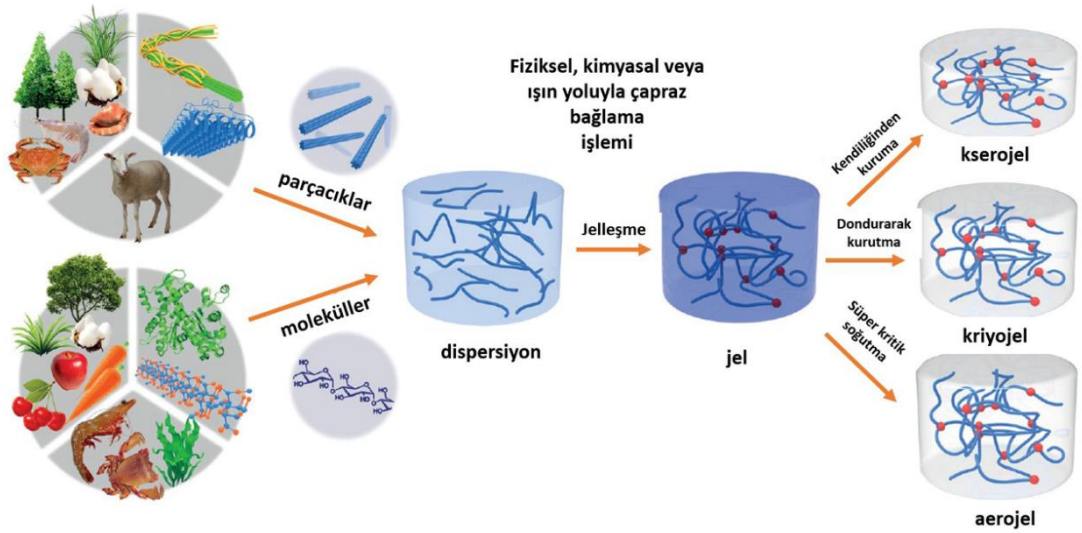
görüntülemeler gerçekleştirilebilmektedir (Lei ve diğerleri, 2020). Tan ve ark. boya katkılı silisyum nanopartiküllerini ters mikroemisyon tekniği ile üretmiş ve nanopartiküllerin yüzeyi modifiye edilerek insan lösemi hücre yüzeylerine tutunabilir hale getirmişlerdir. Yapılan çalışmaya göre lösemi hücrelerinin lüminesans boya içeren silisyum nanopartikülleri ile görüntülenmesinde normal floresan görüntülemeye göre 4 kat daha yüksek seviyede optik sinyal elde edilebilmiştir (Santra, Wang, Tapec, ve Tan, 2001). An ve ekibinin yaptığı bir çalışmada ise manyetik rezonans görüntüleme sistemlerinde kullanılan süper-paramanyetik nanoparçacıkların, demir oksit tozları (γ-Fe_2O_3, maghemit), sol-jel metoduyla sentezlediği yeni bir yöntem geliştirmiştir (An, Shim, ve Kim, 2005).

Nanosilika yapılar düşük dielektrik sabiti ve istenen morfolojide üretilebilme özellikleri nedeniyle çeşitli biyosensör yapıların yüzey kaplama işlemlerinde de kullanılmaktadır. Behrens ve ark. sol-jel metoduyla üretilmiş mezoporoz silika ince film yapıları ile ticari olarak kullanımda olan Bioverit II kemik implantların biyouyumluluğunu arttıracak, korozyona direçli implantları geliştirmişlerdir. Modifiye edilen Bioverit II implantında hücre canlılığının%10 daha fazla olduğu belirtilmiştir (Ehlert ve diğerleri, 2013).

Sol-jel teknolojisi KDM alanında da osteokonduktif, gözenekli silisyum katkılı hibrit yapıların oluşturulmasında kullanılan bir yöntemdir. Blanch ve ark. KDM için yaptıkları HA doku iskelelerinin biyouyumluluğunu arttırmak, biyoaktifliğini desteklemek, kristal boyutunu ve morfolojisini kontrol edebilmek için, HA kristallerini trietil fosfit ve kalsiyum nitrat kullanarak sol-jel metodu ile sentezlemişlerdir (Garreta, Gasset, Semino, ve Borrós, 2007). Zhao ve ark. kemik doku grefti yapımı için kitosan ve silika nanopartiküllerden oluşan hibrit 3B yapılar elde etmişlerdir. Ürettikleri malzemeyi osteoblast hücreleri ile kültür ettiklerinde silika içeren iskelelerin, silika içermeyen iskelelerden daha yüksek seviyede hücre canlılığı sağladığını rapor etmişlerdir (Lei ve diğerleri, 2020).

Sol-jel yöntemiyle hibrit 3B gözenekli yapıların oluşturulabilmesi için temel olarak iki yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar: (1) organik materyalin kolloidal olarak solüsyon içinde çözündürülmesi veya (2) partikül temelli organik materyallerin kullanılması (nanofiber yapılar) esasına dayanır. Her iki yaklaşımda da sol-jel reaksiyonu sonucunda elde edilecek yapının özellikleri, kullanılan organik materyalin fonksiyonel gruplarının yapısına (örneğin -OH gruplarının sayısı), elde edilen karışımın (sol) pH ve yoğunluğuna, varsa kullanılan çapraz bağlayıcı ajanların miktarı ve çapraz bağlama süresine, elde edilen jel yapısından gözenekli forma geçiş için yapılan kurutma tekniğinin çeşidine bağlı olarak değişiklik

gösterir (Zhao ve diğerleri, 2018). Şekil 18'de 3B gözenekli sol-jel yapıları elde edilmesi için kullanılan teknikler özetlenmiştir.



Şekil 18. Sol-jel metodu ile 3B hibrit yapıların elde edilmesi (Zhao ve diğerleri, 2018)

Yapılan tez çalışmasında AÇJ-silisyum nanopartikül hibritleri sol-jel metoduyla elde edildikten sonra dondurarak kurutma işlemi ile 3B gözenekli "kriyojel" yapılar elde edilmiştir. Sol-jel ürünleri oda koşulları altında kendiliğinden evaporasyona uğrayarak gözenekli yapıları oluşturursa bu yapılara "kserojel", dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemiyle kurutulursa "kriyojel", kritik CO_2 soğutma yöntemiyle kurutulursa "aerojel" adı verilen yapılar elde edilir (Zhao ve diğerleri, 2018). Dondurarak kurutma ve kritik soğutma metotları sayesinde oldukça düşük yoğunlukta, yüksek gözenekliliğe sahip (mikro ve makroporoz), ultra hafif materyallerin üretimi mümkün olmaktadır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

DM alanında geliştirilen yeni biyomalzemelerin hücreler ile etkileşime girdiğinde optimal fiziksel ve kimyasal özellikleri gösterebilmeleri ve HDM'yi en gerçekçi şekilde taklit edebilmeleri için günümüzde birçok bilimsel araştırma grubu tarafından çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Geliştirilen biyomalzemeler dokuda kalıcı veya biyobozunur olacak şekilde tasarlanmış olup doğal, sentetik ya da hibrit malzemelerden oluşmuşlardır. Tasarlanan biyomalzemelerin, malzeme ile hücre ara yüzeyinde gerçekleşen moleküler seviyedeki etkileşimlerin aydınlığa kavuşturulması, malzemenin hücre içi sinyal yolaklarına nasıl bir etkisinin olduğunun anlaşılması yeni nesil biyoaktif materyallerin gelişiminde önemli bir role sahiptir (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013).

Yapılan tez çalışmasında KDM uygulamaları için 3B silisyum modifiyeli gözenekli kriyojel formda hibrit yapılar üretilmiştir. Malzemenin içerdiği doğal polimerin (AÇJ) biyouyumluluğu ve yüksek rejeneratif kapasitesi sayesinde AÇJ polimerinin kemik, kıkırdak, deri ve bağ doku olmak üzere pek çok DM çalışmasında hücrelere uygun bir niş sağlayacağı düşünülmüştür (Ghafourian, Tamri, ve Hemmati, 2015). AÇJ polimerinin silisyum minerali ile modifikasyonu sonucu oluşan hibrit Si-AÇJ materyalin, mekanik ve termal olarak daha sağlam ve stabil olması; malzemeden elde edilmiş 3B kriyojel formlarında artmış yüzey alanına ve gözenekli yapıların elde edilmesi, üretilen hibrit yapıların KDM uygulamaları için kullanımına uygun bir morfoloji sunmuştur.

Literatür incelendiğinde aljinat, kitosan, kitin, hiyaluronik asit ve kollojen gibi birçok doğal biyopolimerin DM uygulamalarında sıkça kullanılan polimerler olduğu anlaşılır (Collins ve Birkinshaw, 2013; C. Ji, Annabi, Khademhosseini, ve Dehghani, 2011). Ancak, doğada keşfedilmeyi bekleyen birçok biyomalzeme çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan biri de bitki polisakkaritler yapılı müsilajdır (çekirdek jeli, bitkisel jel). Bitkisel jeller özellikle ilaç endüstrisi olmak üzere gıda ve kozmetik gibi farklı alanlarda sıkça kullanılan doğal polimerlerdir. DM alanında kullanımın ise henüz yeni keşfedilmekte olduğu görülür. Bitki jelleri sahip oldukları rejeneratif özellikler sayesinde tek başına veya bir başka materyal ile hibrit halinde kullanılarak DM uygulamaları için yeni nesil biyomateryal olarak literatüre sunulabilir niteliktedir (Urena-Saborio ve diğerleri, 2018).

Spesifik olarak KDM uygulamalarında literatürde yer edinmiş önceki çalışmalar incelendiğinde kollajen, hyalüronik asit, karboksimetil selüloz ve kitosan doğal polimerleri doku iskelesi geliştirilmesinde en sık tercih edilen ve çalışılmış biyomateryallerdir.

Kollajenin HDM'in ana bileşenlerinden birisidir ve literatürde hyalüronik asit gibi farklı biyomalzemele ile beraber çapraz bağlanarak KDM için biyoiskele olarak kullanıldığı görünmektedir (Krishnakumar ve diğerleri, 2017).

Hyalüronik asit (hyaluronan), bağ dokuda doğal olarak bulunan sülfatlanmamış bir glikozaminoglikan polimeridir. İnsan vücudunda sinoviyal eklem sıvısında, diş pulpa matriksinde ve dermişin bağ doku kısmında bulunur. Hyalüronik asit HDM'in vizkoelastikiyetini korur ve eklem hareketinde sürtünmeyi azaltıcı sıvı olarak görev alır. Hidrofilik doğası ve hücre farklılaştırma faktörlerini (CD44) içermesinden dolayı hücreler üzerinde adezyonu ve hücre mortalitesini düzenleyici etkiye sahiptir (Zhai ve diğerleri, 2020). Literatürde hyalüronik asit kullanılarak tasarlanan kemik doku iskelelerinde osteojenik aktivitenin sağlandığı ancak mekanik dayanımının arttırılması için çeşitli inorganik veya sentetik materyalleri ile hibritlerinin de oluşturulduğu görülmektedir (Kaczmarek, Sionkowska, Kozlowska, ve Osyczka, 2018; Zhai ve diğerleri, 2020).

Karboksimetil selüloz, selüloz bazlı biyoiskelelerin geliştirilmesinde kullanılır. Genellikle suda çözünür formu olan sodyum karboksimetil selüloz üretim için tercih edilen polimer çeşididir. Hidrofilik, vizkoelastik ve yara iyileştirici özellikleri bu polimeri biyoiskele yapımında kullanım için tercih edilmesine neden olsa da KDM uygulamalarında osteoindüktif özelliklerinin artması için kompozit olarak kullanımı ve yapı bütünlüğünün sağlanması için çapraz bağlayıcı kullanılması gerektiği not edilmiştir (Dorati ve diğerleri, 2017).

Kitosan, asidik ortamda suda çözünen ancak nötral pH'larda suda çözünmeyen yapı gösteren pozitif yüklü hidrofilik bir polimerdir. Hidrofilik ve pozitif yüklü oluşu insan ve memeli mukozal yapısında güçlü bir adezyon kuvveti oluşturmasını sağlar. Bu nedenle daha çok ilaç kaplama ve ilaç dağıtım sistemlerinde tercih edilen bir biyomalzemedir. KDM alanında kullanımı için genellikle başka bir polimer ile hibrit halinde kullanıldığı görülür. Kitosan biyopolimerinin enjekte edilebilir formlarının çeşitli kıkırdak ve KDM uygulamalarında kullanıldığı görülebilir (Dorati ve diğerleri, 2017; Saravanan ve diğerleri, 2017).

Şimşek ve ark. ayva çekirdeği müsilajı ile 3B gözenekli doku iskeleleri oluşturmuş ve bu iskelelerin iAMKH'ler ile etkileştirerek *in vitro* koşullarda malzemenin biyouyumluluğunu ve biyobozunurluluğunu test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre ayva çekirdeği müsilajının doku rejenerasyonu için kullanılabilir degradasyon kinetiğine sahip olduğu, biyouyumlu olduğu ve hücre proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020).

Janbaz ve ark.larının ayva jelinin sindirim sistemi ve solunum sistemi kasları üzerine etkisinin incelenmesi için yaptığı bir çalışmada ise, Gine domuzu ve tavşan jejenumlarından izole edilen canlı doku parçaları üzerine AÇJ uygulandığında, doku üzerinde atropine bağlı spazmotik etkilerin oluştuğunu gözlemlemiştir. Tavşan jejenumundaki uygulamada ayva jelinde yüksek dozlara (0,1-10 mg/mL) çıkıldığında kas gevşetici etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Potasyum iyonları ile kasılmaya tabi tutulan tavşan jejenum dokusu (80 mM) AÇJ'nin uygulanmasından sonra (0,003-10 mg/mL) kısa bir süre içinde salınarak kasın eski haline döndüğü gözlemlenmiştir. Kas dokusu üzerinde verapamil ilacının etkisine benzer spazmolitik bir etki gösteren ayva jelinin, astım gibi solunum yolu hastalıklarında veya ishal-kabız gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Janbaz, Shabbir, Mehmood, ve Gilani, 2013; Sajid ve diğerleri, 2015).

Doğal biyopolimerler, biyoiskele oluşturulmasında tek başına kullanılabileceği gibi kendi aralarında, sentetik polimerler ile birlikte veya inorganik katkı materyalleri ile beraber hibrit materyaller oluşturularak daha fonksiyonel hale getirilebilir. Literatür incelendiğinde organik/inorganik hibrit materyallerin üretilmesi için en sık HA kristallerinin kullanıldığı görülecektir.

HA, hidrofilik, biyouyumlu, biyoaktif özellikte sülfatlanmamış glikoz aminoglikan yapısına sahip bir çeşit kristal yapıdır. HA'in gözenekli yapısı sayesinde kemik rejenerasyonuna yönelik malzemelerin tasarımında yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerden biridir. HA, insan kemiğinin inorganik bileşimine benzer kimyasal içeriği nedeniyle kemiğin yeniden yapılandırılmasında kullanılır. Biyoseramik özellikteki bu malzeme, genellikle öncül olarak kalsiyum hidroksit veya nitrat kullanılarak kimyasal yöntemlerle sentezlenir. Ancak sinterlenmiş HA, mekanik gücü zayıf olduğu için tek başına kemik doku tamir materyali olarak kullanılamaz. Kemik dokusu, HA içeren ve kollajen proteinlerden oluşan kompleks bir yapı olduğu için HA ile yapılan birçok çalışma, HA'in proteinler ve diğer sentetik polimerlerle hibritleri şeklinde gerçekleştirilmiştir (Tachibana, Kaneko, ve Tanabe, 2005). Arslan ve ark. 2017 yılında yayımladıkları bir çalışmada kollajen, keratin ve nano HA tozu içeren biyoiskeleler üreterek insan mezenkimal kök hücreleri ile *in vitro* koşullarda etkileştirmişlerdir. Yapılan çalışmanın neticesinde hücrelerin HA içeren iskeleler üzerinde daha yüksek hücre canlılığı sergilediği ve osteojenik farklılaşmanın daha çok gerçekleştiği ortaya konmuştur (Arslan ve diğerleri, 2017).

Organik/inorganik hibrit malzemelerin elde edilmesinde sıkça kullanılan bir diğer inorganik bileşen silisyum molekülleridir. Literatür incelendiğinde silisyum elementinin tek başına ve çeşitli biyomalzemeler ile beraber katkı materyali olarak kullanıldığı görülecektir.

Silisyum elementi doğada en çok bulunan elementlerden biridir ve yer kabuğundaki minerallerin yaklaşık olarak dörtte biri silisyum içeren bileşiklerden oluşur. Silisyum mineralinin yarı iletken olması, yüksek termal stabiliteye sahip olması ve düşük reaktiflik gösteren doğaya sahip olması silisyum elementinin başta elektronik olmak üzere, kimya ve malzeme bilimi alanlarında kullanımına yol açmıştır (S. Zou ve diğerleri, 2008). Biyomalzeme olarak silisyum elementinin kullanımı incelendiğinde ise silisyum mineralinin biyoaktif özellikler gösterdiği anlaşılacaktır.

Silisyum elementinin biyomalzeme olarak kemik doku mühendisliği alanında kullanımı incelendiğinde en sık biyocam olarak kullanıldığı görülecektir. Biyocam materyali yüksek osteokondüktif özellikler gösteren, biyoaktif ve biyobozunur bir malzemedir. Ancak tek başına kullanımında yeterli mekanik dayanımı gösteremediği için kırılgan niteliktedir, çeşitli malzemeler ile kompozit ya da yüzey kaplaması şeklinde modifikasyonlarla yapılan uygulamalar mevcuttur (Boccardi, Liverani, ve Boccaccini, 2019).

Literatürde sol-jel metodu olarak geçen teknik sayesinde silisyum elementinin çeşitli polimerler ile hibrit materyal oluşturabildiği gösterilmiştir. Reaksiyonlarda genellikle TEOS isimli solüsyon, silisyum prekürsoru olarak kullanılır. TEOS özellikle doğal polimerlerle kullanımında daha az toksik olması nedeniyle tercih edilen, reaksiyonlarının kolay manipüle edilebildiği ve nispeten düşük tepkime hızına sahip bir silisyum prekürsördür. Polimerler ile etkileşime girmeden önce TEOS uygun koşullar altında asit veya baz katalizi altında hidrolize edilir, ardından polikondenzasyon tepkimesi için hazır hale gelir. TEOS solüsyonunun bu özelliği onu birçok hibrit biyomateryal elde edilmesi hedeflenen çalışmalarda kullanılmasına neden olmuştur (S. Zou ve diğerleri, 2008). 2014 yılında yapılan bir çalışmaya göre PVA sentetik bileşiği, TEOS solüsyonu kullanılarak asit katalizli sol-gel prosesi ile PVA polimerinin suda çözünürlüğünün azaltılıp sulu ortamlarda daha kararlı bir kserojel formda bir malzemele geliştirilmesi hedeflenmiştir. Makale de PVA'nın yapısında bağ yapmamış halde bulunan hidroksil (-OH) gruplarının, TEOS'dan gelen silisyum elementi ile bağ yaparak oluşan hibrit materyalin suda daha kararlı özellikler göstereceği belirtilmiştir. Farklı TEOS oranları denenip malzemenin morfolojik, termal özellikleri, kristallenebilirliği ve çözünürlüğü incelenmiştir. Ancak geliştirilen kserojel malzemeye dair *in-vivo* veya *in-vitro* herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Pirzada ve Shah, 2014).

Bir başka çalışmada ise kitosan hidrojellerin farklı çapraz bağlayıcılar ile bağlanması sonucu elde edilen boncuksu yapılarının biyosorbent olarak kullanımında adsorbsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Kitosan hidrojelinin TEOS solüsyonu ile çapraz bağlayanarak elde edilen boncuk yapıları, literatürde sıkça kullanılan epiklorohidrin ve gluteraldehit

çapraz bağlayıcının performansları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın rapor ettiklerine göre TEOS ile çapraz bağlanan kitosan jel boncukların remazol siyah (RB) ve kadminyum Cd (II) bileşenlerini adsorplama kapasitesi kitosanın epiklorohidrin ve gluteraldehit ile çapraz bağlanmış formalarından daha yüksek verim göstermiştir. Ayrıca TEOS ile yapılan çapraz bağlama işlemlerinin daha çevreci ve güvenli bir metot olduğu vurgulanmıştır. Ancak yayınlanan makalede TEOS ile geliştirilen adsorbent kitosan materyalinin *in-vitro* ortamda davranışlarına dair herhangi bir deneme yapılmamıştır (Copello ve diğerleri, 2014).

Kitosan ve silisyum hibritlerinin oluşturulduğu bir diğer makalede, kitosan glikodoksi propil trimetoksisilan (GPTMS) isimli bileşen ile çapraz bağlanmış ve değişen GPTMS konsantrasyonuna bağlı malzemenin mekanik ve sitotoksik özellikleri ortaya konulmuştur. Geliştirilen malzeme film membran formatında olup osteoblast hücreleriyle *in-vitro* testler gerçekleştirilmiştir. Çalışmada geliştirdikleri malzemenin kemik doku rejenerasyonunda kullanılabilir niteliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Shirosaki ve diğerleri, 2009).

Biyomedikal alanda kullanmak üzere 2016 yılında yapılan bir çalışmaya göre keratin biyopolimeri, TEOS solüsyonu kullanılarak sol-gel reaksiyonu ile silisyum-keratin hidrojeli elde edilmiş, geliştirilen malzemenin iskele, jel, sünger veya film halinde kullanılabileceği vurgulanmıştır. Fibroblast hücre hattı ile beraber geliştirilen malzeme kullanılarak biyouyumluluk *in-vitro* olarak test edilmiştir. Ancak çalışmada herhangi spesifik bir dokunun oluşturulması ya da malzemenin belirlenen dokuya yönelik rejeneratif kapasitesinin araştırılmasına yönelik bir çalışma ortaya konulmamıştır (Kakkar ve Madhan, 2016).

Selüloz polisakkaritin sol-jel metodu ile silisyum hibrit bileşiklerinin oluşturulup hava purifiye edici adsorban ajan olarak ve enzim-mimetik katalizör olarak kullanıldığı literatürde görülür (Gamelas, Evtyugina, Portugal, ve Evtuguin, 2012; Jiang ve diğerleri, 2013).

Aljinat ve silisyum hibritleri ile yapılan çalışmalarda TEOS genellikle silika öncülü olarak kullanılmış ve çeşitli mikroalglerin membran sensör materyali olrak kullanımında hücre immobilizasyon ajanı olarak kullanıldığı ve bir başka çalışmada ise ağır metallerin çevreden uzaklaştırılmasında adsorban materyal olarak geliştirildiği literatüde görülmüştür (Pannier ve diğerleri, 2014; S. Zhang ve diğerleri, 2013).

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

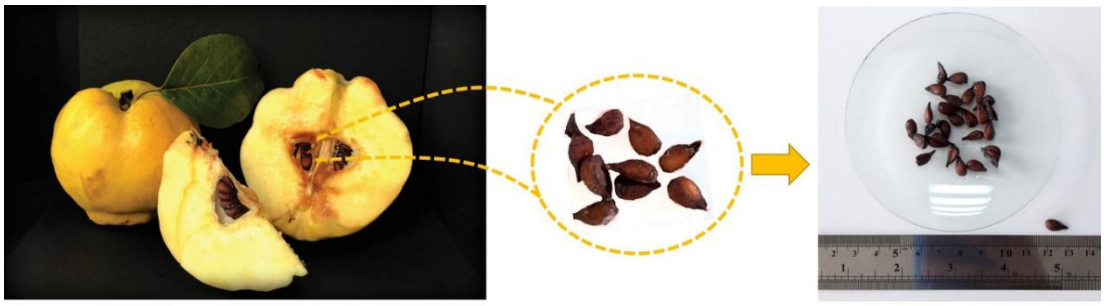
Tez çalışmasında 3B gözenekli doku iskelelerin üretimi için AÇJ polimeri kullanılmıştır. AÇJ, Çanakkale şehrinde bulunan yerel meyve-sebze pazarlarındaki olgun ayvalardan elde edilmiştir. Taze ve olgun ayva meyvelerindeki çekirdekler ayıklanarak yapısında morfolojik bir bozukluk, çürüme veya küf belirtisi göstermeyen sağlam çekirdekler, jel üretimi için +4 °C buzdolabında (Siemens KG57NPW24N, Almanya) stoklanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında sarf edilen kimyasallar ve içerikleri, kullanılan cihazların marka ve model bilgileri ilgili yöntem başlığı altında detaylı olarak belirtilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ayva Çekirdeği Jelinin Üretimi ve Liyofilizasyon İşlemi

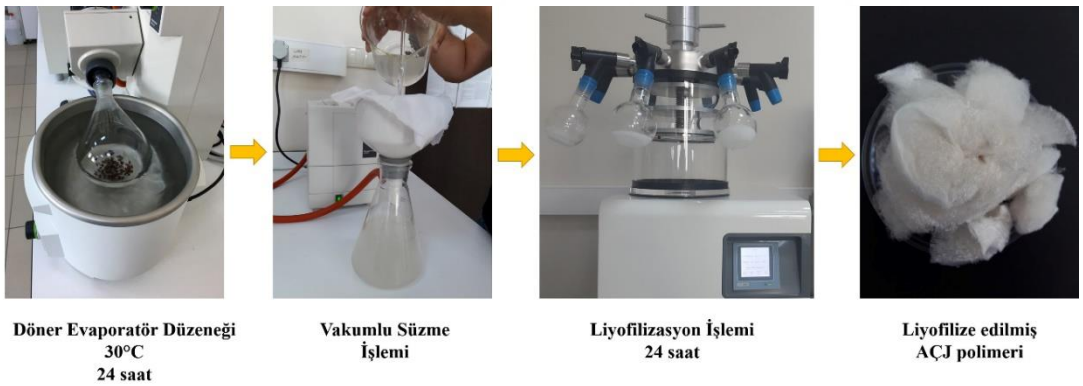
Ayva meyvesinden çıkarılan çekirdekler morfolojik olarak incelendikten sonra jel üretiminde kullanılacak çekirdekler ayıklanmıştır. Çekirdekler arasından pürüzsüz ve kaygan yüzeye sahip olan, ortalama boy uzunluğu 5 mm'den büyük ve parlak kızıl-kahverengi renge sahip çekirdekler (Şekil 19). AÇJ ekstraksiyon işlemi için ayıklanarak +4 °C'de stoklanmıştır.



Şekil 19. Ayva meyvesi (*Cydonia Oblonga* Mill) ve jel üretilmek üzere ayıklanan ayva çekirdekleri

AÇJ ekstraksiyonu döner evaporatör cihazında (Rotavapor R-200, Buchi, İsviçre) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için her 4 g ayva çekirdeği 75 mL ultra saf su (Milli Direct-Q 3UV, Merck Millipore, Almanya) kullanılmıştır. Cam balon içerisine alınan ayva çekirdekleri ve saf su, 1 gece boyunca 30 °C sıcaklıkta döner evaparatör cihazında 6. seviye

hız değerinde döndürülerek çekirdek jelinin saf suya geçmesi sağlanmıştır. 24 saatlik ekstraksiyon işleminin sonunda cam balon içerisinde viskoz ve şeffaf AÇJ elde edilmiştir. Jel içerisinde bulunan çekirdeklerden ve kalıntı partiküllerden ayrışması için vakumlu pompa düzeneği (Vacuum Pump V-700, Buchi, İsviçre) ve 5 katlı steril bez kullanılmıştır. Vakumlu pompa düzeneğine bağlı süzme hunisinin üzeri steril bez ile kaplanıp, ekstrakte edilen çekirdek jeli daha sonra vakum yardımıyla bez arasından süzülmüştür. Süzülmüş AÇJ cam balonlar içerisine pay edilip -26 °C dondurucuda (Siemens KG57NPW24N, Almanya) 12 saat boyunca dondurulduktan sonra liyofilizatör cihazında (LyoQuest -55, Telstar, İspanya) dondurularak kurutulmuştur. Böylece liyofilize halde AÇJ materyalinin stokları hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Ayva çekirdeklerinden jel ekstraksiyonu ve liyofilizasyon işlemi

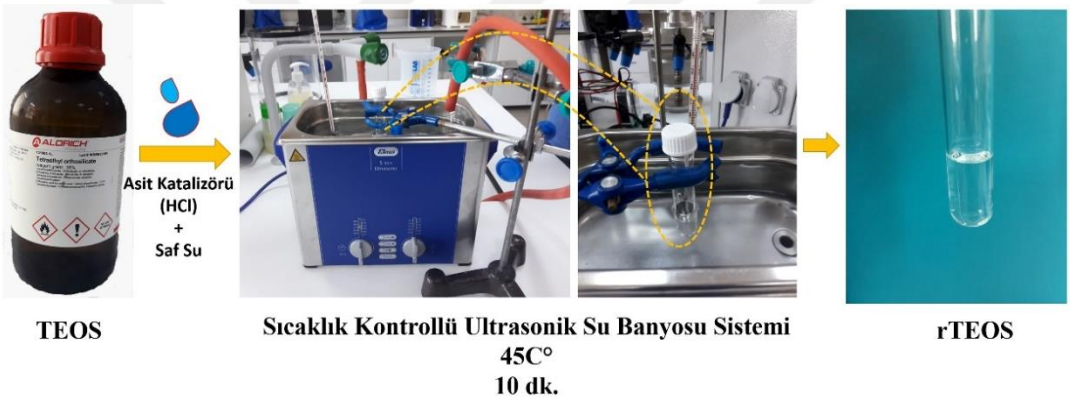
3.2.2. AÇJ Temelli 3B Kriyojel Yapılarının Üretimi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında silisyum ile modifiye edilmiş kriyojel iskelelerinin (Si-AÇJ) kemik doku rejenerasyonuna etkisi incelenirken, modifiye edilmemiş AÇJ ile üretilen kriyojeller kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

AÇJ yapılarının üretimi için liyofilize AÇJ lifleri 5mg/mL konsantrasyonda saf suda homojenizatör (IKA T18 basic ULTRA TURRAX®, Staufen, Almanya) yardımı ile çözülmüştür. Elde edilen solüsyon 48 bölmeli teflon kalıplar içerisine her bölmeye 300 µL olacak şekilde pay edilmiştir. Teflon kalıp 12 saat süre boyunca -26 °C'de dondurucuda tutulup, AÇJ'nin tamamen donması sağlanmıştır. Teflon kalıp içerisinde donmuş AÇJ, 12 saat boyunca liyofilize edilerek sıvı formdan 3B gözenekli kriyojel yapılar elde edilmiştir.

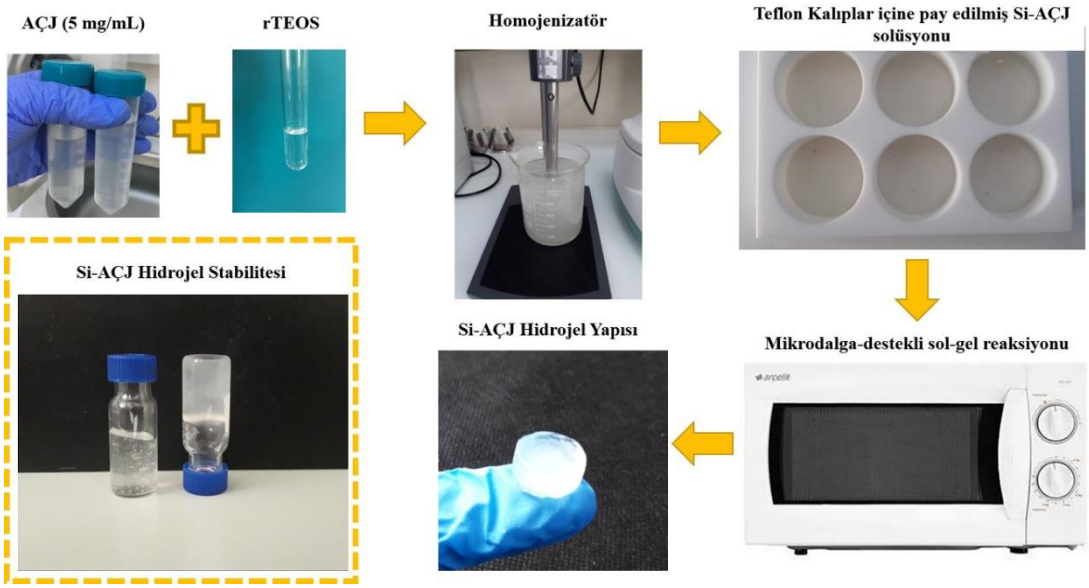
3.2.3. Si-AÇJ Hibrit Materyalinin Oluşturulması ve Kriyojel Üretimi

Silisyum ile mofidiye edilmiş AÇJ materyalinin üretimi için mikrodalga destekli sol-jel reaksiyon mekanizması temel alınmıştır. Silika öncülü olarak TEOS (%98, Millipore-Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen sol-jel reaksiyonu iki aşamalı bir reaksiyondur ve ilk aşaması TEOS solüsyonundan asit katalizörlü ortamda re-aktive edilmiş TEOS (rTEOS) elde edilmesi basamağıdır (Şekil 21), rTEOS eldesi için 3 mL TEOS, 0,18 mL HCl (0,1 M, Merck Millipore, Almanya) ve 0,6 mL ultra saf su (Milli Direct-Q 3 UV, 18 MΩ cm-1, Merck Millipore, Almanya) cam bir tüp içerisine konulmuştur (Copello 2014). Ardından karışım 45 °C'de 10 dk. boyunca su banyosu içerisinde ultra-sonikasyon işlemine (Elma S 30H, Almanya) maruz bırakılmıştır. Sürecin sonunda elde edilen şeffaf rTEOS solüsyonu içerdiği silanol grupları ile sol-jel reaksiyonun ikinci basamağı için hazır hale gelmiştir.



Şekil 21. TEOS solüsyonunun asit katalizörlü ortamda hidrolizi ve rTEOS eldesi

Liyofilize haldeki AÇJ polimeri 5 mg/mL konsantrasyonda saf su içerisinde çözündürülerek sol-jel reaksiyonunda kullanıma hazır hale getirilmiştir. Si-AÇJ hibritlerinin üretiminde gerçekleşen sol-jel reaksiyonu için farklı rTEOS ve AÇJ konsantrasyonları oranları denenmiş ve morfolojik gözlemlere dayanarak her 1 mL ultra saf suda çözündürülmüş 5 mg AÇJ ($AÇJ_{aq}$,1 mL) için 100 µL rTEOS kullanılmasına (hacimce 10:1 oranına) karar verilmiştir. Sol-jel reaksiyonu için hazırlanan rTEOS ile $AÇJ_{aq}$, karışımı (sol) homojenizatörde yaklaşık 10 sn. boyunca 2. kademe dönme hızında homojenize edilmiştir. Daha sonra $AÇJ_{aq}$-rTEOS karışımı, 24 bölmeli teflon kalıp içerisine alınıp mikrodalga cihazında (Arçelik MD-574 mikrodalga fırın, Türkiye) 350 W'ta 2 dk. boyunca mikrodalga işlemine tabi tutulmuştur. Mikrodalga işlemi süreci sonunda AÇJ ve silisyum molekülleri sol-jel reaksiyonun polikondenzasyon aşamalarını tamamlayarak, sol (sıvı) formdan jel (katı) form elde eldilmiştir (Şekil 22).



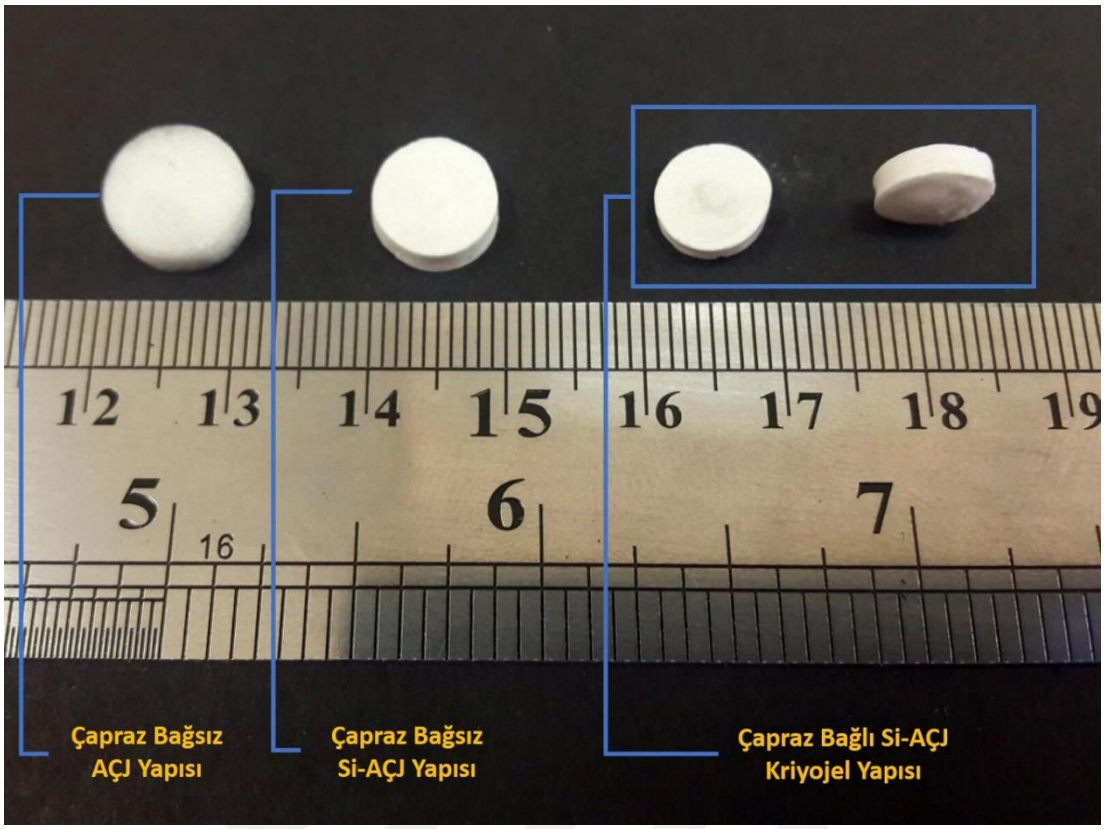
Şekil 22. Hibrit Si-AÇJ jel yapılarının elde edilmesi

Elde edilen hibrit jel yapısından, reaksiyona girmemiş fazla TEOS ve sol-jel reaksiyonun bir yan ürünü olarak oluşan etanolden yapının arındırılması için jeller kalıptan çıkartılıp saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemleri jellerin falcon tüp içerisine alınıp saf su ile santrifüj cihazında (EBA20 Hettich, Almanya) 3 tur 3461 xG'de (6000 rpm) 5 dk. boyunca santrifüj edilerek gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış Si-AÇJ yapısı -26 °C'de 12 saat dondurulduktan sonra 12 saat boyunca dondurularak kurutulmuştur. Dondurarak kurutma işleminin sonunda toz formda hibrit Si-AÇJ materyali elde edilmiştir. Sol-jel reaksiyonu sonucunda oluşmuş hibrit materyalden 3B kriyojel yapılarının üretimi için, Si-AÇJ tozu farklı derişimlerde baz, sodyum hidroksit (NaOH), solüsyonu içerisinde çözündürülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda hibrit malzemeden elde edilen kriyojellerin yapısal bütünlüğünü koruyan derişimin 50 mg/mL Si-AÇJ konsantrasyonunda 0,3 M'lık NaOH içinde çözündürülmesiyle elde edildiği tespit edilmiştir. 50 mg/mL'lık Si-AÇJ tozu, kriyojel üretimi için 0,3 M NaOH çözeltisi içinde vorteks ve homojenizatör yardımı ile çözündürülmüştür. Çözdürme işlemi sonrasında Si-AÇJ solüsyonu 48 bölmeli teflon kalıp içerisinde her bir bölmeye 300 µL olacak şekilde pay edilerek -26 °C'de 24 saat dondurulmuştur. Kalıp içerisinde donan Si-AÇJ yapıları 0,081 ile 0,1 mBar arasında değişen vakum değeri ve -55 °C kondansatör soğutma derecesinde liyofilize edilerek 3B gözenekli kriyojel yapıları elde edilmiştir.

3.2.4. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerin Çapraz Bağlanması

Kriyojellerin yapısal bütünlüğünün korunması ve mekanik dayanımın arttırılması amacıyla N-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) ajanları kullanılarak çapraz bağlama işlemi yapılmıştır. Çapraz bağlama için her iki tür kriyojel (AÇJ ve Si-AÇJ) yapısında da bulunan AÇJ kütlesi temel alınmıştır. EDC/NHS çapraz bağlama protokolü litaratürde bulunan Buttafoco ve ark. (2006) geliştirdiği tekniğin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur (Buttafoco ve diğerleri, 2006).

Çapraz bağlama işlemi için kriyojel yapılar önce 30 dk. boyunca %100'lük etanol (Millipore-Sigma, Almanya) solüsyonunda bekletilmiştir. Bekleme süresi boyunca çapraz bağlama için gerekli solüsyon hazırlanmıştır. Her 1,5 mg AÇJ kütlesi için 1 mL çapraz bağlayıcı solüsyonu hazırlanmıştır. Çapraz bağlanacak kriyojel yapısı adedince gereken çapraz bağlayıcı hacmi belirlenmiştir ($V_{ÇB}$). Çapraz bağlayıcı solüsyonu %70 etanol içinde 0,05 M'lık 2- (N-morfolino) etansülfonik asit (MES, Millipore-Sigma, Almanya) içeren tampon çözeltide $V_{ÇB}$ hacminde hazırlanmıştır. Her 1 mL çapraz bağlayıcı solüsyonu için 13,8 mg EDC ve 6,72 mg NHS çapraz bağlayıcı ajanları hassas terazide (Shimadzu ATX224, Japonya) tartılıp MES tamponu içinde çözdürülmüştür. 30 dk. boyunca %100'lük etanolde bekletilen kriyojel yapıları daha sonra çıkartılarak temiz ve kuru 24 bölmeli well-plate içerisine alınmıştır. Hazırlanan çapraz bağlayıcı solüsyonundan her kriyojel üzerine 1'er mL olacak şekilde kriyojel yapıları üzerine pay edilmiştir. Kriyojel yapıları 2 saat boyunca oda sıcaklığı koşullarında çalkayıcıda (Incu-Shaker Mini Benchmark, ABD) 150 rpm dönme hızında dönerek çapraz bağlama işlemi tamamlanmıştır. Çapraz bağlayıcı ajanların kriyojel yapısında kalmaması gerektiğinden çapraz bağlama işlemi sonrası iskeleler manyetik karıştırıcıda (Magnetic Stirrer MS-12BB, Jeio Tech, Daejeon, Güney Kore) 3 saat boyunca saf su ile yıkanmıştır. Saf su ile yıkanan çapraz bağlanmış yapılar dikkatli bir şekilde tekrar 48 bölmeli teflon kalıptaki bölmelerine yerleştirilerek -26 °C'de 12 saat dondurulmuştur. Donan yapılar liyofilizatör cihazında dondurularak kurutulduktan sonra rijit ve gözenekli yapıda, hücre kültüründe kullanıma hazır, nihai kriyojel formları elde edilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Çapraz bağsız AÇJ, Si-AÇJ ve çapraz bağlanmış Si-AÇJ kriyojel yapıları

3.2.5. AÇJ ve Si-AÇJ Yapılarının Karakterizasyonu

Üretilen hibrit Si-AÇJ materyali çeşitli fiziksel formlarda elde edilmiştir. Si-AÇJ üretim sürecinde malzeme önce jel faz, ardından hibrit toz fazı ve son olarak 3B kriyojel fazında elde edilmiştir. Si-AÇJ üretim sürecindeki fazlarına göre önce jel formunun reolojik testleri yapılmış ardından elde edilen toz formunun fizikokimyasal olarak incelenmesi için ATR-FTIR, XRD ve ^{29}Si-MAS-NMR analizleri yapılmıştır. Hibrit malzemenin termal özellikleri yapılan TGA ve DSC analizleriyle incelenmiştir. Si-AÇJ materyalinden çapraz bağlı kriyojel yapılarının elde edilmesinden sonra malzemenin mekanik analizi için basma testi uygulanmıştır. 3B gözenekli hibrit malzemenin yapısal özelliklerinin incelenmesi için porozite, şişme, BET ve temas açısı testleri yapılmıştır. Malzemenin mikro ölçekte morfolojisinin aydınlatılması için FE-SEM görüntüleri çekilmiş ve gözenek çapları incelenmiştir. Geliştirilen hibrit yapıların fizyolojik koşullarda biyobozunurluğunun incelenmesi için enzim ile degradasyon testi yapılmıştır. Si-AÇJ kriyojel yapılarının osteojenik farklılaşma kapasitelerinin incelenmesi için iAMKH'ler ile hücre kültürü ortamında 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. Belirlenen kontrol aralıklarında (7.,14. ve 21. günlerde) hücre canlılık testleri yapılmıştır. Yine aynı zaman aralıklarında fikse edilen hücrelendirilmiş kriyojel yapılar FE-SEM ve histolojik boyamalarla materyalin osteojenik

farklılaşmaya etkisi gözlemlenmiştir. Hibrit malzemenin osteojenik farklılaşmaya gen boyutundaki etkisi yapılan RT-qPCR analizi ile belirlenmiştir.

Üretilen Si-AÇJ hibrit malzemenin kontrol grubu olarak belirlenen AÇJ yapıları da benzer şekilde karakterize edilmiştir. AÇJ karakterizasyonu için de ATR-FTIR, XRD, ^{29}Si-MAS-NMR, TGA, DSC, basma testi, porozite, şişme, BET-BJH ve ıslanabilirlik testleri, FE-SEM gözlemi, biyobozunurluk testi, hücre kültürü uygulaması ve canlılık testi, hücreli FE-SEM analizi, histolojik incelemeler ve RT-qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlere ilişkin detaylar aşağıda belirtilen başlıklar halinde açıklanmıştır.

3.2.6. Si-AÇJ Hidrojellerinin Reolojik Davranışının İncelenmesi

Mikrodalga destekli sol-jel reaksiyonu ile üretilen hibrit jellerin reolojik karakterizasyonu DHR 2 Reometre (TA Instruments, ABD) cihazı ile yapılan frekans ve sıcaklık taramaları ile belirlenmiştir. Si-AÇJ jeller dikkatli bir şekilde çelik çapraz-çizgili geometriye sahip (Φ = 40 mm) paralel plakaların arasına yerleştirilmiştir. Plakalar arası mesafe 0,9 ± 0,1 mm olacak şekilde ayarlamasından sonra, salınımlı gerinim taraması yapılarak jelin vizkoelastik bölgesi tespit edilmiştir. %0,157 olarak tespit edilen gerinim değeri sabit kabul edilerek 0,1 ile 100 Hz. arası frekans tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Frekans taraması sonucu malzemenin davranış özelliklerinin belirlenmesinden sonra termal tarama yapılmıştır. Termal tarama işlemi sabit %0,157 gerinim değerinde ve 10 Hz. frekansında dakikada 1 °C artacak şekilde 4 ile 40 °C aralığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Si-AÇJ hidrojellerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.7. Zayıflatılmış Toplam Yansıtmalı – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre Analizi (ATR-FTIR)

AÇJ ve Si-AÇJ tozlarının fizikokimyasal karakterizasyonu için ATR-FTIR analizi yapılmıştır. Analiz Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 16 cm^{-1} spektral çözünürlükte 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında tarama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Katı Hal Silisyum Nükleer Manyetik Rezonans Spekstoskopisi (^{29}Si-CP-MAS NMR)

AÇJ ve Si-AÇJ malzemelerin yapılarının aydınlatılması ve Si-AÇJ hibrit materyalindeki silisyum-jel etkileşimlerinin ortaya konulabilmesi için JEOL ECZ 500R cihazı (JEOL, Japonya) ile ^{29}Si-CP-MAS NMR analizi yapılmıştır. Spektrumlar 3,2 mm'lik zikronyum oksit rotorlarla, 6 kHz spin frekansında 5000 kez taranarak elde edilmiştir.

3.2.9. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD)

AÇJ ve Si-AÇJ yapıları arasındaki farkın X-ışını kırınım difraktometresi ile ortaya konulması için XRD (PANalytical Empyrean, Hollanda) analizi yapılmıştır. Analiz için Cu-K_α ışınları kullanılmıştır (λ = 1.54056 Å, 45 kV, 40 mA). Tarama hızı dakikada 0,02° olmak üzere 2θ alanında 5 ile 70° arasında tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. XRD cihazından gelen tüm değerler X'Pert HighScore Plus yazılımı ile işlenmiştir.

3.2.10. Malzemelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri

AÇJ ve Si-AÇJ materyallerinin termal özelliklerinin incelenmesi ve yapıya katılan silisyumun müsilajın ısısal davranışına etkisinin incelenmesi için termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri yapılmıştır. TGA analizi için TGA 8000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı kullanılmıştır. Tarama işlemi 30 ile 800 °C arasında, 10 °C/dk. ısınma hızında gerçekleştirilmiştir. DSC tarama işlemi, DSC Perkin Elmer 8000 cihazıyla (Perkin Elmer, Groningen, Hollanda) 10 °C/dk. ısınma hızında ve 0 ile 400 °C aralığında nitrojen atmosferi altında (250 mL/dk.) gerçekleştirilmiştir. Her iki termal analizinde sonuçları Pyris™ yazılımı (Perkin Elmer, ABD) aracılığı ile kaydedilmiştir.

3.2.11. Kriyojellerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi

AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin basma kuvveti altındaki mekanik dayanımlarının ölçülebilmesi için Instron-5569 cihazı (Instron, Massachusetts, ABD) ile basma testi yapılmıştır (n=3). Basma testinde numuneler 100 N'luk basma yükleri altında dakikada 0,1N basma hızı olacak şekilde test gerçekleştirilmiştir. Basma testi neticesinde lineer basma modulüs değeri, maksimum akma gerinimi ve maksimum gerinim değerleri bulunmuştur.

3.2.12. Kriyojellerin Porozitelerinin Belirlenmesi

AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapılarının porozitelerinin belirlenmesi için sıvı-yer değiştirme tekniği (U. J. Kim ve diğerleri, 2005) uygulanmıştır. Bunun için sıvı *n*-hekzan (≥ %99, Millipore-Sigma, MA, ABD) çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL'lik ince bir dereceli silindir içine 4 mL hekzan konulmuştur (V_1). Tek bir kriyojel mezür içine atılarak yapının hekzan ile ıslanması sağlanmıştır. Kriyojel yapılarının gözeneklerinin hava ile dolu olmasından dolayı hekzanın tamamen nufüs edebilmesi için cam mezür 1 dk. boyunca ultrasonik su banyosunda sonikasyona tabi tutularak yapı içinden baloncuklar halinde havanın tamamen çıkması sağlanmıştır. Ardından yer değiştiren sıvıyla birlikte değişen son hacim not edilmiştir (V_2). Daha sonra kriyojel dikkatli bir şekilde cam mezür içinden çıkartılıp kalan hekzan sıvısının son hacmi kaydedilmiştir (V_3). Kriyojel yapılarının poroziteleri yapılan bu uygulamalar sonucunda not edilen değerlerle aşağıdaki denklemde yerlerine konularak hesaplanmıştır.

$$\text{Porozite}\ (\%) = [(V_1 - V_3)/(V_2 - V_3)]\ \text{x}\ 100 \qquad (3.1)$$

3.2.13. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskop Analizi (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS)

Kriyojellerin 3B morfolojik yapıların mikro ve nano seviyede incelenmesi için FE-SEM görüntüleme tekniği kullanılmıştır. FE-SEM görüntüleri JEOL JSM-7100F cihazıyla 10 kV prob akımı altında elde edilmiştir. Farklı büyütme değerlerinde hücresiz AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapılarının mikrografları elde edilmiştir. Görüntüler üzerinden ortalama por büyüklüğü hesaplanmıştır. SEM cihazına bağlı Oxford Instrument X-Max detektörü (Oxford Instruments, Oxford, İngiltere) yardımıyla enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizi de yapılarak Si-AÇJ yapısındaki atomik Karbon, Oksijen ve Silisyum oranı incelenmiştir.

3.2.14. Şişme Testi

3B gözenekli AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin sıvı tutma ve şişme kapasiteleri Shirosaki ve ark. (2009) kullandığı fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) alım testi metodu ile belirlenmiştir (Shirosaki ve diğerleri, 2009). Bu uygulamaya göre kriyojellerin kuru kütleleri (m_{kuru}) hassas terazide tartılarak ilk halleri olarak not edilmiştir. Ardından kriyojeller ayrı ayrı 10'ar mL PBS (pH 7,4) içeren kaplar içerisine bırakılarak 37 °C'de, 24 saat boyunca etüvde (Memmert UN30 Etüv, Almanya) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin sonunda ıslanan kriyojellerin kütlesi ($m_{ıslak}$) olarak kaydedilip aşağıda verilen formüle göre her bir kriyojelin %şişme oranı hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%) (mg/mg)} = [[(m_{ıslak} - m_{kuru})] / (m_{kuru})] \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.15. Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi

AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapılarının ıslanabilirlik özellikleri Attension Theta Optik Tensiyometre cihazı ile (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) belirlenmiştir. Analiz sırasında her bir kriyojel yapı üzerine motorize şırınga yardımıyla 5 µL ultra saf su damlatılmıştır, cihazın kamerasından anlık olarak su damlacığının kriyojel yüzeyinden emilimi incelenmiştir. Su damlacığının saniyedeki emilim hız değerleri her iki iskele içinde kaydedilen anlık görüntüler üzerinden hesaplanmıştır.

3.2.16. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri

Kriyojellerin por karakterizasyonu ve toplam yüzey alanlarının hesaplanması için Quadsord SI cihazı (Quantachrome Instruments, Anton-Paar GmbH, Avusturya) ile BET ve BJH analizleri yapılmıştır. Kriyojel numuneler 8 parçaya bölünerek 100 °C'de 1 saat degas edilmiştir. Ardından 77 K° sıcaklıkta nitrojen gaz atmosferi altında ve 0,01 ile 0,99 P/P_0 basınç aralığında gaz adsopsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.17. Biyobozunurluk Testi

Kriyojellerin fizyolojik sıvılarla etkileşiminin ve biyobozunurluğunun test edilmesi için enzim bozulma testi yapılmıştır. Polisakkarit temelli olan AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri lizozim enzim solüsyonunda Tamburacı ve ark. protokollerine göre modifiye edilerek inkübe edilmiştir (Tamburaci ve diğerleri, 2019). Test için önce %0,01 sodyum azid (≥99.5%, NaN_3) içeren PBS (pH 7,4) solüsyonu hazırlanmıştır, ardından 1,5 µg/mL

konsantrasyonda lizozim enzimi (≥98%, ≥40,000 U/mg, Millipore-Sigma, ABD) solüsyonda çözdürülmüştür. Test edilecek kriyojellerin her biri hassas terazide tartılmış ve ilk hallerinin kütleleri m_{ilk} olarak not edilmiştir. Tartımları yapılan kriyojeller steril 24 bölmeli well-plate içerisine alınmıştır ve her bir kriyojelin üzerine hazırlanan enzim solüsyonundan 1'er mL dökülerek, kriyojellerin enzim solüsyonu ile teması sağlanmıştır. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojeller 7 günlük ve 14 günlük periyotta, her iki günde bir enzim solüsyonları aynı prosedür ile tazalenerek, 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonucunda her bir kriyojel enzim solüsyonundan çıkartılarak -26 °C'de dondurulmuştur. Donan örnekler daha sonra liyofilize edilmiştir ve enzim bozunma testi sonrasında kalan kütleleri hassas terazide tartılıp m_{son} olarak not edilmiştir. Toplam kütle değişimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Kütle Kaybı } (\%) = [(m_{ilk}) - (m_{son})/(m_{ilk})] \text{ x } 100 \quad (3.3)$$

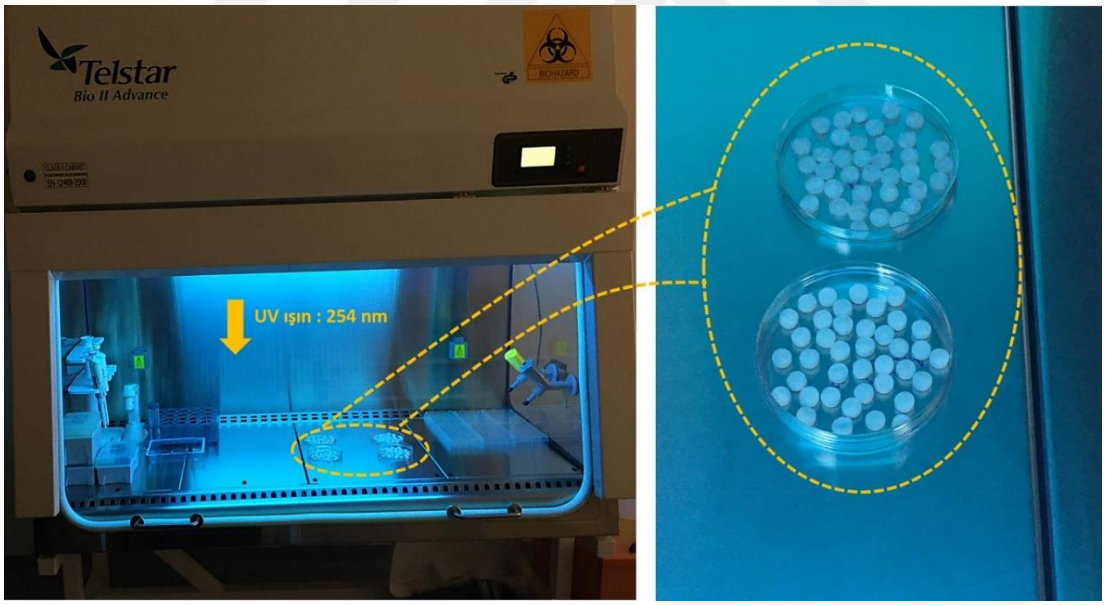
3.2.18. Hücre Kültürü Uygulaması ve Kriyojellerin *in vitro* Canlılık Testi

Üretilen Si-AÇJ kriyojel yapılarının osteobiyolojik özelliklerinin incelenmesi, malzemenin hücre canlılığı ve morfolojisi üzerine etkilerinin belirlenmesi için, kontrol grubu olan AÇJ kriyojelleriyle birlikte 7, 14 ve 21 günlük setler halinde iAMKH'ler (Merck-Milliopore, İnsan Yağları Mezenkimal Kök Hücre Kiti, Kat.no. SCC038, Lot QVP1303200, ABD) ile statik hücre kültürü ortamında etkileştirilmiştir. Pasaj numarası 6'da olan -80 °C'de dondurulmuş iAMKH hücreleri, hücre açma prosedürüne göre biyogüvenlik seviyesi II olan laminar akışlı kabinde (Bio II Advance, Telstar, İspanya) steril T75 flask içine açılarak 1 hafta boyunca iki boyutlu (2B) hücre kültürü plastiği yüzeyinde konflüens olana kadar (hücrelerin %80 dolulukta ve üzeri flask yüzeyini kaplaması) çoğaltılmıştır.

Hücre açma prosedürüne göre -80 °C dondurucuda (Panasonic, Japonya) kriyovial tüpün içinde bulunan hücreler önce -80 °C'den çıkartılarak 37 °C su banyosunda buzun 1/3'i kalana kadar eritilmiştir. Ardından seri bir şekilde hareket edilerek hücreler pipet yardımıyla taze besi ortamı içeren falcon tüpün içerisine alınmıştır. Böylece hücrelerin donma sıvısında bulunan ve +4 °C'den sonra sitotoksik özellik gösteren dimetil sülfoksit (DMSO) ile etkileşimi en az seviyeye indirilmiştir. DMSO'nun ortamdan uzaklaştırılması için falcon tüp 200 xG'de 5dk santrifüj (NÜVE, Türkiye) edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Dipte toplanan hücre pelleti taze besi ortamıyla resüspanse edilerek hücreler sıvı faza alınmıştır. Falcon tüpte resüspanse edilen hücreler pipet yardımı ile T75 flasklar içerisinde aktarılmış ve 1 hafta boyunca, 3 günde bir besi ortamları tazelenerek, 37 °C, %95 nem ve %5 CO_2

içeren inkübatör cihazında (Panasonic, Japonya) inkübe edilmiştir. Hücre açma işleminde ve 1 haftalık hücre çoğaltma sürecinin tümünde hücreler ScienceCell (San Diego, ABD) firmasının mezenkimal kök hücreler için ürettiği özel besi ortamı setinde kültür edilmiştir. Besi ortamı içeriği mezenkimal kök hücre vasatı (ScienceCell, MSCM, Kat.no. 7501), mezenkimal kök hücre büyüme serumu (ScienceCell, MSCGS, Kat.no. 7552), fetal sığır serumu (ScienceCell, FBS, Kat.no. 0025) ve penisilin/streptomisin solüsyonundan (ScienceCell, P/S, Kat.no.0503) oluşmaktadır. T75 flaskların içerisindeki hücreler Zeiss PrimoVert faz-konstrast mikroskobu (Zeiss, PrimoVert, Almanya) yardımı ile gözlemlenerek hücre proliferasyonu incelenmiştir.

1 haftalık hücre çoğaltma sürecinin sonucunda yeterli sayıda hücrenin T75 flask yüzeyinde elde edildiği gözlemlenince hücreler flask yüzeyinden kaldırılarak AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerine ekilmiştir. Bu işlem için kriyojel yapılar biyogüvenlik kabini içerisinde 1 saat boyunca UV (254 nm) ışın uygulanarak sterile edilmiştir (Şekil 25). Steril edilen kriyojel yapıları daha sonra steril 48 bölmeli well-plate içerisine alınarak hücre ekimine hazır halde biyogüvenlik kabini içinde bekletilmiştir.

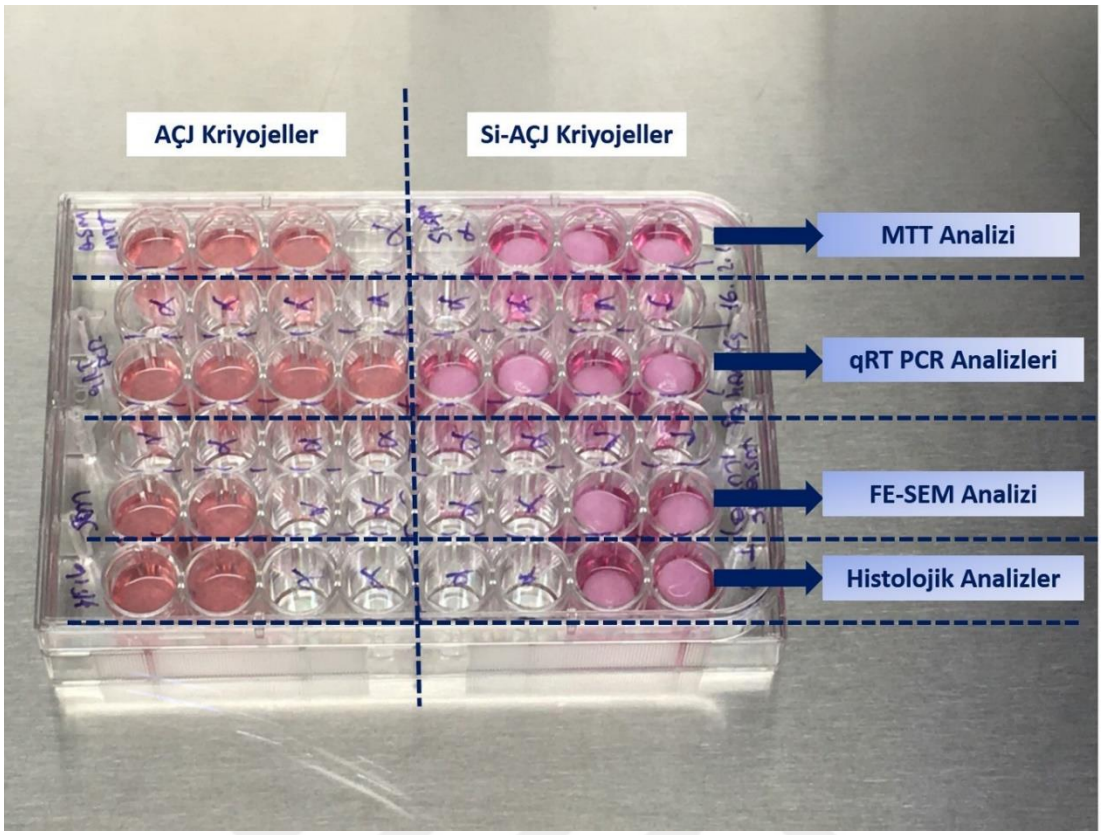


Şekil 25. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin biyogüvenlik kabini içinde UV (254 nm) ışınlar ile sterilizasyonu

T75 içindeki hücrelerin kriyojel yapıları üzerine ekimi için, önce hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücrelerin yüzeyden kaldırılıp kriyojel üzerine ekim işlemi için önce T75 içindeki eski besi ortamı pipetle atılmıştır. Daha sonra flask yüzeyine tutunmamış, ölmüş hücreler ve serum kalıntılarından kurtulmak için T75 flask yüzeyi 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Ardından T75 flask yüzeyine tutunmuş hücrelerin yüzeyden kalkması için

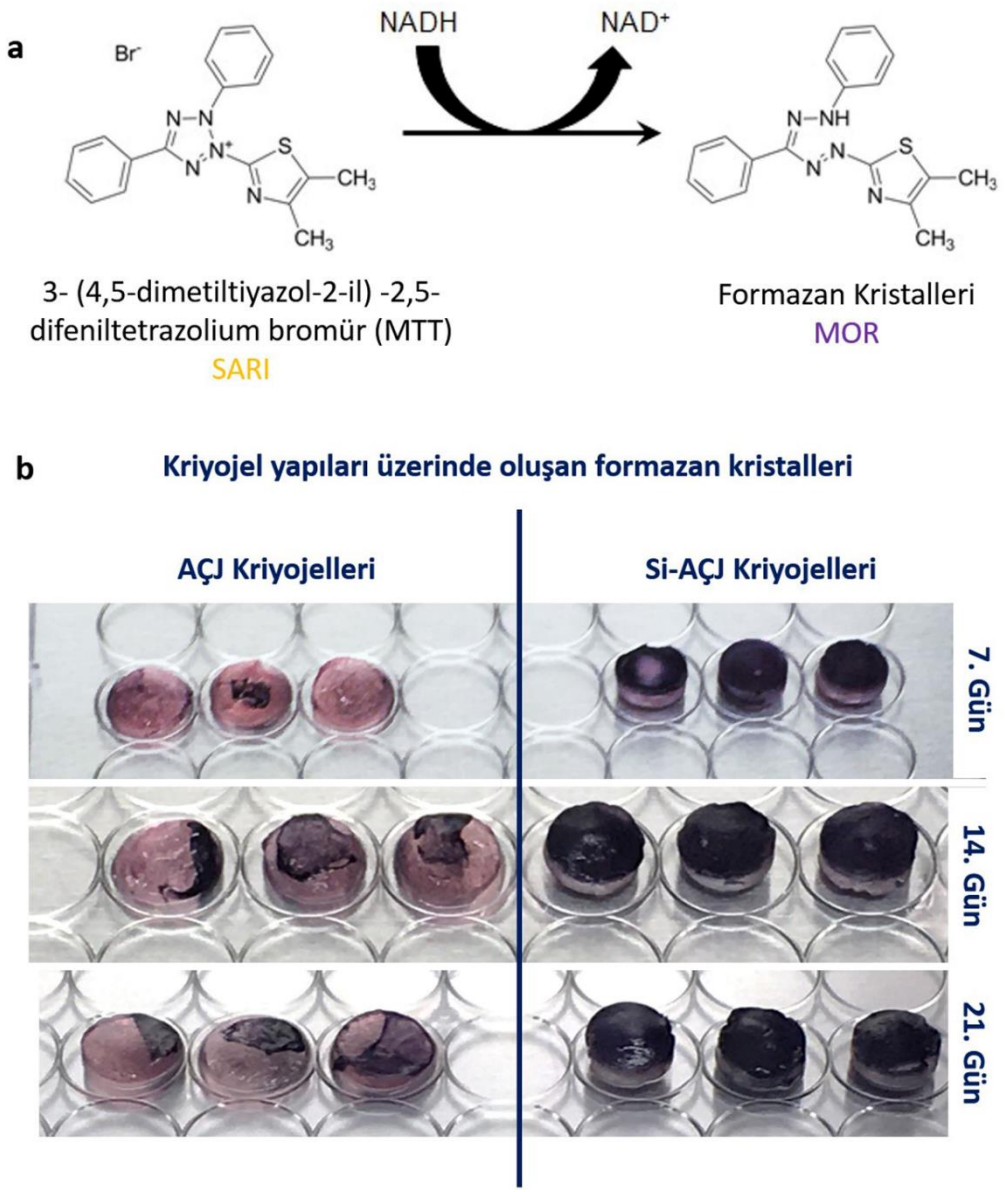
tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için %0,25 tripsin ve 0,53mM'lık etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ajanını içeren tripsin-EDTA çözeltisi hazırlanmıştır. T75 flaskın içerisine hazırlanan tripsin solüsyonundan 2 mL pipetle döküldükten sonra hafifçe sallanarak tripsinin tüm yüzeye temas etmesi sağlanmış ve 3 dk. boyunca 37 °C inkübatörde bekletilerek tripsinizasyon işlemi tamamlanmıştır. Flask yüzeyinden kalktığı gözlemlenen hücreler tripsinin toksik etkisinden kurtarmak için pipetle alınarak (15 mL) besi ortamı içeren ayrı bir falcon tüpe aktarılmıştır. Falcon tüp içerisindeki hücreli solüsyon 200 xG'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Dipte toplanan hücre pelleti taze besi ortamıyla pipetleme işlemi yardımıyla resüspanse edilmiştir. Daha önceki çalışmalardan elde edilen bilgi birikimine dayanarak her bir kriyojel üzerine pasaj numarası 7 olan (P7) 125,000 hücrenin (100 µL) ekilmesine karar verilmiştir. Hücrelerin kriyojeller üzerine ekimi sonrasında üzerleri 1 mL taze MSCM ve katkı materyallerini içeren besi ortamı ile doyurularak, hücrelerin kriyojel yapısına uyum sağlamaları ve şartlanmaları gerçekleştirilmiştir.

Şekil 26'da AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin hücre canlılık testi (MTT testi), FE-SEM, histoloji ve mRNA analizleri için 48 bölmeli well-plate içindeki dizilimleri gösterilmektedir. Kriyojel yapılarına ekilmiş hücreler bulundukları 3B ortama alışmaları için 1 gün boyunca 37 °C, %95 nem ve %5 CO_2 içeren kabinde inkübe edilmiştir. 24 saatlik MSCM şartlandırma besi ortamından sonra iAMKH'leri, hücre kültürü periyodunun sonuna kadar olan tüm süreçte ScienCell firmasından temin edilmiş mezenkimal kök hücre osteojenik farklılaşma besi yeri (MODM, Kat.no. 7531) ve katkı solüsyonlarını (FBS, mezenkimal kök hücre osteojenik besi ortamı katkı maddesi A (MODS-A), mezenkimal kök hücre osteojenik besi ortamı katkı maddesi B (MODS-B) ve P/S) içeren besi ortamında kültür edilmiştir. Her kriyojelin üzerine hazırlanan osteojenik besi ortamı solüsyonundan 1'er mL dökülerek, hücre kültürü işlemi ayrı setler halinde 7,14 ve 21 günlük periyotlarda devam etmiştir. Kriyojellerin üzerindeki osteojenik besi ortamı her 2-3 günde bir çekilerek taze besi ortamı ile devam edilmiştir.



Şekil 26. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin hücre kültürü well-plate dizilimleri

Hücre kültürü periyodunun 7., 14. ve 21. günlerinde kriyojel yapısı üzerine ekilmiş hücrelerin *in vitro* hücre canlılığının ölçülebilmesi için MTT testi yapılmıştır. MTT testi hücresel metabolik aktivitenin kalorimetrik olarak ölçülebileceği bir testtir. Canlı hücrelerde bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NAD(P)H) bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri MTT reaktifi ile etkileşerek MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesini sağlar. Formazan kristalleri görünür dalga boyu aralığında mor tonlarında renk verdiği için hücre canlılığı kolorimetrik ölçümle belirlenmiş olur (Şekil 27).



Şekil 27. Hücre canlılığı testi. (a) MTT reaktifinin mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi (b) Hücre kültürü periyodunun 7., 14. ve 21. günlerinde MTT testleri yapılan AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri

Yapılan MTT testi Millipore-Sigma firmasından temin edilen kit ile üreticinin sunduğu prosedüre göre gerçekleştirilmiştir (Cell Growth Determination Kit, MTT based, CGD1, Milliope-Sigma, ABD). Test protokolüne göre her kriyojel için %10'u MTT reaktifi, %90'ı serumsuz DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı) içeren 300 µL MTT solüsyonu hazırlanmıştır. MTT testi yapılacak kriyojellerin üzerindeki besi ortamı atılmış ve kriyojeller iki tur steril PBS ile yıkanmıştır. PBS ile yıkama işlemi sayesinde yapıdan serum uzaklaştırılıp MTT reaktifinin inaktive olması engellenmiştir. Ardından hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kriyojelin üzerine 300 µL dökülmüş ve inkübatörde 4 saat

boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için beklenilen 4 saatin sonunda kriyojel yapıları dikkatli bir şekilde well-plate içerisinden alınıp mikrofüj tüplerin içine alınmıştır. Mikrofüj tüp içerisindeki kriyojel yapıları parçalanarak üzerlerine 300 µL MTT solvent konulmuştur. Formazan kristallerinin solvent içerisine geçişini hızlandırmak için tüpler ağızları sıkıca kapatılarak mini-spin cihazında (ISOLAB, Türkiye) 15 dk. boyunca döndürülmüştür. Formazan kristallerini içeren solvent santrüfüj işlemi sonrasında toplanarak 96 bölmeli well-plate içine alınmıştır. Plate Multiskan™ µdrop™ mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher-Scientific, ABD) cihazında MTT solventinin kör olarak kullanılmasıyla 570 nm dalgaboyunda spektrofotometrik olarak okutulmuştur.

3.2.19. Hücrelendirilmiş Kriyojel Yapılarının Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama)

Hücre kültürü işleminden sonra AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapıları hücrelerin kriyojel üzerindeki morfolojik davranışının incelenmesi ve hücre dışı matriksin mineral kompozisyonun belirlenmesi için FE-SEM EDX ve FE-SEM EDX elemental haritalama analizleri (Oxford Instrument X-Max detektörü, Oxford Instruments, Oxford, İngiltere) yapılmıştır.

Hücre kültürü periyodunun 7., 14. ve 21. günlerinde kriyojeller besi ortamından çıkartılarak PBS ile iki tur yıkanmıştır. Yıkanan kriyojeller %2,5'luk gluteraldehit (grade II, 25%in H_2O, Millipore-Sigma, ABD) çözeltisine daldırılmıştır ve fiksatif içerisindeki numuneler 2 hafta boyunca +4 °C buzdolabında bekletilmiştir. Gluteraldehit fiksatif çözeltisi içerisinde bekletilen kriyojeller daha sonra saf su ile yıkanarak sırasıyla %50, %70, %80, %85, %90 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilmiştir. Kriyojeller etanol serilerinden sonra kuruması ve yapıdan etanolün ayrılması için oda koşullarında 24 saat bekletilmiştir. FE-SEM görüntüleme ve devamındaki EDX haritalama analizleri için hazırlanan kriyojeller, 90 sn. süreyle $8x10^{-1}$mbar/ Pa basınçta Au-Pd (%80:20) alaşımıyla SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies, East Susssex, İngiltere) cihazı ile yüzeyi kaplanmıştır. 10 kV prob akımı altında farklı büyütme değerlerinde hücrelendirilmiş kriyojellerin FE-SEM görüntüleri alınmış, EDX sisteminde elemental analizler ve elemental haritalama işlemleri yapılmıştır.

3.2.20. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler

Hücre kültürü periyodunun 7.,14. ve 21. günlerinde besi ortamından alınan hücrelendirilmiş AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri PBS ile yıkandıktan sonra %10'luk formalin

çözeltisinde fikse edilmiştir. Formalin çözeltisinde en az 48 saat bekletilmiş kriyojeller daha sonra yıkanarak sırasıyla %50, %70, %80, %85, %90 ve %100'lük Et-OH serilerinden geçirilmiştir. Etanolün yapıdan uçması için kriyojeller oda koşullarında 24 saat boyunca açık havaya bırakılmıştır. Kuruyan kriyojeller parafin içine gömülmüştür. Parafin bloklar içindeki kriyjeller mikrotom cihazında 3-5 µm kalınlığında kesitler halinde Poly-L-lizin mikroskop lamelleri (Thermo Scientific, Braunschweig, Almanya) üzerine yerleştirilmiştir ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Daha sonra yapıdan parafinin ayrılması için de-parafinizasyon işlemi yapılmış, kesitler su ile ıslandırılarak (rehidrasyon) HK ve İHK boyamalara hazır hale getirilmiştir.

İHK boyamalar için numunelerdeki endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için numuneler 30 dk. boyunca %0,3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonunda bekletilmiştir. Numunede formalin fiksasyonuna bağlı meydana gelen kimyasal modifikasyonların hücreli numunedeki antijenik yapılara (epitoplara) zarar vermemesi için ısı ile indüklenmiş antijen geri kazanım tekniği (HIER) uygulanmıştır. Bu teknik için numuneler, mikrodalga fırının 800W güç değerinde 20 dk. boyunca 0,1 M'lık (pH 6,0) sitrat tamponunda (Sigma Aldrich, Inc, ABD) ısıtılarak bekletilmiştir. Non-spesifik bağlanmaları önlemek için numuneler, 30 dk. boyunca %10 normal keçi serumunda bekletilerek bloklanmıştır. Daha sonra numuneler gruplandırılarak üzerlerine anti-osteopontin (OP), (1:500, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-osteonektin (ON), (1:750, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-osteokalsin (OC), (1:400, Biorbyt, Cambridge, İngiltere) ve anti-alkalen fosfataz (ALP), (1:200, Boster, CA, ABD) primer antikorları uygulanarak gece boyunca inkübe edilmiştir. İHK boyamasının ileriki aşamaları Histostain-Plus İHK kiti (HRP, geniş-spektrum, Invitrogen, MA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm görüntüler Leica DFC450 model dijital ışık mikroskobu (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) aracılığı ile elde edilmiştir.

Hücrelendirilmiş kriyojel yapılardaki histomorfoloji ve kriyojel matriksi üzerindeki mineralleşme histokimyasal boyamalar ile incelenmiştir. Histokimyasal analizler Alizarin kırmızısı, Von Kossa, Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyamalar ile yapılmıştır.

Alizarin kırmızısı boyama işlemi kriyojel üzerindeki hücrelerin oluşturduğu ekstrasellüler matriks üzerindeki kalsiyum mineralizasyonunun görüntülenmesi için yapılmıştır. Alizarin kırmızısı boyama için kesit halindeki numuneler distile su ile birkaç defa yıkanmıştır. Yıkanan kesitler 10 dk. boyunca Alizarin kırmızısı içeren solüsyonda (pH 4,1-4,3) bekletilmiştir. Son olarak numuneler Entellan (Merck, Darmstadly, Almanya) reçinesi içine gömülerek Leica DM2500 ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Von-Kossa boyama işlemi için numuneler %1 gümüş nitrat içeren solüsyonda ve UV ışık altında 30 dk. boyunca bekletilmiştir. Numuneler daha sonra saf su ile birkaç kez yıkanıp %5'lik sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) çözeltisi içerisinde 10 dk. inkübe edilerek reaksiyona girmeyen gümüş nitrat yapıdan uzaklaştırılmıştır. Ardından numuneler sırasıyla %50, %70, %80, %85, %90 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilip yapıdaki su ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak numuneler ksilen ile temizlenerek Entellan reçinesine gömülmüştür. Kesitler Leica DM2500 ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.2.21. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi

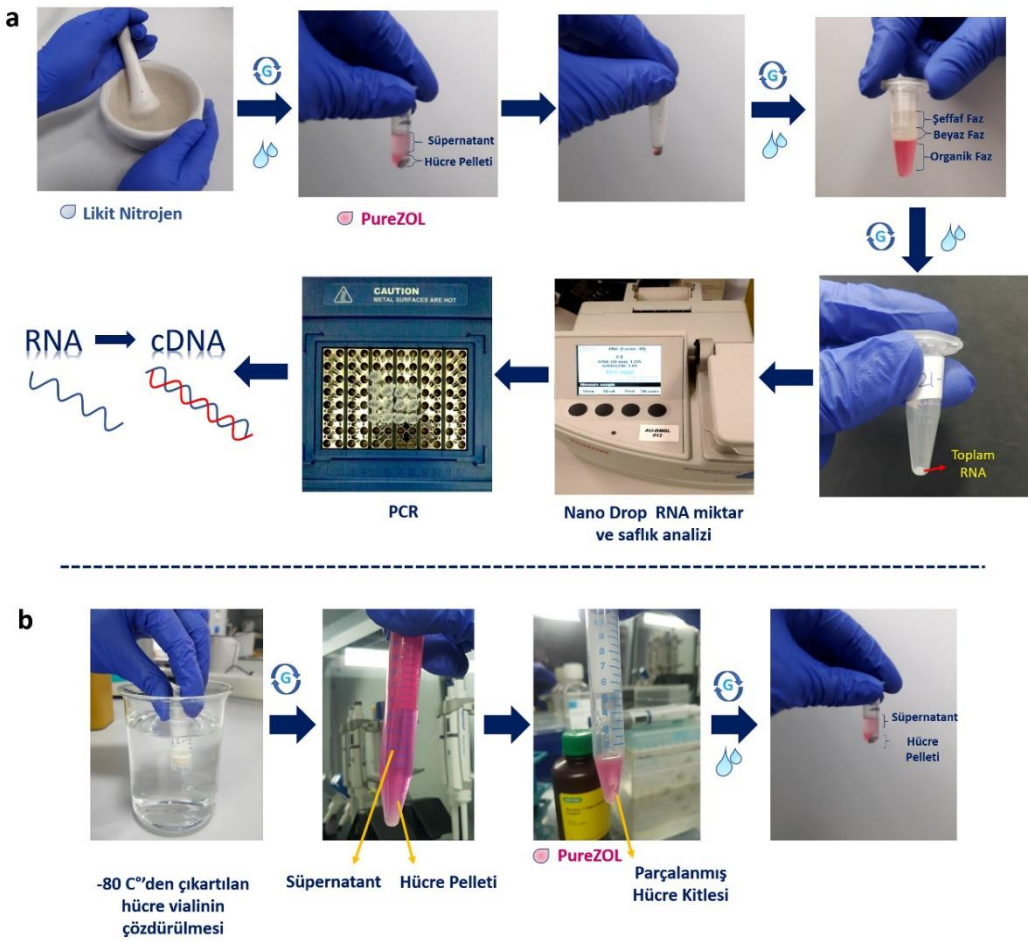
Hücrelendirilmiş Si-AÇJ, AÇJ ve kontrol grubu olarak pasaj 7'de dondurulmuş iAMKH'lerde, osteojenik faklılaşma kapasitelerinin değerlendirilebilmesi için RT-qPCR ile osteojenik genlerin ifade seviyeleri belirlenmiştir. Bu analiz için kriyojel yapılar hücre kültürü periyodunun 7.,14. ve 21. günlerinde besi ortamlarından çıkartılarak her bir kriyojel için 1 mL pureZOL™ RNA izolasyon solüsyonu (fenol ve guanidinyum tiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi) (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) eklenmiş ve steril saklama kapları içerisine alınmıştır. Numunenin bozulmadan saklanıp taşınabilmesi için pureZOL™ içerine konulmuş kriyojeller -26 °C'de 24 saat boyunca dondurulmuştur. Kontrol grubu olarak pasaj 7'de dondurulmuş ve -80 °C saklanmış iAMKH'leri kullanılmıştır. iAMKH'lerden ve hücrelendirilmiş kriyojel yapılarından mRNA izolasyonu için Bio-Rad firmasının #732-6890 katalog numaralı RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

Uygulanan mRNA izolasyon protokolüne göre donan kriyojel numuneler önce sıvı nitrojen ile steril havanlarda tokmak yardımıyla mekanik olarak parçalanarak homojenize edilmiştir. Elde edilen lizat oda koşullarında 5 dk. inkübe edilmiştir. Ardından 12000 xG soğutmalı santrifüjde (4 °C) santrifüj edilerek süpernatant toplanıp ribonükleaz (RNAaz) içermeyen polipropilen mikrosantrifüj tüpleri içerisine alınmıştır. Ayrı bir tüpe alınan süpernatantın üzerine başlangıçta kullanılan her mL pureZOL™ için 0,2 mL kloroform ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 sn. boyunca tüp hafifçe elle sallanarak kloroform ile süpernatantın karışması sağlanmıştır. Tüp daha sonra 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından numuneyi içeren tüp santrifüje yerleştirilerek 12000 xG'de 15 dk. santrifüj (4 °C) edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüp üzerinde 3 faz gözlemlenmiştir. Bu fazlar en dipteki koyu renkli faz (organik çökelti), ortadaki beyaz renkli faz (DNA fazı) ve en üstteki berrak sıvı fazdır (RNA fazı). En üstteki şeffaf faz pipet yardımıyla çok dikkatli bir şekilde çekilerek RNAaz içermeyen steril yeni bir tüpe aktarılmıştır. Numuneler için kullanılan her 1 mL pureZOL™ hacmi için 0,5 mL isopropil alkol tüpün içine eklenmiştir ve hafifçe

karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilmiştir. Beklemenin sonunca tüp 12000 xG'de 10 dk. boyunca (4 °C) santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda RNA, tüpün dibinde beyaz renkli pellet olarak toplanmıştır. Tüpün üzerindeki süpernatant atılıp kalan RNA pelleti %75'lik etanolde hafif pipetleme yapılarak yıkanmıştır. Daha sonra 7500 xG'de 5 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatanttaki etanol pipetle çekilip atılarak ve tüpte kalan RNA oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Kontrol grubu olarak pasaj 7'de dondurulmuş iAMKH'lerden mRNA izolasyonu, kriyojeller için yapılan mekanik parçalama işlemi hariç geriye kalan tüm adımlarda aynı prosedür uygulanmıştır. -80 °C'de saklanan iAMKH'lerin liziz edilmesi için biyogüvenlik seviye 2 kabininde açılarak 10 mL Dubecco'nun Eagle Besi Ortamı (DMEM) içerisinde çözündürülmüştür. Ardından 200 xG'de santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 1 mL pureZOL™ içinde çözünmüştür. Hafif pipetleme işlemi yapılarak hücreler lize edilmiştir. Hücre lizatının elde edilmesinden sonraki mRNA izolasyon basamakların hepsi yukarıda kriyojellerden mRNA izolasyonu için açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen RNA miktar ve saflık tayini için izole edilen RNA 25 µL RNAaz içermeyen saf su ile resüspanse edilerek Thermofisher NanoDrop™ LITE Spektrometresi (ThermoFisher Scientific, MA, ABD) yardımıyla okutulmuştur. Şekil 28'de 3B hücrelendirilmiş kriyojellerden ve iAMKH'lerden RNA izolasyonuna kadar olan süreç görseller yardımıyla özetlenmiştir. Her bir numune NanoDrop cihazında 2 tekrar olarak okutulmuştur ve kör solüsyonu olarak RNAaz içermeyen saf su kullanılmıştır. İzole edilen RNA'dan ters transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) yapıları elde edilmiştir. cDNA elde etmek için Bio-Rad firmasının iScript™ cDNA Sentez kiti (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan komponentler Tablo 7'de özetlenmiştir.



Şekil 28. mRNA izolasyon protokolü (a) AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA eldesi (b) Kontrol grubu olarak kullanılan P7'de dondurulmuş iAMKH'lerin mRNA izolasyon aşamaları

Tablo 7
cDNA sentez kiti bileşenleri (BIORAD kat. No #1708890)

Bileşenler	Reaksiyon başına kullanılan hacim (µL)
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Ters Transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen saf su	Değişken
RNA şablonu	Değişken
Toplam hacim	20

İzole edilen total RNA; tablo 7'deki konsantrasyonlarda hazırlanan cDNA solüsyonuyla birlikte PCR cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur. Kullanılan protokol ile 25 °C'de 5 dk., 46 °C'de 20 dk. ve 95 °C'de 1 dk. olmak üzere üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir (Applied Biosystem, ABD).

Reaksiyon sonucu elde edilen cDNA Bio-Rad firmasından temin edilen SYBR Green RT-qPCR kiti ve tablo 8'de belirtilen primerler kullanılarak RT-qPCR işlemine tabi

tutulmuştur. Öncelikli olarak; SYBR Green PCR master karışımı hazırlanmıştır. Karışımda her 1 µL cDNA için, 3 µL SYBR Green reaktifi, 5 µL nükleaz içermeyen saf su ve 0,5 µL ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Ostejenik farklılaşmanın gen seviyesinde incelenmesi için osteopontin (OPN), osteonectin (ON), osteokalsin (OC), runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), kollojen tip1 α1 (COL1A1) ve alkalen fosfataz (ALP) genleri incelenmiştir. Kontrol gen grubu olarak (housekeeping geni) glikoliz aşamalarını katalizleyen enzim geni gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılmıştır.

Tablo 8
RT-qPCR'da kullanılan ileri ve geri primerler, gen dizilimleri ve boyutları (Kang ve diğerleri, 2013; Knippenberg ve diğerleri, 2007; Yanai ve diğerleri, 2019)

Hedef Gen	Kısaltma	Oligonükleotit Sekansı	
		İleri 5'/3'	Geri 5'/3'
Osteopontin	OPN	TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG	GTGACCAGTTCATCAGATTCAT
Osteonektin	ON	GCTCAAGAACGTCCTGGTCA	TTCTCATGGATCTTCTTCAC
Osteokalsin	OK	GCAAAGGTGCAGCCTTTGTG	GGCTCCCAGCCATTGATACAG
Runx transkripsiyon faktör 2	RUNX2	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC	CGTTACCCGCCATGACAGTA
Kollajen tip I α1	COL1A1	CAAGACAGTGATTGAATACAAAACCA	ACGTCGAAGCCGAATTCCT
Alkalen Fosfataz	ALP	ATGTCATCATGTTCCTGGGAGAT	TGGAGCTGACCCTTGAGGAT
Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	GAPDH	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	GTGGTCGTTGAGGGCAATG

Analiz için kullanılan primerlerin erime sıcaklığı değerleri (T_m) farklı olduğu için RT-qPCR için Tm sıcaklıkları birbiri ile uyumlu olan primerler aynı 96'lı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) well plate içinde kullanılmıştır. Şekil 27'de 3 farklı grup halinde oluşturulmuş plaka tasarımları görülmektedir. Şekilde "A" harfi ile gösterilenler AÇJ kriyojellerini, "S" ile gösterilenler Si-AÇJ kriyojellerini belirtmektedir. Benzer şekilde plate üzerindeki her A ve S bölmesi için yanındaki 7,14 ve 21 numaraları hücre kültürü periyodunun 7,14 ve 21. günlerinden izole edildiğini, tireden sonraki 1 ve 2 numaraları teknik tekrar numunelerini, (') tek tırnak işaretiyle gösterilen bölümler ise biyolojik tekrar numunelerini göstermektedir.

qRT-PCR reaksiyonlarında her gen için 2 teknik, ve 2 biyolojik tekrar uygulanmıştır. Şekil 29'daki plate tasarımlarıyla CFX-96 Termal Döngü (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonuçlarında eşik döngü sayısı C_t olarak ifade edilmiştir ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin ekspresyon değerine göre diğer genlerin ifade seviyeleri ile normalize edilmiştir. Farkılaştırılmamış ve pasaj 7'de dondurulmuş hücrelerinden elde edilen sonuçlar kantitasyon için kontrol olarak kullanılmıştır. Hedeflenen gen ifadelerindeki değişim (FC) housekeeping geni ile kıyaslanarak belirlenmiş ve normalizasyonu $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

1. Plaka (Tm : 59°C)

GAPDH ALP RUNX2 GAPDH NK ALP NK RUNX2 NK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
B	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
C	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
D	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
E	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
F	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
G	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH						
H							NK	NK	NK	NK	NK	NK

2. Plaka (Tm : 59°C)

OK OK NK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
B	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
C	iAMKH	iAMKH	iAMKH									
D												
E												
F												
G												
H											NK	NK

3. Plaka (Tm : 57°C)

ON OPN COL1A1 ON NK OPN NK COL1A1 NK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
B	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
C	A7-1	A-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
D	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
E	A7-1	A7-2	S7-1	S7-2	A14-1	A14-2	S14-1	S14-2	A21-1	A21-2	S21-1	S21-2
F	A7-1′	A7-2′	S7-1′	S7-2′	A14-1′	A14-2′	S14-1′	S14-2′	A21-1′	A21-2′	S21-1′	S21-2′
G	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH	iAMKH						
H							NK	NK	NK	NK	NK	NK

Şekil 29. RT-qPCR yapılacak genlerin uygun T_m değerlerine göre yerleştirilmiş plaka tasarımları (GAPDH: gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, ALP: alkalen fosfataz, RUNX2: runx transkripsiyon faktör 2, OK: osteokalsin, ON: osteonektin, OPN: osteopontin, COL1A1: kollajen tip 1 A1, NK: negatif kontrol)

3.2.22. İstatistiksel Analiz

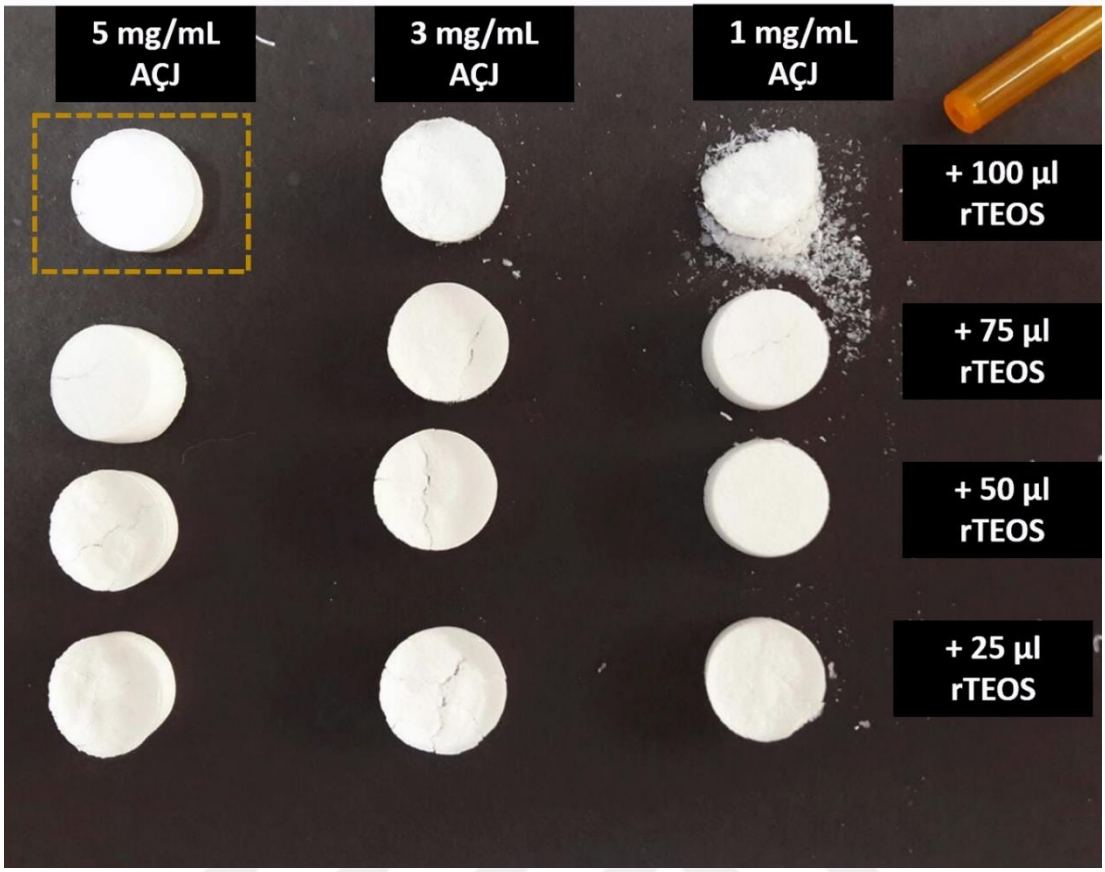
Deneysel veriler en az 3 tekrar sonucunda elde edilmiştir ve standart sapma değerleri (±) simgesiyle gösterilip MS Office Professional Plus 2016 Excel programında hesaplatılmıştır. Bir deney grubu içindeki istatistiksel anlamlılık Tukey testinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) programında hesaplatılmıştır. Deney grupları arasındaki farklılık *p değeri <0,05 için anlamlı kabul edilirken p değeri> 0,05 istatistiksel olarak anlamlı değil kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan tez çalışmasının ana hedefi sürdürülebilir, ucuz ve doğal bir kaynak olan ayva çekirdeklerinden elde edilen jel yapısının silika ile oluşturduğu hibrit yapıların KDM uygulamalarında etkin bir şekilde kullanılabileceğinin gösterilmesi ve literatüre yeni fonksiyonel hibrit biyomalzemenin kazandırılması üzerinedir. AÇJ polimeri içinde bulunduğu ortamın pH, iyon dağılımı ve sıcaklık gibi değişimlerine tepki veren yapıya sahiptir. Ayrıca literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde AÇJ'nin rejeneratif etkilerinin de olduğu görülmektedir (Iravani ve Varma, 2019). Ancak AÇJ polimerinin aşırı hidrofilik doğası ve nispeten düşük mekanik dayanıma sahip olması, AÇJ'nin KDM uygulamalarında kullanımı için iyileştirilmesi gereken hususlardır. Bunun için AÇJ polimerinin nano silika partikülleri ile modifikasyonu önerilmiştir. Tez çalışmasında litaratüre mikrodalga-destekli sol-jel yöntemi sunulmuştur. Bu teknik sayesinde reaksiyon süresi oda koşullarında 24 saat veya üzerinde sürerken 120 sn. gibi kısa bir süre içinde tamamlanabilmiştir. Yapılan silika modifikasyonu sayesinde oluşturulan 3B kriyojel yapılarının özgül toplam yüzey alanı ve mekanik dayanımı artmış, hücre-malzeme adezyonu iyileştirilmiş ve malzeme üzerinde mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potensiyellerinde artış gözlemlenmiştir.

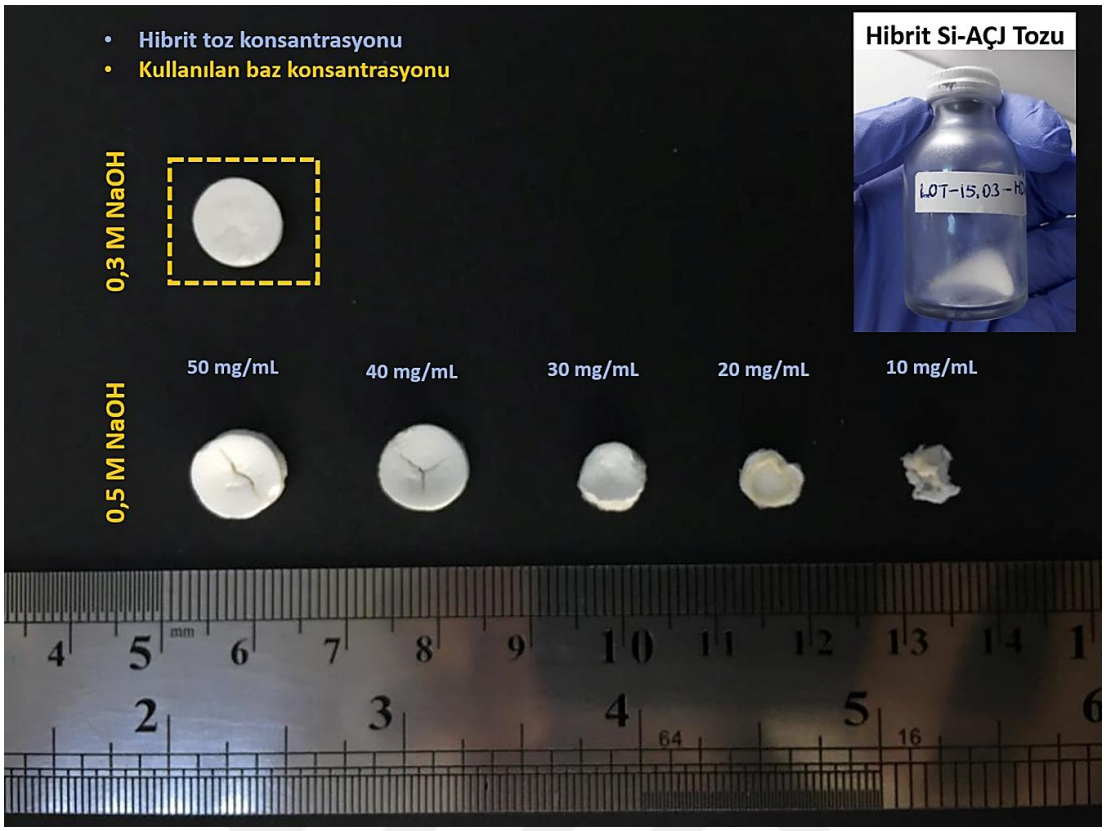
4.1. Hibrit Materyallerin Üretiminin Optimizasyonu

Si-AÇJ hibritlerin üretimi için farklı konsantrasyonlarda AÇJ polimeri ve rTEOS miktarları denenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Malzemenin kalıplanıp liyofilize edilmesinden sonra elde edilen 3B yapılarda morfolojik olarak en kararlı yapı gösteren konsantrasyon, hibrit malzemenin üretiminde kullanılacak optimum değer olarak belirlenmiştir. Şekil 30'da hibrit malzeme üretimi için denenen AÇJ-rTEOS konsantrasyonları verilmiştir.



Şekil 30. Si-AÇJ hibrit materyalinin üretiminin optimizasyonu. Farklı AÇJ ve rTEOS konsantrasyonlarının denenmesi

Yapılan denemeler sonunda morfolojik olarak en kararlı yapının 5mg/mL AÇJ polimeri ile 100 µL rTEOS solüsyonun verdiği sol-jel reaksiyonu üretim için kullanılacak prosedür olarak belirlenmiştir. Hibrit yapıların oluşturulmasından sonra elde edilen hibrit toz yapı saflaştırılarak iskele oluşturulmak üzere NaOH çözeltisi içerisinde çözdürülüp kriyojel elde edilmek üzere liyofilize edilmiştir. Hibrit tozun uygun bazik ortamda çözünebilmesi için 0,5 M ve 0,3 M derişimde sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/mL hibrit toz/NaOH konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 31'de yapılan denemeler sonunda elde edilen 3B yapıların görüntüleri verilmiştir.

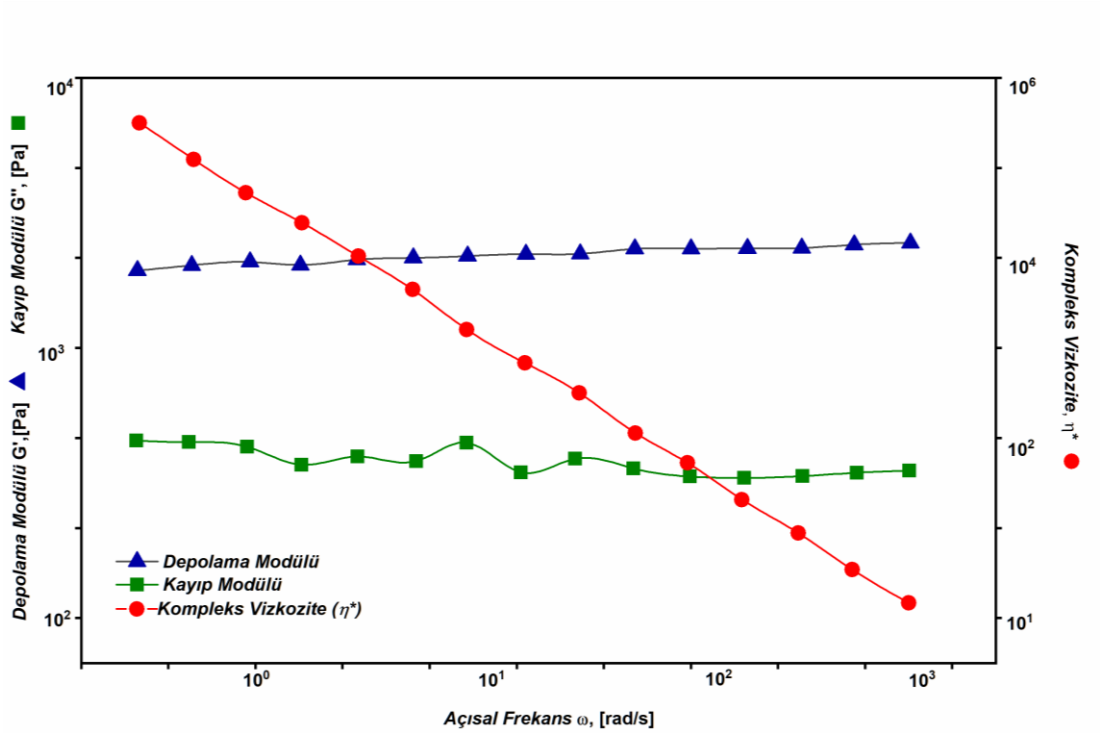


Şekil 31. Si-AÇJ hibrit tozunun farklı baz konsantrasyonlarında çözündürülerek elde edilen 3B yapıların morfolojik olarak incelenmesi

Denemeler sonucunda elde edilen 3B morfolojik yapıların incelenmesine dayanarak 50 mg/mL derişim sağlanacak şekilde elde edilen hibrit tozun 0,3 M NaOH solüsyonunda çözündürülmesine karar verilmiştir.

4.2. Si-AÇJ Hidrojellerinin Reolojik Özellikleri

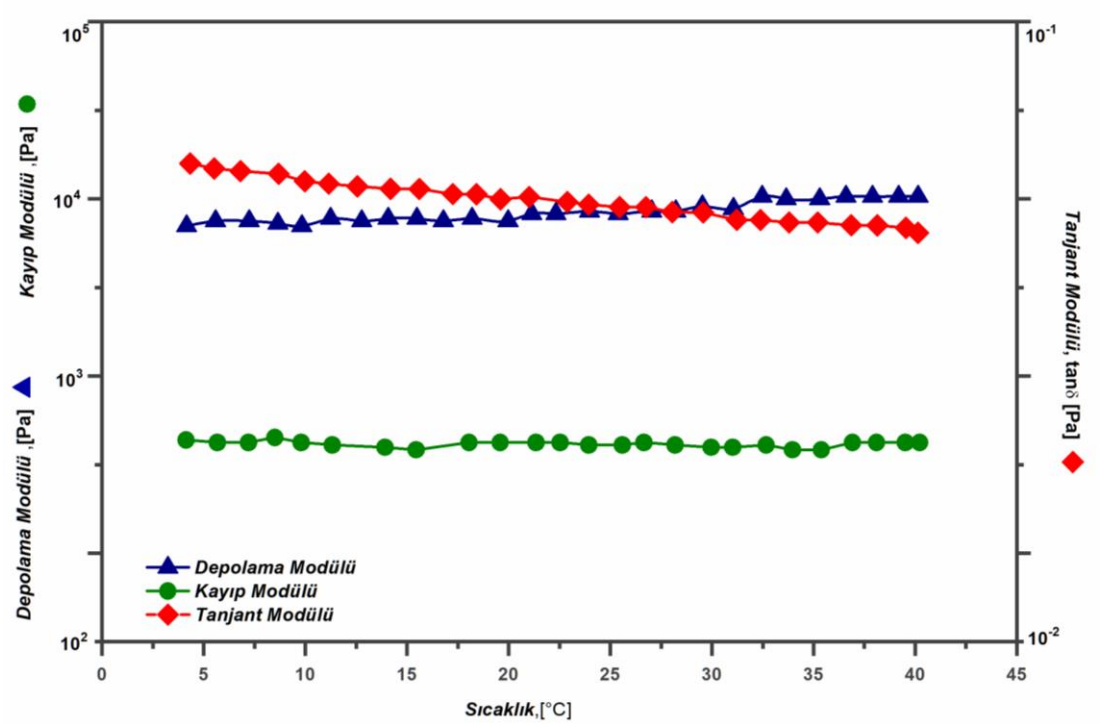
Si-AÇJ hidrojellerinin reolojik özellikleri gerinim (strain), frekans ve sıcaklık tramaları yapılarak belirlenmiştir. Frekans taraması belirlenen sabit gerinim değer altında (%0,157) 0,1-100 rad/sn aralığında gerçekleştirilmiştir. Frekans taraması sonucunda depolama modülüsü (G'), kayıp modülüsü (G") ve kompleks modülüs (η*) değerleri tespit edilmiştir. Şekil 32'deki grafikte yapılan frekans taramasının sonuçları verilmiştir.



Şekil 32. Si-AÇJ jellerinin reolojik frekans taraması

Elde edilen değerler incelendiğinde tüm taranan aralıktaki tüm frekans değerleri için jelin depolama modülüsünün kayıp modüllüsünden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre hibrit hidrojellerin iyi gelişmiş 3B jel örgü yapısının olduğu ve likit davranışından ziyade jel benzeri davranış sergilediği ortaya konmuştur. Literatür incelendiğinde Abbastar ve ark. (2015) AÇJ polimerinin kendisinin reolojik özelliklerini incelemiştir, yayımladıkları çalışmaya göre AÇJ polimerinin kayıp ve depolama modülüsleri 0,1 ile 100 Pa arasında değiştiği görülmektedir (Abbastabar, Azizi, Adnani, ve Abbasi, 2015). Si-AÇJ'nin reolojik frekans taraması sonuçlarına göre literatürde AÇJ için belirtilen değerlerden daha yüksek G' ve G" değerleri elde edildiği görülmüştür.

Si-AÇJ hidrojellerinin yine sabit %0,157 gerinim değerinde ve 10 Hz. frekansında 4-40 °C aralığında sıcaklık taraması da yapılmıştır. Şekil 33'de, yapılan sıcaklık taramasına ait grafik verilmiştir.

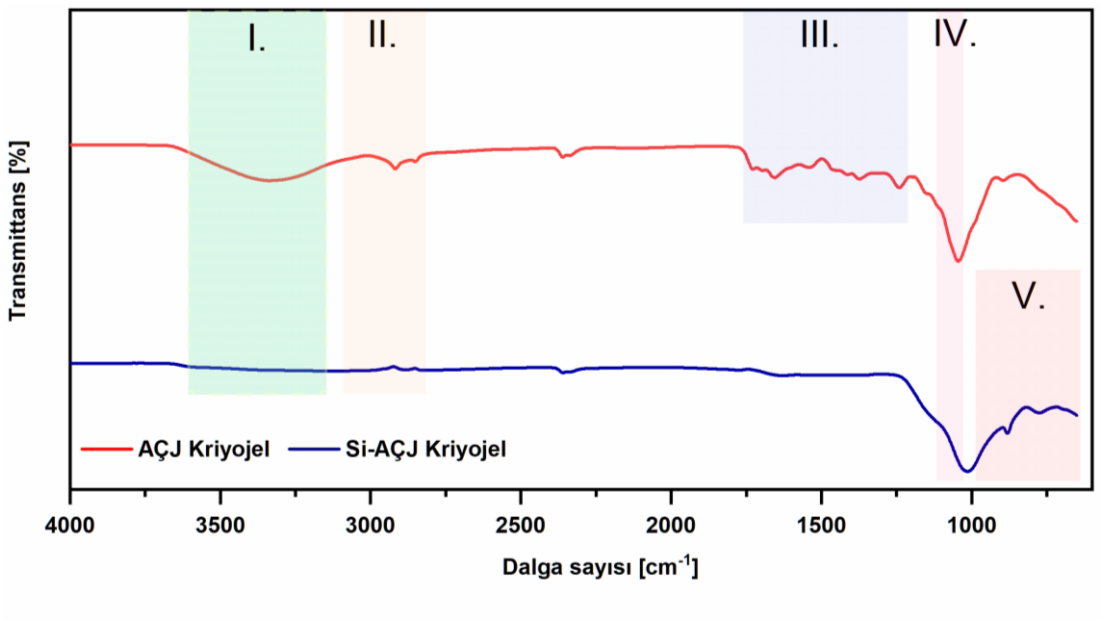


Şekil 33. Si-AÇJ hidrojellerinin reolojik sıcaklık taraması

Yapılan sıcaklık taraması sonuçlarına göre Si-AÇJ hidrojeli 4-40 °C aralığında stabil termal davranış göstermiştir. Bu durum Si-AÇJ'nin *in vivo* koşullarda hidrojel olarak da kullanıldığında fizyolojik ortamda yapı bütünlüğünün bozulmadan kullanılabileceği fikrini vermiştir.

4.3. Fizikokimyasal Karakterizasyon: ATIR- FTIR, ^{29}Si-CP-MAS NMR ve XRD Analizleri

AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının yapısal karakterizasyonu için ATR-FTIR, ^{29}Si-CP-MAS NMR ve XRD analizleri yapılmıştır. Şekil 34'de AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri için 600-4000 cm^{-1} arasında yapılan optik tarama spektrumu verilmiştir. Elde edilen spektrumlara göre hem AÇJ hem de Si-AÇJ materyalleri genel polisakkaritler pikleri vermişlerdir. Piklerin incelenmesinde kolaylık sağlanması için bant üzerinde pikleri I' den V' e kadar gruplandırılmıştır. Grup I incelendiğinde AÇJ polimerine ait -OH gruplarından gelen titreşime bağlı pik olduğu görülmektedir. Grup II'deki pikler ise $-CH_2$ ve -CH gruplarının titreşimsel simetrik gerilmesi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Jouki, Mortazavi, Yazdi, ve Koocheki, 2014; Rath, Subramanian, Sivanandam, ve Pradeep, 2001). Grup III' den gelen bantlar 1594 cm^{-1} ve 1419 cm^{-1} için sırasıyla asimetrik ve simetrik $-COO^-$ grubu gerilimlerine ait olduğu belirlenmiştir (Hosseinzadeh ve Mohammadi, 2015).

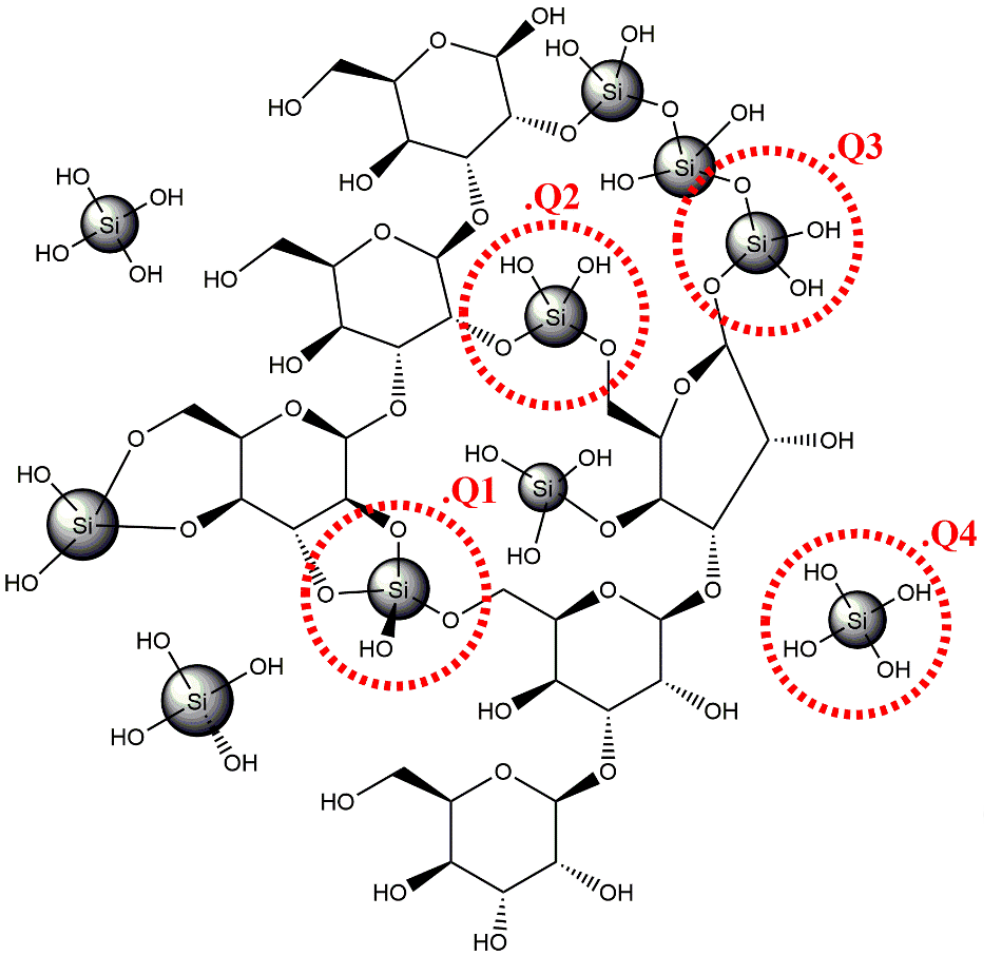


Şekil 34. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapıların ATR-FTIR spektrumları

Si-AÇJ spektrumu incelendiğinde, AÇJ de grup III' te bulunan piklerin kaybolduğu görülecektir. Bu durum AÇJ yapısının silika ile modifikasyonu sonucu AÇJ'de bulunan serbest grupların silanol grupları ile bağ yapması ile açıklanabilir. 800-1200 cm^{-1} aralığında gelen pikler incelendiğinde karbohidratların parmak izi olarak nitelendirilen değerlerin geldiği görülecektir (Jouki, Mortazavi, Yazdi, ve Koocheki, 2014). Grup IV 'teki pikler ise 1159 cm^{-1} ve 1049 cm^{-1} için sırasıyla primer alkol ve riboz grubu için gelen bantlardır (Wiercigroch ve diğerleri, 2017). Anomerik bölge aralığında 897cm^{-1} 'de görünen bant hemiselüloz yapıdaki şeker birimleri arasındaki β-glikozidik bağlardan geldiği anlaşılacaktır (E. E. Oliveira ve diğerleri, 2010). AÇJ ve Si-AÇJ spektrumları arasında 1049 ile 1039 cm^{-1} aralığında keskin bir pik kayması olduğu görülecektir. Bu kaymanın şeker yapısındaki C-OH gruplarının Si-AÇJ yapısında silanol gruplarıyla bağlanarak Si-O, C-O ve Si-O-C bağlarına dönüşmesi ile açıklanabilir. Si-AÇJ spektrumu incelendiğinde 950 ile 1150 cm^{-1} aralığında Si-O-C bağına ait karakteristik bir pik geldiği görülecektir (Walter, 1982). Grup V 'te 958 ve 794 cm^{-1} Si-AÇJ yapısında AÇJ'de bulunmayan yeni piklerin oluştuğu görülecektir. 958 cm^{-1} 'de gelen piklerin Si-OH ve C-OH arasında oluşan bağ ile açıklanabilirken, 794 cm^{-1} gelen pikin Si-O bağ gerilimine ait olduğu düşünülmektedir (Teresa ve Choi, 2010).

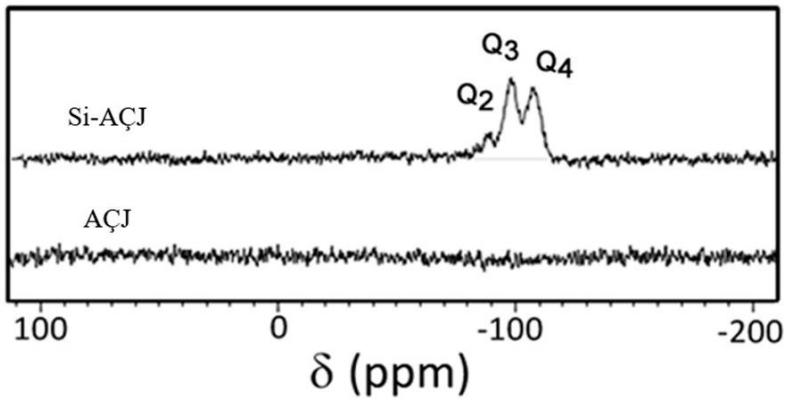
Şekil 33'te hibrit Si-AÇJ yapısının temsili gösterimi verilmektedir. Görselde belirtilen Q_n silisyum elementinin 4'lü bağ yapabilme kapasitesine bağlı olarak oksijen atomu ile oluşturduğu bağ sayısı "4-n" olarak gösterilmiştir. Buna göre Q_1 sadece 1 serbest -OH grubu

bulundurup 3 koldan organik yapıyla bağ kurduğu anlamına gelirken; Q_4 yapısı 4 kolda da polimer ile herhangi bir bağ kurmadığı anlamına gelmektedir (Şekil 35).



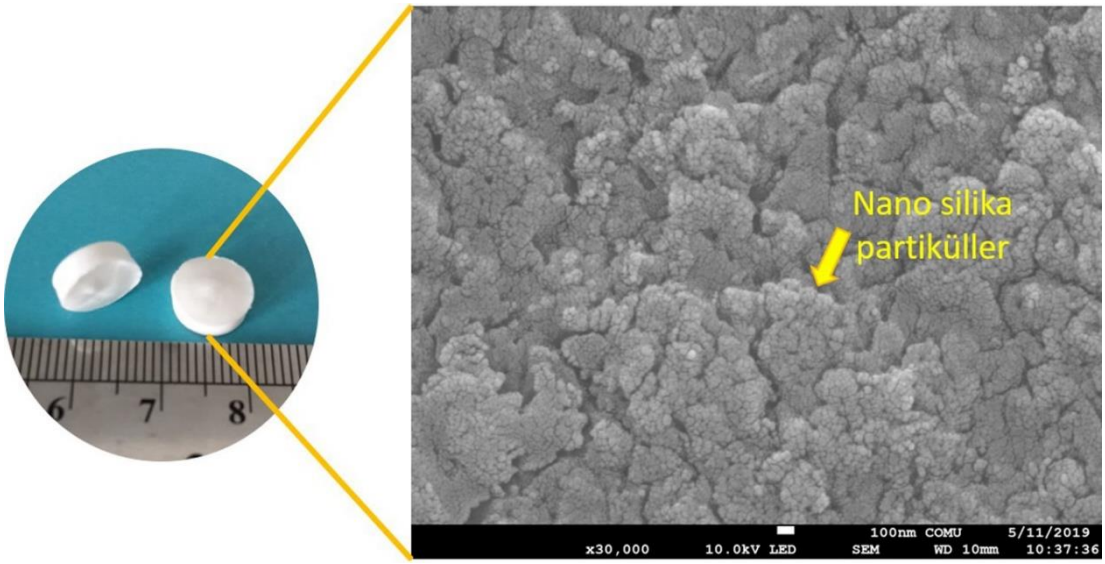
Şekil 35. Si-AÇJ hibrit yapısının bağlarının temsili gösterimi

AÇJ ve Si-AÇJ tozlarıyla yapılan katı silisyum NMR (^{29}Si-CP-MAS NMR) sonucu Şekil 36'da verilmiştir.



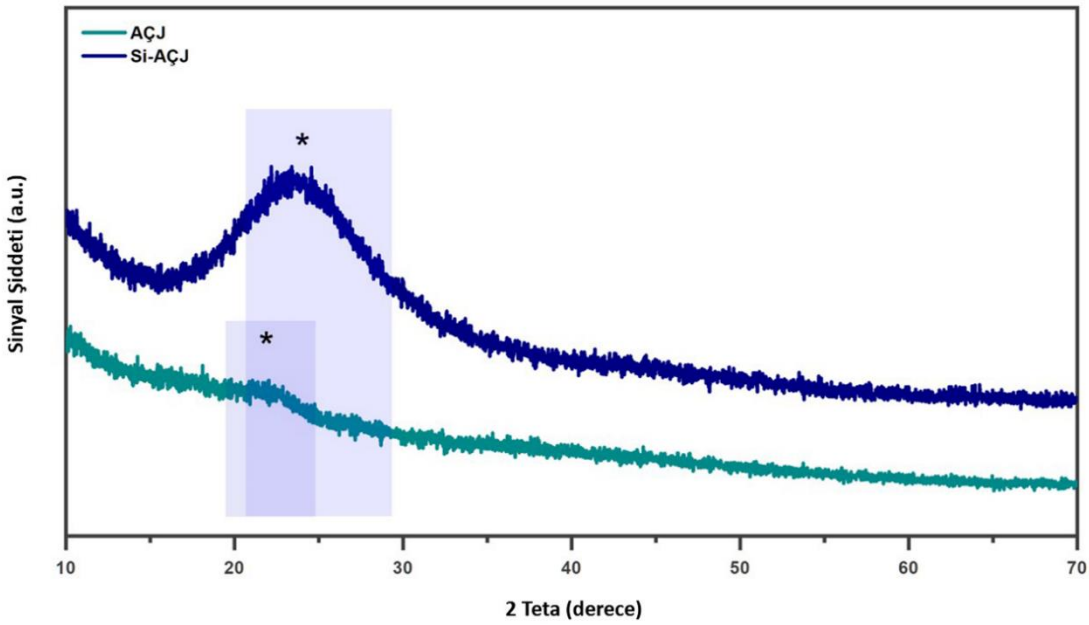
Şekil 36. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının ^{29}Si-CP-MAS NMR spektrumları

NMR sonuçlarına göre AÇJ yapısının silisyum ile modifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır. Si-O-C bağları ^{29}Si-CP-MAS NMR spektrumunda tespit edilmiştir. Spektrumdaki tepeler incelendiğinde en yüksek şiddette Q_3 ve Q_4 türünde bağların olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum silika nanopartikülleri ile AÇJ polimeri arasında naif bir çapraz bağlamanın gerçekleştirilmiş olduğu bilgisini verir. Q_4 pikinin varlığı AÇJ polimerinde silika partiküllerinin kendi içinde küresel olarak çökelti halde yapıda kaldığını da göstermektedir. Şekil 35'teki FE-SEM görüntüsünde 30000 X'lik büyütme değerinde bahsedilen silika nanopartiküller gösterilmektedir (Şekil 37).



Şekil 37. Si-AÇJ kriyojel yapıları ve 30000X büyütmedeki FE-SEM görüntüsü (Ölçek çubuğu 100 nm'yi göstermektedir. Sarı ok yüzey üzerinde homojen dağılmış nano silika partikülleri göstermektedir)

Yapılan XRD analizine göre AÇJ polimeri 2θ = 22-24° aralığında amorf karakter gösterirken, Si-AÇJ yapısı da 2θ = 20-27° aralığında amorf davranış göstermekle birlikte silika nano partiküllerin yoğunluğuna bağlı olarak kristal benzeri örgü nedeniyle XRD spektrumundaki sinyal şiddetinde artış gözlemlenmiştir (Şekil 38).

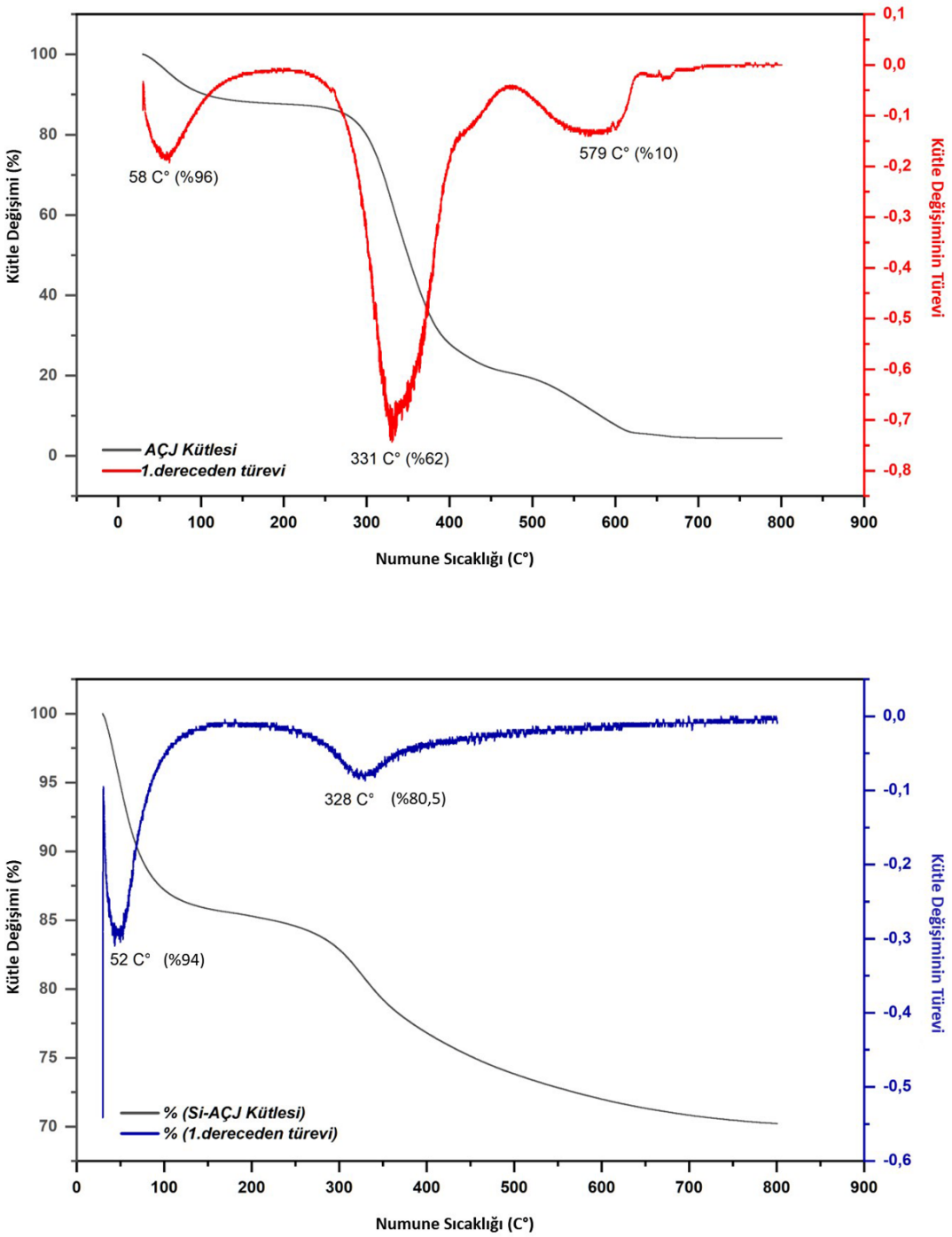


Şekil 38. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının XRD spektrumları. (*) XRD taramasında elde edilen en yüksek sinyal şiddetini işaret etmektedir

XRD analizinden elde edilen spekrumlar literatürde AÇJ ve diğer polisakkarit içerikli jeller ile yapılan analiz sonuçları ile paralellik göstermektedir (Alpizar-Reyes ve diğerleri, 2017; Djambaski ve diğerleri, 2009; Nallathambi, Ramachandran, Rajendran, ve Palanivelu, 2011).

4.4. Termal Karakterizasyonlar: TGA ve DSC Analizleri

AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının termal özelliklerinin belirlenebilmesi ve silika modifikasyonunun AÇJ üzerindeki termal etkilerinin ortaya konulabilmesi için TGA ve DSC analizleri yapılmıştır. Şekil 39'da AÇJ ve Si-AÇJ tozlarının TGA ve birinci derece türevi alınmış (DTG) termogramları gösterilmektedir.

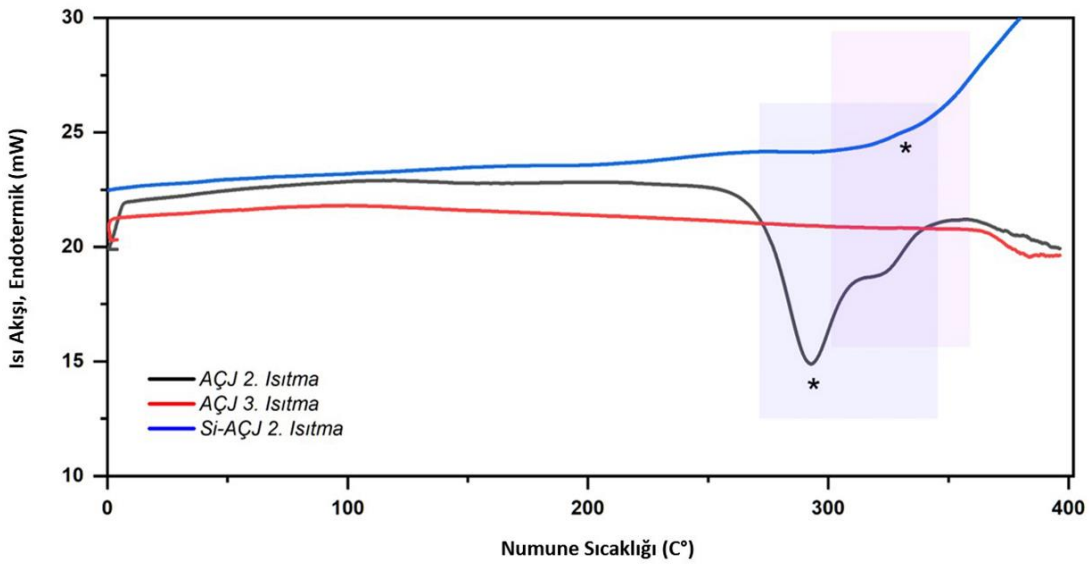


Şekil 39. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının TGA ve DTG spektrumları

TGA sonuçları incelendiğinde AÇJ yapısı 58 °C'de, Si-AÇJ ise 52 °C'de yapılarında bulunan nemin buharlaşarak uzaklaşmasına bağlı yaklaşık %4-6'lık bir kütle kaybı yaşandığı görülmektedir (Archana ve diğerleri, 2013). Literatüre göre polisakkaritlerin bozunması yaklaşık olarak 175 ile 320 °C arasında gerçekleşmektedir (de Alvarenga Pinto Cotrim, Mottin, ve Ayres, 2016). TGA analizinin sonuçları incelendiğinde AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının literatürdeki bilgilere benzer şekilde 320 °C ve üzerinde bozunmaya başladığı

görülmektedir (Şekil 37). AÇJ yapısında analiz sonunda yaklaşık %34 'lük bir kütle kaybı gerçekleşirken silika ile modifiye edilmiş Si-AÇJ kütlesinin sadece %14'ünün kaybedildiği görülmektedir. Analiz sonucunda AÇJ yapısının neredeyse tamamı kül olurken Si-AÇJ kütlesinin %70'inin yanmadan kaldığı görülmektedir. Bu durum silika modifikasyonunun malzemenin termal direncini önemli ölçüde etkilediği bilgisini vermektedir. Literatür incelendiğinde silika hibritlerinin çok iyi termal yalıtım sağladığı, silika aerojel yapılarının uzay mekiği gibi aşırı sıcaklıklara dayanım gösterebilen yapılarda kullanılan materyaller olduğu görülecektir (Woods, 2011). Organik/inorganik silika hibritlerin ise 500 °C ve üzerinde termal stabilitesini koruduğu bilinmektedir (Maleki ve diğerleri, 2018).

AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının ayrıca DSC analizleri de yapılmıştır. DSC analiz verileri TGA sonuçlarına benzer nitelik göstermiştir. Şekil 40'ta DSC analizinin spektrumları gösterilmektedir. DSC taramasında 1. tarama işlemi yapıdaki nemin uzaklaştırılması üzerine gerçekleştirildiği için polimerlerin termal yapısal özellikleri 0 ile 400 °C arasında gerçekleştirilen 2. tarama üzerinden incelenmiştir (Şekil 38).



Şekil 40. AÇJ ve Si-AÇJ yapılarının DSC spektrumları. (*) Bozunma eğrisindeki maksimum pik değerlerini göstermektedir

AÇJ yapıları 300 °C yakınlarında bozunmaya başlamıştır. Bu durum hemiselülozik AÇJ polisakkaritinin içindeki glikozidik bağların bozunmasıyla açıklanabilir (Werner, Pommer, ve Broström, 2014). Ancak Si-AÇJ yapısında aynı sıcaklık değerinde herhangi bir bozunma piki gözlemlenmemiştir. Bu durumun silanol gruplarıyla yapıda oluşan bağlar nedeniyle olduğu düşünülmektedir. AÇJ'de 300 °C dolaylarında gelen pikin gerçekten bozunma piki olup olmadığını teyit emek için ayrıca sıcaklık taraması işlemi yapılmış ancak

herhangi bir pik gelmediği görülmüştür. Bu durumda 300 °C yakınlarında gelen pikin kesinlikle bozunma piki olduğu anlaşılmıştır (Şekil 40).

4.5. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerinin Mekanik Özellikleri

Kriyojel yapıları EDC/NHS ajanları ile çapraz bağlanarak mekanik dayanımlarının arttırılması hedeflenmiştir. EDC/NHS çapraz bağlayıcıları polisakkarit yapıyı birbirine bağladığı için AÇJ kriyojelleri Si-AÇJ yapısına göre daha fazla çapraz bağlanmıştır. Ancak AÇJ polimeri mekanik olarak nispeten düşük dayanıma sahip olduğu gözlemlendiği için yapı silika molekülleri ile modifiye edilerek Si-AÇJ hibritleri oluşturulmuştur. Yapılan basma testinde EDC/NHS çapraz bağlanma miktarının ve silika molekülleri ile gerçekleşen örgünün kriyojellerdeki mekanik özelliklere olan etkisi incelenmiştir. Üretilen 3B gözenekli kriyojel yapıların mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi için mekanik basma testi gerçekleştirilmiştir. Tablo 9'da mekanik basma testinin sonuçları özetlenmiştir.

Tablo 9
Mekanik Basma Testi

Kriyojeller	Maksimum Basınç Dayanımı (kPa)	Maksimum Basma Gerinimi (%)	Lineer Basma Modülü (kPa)
AÇJ	85,1 ± 0,1	88,7 ± 6,6	6
Si-AÇJ	132,2 ± 0,0	70,0 ± 4,5	200

Test sonuçlarına göre Si-AÇJ kriyojel yapılarında maksimum basınç dayanımının AÇJ yapılarına göre 1,5 kat, lineer basma modülüsünün 33,3 kat artarken, maksimum gerinim değerinin Si-AÇJ de nispeten azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum çekirdek jelinin sahip olduğu lifsi elastik doğanın silika molekülleri ile modifiye edildiğinde elastikiyetini nispeten kaybettiği ancak mekanik dayanımın önemli bir ölçüde iyileştirildiği sonucunu ortaya çıkartmaktadır.

Literatürde AÇJ ile yapılmış 3B yapılar incelendiğinde, AÇJ'nin mekanik dayanım değerlerinin kitosan polimeri ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Kullanılan polimer konsantrasyonuna bağlı olmakla beraber mekanik dayanımın 1,37 ± 0,03 MPa değerine kadar yükseltilebildiği görülmüştür (Izadyari Aghmiuni, Heidari Keshel, ve Sefat, 2020). Birim hacimdeki polimer miktarı, çapraz bağlanma sürecini ve mekanik dayanımı doğrudan etkileyebilecek bir parametredir. Shiroshaki ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ise silika-kitosan hibritleri mekanik testlere tabi tutmuşlardır ve artan silika oranlarıyla birlikte mekanik dayanımın da arttığını ancak belirli bir polimer/silika oranından sonra kırılganlığın

artmasıyla birlikte mekanik dayanımın düştüğü belirtilmiştir (Shirosaki ve diğerleri, 2009). Konuyla ilgili yapılan literatür incelemesine göre kriyojellerin mekanik dayanımları çapraz bağlayıcı miktarı, süresi ve kullanılan silika miktarının oranlarına göre değiştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

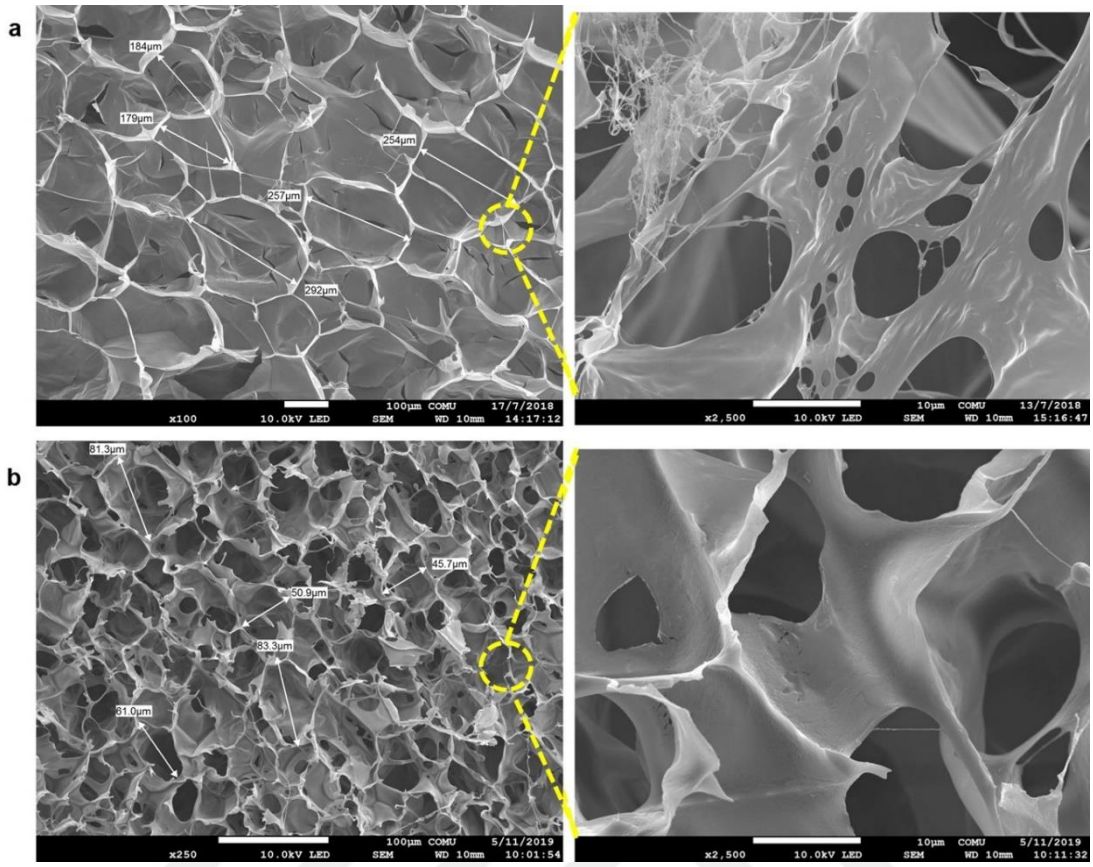
4.6. Kriyojellerinin Gözeneklilik ve Islanabilirlik Özellikleri

Kriyojelin 3B yapısı, gözenekliliği, gözenek boyutu ve gözenek birbirine bağlılığı, malzeme üzerindeki kütle transferi akışını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Gözenekli 3B yapıların geometrik ve uzaysal özellikleri, çözünür besinlerin, hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerinin difüzyon ve adsorpsiyon kinetiklerini doğrudan etkilemektedir ve iskelelere ekilen hücrelerin tutunma, çoğalma ve farklılaşma olaylarını yönlendirmektedir (Lanza, Langer, ve Vacanti, 2013). Bu nedenle oluşturulan 3B kriyojel yapıların kemik nişine benzer nitelikte gözenekli yapıya sahip olması gerekir. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin %gözenekliliği yapılan sıvı değiştirme metodu ile belirlenmiştir. Gözenek boyutu FE-SEM analizi sırasında malzemenin iç kesitindeki por çapları ölçülerek elde edilmiştir. Malzemenin ıslanabilir özellikleri sıvı tutma testi ve temas açısı tensiyometre cihazı ile ölçülerek incelenmiştir. Tablo 10'da ölçümlerden elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

Tablo 10
Kriyojellerin gözeneklilik ve ıslanabilirlik özellikleri

Kriyojeller	Gözeneklilik (%)	Por Çapı (μm)	Sıvı Tutma Kapasitesi (w/w)	Sıvı Emiş Hızı (μL/sn.)
AÇJ	83,4 ± 2,8	233 ± 40	13900 ± 925	20,6 ± 1,3
Si-AÇJ	75,0 ± 1,1	64 ± 15	1380 ± 73	56,0 ± 6,2

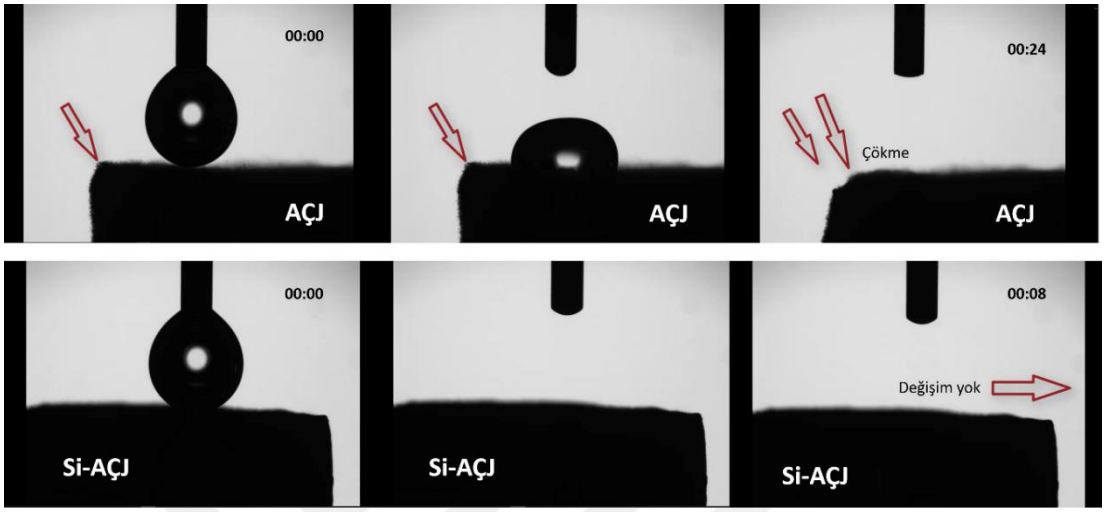
Kriyojellerin gözeneklilikleri incelendiğinde AÇJ yapısının lifsi doğasından dolayı Si-AÇJ kriyojellerinden daha yüksek bir poroziteye sahip olduğu görülmektedir. Ancak KDM uygulamaları için literatür incelendiğinde üretilen 3B malzemelerde %50 ile 90 gözenekliliğin bulunması malzemenin kemik grefti olarak kullanımında ideal olarak belirlenmiştir (Costa-Pinto, Reis, ve Neves, 2011). Por çapları incelendiğinde ise yine gözeneklilik oranlarına benzer şekilde Si-AÇJ yapılarında por çapının bir miktar daraldığı görülmektedir. Şekil 41'de AÇJ ve Si-AÇJ için FE-SEM ile elde edilmiş görüntüler ve ölçülen gözenek çapları verilmiştir.



Şekil 41. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojel yapılarının FE-SEM kesit görünümleri ve por çapları. (a) AÇJ kriyojeli por çapı ve 2500X büyütmedeki görünümü. (b) Si-AÇJ kriyojeli por çapı ve 2500X büyütme altındaki görünümü. (Ölçek çubuğu por çaplarının gösterildiği resimlerde 100 µm'yi; 2500X büyütmenin olduğu resimlerde 10 µm'yi belirtmektedir.)

Malzemelerin sıvı tutma kapasiteleri incelendiğinde ise AÇJ polimerinin tek başına daha çok su tutabildiği gözlemlenmiştir. Şimşek ve ark. AÇJ polimeri ile yaptığı sıvı tutma testi değerleri ile yakın sonuçlar veren AÇJ kriyojelleri silika ile modifiye edildiğinde sıvı tutma kapasitelerinde bir düşme gözlemlenmiştir (Tablo 10). Ancak literatürdeki polimer/silika hibritleri incelendiğinde Si-AÇJ hibrit malzemesinin nispeten yüksek bir sıvı tutma kapasitesinin olduğu görülmektedir. Shirosaki ve ark. kitosan ve silika ile oluşturduğu hibrit yapılar artan silika miktarına bağlı olarak %230 ile %50 arasında sıvı tutma kapasitelerine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Shirosaki ve diğerleri, 2009). Benzer şekilde Pandis ve ark. kitosan-silika hibritleri ile gerçekleştirmiş oldukları şişme testinde 24 saatlik inkübasyon periyodu sonucunda 3B yapıların %1500-2500 (w/w) şişme gösterdiğini belirtmişlerdir (Pandis ve diğerleri, 2014). Literatürdeki değerlere göre KDM çalışmaları için üretilen hibrit Si-AÇJ kriyojellerinin yeterli miktarda sıvı tutma kapasitelerinin olduğu gözlemlenmiştir.

Kriyojellerin ıslanabilirlik özellikleri ayrıca temas açısı ölçüm cihazı ile incelenmiştir. Ancak her iki kriyojel yapısı da 5µL'lik saf suyu 1/5 sn.'nin altında bir hızla emdiği için temas açısı ölçülememiştir. Şekil 42'de temas açısı cihazından elde edilen görüntüler verilmiştir.



Şekil 42. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin temas açısı cihazı ölçüm görüntüleri (kırmızı oklar su damlatılmasıyla beraber kriyolojel yapısındaki değişimleri göstermektedir)

Hidrofilik davranış gösteren kriyojellerin damlatılan sıvıyı emiş hızları hesaplandığında Si-AÇJ'nin AÇJ kriyojelinden yaklaşık 2 kat daha hızlı emildiği görülmektedir (Tablo 10). Bu durum Si-AÇJ kriyojellerinde silika nano partiküllerinin AÇJ polimerinin yüzey pürüzlülüğünü arttırması ve birim süre içinde su moleküllerin etkileşeceği daha çok yüzeyin oluşması ile açıklanabilir.

4.7. Kriyojellerinin Spesifik Yüzey Alanı Ölçümü

Gözenekli kriyojel yapıların özgül yüzey alanı ölçümü BET ve BJH analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11
BET-BJH analiz sonuçları

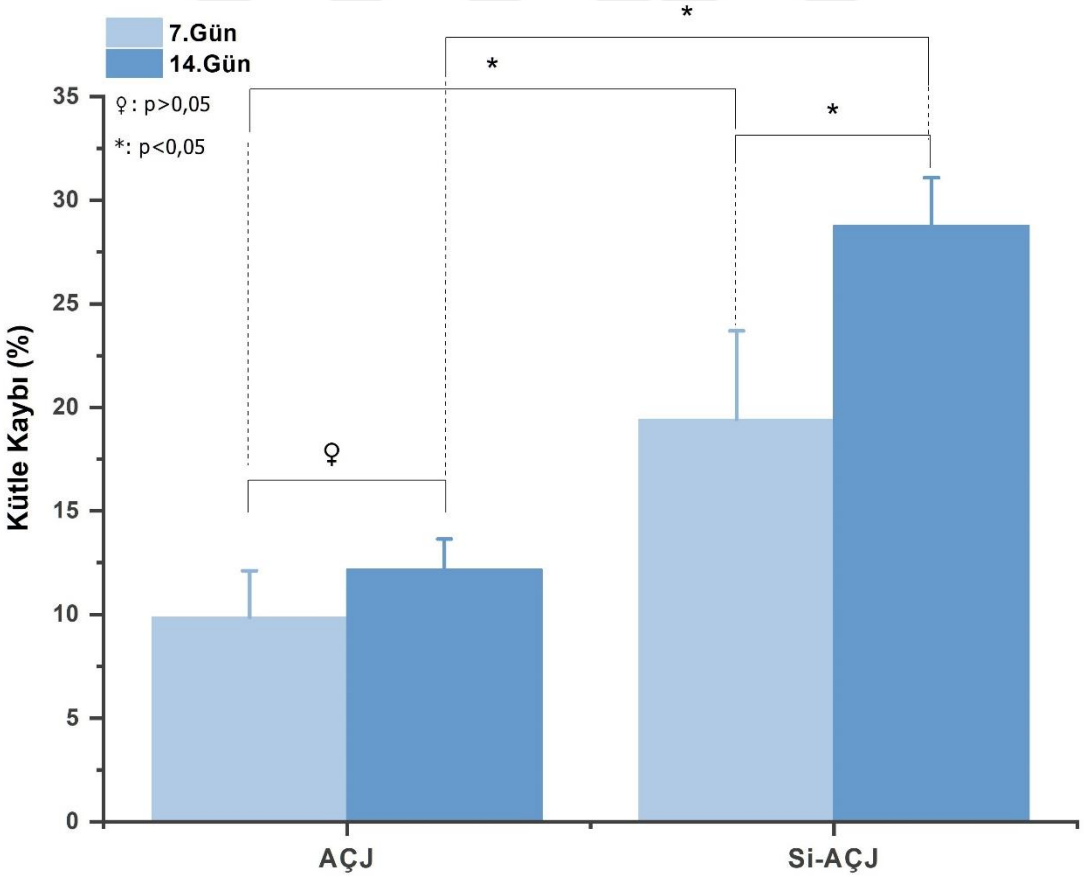
Kriyojeller	BET Yüzey Alanı (m^2/g)	BJH (Barrett-Joyner-Halenda Metodu)		
		Yüzey Alanı (m^2/g)	Por Hacmi (mL/g)	Por Çapı (nm)
AÇJ	0	27,195	0,071	3,4275
Si-AÇJ	249,833	31,712	0,047	1,7234

Analiz sonuçlarına göre Si-AÇJ kriyojelleri, AÇJ kriyojellerine göre 9 kat daha fazla toplam yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir. Silika nano partikülleri AÇJ yüzeyini

homojen bir şekilde kaplayarak yüzey alanını önemli ölçüde arttırmıştır. Bu durum *in vitro* uygulamalarda hücrelerin malzemeye tutunmasını arttıracağını ve pürüzlü yüzeyin malzemenin gerçek HDM yapısının taklit edilmesinde avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. IUPAC sınıflandırmasına göre hem AÇJ hem de Si-AÇJ kriyojelleri mezoporoz yapılar olarak görülmektedir (Alothman, 2012; Brunauer, Emmett, ve Teller, 1938).

4.8. AÇJ ve Si-AÇJ Kriyojellerin Biyobozunurluk Özellikleri

Kemik doku rejenerasyonunda kullanılan biyomateryallerin kemik dokunun oluşmasına paralel olarak yapının bozunması ve bozunma sürecinde herhangi bir toksik yan ürünler oluşturmaması ayrıca bu süreç içinde kemik dokusunda gerekli mukavemeti koruyabilmesi üretilen kemik grefti malzemesinde aranan temel özelliklerdir (Bose, Roy, ve Bandyopadhyay, 2012; K. Kumar, Gill, ve Batra, 2018). Bu nedenle üretilen kriyojellerin lizozim enzimi içeren fizyolojik ortamın simülasyonunu sağlayacak biyobozunurluk testi gerçekleştirilmiştir (Tamburaci ve diğerleri, 2019). Şekil 43'te AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri ile 7 ve14 gün boyunca gerçekleştirilmiş biyobozunurluk testi sonuçları gösterilmiştir.



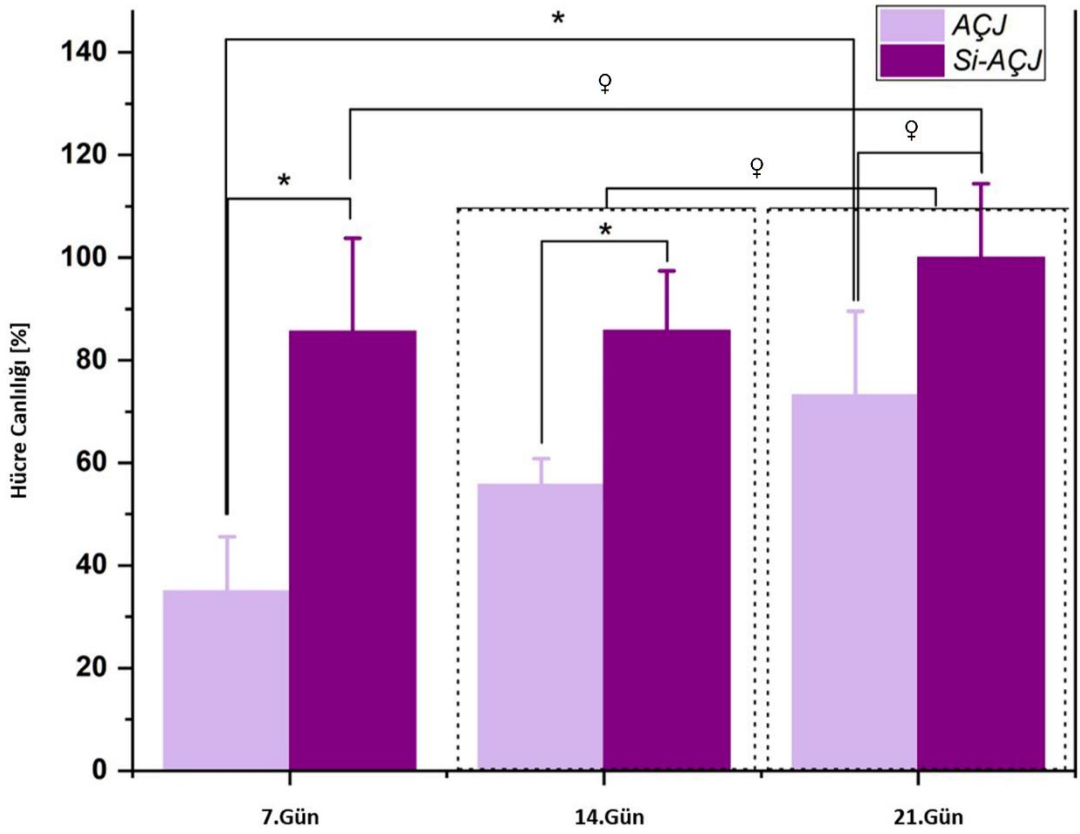
Şekil 43. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin 7 ve 14 günlük periyotta biyobozunurluk değerleri. (*: p<0,05; ♀: p>0,05)

Lizozim içeren (1,5 µg/mL) biyobozunurluk testinin 7. gün sonuçlarına göre toplam kütle kabı AÇJ kriyojellerinde %9,8 ± 2,2 (n=3) iken, Si-AÇJ yapıları %19,4 ± 1,4'lük (n=3) bir kütle kaybına uğramıştır. Benzer durum 14. gün sonuçları içinde gözlemlenmiş olup AÇJ %12,1 ± 4,3 iken Si-AÇJ %28,7 ± 2,3 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak Si-AÇJ yapıları yaklaşık olarak 1,3 kat daha hızlı biyobozunurluk sergilemiştir. Yapılan anova testi sonuçlarına göre, 7.gün ve 14. gün AÇJ ve Si-AÇJ yapıları kendi aralarında istatistiki olarak anlamlı farklılık göstermiştir. Benzer şekilde 7. gün Si-AÇJ bozunma değeri ile 14. gün Si-AÇJ bozunma değeri de yine istatistiki olarak anlamlı farklılık sergilemiştir. Ancak AÇJ kriyojelleri 7. ve 14. günleri arasındaki bozunma değerleri istatistiki olarak bir fark oluşturmamıştır (*p>0,05). Bu durum kriyojeller arasındaki çapraz bağlanma seviyelerindeki farklılıklara bağlanabilir. Si-AÇJ, AÇJ kriyojellerine göre birim hacimde daha az miktarda polisakkarit polimeri içermektedir ve bu nedenle EDC/NHS çapraz bağlayıcı ajanlarda daha az seviyede çapraz bağlanabilmiştir. Ancak Si-AÇJ kriyojellerinde bulunan silika grupları polimer ile polisakkaritler jelin zincirleri arasında bazı bağlar oluşturduğu bilinmesine rağmen (^{29}Si-MAS-NMR spektrumunda görülen Q_2 ve Q_3 bağları) çapraz bağlayıcı ajanlar ile oluşan bağlar kadar sulu ortamda dayanım göstermediği için silika kütlesi zaman içinde PBS tampon çözeltisine dağılmıştır.

Fiziksel stabilite ve biyobozunurluk kemik dokusu rejenerasyonunda kritik öneme sahiptir. 3B iskelenin bozunma kinetiği kontrol edilebilir olmalı ve sonunda yapı içinde yeni kemik oluşumu için bir alan açmalıdır (Bose, Roy, ve Bandyopadhyay, 2012). Kemiğin iyileşme süreci, kırık tipi, kırığın vücuttaki yeri ve kırık boyutu, hasta yaşı ve hastanın tıbbi durumu gibi birçok faktöre bağlıdır (K. Kumar, Gill, ve Batra, 2018). Bu nedenle, iskelenin bozunma kinetiği hedef dokunun rejenerasyon kapasitesine uygun olması gerekir. Yapılan çalışmada, AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin bozunma kinetikleri, 14 günlük simüle fizyolojik koşullar boyunca incelenmiş ve her iki kriyojelin de bozunma kinetiği uzun kemik dokusu rejenerasyonu için uygun bulunmuştur.

4.9. Kriyojellerin *In Vitro* Değerlendirilmesi: Hücre Canlılık Testi

Kriyojellerin biyouyumluluk performansının ve osteobiyolojik özelliklerinin incelenebilmesi için 7, 14 ve 21 günlük setler halinde iAMKH'ler ile hücre kültürü işlemine tabi tutulmuşlardır. Kriyojel üzerindeki hücrelerin canlılıkları 7.,14. ve 21. gün sonunda MTT testleri ile belirlenmiştir. Elde edlen sonuçları şekil 44'te sunulmuştur.



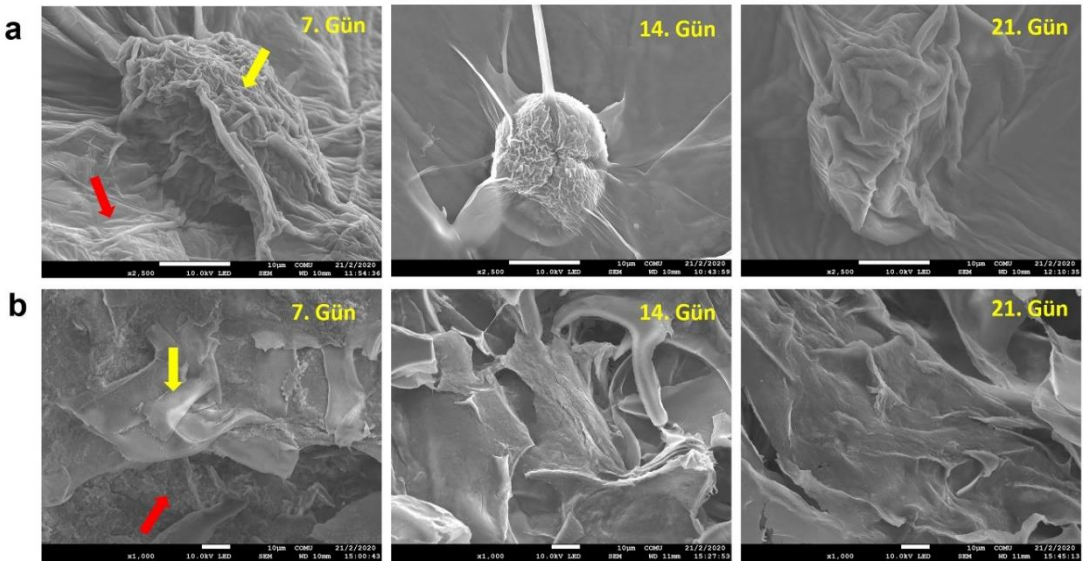
Şekil 44. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinin 7, 14 ve 21 günlük hücre kültürü işleminin sonunda yapılan hücre canlılığı (MTT) testi sonuçları. (*: $p<0,05$; ♀: $p>0,05$)

MTT sonuçları her iki kriyojelin de hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki yaratmadığını göstermektedir aksine, hücreler kriyojeller üzerinde yerleşip ve bölünerek hücre yoğunluğunu arttırdığı anlaşılmıştır. Şekil 44'de de görüldüğü üzere AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri arasında 7. ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı (*$p<0,05$) bir farkın bulunduğu görülmektedir. Grafik genel olarak incelendiğinde ise silika içeren kriyojellerde hücresel aktivitenin daha yüksek olduğu anlaşılacaktır. Kriyojeller arasındaki bu varyasyon AÇJ'nin aşırı hidrofil doğası ile açıklanabilir. AÇJ yapısının yüksek su içeriği hücre-yüzey etkileşimlerini sınırlayabilir (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020) ve kriyojel üzerindeki hücre bağlanma verimliliğini düşürebilir. Buna ilaveten silika nanopartikülleri hücrelerdeki sinyal yolaklarını etkilemiş olabildiği düşünülmektedir, ancak bunu nasıl gerçekleştirmiş olabildiği net olarak bilinmemektedir. 21 günlük periyodun sonunda her iki kriyojel çeşidi de 7. günlerinde verdikleri canlılık değerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde fazla canlılık değeri vermişlerdir. Hücre kültürü periyodunun sonunda (21. gün), her iki kriyojele de yüksek derecede hücre canlılığı gözlemlenmiştir ve kriyojeller arasındaki fark istatistik olarak anlamlı çıkmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca kriyojeller grup olarak incelendiğinde, 14. gün

değerlerinin 21. günden önemli ölçüde bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, her iki kriyojel çeşidinde de hücrelerin bölünme-çoğalma fazından (log fazı) farklılaşma fazına geçiş yaptığını düşündürtmektedir (Schorl ve Sedivy, 2007). Bu durumda osteojenik farklılaşmanın her iki kriyojel yapısı için de 14. gün itibari ile başlamış olabileceği ve Si-AÇJ kriyojelleri üerindeki hücrelerin daha fazla metabolik aktivite sergilediği sonucu çıkarılmaktadır.

4.10. FE-SEM Analizi ve Hücrelerin Kriyojel Yapıları Üzerindeki Morfolojileri

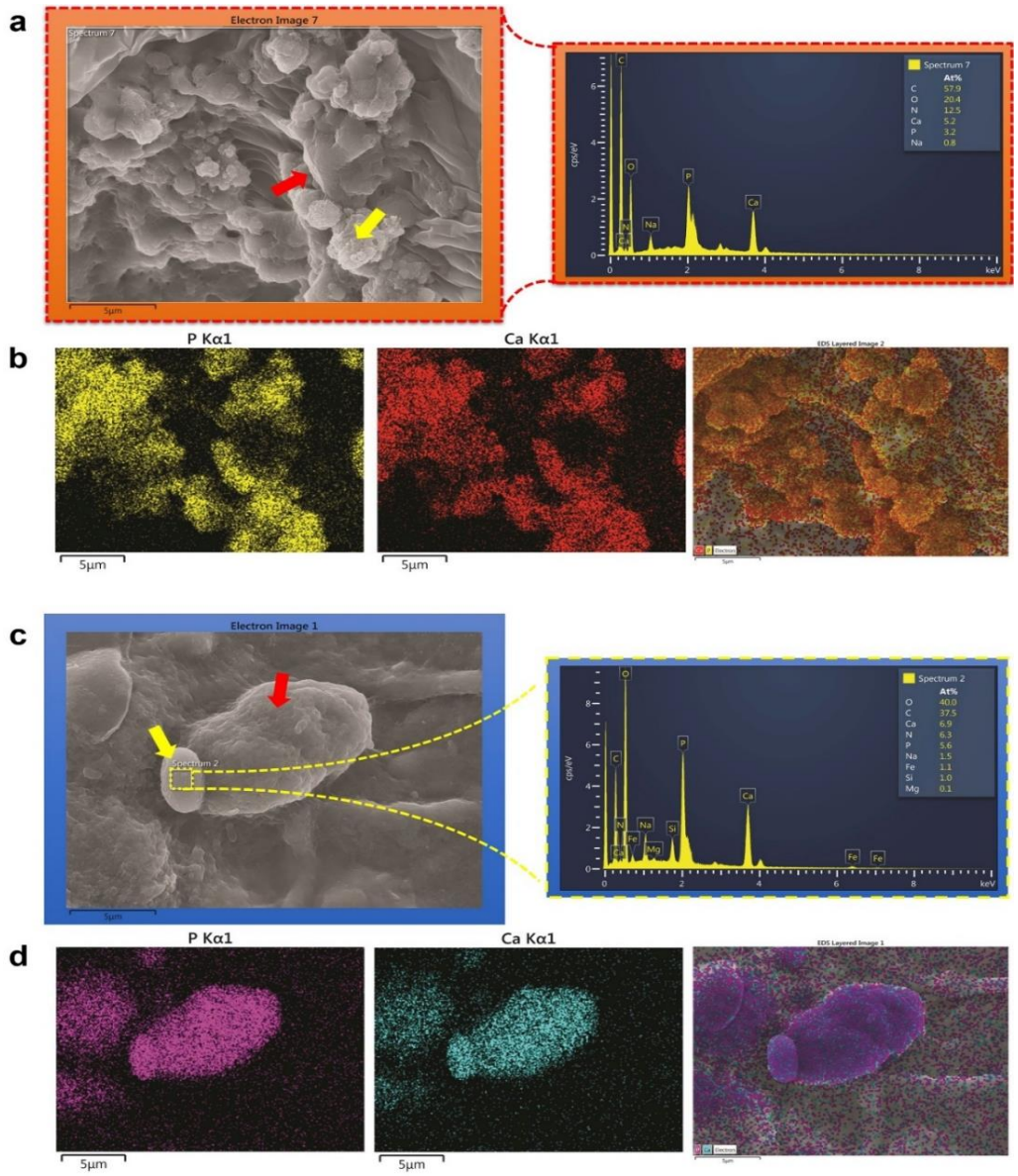
Kriyojellerin 3B mikro yapısı, hücre tutunması, büyümesi ve farklılaşması için bir uzaysal sınır olarak işlev görmüştür. HDM'nin taklit edilmeye çalışıldığı kriyojellerin üzerindeki iAMKH'lerin biyolojik ve morfolojik davranışlarının (tutunma, çoğalma) incelenmesi için FE-SEM, FE-SEM EDX ve elemental haritalama analizi yapılmıştır. Şekil 45'te AÇJ ve Si-AÇJ kriyojelleri üzerindeki iAMKH'lerin 7, 14 ve 21. günlerdeki morfolojileri gösterilmektedir.



Şekil 45. FE-SEM ile çekilmiş iAMKH'lerin 7, 14 ve 21. günlerde kriyojel yapıları üzerindeki morfolojileri. (a) AÇJ kriyojeli üzerindeki hücrelerin 7, 14 ve 21. gündeki görünümleri. (b) Si-AÇJ kriyojeli üzerindeki hücrelerin 7, 14 ve 21. gündeki görünümleri. (Ölçek çubuğu 10 µm'yi göstermektedir. Kırmızı ok hücresel yapıyı, sarı ok matriks yapısını göstermektedir)

FE-SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere AÇJ üzerinde hücreler küresel formda kalırken, Si-AÇJ kriyojeli üzerinde tamamen farklı bir davranış sergileyip kriyojel porlarında yüzeyi örten fibroblast benzeri morfolojide hücre tabakaları oluşturmuştur. Şimşek ve ark. 2020 yılında AÇJ ile yaptıkları çalışmada da iAMKH'ler AÇJ yapısı üzerinde

benzer davranışı göstermiştir (Şimşek, Karaca, ve Arslan, 2020). Kriyojeller arasında gözlemlenen bu hücresel davranış farklılıklarının Si-AÇJ yapılarda silika nanopartikülleri ile artan yüzey pürüzlülüğünün hücrelerin daha iyi tutunmasını ve gerçek kemik dokusuna benzer davranış sergilemelerini sağladığı düşünülmektedir. FE-SEM görüntülerinin yanında hücre ekilmiş kriyojeller 21. günün sonunda EDX analizi ve elemental haritalama işlemleri de gerçekleştirilerek hücrelerin kriyojel üzerindeki osteojenik davranışları incelenmiştir. Şekil 46'da FE-SEM elemental haritalama ve EDX analiz sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 46. Hücre kültürü periyodunun sonunda AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin elemental haritalaması ve FE-SEM EDX analizleri. (a) Hücreli AÇJ kriyojeli yüzeyi ve EDX analizi. (b) Hücreli AÇJ kriyojeli P ve Ca elemental haritası. (c) Hücreli Si-AÇJ kriyojeli yüzeyi ve EDX analizi. (d) Hücreli Si- AÇJ kriyojeli P ve Ca elemental haritası. (Ölçek çubuğu 5 µm'yi göstermektedir. Kırmızı ok osteojenik hücresel yapıları, sarı ok Ca ve P içeren hidroksiapatit benzeri kristal yapıları göstermektedir)

EDX spektrumlarına göre her iki kriyojelde de hücrelerin kendi kemik benzeri HDM bileşenlerini sentezlediği gözlemlenmiştir. EDX analizinde %atomik kütle cinsinden, AÇJ kriyojellerinde Ca ve P atomlarının atomik birikimleri sırasıyla %5,2 ve %3,2 olarak gözlemlenirken Si-AÇJ kriyojellerinde Ca %6,9 ve %5,6'lık P atomu birikimi tespit edilmiştir (Şekil 46 a-c). Ca ve P atomlarının EDX haritalamadaki yerleri incelendiğinde birbiri ile çok yakın veya üst üste konumlanmış olduğu görülmektedir. Bu görünüm iAMKH'lerin hücre dışı ortamda osteojenik farklışama ile birlikte HA kristalleri oluşturmuş olabileceğini göstermektedir.

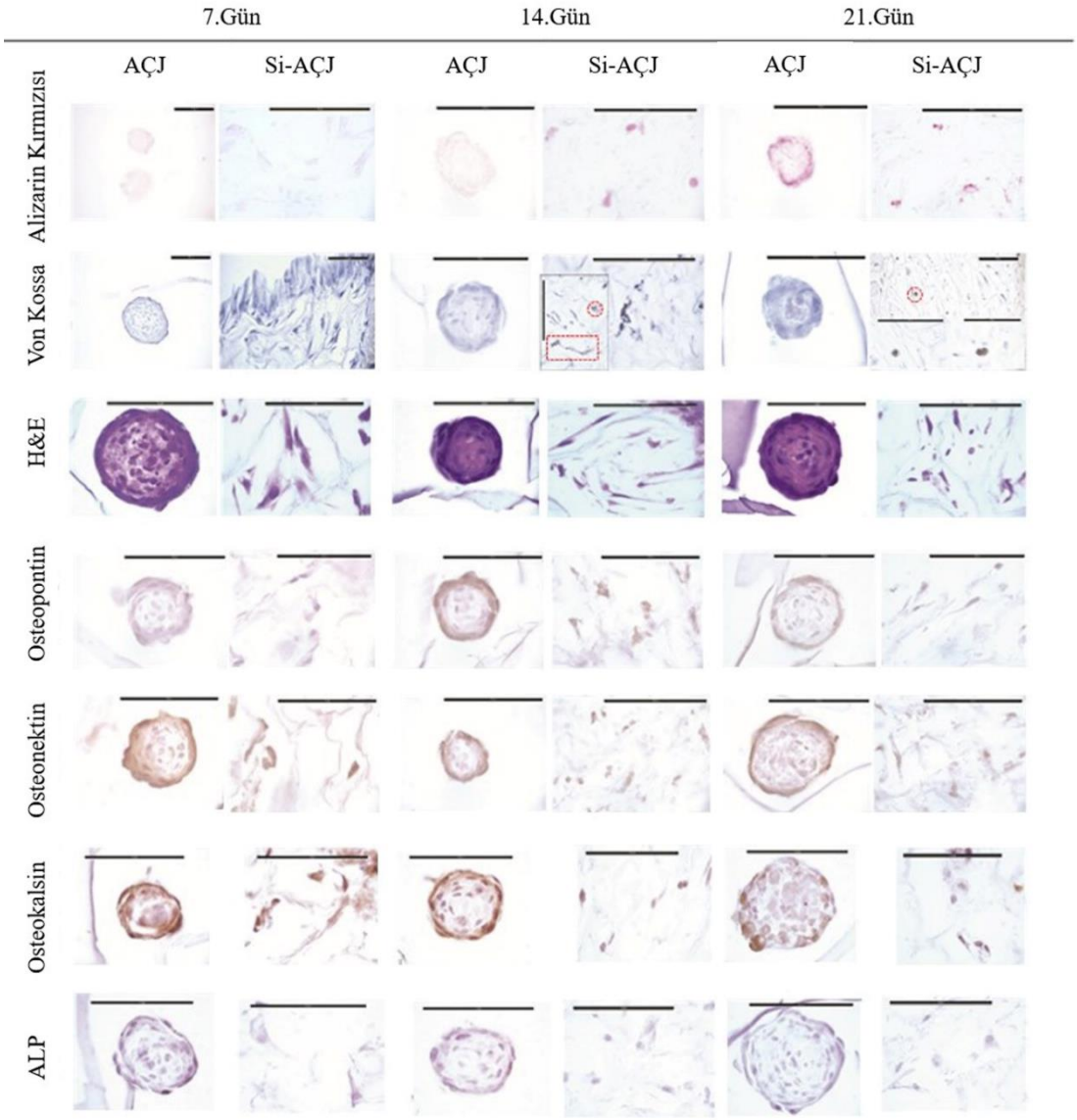
4.11. Osteojenik Farklılaşmanın Takibi: HK ve İHK Boyamalar

Hücrelerin osteojenik farklılaşma ile beraber yüzeylerinde ürettikleri özel protein yapıları o protein yapılarına tutunacak antikor ve antikora bağlı boyar maddeler ile işaretlenerek, osteojenik farklılaşmanın morfolojik olarak tespit edilmesi amacıyla HK ve İHK boyamalar yapılmıştır. Hem AÇJ hem de Si-AÇJ kriyojelindeki hücrelere 7.,14. ve21. gün sonunda yapılan Alizarin Kırmızısı, Von Kossa, H&E, osteopontin, osteonektin, osteokalsin ve ALP boyamaları Şekil 47'de verilmiştir.

Alizarin kırmızısı histokimyasal boyamalarda hücrelerin Ca birikimini ve mineral matriks oluşumunu görüntülemek için kullanılan bir tekniktir (Gregory, Grady Gunn, Peister, ve Prockop, 2004). Alizarin kırmızısı boyama yöntemiyle kriyojellerde 7. günden 21. güne kadar HDM matriksinde mineralizasyonun giderek artış gösterdiği anlaşılmıştır. Genel olarak AÇJ üzerindeki küresel hücre yapılarında alizarin kırmızısı renk şiddeti Si-AÇJ üzerinde homojen şekilde dağılım gösteren hücrelerden daha fazla ifade edilmiştir. 7. gün boyamasında AÇJ ve Si-AÇJ arasında belirli bir fark gözlemlenmezken 14 ve 21. günlerde AÇJ kriyojellerinin daha belirgin olarak boyandığı görülmektedir.

Alizarin boyamasına ek olarak Von Kossa boyaması da yapılmıştır. Von Kossa boyasaması mineralleşmiş matriks üzerindeki fosfat gruplarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Boyanın içerdiği gümüş (Ag) iyonları asidik ortamda fosfat (P) ile reaksiyona girerek gümüş fosfat (Ag_3PO_4) bileşiğini oluşturur. Fotokimyasal bozunma sonucunda Ag_3PO_4 bileşiği gümüş birikintileri oluşturarak fosfat varlığı ispatlanmış olur (Shi ve diğerleri, 2002). Von Kossa boyamasında kalsiyum tuzlarının koyu kahve-siyah rengi boyanırken, hücre çekirdeği ve sitozol mavi renkte görülür. Alizarin boyamasının sonuçlarına paralel şekilde Von-Kossa renk şiddeti de 7. günden 21. güne doğru artış göstermiştir (Şekil 45). Yapılan Von-Kossa boyaması incelendiğinde genel olarak Si-AÇJ kriyojellerindeki hücreler Von-Kossa boyamasında AÇJ kriyojellerindeki hücrelerden daha

erken tarihte ve görece daha yoğun renkte boyanma sergilemiştir. Bu duruma bakılarak Si-AÇJ kriyojellerinde mineralizasyon aşamasına AÇJ kriyojellerine göre daha önce geçildiği ve nispeten daha yoğun olduğu söylenebilir.



Şekil 47. AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerinde osteojenik farklılaşmanın HK ve İHK boyamalar ile incelenmesi (Ölçek çubukları 100 μm'yi göstermektedir.)

H&E boyaması da histoloji de rutin olarak kullanılan bir boyama tekniğidir, hematoksilen alizarin ile benzer şekilde Ca çökeltilerini görüntülemek içinde kullanılır (Lin ve diğerleri, 2014). Bu çalışmada H&E boyaması ile hücrelerin kriyojel üzerinde genel olarak homojen bir dağılım gösterdiği ve Ca birikintileri oluşturduğu (koyu lekeler) gösterilmiştir. Küresel formda kalan AÇJ hücrelerinin bir arada durup, Si-AÇJ hücrelerinin

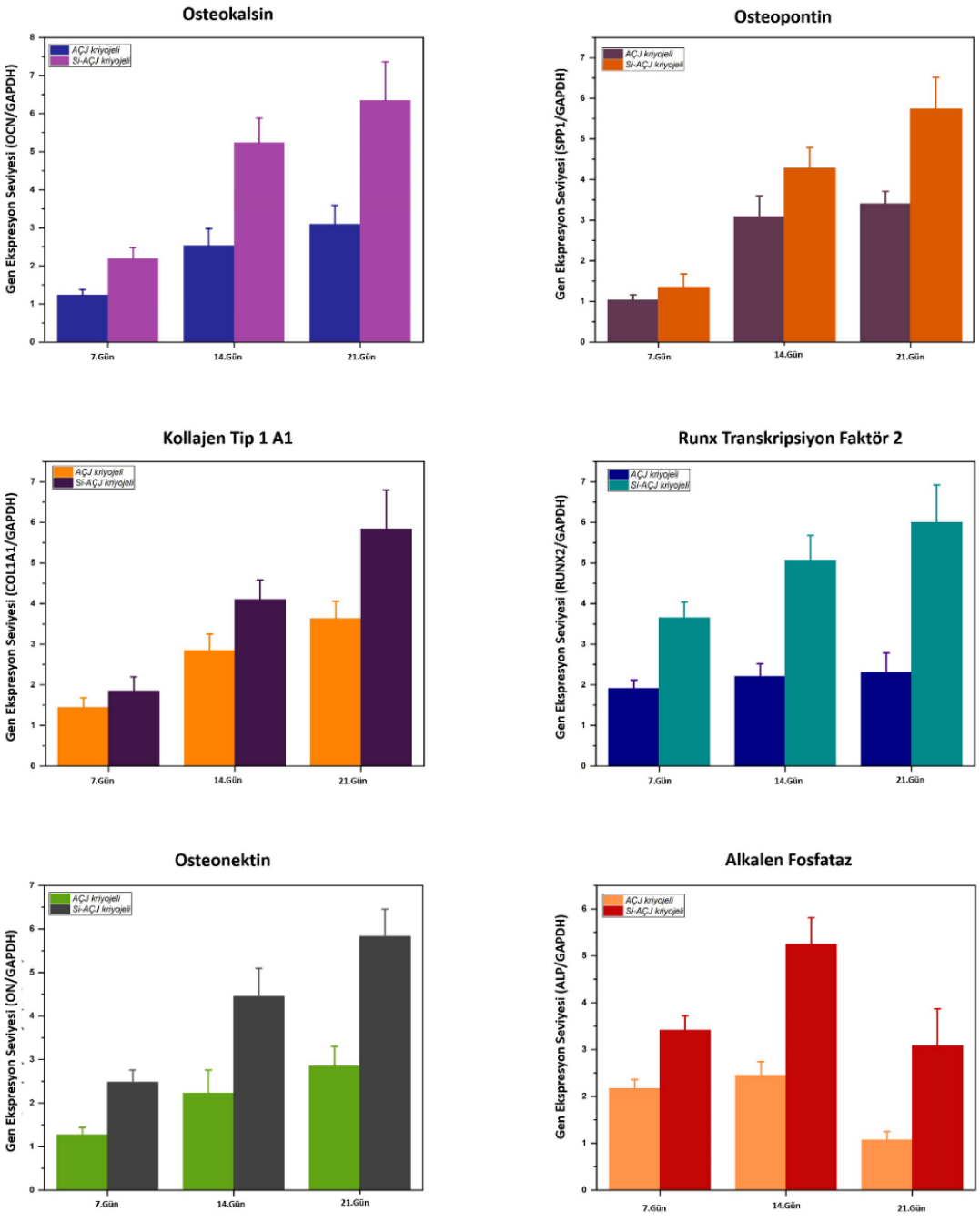
matriks üzerinde dağınık durması nedeniyle elde edilen renk şiddeti AÇJ kriyojellerinde daha yüksektir.

Osteopontin hücrelerin matrikse tutunmalarını ve kemik benzeri morfolojileri almaları için gerekli olan ekstrasellüler matriks proteinidir (Singh, Foster, Dalal, ve Singh, 2010). Yapılan İHK osteopontin boyamasında her iki kriyojel yapıda da ilk hafta düşük seviyede boyanma gözlemlense de 14. günde maksimum seviyede ifade edildiği görülecektir. Osteonektin insanlarda SPARC (sistein bakımından zengin asidik protein salgısı) geni tarafından sentezlenen ve kemik mineralizasyonunda etkili bir proteindir (Jundt, Berghauser, Termine, ve Schulz, 1987). İHK boyama sonuçlarına göre osteonektin ilk hafta (7.gün) yüksek miktarda boyama gösterirken 14 ve 21. günlerde daha az ve benzer bir boyanma şiddeti göstermiştir. Osteokalsin boyaması incelendiğinde ise 7. gün ile beraber sonraki haftalarda dahil olmak üzere her iki kriyojel yapısındaki hücrelerde de yoğun bir şekilde boyanmanın gerçekleştiği görülecektir. Osteonektin ve osteokalsin geç dönem osteoblastik farklılaşma proteinleri olarak bilinmektedir (Calabrese ve diğerleri, 2016; Reddi ve diğerleri, 2018). Ancak yapılan İHK boyama sonuçlarına göre ilginç bir şekilde hücreler kriyojel üzerinde osteonektin ve osteokalsin proteinlerini erken dönemde de üretitikleri görünmektedir (Şekil 47). Bu durum AÇJ ve Si-AÇJ materyalinin osteojenik farklılaşmayı erken dönemlerde tetiklemiş olduğunu düşündürtmektedir. Malzeme kompozisyonundaki hangi etmenlerin erken dönem osteoblastik dönüşüme neden olduğu ileriki çalışmalarda yapılması planlanan detaylı çalışmalar ile anlaşılacağı umulmaktadır.

4.12. Osteogenez ilişkili genlerin ekspresyonu: RT-qPCR Analizi

AÇJ ve Si-AÇJ kriyojellerin osteobiyolojik etkileri üzerlerine ekilen iAMKH'lerin 7, 14 ve 21 günlük hücre kültürü periyodunun sonunda incelenerek analiz edilmiştir. Ekilen hücrelerde osteogenezin takibi için RT-qPCR analizi yapılmıştır. Şekil 48'de OK, OPN, ON, COL1A1, RUNX2 ve ALP genlerinin farkılaşmamış iAMKH'lerdeki gen seviyelerine ve GAPDH seviyelerine göre normalize edilmiş ekspresyon değerleri gösterilmiştir. Gen ifade analizinin sonuçları HK ve İHK boyamalarının sonuçlarına benzer çıkmıştır. Sonuçlar incelendiğinde osteogenez markörleri olan osteokalsin, osteopontin ve osteonektin genlerinin hücre kültürü süreci boyunca yukarı regüle (up-regülasyon) olduğu görülmektedir. Si-AÇJ kriyojelleri, AÇJ ile kıyaslandığında da RUNX2 ve COL1A1 genlerinin daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 48). Ayrıca ilk iki haftalık süreç içindeki (7. ve 14. gün) ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ALP geninin yüksek seviyede ifade edildiği görülürken 21. günde düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu durum ALP'nin erken

dönem osteojenik farklılaşma markörü olması ve osteosit hücrelerinde ifade edilmemesi ile açıklanabilmektedir (Miron ve Zhang, 2012). 21 günlük sürece ilişkin sonuçlar karşılaştırıldığında, genel olarak AÇJ kriyojellerine kıyasla Si-AÇJ kriyojellerinin osteogenez ilişkili genlerinin daha fazla indüklendiği belirlenmiştir. Osteogenez genlerinin ifadesindeki bu farklılığın Si-AÇJ kriyojellerinde hücrelerin matriks ile olan uyumlu ilişkisi, silika nanopartiküllerin ve AÇJ polimerinin hücre rejenerasyonunu tetikleyecek hücre yolaklarını aktif etmiş olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 48. Kriyojellerideki RT-qPCR analizine göre hesaplanan osteokalsin (OK), osteopontin (OPN), osteonektin (ON), kollajen tip 1 A1 (COL1A1), runx transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) ve alkalen fosfataz (ALP) genlerinin ekspresyon seviyeleri

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Uzayan insan ömrü ve yaşlanan nüfus ile birlikte toplumda görülen bazı hastalıkların seyrinde de artış yaşanmaktadır. Klinikte bu durumda en sık karşılaşılan sağlık problemlerinden birisi de kemik doku hasarları ve kemik travmaları olarak belirtilebilir. Dünya genelinde sadece bir yıl içinde ortalama 2 milyon kemik greftleme işlemleri yapılmaktadır ve bu oran gelişmiş ülkelerde her geçen yıl artmaktadır. Klinik olarak kemik rekonstrüksiyon işlemlerinde altın standart "otogreftleme işlemi" olarak kabul görmesine rağmen; hastanın birden fazla kemik ameliyatı geçirme durumu, otograftleme için kullanılabilecek kemik yapısının sınırlı olması, enfeksiyon riski ve hastanın immünojenik yanıt geliştirebilme riskleri gibi dezavantajların bulunması bilim insanlarını yeni ve alternatif çözüm arayışlarına sürüklemiştir.

Doku mühendisliği yaklaşımı bu anlamda klinikte yaşanan sorunlar için alternatif çözüm yolları sunmaktadır. Alanın önde gelen bilim insanlarından Dr. Langer ve Dr. Vacanti'ye göre doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini, dokunun veya tüm organın işlevini geri kazandıran, koruyan veya iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik uygulanan disiplinler arası bir bilim dalı olarak nitelendirilmiştir. Bilim insanları bu yaklaşım çerçevesinde fonksiyonel yapay dokuların oluşturulabilmesi için birçok biyomalzemenin geliştirilmesi üzerine çalışmaktadır. Özellikle kemik doku mühendisliği uygulamaları için pek çok farklı sentetik, doğal veya hibrit kökenli biyomalzeme geliştirilmiştir. Bu malzemelerin bir kısmı klinik olarak kullanılırken bir kısmı *in vitro* veya *in vivo* test aşamasındadır.

Kemik hasarlarında konvansiyonel olarak kullanımda olan materyaller genel olarak metaller, seramikler, sentetik ve doğal biyomalzemelerdir. Metal malzemeler biyobozunur olmadığı için malzemenin çıkartılması için tekrar ameliyat gerektirir ve bazı metal iyonlarının fizyolojik koşullarda korozyon nedeniyle vücut sıvılarına karışarak toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Seramik materyaller genellikle kemik katkı materyali olarak veya metal implantlarda yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılırlar. Osteobiyolojik özellikleri vardır ancak kırılgan nitelikte olduğu için tek başına kullanım alanı sınırlıdır. Sentetik biyomateryaller genel olarak fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerinin kolay manupülasyonunu sağlaması açısından avantajlı bulunurken, doğal biyomateryaller ile karşılaştırıldığında daha az biyouyumluk ve daha düşük biyoaktivite gösterir. Doğal biyomalzemerin kemik doku greftlerinde kullanımı son zamanlarda sıkça çalışılan bir konu başlığı olmuştur. Çünkü hücrelerin kemik doku tamiri için biyolojik olarak aktif ve doğal

matriks ortamını taklit eden yapılarda daha yüksek bir rejenerasyon performansı sergilendiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır.

Diğer bir yandan doğal biyomalzemelerin ve inorganik materyallerin bir arada kullanıldığı hibrit biyomalzemeler, organik ve inorganik bileşenlerin avantajlarını beraber yapısında bulundurabilmesinden dolayı yeni nesil malzemelerin geliştirilmesinde tercih edilen bir yaklaşımdır. Hibrit malzemelerin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı doğal polimerlerin sunduğu esneklik ve kolay işlenebilir özelliklerinin, inorganik materyalinin sağladığı yüksek mekanik ve termal dayanım özellikleri ile birlikte değerlendirilmesini sağlar.

Yapılan tez çalışmasında doğal polimer olan ayva çekirdeğinin jeli, memeli hücre dışı matriksine benzer fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin bulunması nedeniyle kemik doku rejenerasyonu için kullanılabilecek yeni bir doğal biyomateryal olarak düşünülmüştür. Malzemenin doğadan kolay ve ucuz yöntemlerle temin edilmesi, sürdürülebilir bir hammadde kaynağı olması, biyolojik olarak insan hücrelerinde immün tepki oluşturmaması ve hücresel yenilenmede uyarıcı etkilere sahip olması gibi avantajları bulunan AÇJ polimeri, biyomedikal malzemelerin geliştirilmesi için değerli bir alternatif olarak görülmektedir. Bu çalışmada, kemiğin doğal mikro ortamını taklit etmek için mikrodalga destekli sol-jel reaksiyonu kullanarak AÇJ polimeri ile silika nanopartiküllerini birleştiren hibrit 3B kriyojeller üretmeyi hedeflenmiştir. Üretilen kriyojeller fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik olarak test edilmiştir. Malzemenin karakterizasyonu için reolojik ölçüm analizleri, ATR-FTIR, ^{29}Si-MAS-NMR, XRD, TGA, DSC, mekanik basma testi, porozite ve sıvı tutma testleri, FE-SEM görüntüleme ve EDX analizi, BET-BJH analizi, temas açısı analizi, biyobozunurluk testi, hücre kültürü ve hücre canlılığı testi, HK ve İHK boyamaları ve gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. Genel olarak silika molekülleri ile modifiye edilen kriyojellerinin uygun hidrofilik davranıştaki gözenekli yapısı, artan mekanik dayanımı ve spesifik yüzey alanı sayesinde üzerine ekilen hücrelerin tutunma ve çoğalma oranı AÇJ malzemesine göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, Si-AÇJ kriyojellerinin osteobiyolojik özellikleri incelendiğinde, tek başına AÇJ malzemesinin kullanıldığı duruma kıyasla, daha yüksek bir oranda osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiği görülmüştür.

Si-AÇJ hibrit kriyojellerinin fizyolojik ortamdaki performansının belirlenmesi ve klinikte kullanımının önünün açılabilmesi için ileride *in vivo* testlerin de yapılması, malzemenin kemik dokusundaki onarım yeteneklerinin ardında yatan mekanizmaların tam olarak anlaşılması için çok yardımcı olacaktır. Sonuç olarak, geliştirilen 3B Si-AÇJ hibrit materyalinin kemik doku tamirinde kullanımının uygun olduğunu, malzemenin

geliştirilmeye açık olduğunu ve bu çalışmanın kemik doku mühendisliği stratejilerine yönelik yeni araştırmalara öncülük edeceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

Abbastabar, B., Azizi, M. H., Adnani, A., ve Abbasi, S. (2015). Determining and modeling rheological characteristics of quince seed gum. *Food Hydrocolloids*, *43*, 259–264. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.026

Agnarsson, I., Kuntner, M., ve Blackledge, T. A. (2010). Bioprospecting Finds the Toughest Biological Material: Extraordinary Silk from a Giant Riverine Orb Spider. *PLoS ONE*, *5*(9), e11234. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011234

Ahn, S., Chantre, C. O., Gannon, A. R., Lind, J. U., Campbell, P. H., Grevesse, T., O'Connor, B. B., ve Parker, K. K. (2018). Soy Protein/Cellulose Nanofiber Scaffolds Mimicking Skin Extracellular Matrix for Enhanced Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(9), 1701175. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adhm.201701175

Ahn, S. H., Lee, H. J., ve Kim, G. H. (2011). Polycaprolactone Scaffolds Fabricated with an Advanced Electrohydrodynamic Direct-Printing Method for Bone Tissue Regeneration. *Biomacromolecules*, *12*(12), 4256–4263. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/bm201126j

Alizadeh, H., Rahnema, M., Semnani, S. N., ve Ajalli, M. (2014). Synergistic antifungal effects of quince leaf's extracts and silver nanoparticles on Aspergillus niger. *Journal of Applied Biological Sciences*, *8*(3), 10–13. Erişim adresi: http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/407

Alizadeh, H., Rahnema, M., Semnani, S. N., ve Hajizadeh, N. (2013). Detection of Compounds and Antibacterial Effect of Quince (Cydonia oblonga Miller) Extracts in vitro and in vivo. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, *3*(5–6), 303–309. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/22311866.2013.817731

Alothman, Z. (2012). A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials*, *5*(12), 2874–2902. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/ma5122874

Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Gallardo-Rivera, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramirez, J., ve Pérez-Alonso, C. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (Tamarindus indica L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, *209*, 68–75. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.021

Alvarez, K., ve Nakajima, H. (2009). Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*, *2*(3), 790–832. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/ma2030790

Amini, Ami R., Laurencin, Cato T., Nukavarapu, S. P. (2013). Bone Tissue Engineering:

Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, *40*(5), 363–408. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766369/#

An, S. Y., Shim, I.-B., ve Kim, C. S. (2005). Easy synthesis and characterization of γ-Fe2O3 nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Applied Physics*, *97*(10), 10Q909. Erişim adresi: https://doi.org/10.1063/1.1851919

Archana, G., Sabina, K., Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Fayidh, M. A., Babu, P. A. S., Sivarajan, M., ve Sukumar, M. (2013). Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 89–94. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.062

Arnander, C., Westermark, A., Veltheim, R., Docherty-Skogh, A.-C., Hilborn, J., ve Engstrand, T. (2006). Three-Dimensional Technology and Bone Morphogenetic Protein in Frontal Bone Reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*, *17*(2), 275–279. Erişim adresi: https://doi.org/10.1097/00001665-200603000-00013

Arora, M., ve Arora, E. (2017). The Promise of Silicon: bone regeneration and increased bone density. *Journal of Arthroscopy and Joint Surgery*, *4*(3), 103–105. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jajs.2017.10.003

Arslan, Y. E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., Emregul, E., ve Emregul, K. C. (2017). Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *154*, 160–170. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.034

Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A., ve Bukhari, S. N. A. (2016a). Cydonia oblonga M., A Medicinal Plant Rich in Phytonutrients for Pharmaceuticals. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(February), 87–99. Erişim adresi: https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00163

Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A., ve Bukhari, S. N. A. (2016b). Cydonia oblonga M., A Medicinal Plant Rich in Phytonutrients for Pharmaceuticals. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(JUN), 1–20. Erişim adresi: https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00163

Ayotte, Steven, Velez, J. (2016). Bioglass Surface Reaction. Erişim adresi: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bioglass_Surface_Reaction.jpg

Barati, D., Karaman, O., Moeinzadeh, S., Kader, S., ve Jabbari, E. (2019). Material and regenerative properties of an osteon-mimetic cortical bone-like scaffold. *Regenerative Biomaterials*, *6*(2), 89–98. Erişim adresi: https://doi.org/10.1093/rb/rbz008

Bellido, T., Plotkin, L. I., ve Bruzzaniti, A. (2019). Basic and Applied Bone Biology. Içinde *Basic and Applied Bone Biology* (ss. 37–55). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00003-8

Boccardi, E., Liverani, L., ve Boccaccini, A. R. (2019). Bioactive behavior of mesoporous silica particle (MCM-41) coated bioactive glass-based scaffolds. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, *16*(5), 1753–1761. Erişim adresi: https://doi.org/10.1111/ijac.13245

Bohner, M. (2010). Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today*, *13*(1–2), 24–30. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70014-6

Bose, S., Roy, M., ve Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, *30*(10), 546–554. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005

Brunauer, S., Emmett, P. H., ve Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, *60*(2), 309–319. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/ja01269a023

Burr, D. B., ve Allen, M. R. (2013). Basic and Applied Bone Biology. Içinde *Basic and Applied Bone Biology*. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/C2011-0-05817-9

Buttafoco, L., Kolkman, N. G., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A. A., Dijkstra, P. J., Vermes, I., ve Feijen, J. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, *27*(5), 724–734. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.024

Calabrese, G., Giuffrida, R., Forte, S., Salvatorelli, L., Fabbi, C., Figallo, E., Gulisano, M., Parenti, R., Magro, G., Colarossi, C., Memeo, L., ve Gulino, R. (2016). Bone augmentation after ectopic implantation of a cell-free collagen-hydroxyapatite scaffold in the mouse. *Scientific Reports*, *6*(1), 36399. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/srep36399

Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., Lattanzi, W., ve Logroscino, G. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *25*(10), 2445–2461. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2

Can, A. (2013). *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Klinik Kullanımı*. Erişim adresi: http://www.alpcan.com/index.php?option=com_content&view=article&id=121&Itemid=205

Carlisle, E. M. (1972). Silicon: An Essential Element for Chick. *Science*, *178*(4061), 619–

621. Erişim adresi: https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1982.tb05313.x

Chen, Y., Chen, H., ve Shi, J. (2013). In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Advanced Materials*, *25*(23), 3144–3176. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adma.201205292

Ciriminna, R., Fidalgo, A., Pandarus, V., Béland, F., Ilharco, L. M., ve Pagliaro, M. (2013). The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chemical Reviews*, *113*(8), 6592–6620. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/cr300399c

Collins, M. N., ve Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1262–1279. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028

Copello, G. J., Villanueva, M. E., González, J. A., López Egües, S., ve Diaz, L. E. (2014). TEOS as an improved alternative for chitosan beads cross-linking: A comparative adsorption study. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(21), 1–8. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/app.41005

Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., ve Neves, N. M. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: The role of chitosan. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *17*(5), 331–347. Erişim adresi: https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0704

Croisier, F., ve Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, *49*(4), 780–792. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009

Cui, N., Qian, J., Liu, T., Zhao, N., ve Wang, H. (2015). Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *126*, 192–198. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.013

D.G.Steele, C. A. B. (1988). *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*. *3*(2), 54–67. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/ajpa.1330820214

Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., ve Ma, P. X. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone Research*, *6*(1), 25. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/s41413-018-0025-8

Das, K., Balla, V. K., Bandyopadhyay, A., ve Bose, S. (2008). Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants. *Scripta Materialia*, *59*(8), 822–825. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2008.06.018

David, A., Day, J., ve Shikanov, A. (2016). Immunoisolation to prevent tissue graft rejection:

Current knowledge and future use. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(9), 955–961. Erişim adresi: https://doi.org/10.1177/1535370216647129

de Alvarenga Pinto Cotrim, M., Mottin, A. C., ve Ayres, E. (2016). Preparation and Characterization of Okra Mucilage (Abelmoschus esculentus) Edible Films. *Macromolecular Symposia*, *367*(1), 90–100. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/masy.201600019

Delloye, C., Cornu, O., Druez, V., ve Barbier, O. (2007). Bone allografts. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, *89-B*(5), 574–580. Erişim adresi: https://doi.org/10.1302/0301-620X.89B5.19039

DelSiTech Ltd. (2020). DelSiTech. Erişim adresi: http://www.delsitech.com/company-profile/

Derkus, B., Arslan, Y. E., Bayrac, A. T., Kantarcioglu, I., Emregul, K. C., ve Emregul, E. (2016). Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *228*, 725–736. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.095

Djambaski, P., Aleksieva, P., Emanuilova, E., Chernev, G., Spasova, D., Nacheva, L., Kabaivanova, L., Salvado, I. M. M., ve Samuneva, B. (2009). Sol-Gel Nanomaterials with Algal Heteropolysaccharide for Immobilization of Microbial Cells, Producing A-Galactosidase and Nitrilase. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *23*(2), 1270–1274. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817652

Dorati, R., DeTrizio, A., Modena, T., Conti, B., Benazzo, F., Gastaldi, G., ve Genta, I. (2017). Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. *Pharmaceuticals*, *10*(4), 96. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/ph10040096

Duke, J. A. (1990). CRC Handbook of Medicinal Herbs. *International Clinical Psychopharmacology*, *5*(1), 74. Erişim adresi: https://doi.org/10.1097/00004850-199001000-00014

Ehlert, N., Mueller, P. P., Stieve, M., Lenarz, T., ve Behrens, P. (2013). Mesoporous silica films as a novel biomaterial: applications in the middle ear. *Chemical Society Reviews*, *42*(9), 3847. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/c3cs35359a

Eivazzadeh-Keihan, R., Chenab, K. K., Taheri-Ledari, R., Mosafer, J., Hashemi, S. M., Mokhtarzadeh, A., Maleki, A., ve Hamblin, M. R. (2020). Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering.

Materials Science and Engineering C, *107*, 110267. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110267

Erten, E., ve Arslan, Y. E. (2018). Cell Biology and Translational Medicine. Içinde *Advances in Experimental Medicine and Biology* (C. 1119, ss. 21–39). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/5584_2018_231

Erten, E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., ve Arslan, Y. E. (2016). Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. *RSC Advances*, *6*(96), 94236–94246. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C6RA16647D

Feng, J., Yan, W., Gou, Z., Weng, W., ve Yang, D. (2007). Stimulating effect of silica-containing nanospheres on proliferation of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *18*(11), 2167–2172. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10856-007-3229-9

Gamelas, J. A. F., Evtyugina, M. G., Portugal, I., ve Evtuguin, D. V. (2012). New polyoxometalate-functionalized cellulosic fibre/silica hybrids for environmental applications. *RSC Adv.*, *2*(3), 831–839. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C1RA00371B

Garreta, E., Gasset, D., Semino, C., ve Borrós, S. (2007). Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone. *Biomolecular Engineering*, *24*(1 SPEC. ISS.), 75–80. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.017

Gershlak, J. R., Hernandez, S., Fontana, G., Perreault, L. R., Hansen, K. J., Larson, S. A., Binder, B. Y. K., Dolivo, D. M., Yang, T., Dominko, T., Rolle, M. W., Weathers, P. J., Medina-Bolivar, F., Cramer, C. L., Murphy, W. L., ve Gaudette, G. R. (2017). Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, *125*, 13–22. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.011

Ghafourian, M., Tamri, P., ve Hemmati, A. (2015). Enhancement of Human Skin Fibroblasts Proliferation as a Result of Treating With Quince Seed Mucilage. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, *10*(1), 10–13. Erişim adresi: https://doi.org/10.17795/jjnpp-18820

Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., ve Moradi, A. (2018). Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Archives of Bone and Joint Surgery*, *6*(2), 90–99. Erişim adresi: https://doi.org/10.22038/ABJS.2018.26340.1713

Gomes, A. P., Mano, J. F., Queiroz, J. A., ve Gouveia, I. C. (2015). Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications. *Carbohydrate Polymers*, *127*, 451–461. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.089

Goodman, S. B., Ma, T., Chiu, R., Ramachandran, R., ve Lane Smith, R. (2006). Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells. *Biomaterials*, *27*(36), 6096–6101. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.023

Graham, T. (1877). On the Properties of Silicic Acid and other Analogous Collaidal Substances. *Journal of the Chemical Society*, *32*(318), P001. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/js87732fp001

Granito, R. N., Custódio, M. R., ve Rennó, A. C. M. (2017). Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *105*(6), 1717–1727. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jbm.b.33706

Gregory, C. A., Grady Gunn, W., Peister, A., ve Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, *329*(1), 77–84. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002

Gümüşderelioğlu, M., ve Aday, S. (2011). Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydrate Research*, *346*(5), 606–613. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.007

Gupta, R., ve Kumar, A. (2008). Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology. *Biomedical Materials*, *3*(3), 034005. Erişim adresi: https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034005

Ha, S.-W., Weitzmann, M. N., ve Beck, G. R. (2013). Applications of silica-based nanomaterials in dental and skeletal biology. Içinde *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (ss. 69–91). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3127-5.00004-0

Ha, S. W., Viggeswarapu, M., Habib, M. M., ve Beck, G. R. (2018). Bioactive effects of silica nanoparticles on bone cells are size, surface, and composition dependent. *Acta Biomaterialia*, *82*, 184–196. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.018

Haddow, D. B., James, P. F., ve Van Noort, R. (1996). Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*,

7(5), 255–260. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/BF00058562

Hajji, P., David, L., Gerard, J. F., Pascault, J. P., ve Vigier, G. (1999). Synthesis, structure, and morphology of polymer–silica hybrid nanocomposites based on hydroxyethyl methacrylate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *37*(22), 3172–3187. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(19991115)37:22<3172::AID-POLB2>3.3.CO;2-I

Hemmati, A. A., Kalantari, H., Jalali, A., Rezai, S., ve Zadeh, H. H. (2012). Healing effect of quince seed mucilage on T-2 toxin-induced dermal toxicity in rabbit. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *64*(3), 181–186. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.004

Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *17*(11), 967–978. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z

Hosseinzadeh, H., ve Mohammadi, S. (2015). Quince seed mucilage magnetic nanocomposites as novel bioadsorbents for efficient removal of cationic dyes from aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, *134*, 213–221. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.008

Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T., ve Tahir, M. N. (2019). Quince Seed Mucilage: A Stimuli-Responsive/Smart Biopolymer. Içinde *Functional Biopolymers, Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series* (ss. 127–148). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95990-0_19

Iravani, S., ve Varma, R. S. (2019). Plants and plant-based polymers as scaffolds for tissue engineering. *Green Chemistry*, *21*(18), 4839–4867. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/c9gc02391g

Izadyari Aghmiuni, A., Heidari Keshel, S., ve Sefat, F. (2020). Quince seed mucilage-based scaffold as a smart biological substrate to mimic mechanobiological behavior of skin and promote fibroblasts proliferation and h-ASCs differentiation into keratinocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *142*, 668–679. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.008

Izadyari Aghmiuni, A., Heidari Keshel, S., Sefat, F., ve Akbarzadeh Khiyavi, A. (2020). Quince seed mucilage-based scaffold as a smart biological substrate to mimic mechanobiological behavior of skin and promote fibroblasts proliferation and h-ASCs differentiation into keratinocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *142*, 668–679. Erişim adresi:

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.008

Janbaz, K. H., Shabbir, A., Mehmood, M. H., ve Gilani, A. H. (2013). Insight into mechanism underlying the medicinal use of Cydonia oblonga in gut and airways disorders. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *23*(1), 330–336. Erişim adresi: https://ecommons.aku.edu/pakistan_fhs_mc_bbs/184/

Jeong Park, Y., Moo Lee, Y., Nae Park, S., Yoon Sheen, S., Pyoung Chung, C., ve Lee, S. J. (2000). Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, *21*(2), 153–159. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00143-X

Ji, C., Annabi, N., Khademhosseini, A., ve Dehghani, F. (2011). Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO2. *Acta Biomaterialia*, *7*(4), 1653–1664. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.043

Ji, D., Song, H., Chen, B., Zhang, F., Cheney, A. R., Zhang, N., Zeng, X., Atkinson, J. D., Zhou, C., Cartwright, A. N., ve Gan, Q. (2017). Frozen "Tofu" Effect: Engineered Pores of Hydrophilic Nanoporous Materials. *ACS Omega*, *2*(8), 4838–4844. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00901

Jiang, Y., Wang, W., Li, X., Wang, X., Zhou, J., ve Mu, X. (2013). Enzyme-Mimetic Catalyst-Modified Nanoporous SiO 2 –Cellulose Hybrid Composites with High Specific Surface Area for Rapid H 2 O 2 Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *5*(6), 1913–1916. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/am400253d

Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., ve Koocheki, A. (2014a). Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 537–546. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.077

Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., ve Koocheki, A. (2014b). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 537–546. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.077

Jugdaohsingh, R. (2007). *Silicon and Bone Health*. *11*(2), 99–110. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658806/

Jundt, G., Berghauser, K.-H., Termine, J. D., ve Schulz, A. (1987). Osteonectin a differentiation marker of bone cells. *Cell and Tissue Research*, *248*(2), 409–415. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/BF00218209

Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Kozlowska, J., ve Osyczka, A. M. (2018). New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*(PartA), 247–253. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.173

Kakkar, P., ve Madhan, B. (2016). Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, *66*, 178–184. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.067

Kang, K. S., Hong, J. M., Kang, J. A., Rhie, J.-W., Jeong, Y. H., ve Cho, D.-W. (2013). Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Experimental & Molecular Medicine*, *45*(1), e6–e6. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/emm.2013.11

Kao, S. T., ve Scott, D. D. (2007). A Review of Bone Substitutes. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *19*(4), 513–521. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.coms.2007.06.002

Kashirina, A., Yao, Y., Liu, Y., ve Leng, J. (2019). Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomaterials Science*, *7*(10), 3961–3983. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C9BM00664H

Khan, F., ve Ahmad, S. R. (2013). Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. *Macromolecular Bioscience*, *13*(4), 395–421. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/mabi.201200409

Kim, H. D., Lee, E. A., An, Y.-H., Kim, S. L., Lee, S. S., Yu, S. J., Jang, H. L., Nam, K. T., Im, S. G., ve Hwang, N. S. (2017). Chondroitin Sulfate-Based Biomineralizing Surface Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *9*(26), 21639–21650. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/acsami.7b04114

Kim, S.-H., Lee, H. R., Yu, S. J., Han, M.-E., Lee, D. Y., Kim, S. Y., Ahn, H.-J., Han, M.-J., Lee, T.-I., Kim, T.-S., Kwon, S. K., Im, S. G., ve Hwang, N. S. (2015). Hydrogel-laden paper scaffold system for origami-based tissue engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(50), 15426–15431. Erişim adresi: https://doi.org/10.1073/pnas.1504745112

Kim, U. J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M., ve Kaplan, D. L. (2005). Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*, *26*(15), 2775–2785. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.044

Kistler, S. S. (1931). Coherent Expanded Aerogels and Jellies. *Nature*, *127*(3211), 741–741.

Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/127741a0

Knippenberg, M., Helder, M. N., de Blieck-Hogervorst, J. M. A., Wuisman, P. I. J. M., ve Klein-Nulend, J. (2007). Prostaglandins Differentially Affect Osteogenic Differentiation of Human Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering*, *13*(10), 2495–2503. Erişim adresi: https://doi.org/10.1089/ten.2006.0420

Koob, S., Torio-Padron, N., Stark, G. B., Hannig, C., Stankovic, Z., ve Finkenzeller, G. (2011). Bone Formation and Neovascularization Mediated by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells in Critical-Sized Calvarial Defects. *Tissue Engineering Part A*, *17*(3–4), 311–321. Erişim adresi: https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0338

Krishnakumar, G. S., Gostynska, N., Campodoni, E., Dapporto, M., Montesi, M., Panseri, S., Tampieri, A., Kon, E., Marcacci, M., Sprio, S., ve Sandri, M. (2017). Ribose mediated crosslinking of collagen-hydroxyapatite hybrid scaffolds for bone tissue regeneration using biomimetic strategies. *Materials Science and Engineering: C*, *77*, 594–605. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.255

Kumar, A., Srivastava, A., ve Jain, E. (2010). Biomaterial Applications. Içinde B. Basu, D. S. Katti, & A. Kumar (Ed.), *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications* (ss. 533–550). Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/9780470891315.ch15

Kumar, K., Gill, R. S., ve Batra, U. (2018). Challenges and opportunities for biodegradable magnesium alloy implants. *Materials Technology*, *33*(2), 153–172. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/10667857.2017.1377973

Langer, R, ve Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, *260*(5110), 920–926. Erişim adresi: https://doi.org/10.1126/science.8493529

Langer, Robert, ve Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, *51*(1), 8–12. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022

Lanza, R., Langer, R., ve Vacanti, J. P. (2013). Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. Içinde *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/C2011-0-07193-4

Lee, K. Y., ve Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(1), 106–126. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

Lee, S.-H., ve Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *59*(4–5),

339–359. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.016

Lei, Q., Guo, J., Noureddine, A., Wang, A., Wuttke, S., Brinker, C. J., ve Zhu, W. (2020). Sol-Gel-Based Advanced Porous Silica Materials for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, *1909539*, 1909539. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adfm.201909539

Li, Z., Gu, X., Lou, S., ve Zheng, Y. (2008). The development of binary Mg–Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials*, *29*(10), 1329–1344. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.021

Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P., ve Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*, *42*(6), 569–573. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.033

Lin, C.-Y., Chang, Y.-H., Sung, L.-Y., Chen, C.-L., Lin, S.-Y., Li, K.-C., Yen, T.-C., Lin, K.-J., ve Hu, Y.-C. (2014). Long-Term Tracking of Segmental Bone Healing Mediated by Genetically Engineered Adipose-Derived Stem Cells: Focuses on Bone Remodeling and Potential Side Effects. *Tissue Engineering Part A*, *20*(9–10), 1392–1402. Erişim adresi: https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0314

Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. Erişim adresi: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., ve Selvamurugan, N. (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 172–188. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049

Magalhães, A. S., Silva, B. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., ve Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (Cydonia oblonga Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1372–1377. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.017

Maleki, H., Montes, S., Hayati-Roodbari, N., Putz, F., ve Huesing, N. (2018). Compressible, Thermally Insulating, and Fire Retardant Aerogels through Self-Assembling Silk Fibroin Biopolymers Inside a Silica Structure—An Approach towards 3D Printing of Aerogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *10*(26), 22718–22730. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/acsami.8b05856

Martínez-Vázquez, F. J., Cabañas, M. V., Paris, J. L., Lozano, D., ve Vallet-Regí, M. (2015). Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping

for drug delivery and bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, *15*(2015), 200–209. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.021

Masalov, V. M., Sukhinina, N. S., Kudrenko, E. A., ve Emelchenko, G. A. (2011). Mechanism of formation and nanostructure of Stöber silica particles. *Nanotechnology*, *22*(27), 275718. Erişim adresi: https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/27/275718

McGuire, B. (2020). Bone Cells. Erişim adresi: https://www.coursehero.com/sg/anatomy-and-physiology/microscopic-anatomy-of-bone/

Miron, R. J., ve Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction. *Journal of Dental Research*, *91*(8), 736–744. Erişim adresi: https://doi.org/10.1177/0022034511435260

Mishra, R., Bishop, T., Valerio, I. L., Fisher, J. P., ve Dean, D. (2016). The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regenerative Medicine*, *11*(6), 571–587. Erişim adresi: https://doi.org/10.2217/rme-2016-0042

Mozammil Hasnain, S. M., Hasnain, M. S., ve Nayak, A. K. (2019). Natural polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications. Içinde *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (ss. 1–14). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00001-7

Nallathambi, G., Ramachandran, T., Rajendran, V., ve Palanivelu, R. (2011). Effect of silica nanoparticles and BTCA on physical properties of cotton fabrics. *Materials Research*, *14*(4), 552–559. Erişim adresi: https://doi.org/10.1590/S1516-14392011005000086

Nguyen, M. A., ve Camci-Unal, G. (2020). Unconventional Tissue Engineering Materials in Disguise. *Trends in Biotechnology*, *38*(2), 178–190. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.07.014

Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., ve Silva, B. M. (2008). Organic acids composition of Cydonia oblonga Miller leaf. *Food Chemistry*, *111*(2), 393–399. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.004

Oliveira, E. E., Silva, A. E., Júnior, T. N., Gomes, M. C. S., Aguiar, L. M., Marcelino, H. R., Araújo, I. B., Bayer, M. P., Ricardo, N. M. P. S., ve Oliveira, A. G. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5402–5406. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.137

Owens, G. J., Singh, R. K., Foroutan, F., Alqaysi, M., Han, C.-M., Mahapatra, C., Kim, H.-W., ve Knowles, J. C. (2016). Sol–gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, *77*, 1–79. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001

Pandis, C., Madeira, S., Matos, J., Kyritsis, A., Mano, J. F., ve Ribelles, J. L. G. (2014). Chitosan–silica hybrid porous membranes. *Materials Science and Engineering: C*, *42*, 553–561. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.073

Pannier, A., Soltmann, U., Soltmann, B., Altenburger, R., ve Schmitt-Jansen, M. (2014). Alginate/silica hybrid materials for immobilization of green microalgae Chlorella vulgaris for cell-based sensor arrays. *J. Mater. Chem. B*, *2*(45), 7896–7909. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C4TB00944D

Pathmamanoharan, C. (1988). Preparation of monodisperse polyisobutene grafted silica dispersion. *Colloids and Surfaces*, *34*(1), 81–88. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/0166-6622(88)80084-2

Pereira, H. F., Cengiz, I. F., Silva, F. S., Reis, R. L., ve Oliveira, J. M. (2020). Scaffolds and coatings for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *31*(3), 27. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y

Peuster, M. (2001). A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal---results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart*, *86*(5), 563–569. Erişim adresi: https://doi.org/10.1136/heart.86.5.563

Pirzada, T., ve Shah, S. S. (2014). Water-Resistant Poly(vinyl alcohol)-Silica Hybrids through Sol-Gel Processing. *Chemical Engineering and Technology*, *37*(4), 620–626. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/ceat.201300295

PubMed. (2020). PubMed Bone Tissue Engineering Published Papers. Erişim adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=bone+tissue+engineering&filter=simsearch3.fft&filter=years.1993-2020&timeline=expanded

Qadura, M., Terenzi, D. C., Verma, S., Al-Omran, M., ve Hess, D. A. (2018). Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells*, *36*(2), 161–171. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/stem.2751

Qu, H., Fu, H., Han, Z., ve Sun, Y. (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances*, *9*(45), 26252–26262. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C9RA05214C

Rahaman, M. N., Day, D. E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., ve Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *7*(6), 2355–2373. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016

Rath, R. K., Subramanian, S., Sivanandam, V., ve Pradeep, T. (2001). Studies on the

interaction of guar gum with chalcopyrite. *Canadian Metallurgical Quarterly*, *40*(1), 1–12. Erişim adresi: https://doi.org/10.1179/cmq.2001.40.1.1

Ratner, B. D., ve Hoffman, A. S. (2013). OVERVIEW OF TISSUE ENGINEERING CONCEPTS AND APPLICATIONS. Içinde *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (C. 5, ss. 241–247). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00025-5

Reddi, S., Shanmugam, V. P., Tanedjeu, K. S., Kapila, S., ve Kapila, R. (2018). Effect of buffalo casein-derived novel bioactive peptides on osteoblast differentiation. *European Journal of Nutrition*, *57*(2), 593–605. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00394-016-1346-2

Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., ve Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, *20*(2), 92–102. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., ve Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, *78*, 1246–1262. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017

Royal Society of Chemistery. (2020). Silicon. Erişim adresi: https://www.rsc.org/periodic-table/element/14/silicon

Sabir, S., Qureshi, R., Arshad, M., Amjad, M. S., Fatima, S., Masood, M., Saboon, ve Chaudhari, S. K. (2015). Pharmacognostic and clinical aspects of Cydonia oblonga: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *5*(11), 850–855. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60934-3

Sajid, S. M., Zubair, M., Waqas, M., Nawaz, M., ve Ahmad, Z. (2015). A Review on Quince (Cydonia oblong): A Useful Medicinal Plant. *Global Veterinarian*, *14*(4), 517–524. Erişim adresi: https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2015.14.04.93154

Samavedi, S., Whittington, A. R., ve Goldstein, A. S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia*, *9*(9), 8037–8045. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014

Sanchez, C., Arribart, H., ve Giraud Guille, M. M. (2005). Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nature Materials*, *4*(4), 277–288. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/nmat1339

Santra, S., Wang, K., Tapec, R., ve Tan, W. (2001). Development of novel dye-doped silica

nanoparticles for biomarker application. *Journal of Biomedical Optics*, *6*(2), 160. Erişim adresi: https://doi.org/10.1117/1.1353590

Saravanan, S., Chawla, A., Vairamani, M., Sastry, T. P., Subramanian, K. S., ve Selvamurugan, N. (2017). Scaffolds containing chitosan, gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 1975–1985. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.034

Schemitsch, E. H. (2017). Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size. *Journal of Orthopaedic Trauma*, *31*(2), S20–S22. Erişim adresi: https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000978

Schorl, C., ve Sedivy, J. M. (2007). Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods*, *41*(2), 143–150. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.022

Shadjou, N., ve Hasanzadeh, M. (2015). Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress. *Materials Science and Engineering: C*, *55*, 401–409. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.027

Shahbazi, Y., ve Moosavy, M. H. (2019). Quince seed mucilage supplemented with titanium dioxide and Silicon dioxide nanoparticles. *Nanomedicine Research Journal*, *4*(3), 157–163. Erişim adresi: https://doi.org/10.22034/NMRJ.2019.03.004

Shao, W., He, J., Sang, F., Wang, Q., Chen, L., Cui, S., ve Ding, B. (2016). Enhanced bone formation in electrospun poly(l-lactic-co-glycolic acid)–tussah silk fibroin ultrafine nanofiber scaffolds incorporated with graphene oxide. *Materials Science and Engineering: C*, *62*, 823–834. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.078

Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C. M., Robey, P. G., ve Wang, C. Y. (2002). Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature Biotechnology*, *20*(6), 587–591. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/nbt0602-587

Shimko, D. A., Shimko, V. F., Sander, E. A., Dickson, K. F., ve Nauman, E. A. (2005). Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *73B*(2), 315–324. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jbm.b.30229

Shinomiya, F., Hamazu, Y., ve Kawara, T. (2009). Anti-Allergic Effect of a Hot-Water Extract of Quince (Cydonia oblonga). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*,

73(8), 1773–1778. Erişim adresi: https://doi.org/10.1271/bbb.90130

Shirosaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Lopes, M. A., Santos, J. D., Costa, M. A., ve Fernandes, M. H. (2009). Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. *Acta Biomaterialia*, *5*(1), 346–355. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.022

Silva, B. M., Andrade, P. B., Martins, R. C., Seabra, R. M., ve Ferreira, M. A. (2006). Principal component analysis as tool of characterization of quince (Cydonia oblonga Miller) jam. *Food Chemistry*, *94*(4), 504–512. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.045

Şimşek, E., Karaca, B., ve Arslan, Y. E. (2020). Bioengineered three-dimensional physical constructs from quince seed mucilage for human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, *35*(3), 240–253. Erişim adresi: https://doi.org/10.1177/0883911520918390

Singh, M., Foster, C. R., Dalal, S., ve Singh, K. (2010). Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*(3), 538–543. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.015

Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B., ve Nguyen, K. T. (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *85B*(2), 573–582. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jbm.b.30962

Stöber, Werner, Fink, A. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*, *26*(1), 62–69. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5

Stromps, J.-P., Paul, N. E., Rath, B., Nourbakhsh, M., Bernhagen, J., ve Pallua, N. (2014). Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells: A New Path in Articular Cartilage Defect Management? *BioMed Research International*, *2014*, 1–7. Erişim adresi: https://doi.org/10.1155/2014/740926

T.Erdoğan, T.Gönenç, B. D. (2012). Chemical Composition of the Essential Oil of Quince (Cydonia Oblonga Miller) Leaves. *Medicinal & Aromatic Plants*, *01*(08), 8–10. Erişim adresi: https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000e134

Tachibana, A., Kaneko, S., ve Tanabe, T. (2005). Rapid fabrication of keratin hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials*, *26*(3),

297–302. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.032

Tamburaci, S., Cecen, B., Ustun, O., Ergur, B. U., Havitcioglu, H., ve Tihminlioglu, F. (2019). Production and Characterization of a Novel Bilayer Nanocomposite Scaffold Composed of Chitosan/Si-nHap and Zein/POSS Structures for Osteochondral Tissue Regeneration. *ACS Applied Bio Materials*, *2*(4), 1440–1455. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00700

Tang, F., Li, L., ve Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*, *24*(12), 1504–1534. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adma.201104763

Tchobanian, A., Van Oosterwyck, H., ve Fardim, P. (2019). Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects. *Carbohydrate Polymers*, *205*, 601–625. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.039

Teresa, O. H., ve Choi, C. K. (2010). Comparison between SiOC thin films fabricated by using plasma enhance chemical vapor deposition and SiO2 thin films by using fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the Korean Physical Society*, *56*(4), 1150–1155. Erişim adresi: https://doi.org/10.3938/jkps.56.1150

Urena-Saborio, H., Alfaro-Viquez, E., Esquivel-Alvarado, D., Madrigal-Carballo, S., ve Gunasekaran, S. (2018). Electrospun plant mucilage nanofibers as biocompatible scaffolds for cell proliferation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 1218–1224. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.129

Walter, J. L. (1982). The Infrared Spectra of Complex Molecules. *Journal of Chemical Education*, *59*(4), A146. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/ed059pA146.2

Wang, L., Qiu, Y., Lv, H., Si, Y., Liu, L., Zhang, Q., Cao, J., Yu, J., Li, X., ve Ding, B. (2019). 3D Superelastic Scaffolds Constructed from Flexible Inorganic Nanofibers with Self-Fitting Capability and Tailorable Gradient for Bone Regeneration. *Advanced Functional Materials*, *29*(31), 1901407. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adfm.201901407

Wen, H., Lan, X., Zhang, Y., Zhao, T., Wang, Y., Kajiura, Z., ve Nakagaki, M. (2010). Transgenic silkworms (Bombyx mori) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Molecular Biology Reports*, *37*(4), 1815–1821. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s11033-009-9615-2

Werner, K., Pommer, L., ve Broström, M. (2014). Thermal decomposition of hemicelluloses. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *110*(1), 130–137. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.08.013

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., ve Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *185*, 317–335. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045

Woods, T. (2011). Aerogels: Thinner, Lighter, Stronger. Erişim adresi: https://www.nasa.gov/topics/technology/features/aerogels.html

Wu, X., Stroll, S. I., Lantigua, D., Suvarnapathaki, S., ve Camci-Unal, G. (2019). Eggshell particle-reinforced hydrogels for bone tissue engineering: an orthogonal approach. *Biomaterials Science*, *7*(7), 2675–2685. Erişim adresi: https://doi.org/10.1039/C9BM00230H

Yanai, R., Tetsuo, F., Ito, S., Itsumi, M., Yoshizumi, J., Maki, T., Mori, Y., Kubota, Y., ve Kajioka, S. (2019). Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression. *Cell Calcium*, *83*(August 2018), 102058. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102058

Yates, M., Gomez, M. R., Martin-Luengo, M. A., Ibañez, V. Z., ve Martinez Serrano, A. M. (2017). Multivalorization of apple pomace towards materials and chemicals. Waste to wealth. *Journal of Cleaner Production*, *143*, 847–853. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.036

Zaky, S. H., Lee, K. W., Gao, J., Jensen, A., Verdelis, K., Wang, Y., Almarza, A. J., ve Sfeir, C. (2017). Poly (glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone. *Acta Biomaterialia*, *54*, 95–106. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.053

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., ve Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 1224–1239. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169

Zhang, S., Xu, F., Wang, Y., Zhang, W., Peng, X., ve Pepe, F. (2013). Silica modified calcium alginate-xanthan gum hybrid bead composites for the removal and recovery of Pb(II) from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, *234*, 33–42. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.08.102

Zhang, Y., Liu, X., Zeng, L., Zhang, J., Zuo, J., Zou, J., Ding, J., ve Chen, X. (2019). Polymer Fiber Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, *29*(36), 1–20. Erişim adresi:

https://doi.org/10.1002/adfm.201903279

Zhao, S., Malfait, W. J., Guerrero-Alburquerque, N., Koebel, M. M., ve Nyström, G. (2018). Biopolymer Aerogels and Foams: Chemistry, Properties, and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, *57*(26), 7580–7608. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/anie.201709014

Zou, J., Wang, W., Neffe, A. T., Xu, X., Li, Z., Deng, Z., Sun, X., Ma, N., ve Lendlein, A. (2017). Adipogenic differentiation of human adipose derived mesenchymal stem cells in 3D architectured gelatin based hydrogels (ArcGel). *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *67*(3–4), 297–307. Erişim adresi: https://doi.org/10.3233/CH-179210

Zou, S., Ireland, D., Brooks, R. A., Rushton, N., ve Best, S. (2008). The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *90B*(1), 123–130. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jbm.b.31262

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hilal Deniz YILMAZ

Doğum Yeri : Philadelphia, ABD

Doğum Tarihi : 25.06.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 2017

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, 2020

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

1) SCI

Yılmaz H.D., Cengiz U., Arslan Y.E., Kiran F., Ceylan A., (inceleme aşamasında) From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by the microwave-assisted sol-gel reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*.

b) Bildiriler

1) Uluslararası

Yılmaz, H.D., Cengiz, U., Arslan, Y.E., (2019). Synthesis and characterization of Si-modified quince seed mucilage based bioscaffolds for bone tissue engineering. III. International Joint Science Congress of Materials and Polymers. Erişim adresi: http://iscmp.org/science-congress-71-ARCHIEVE

c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Bitkisel Müsilaj/Bor Temelli Yeni Nesil Doku Mühendisliği İskelelerinin Geliştirilmesi. Proje kodu: FBA-2020-3309. Çalışma süresi: 2020, araştırmacı.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Oral ve maksillofasiyal bölgede kullanılma potansiyeli olan nHA/müsilaj temelli biyolojik iskelelerin üretilmesi ve *in vitro* değerlendirilmesi. Proje kodu: TSA-2019-2933. Çalışma süresi: 2020, araştırmacı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı Asistanlığı (50/d), 2018-devam ediyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi : hdyilmaz@comu.edu.tr
ORCID : 0000-0003-0412-2868