

TC

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYVA (*CYDONIA OBLONGA* MILLER) ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ BİYOMALZEME OLARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIPTA KULLANIMI

Ekin ŞİMŞEK

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYVA (CYDONIA OBLONGA MILLER) ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ BİYOMALZEME OLARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIPTA KULLANIMI

Ekin ŞİMŞEK

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği
Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **09/01/2020**

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

Ekin ŞİMŞEK tarafından Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **09/01/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Ayva (*Cydonia Oblonga* Miller) Çekirdeği Müsilajının Biyomalzeme Olarak Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıpta Kullanımı**" 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

Dr. Öğr. Üyesi Burak DERKUŞ ……
Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No: ……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2018-2517

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.

Ekin ŞİMŞEK

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve bilgileriyle katkıda bulunan saygı değer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'a,

Önerileriyle tezime katkıda bulunan değerli jüri üyelerim Doç. Dr. Uğur CENGİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Burak DERKUŞ' a,

Çalışma süresince benimle olan ve deneysel çalışmalarıma katkıda bulunan laboratuvar arkadaşlarım Burak KARACA, Büke DEMİR, Aykut YILDIZ, Eren ÖZÜDOĞRU, Fatma CAL, Hilal YILMAZ ve Hazal KİBAR' a,

Karakterizasyon ve mekanik testlerde yardımcı olan Doç. Dr. Hüseyin AYVAZ, Öğr. Görevlisi Nilay TEZEL, Kim. Mert AKGÜN ve Sevban Akkaya'ya ve kesitler için Çanakkale Mehmet Akif Ersoy Devlet Hastanesi'nden sayın Şule KÖSEOĞLU'na,

Çalışmaya ilham veren Okan ATAY'a,

Son olarak hayatım boyunca hiçbir zaman desteklerini eksik etmeyen ve sevgilerini hissettiren sevgili annem Selma ŞİMŞEK ve babam Kasım ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürlerimi ve en içten duygularımı sunarım.

Ekin ŞİMŞEK

Çanakkale, Ocak 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

EKH	Embriyonik kök hücre
iPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
YKH	Yetişkin kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
AKH	Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal hücre
3B	3-boyutlu
HDM	Hücre dışı matriks
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
DMA	Dinamik mekanik analiz
TGA	Termogravimetrik analiz
BET	Brunauer–Emmett–Teller
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
CD	Farklılaşma kümeleri
HLA-DR	İnsan lökosit antijen-DR
Kİ-MKH	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
%	Yüzde oranı
SVF	Stromal vasküler fraksiyon
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poli (glikolik asit)
PLA	Poli (laktik asit)
PLGA	Poli [laktik-ko- (glikolik asit)]
HA	Hyalüronik asit
GAG	Glikozaminoglikan
BMP-2	Kemik morfojenik proteini-2

TKM	Tohum kabuğu müsilajı
MSH	Müsilaj salgılayıcı hücre
Da	Dalton
mg	Miligram
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
mm	Milimetre
^{1}H	Proton
^{13}C	Karbon-13
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NaOH	Sodyum hidroksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Ara	Arabinoz
Xyl	Ksilan
Gal	Galaktoz
Glc	Glikoz
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit
NHS	N-hidroksi süksinimit
PEG	Polietilen glikol
PCP	PCL-Kitosan-PEG
PQSP	PCL-Ayva Çekirdeği Müsilajı-PEG

g	Gram
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
mM	Milimolar
M	Molar
MES	2-(N-morfolino) etansülfonik asit
rpm	Dakikada dönme sayısı
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
BJH	Barrett–Joyner–Halenda
Hz	Hertz
E′	Depolama modülüsü
FBS	Fötal sığır serumu
g	Gravite
DMSO	Dimetilsülfoksit
nm	nanometre
HCl	Hidroklorik asit
µm	mikrometre
ANOVA	One-way analysis of variance-Tek yönlü varyans analizi
n	Örnek sayısı
CH	Kitosan
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
m^2	Metrekare
kPa	Kilo Pascal

Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
GTA	Gluteraldehit
DTBP	Dimetil 3,3, ditiyo bis propiyonamit
YM	Yüksek moleküler ağırlıklı
DM	Düşük moleküler ağırlıklı
H&E	Hematoksilen ve Eozin

ÖZET

AYVA (*CYDONIA OBLONGA* MILLER) ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJININ BİYOMALZEME OLARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENARATİF TIPTA KULLANIMI

Ekin ŞİMŞEK
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN
09/01/2020, 73

Bu çalışmada, Çanakkale'den toplanan ayvaların (Cydonia oblonga Miller) çekirdeklerinden ultra saf su ile müsilaj ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ayva çekirdeği müsilajı liyofilize edilmiş, daha sonra ultra saf suda yeniden çözdürülmüştür. Müsilaj, 3B gözenekli bir form elde etmek için kalıplanmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyondan sonra, iskeleler mikro yapılarının koruması için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit/N-hidroksi süksinimit (EDC/NHS) ile çapraz bağlanmıştır. İskeleler, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM), Attenuated total reflectance Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR), dinamik mekanik analiz (DMA), termogravimetrik analiz (TGA) ve Brunauer–Emmett–Teller (BET) analizi ve ayrıca şişme, sıvı alımı ve gözeneklilik testleri ile karakterize edilmiştir. Müsilajın ekstraksiyon verimi %6,28 ± 0,40 (n=3) olarak bulunmuştur. Çapraz bağlı iskelelerin şişme oranı ve PBS alımının sırasıyla %12680 ± 388,82 (n=3) ve 220,35 ± 12,34 µL (n=3) olduğu tespit edilmiştir. Çapraz bağlı iskelelerin gözenekliliği sıvı yer değiştirme analizi ile %83,43 ± 2,84 (n = 3) olarak bulunmuştur. Çapraz bağsız ve çapraz bağlı iskelelerin toplam yüzey alanları BET analiziyle 9,416 m^2/g ve 27,195 m^2/g olarak hesaplanmıştır. SEM mikrografileri, çapraz bağlı iskelelerin birbirine bağlı yüksek gözenekli bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Çoğaltılan insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH 'ler) iskeleler üzerine ekilmiştir. Hücre canlılığı, MTT testi ile 3., 7. ve 10. günlerde değerlendirilmiştir. Test, iskelenin iAMKH 'ler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını doğrulamıştır. SEM analizi ve histokimyasal boyama, iAMKH 'lerin iskelelere tutunduğunu,

küre benzeri morfoloji oluşturduğunu ve büyüdüğünü göstermiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, iskelelerin rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında olası bir kullanımı olabileceğine inanılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Ayva (*Cydonia oblonga Miller*) Çekirdeği, Biyomalzeme, Doku Mühendisliği, Mezenkimal Kök Hücreler, Müsilaj, Rejeneratif Tıp**.**

ABSTRACT

THE USAGE OF QUINCE (*CYDONIA OBLONGA* MILLER) SEED MUCILAGE AS A BIOMATERIAL IN TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

Ekin ŞİMŞEK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Material Engineering Science

Advisor: Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

01/09/2020, 73

In this study, the mucilage was extracted from quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds, which were collected from Çanakkale, with ultra-pure water. Obtained quince seed mucilage was lyophilized then was re-dissolved in ultra-pure water. The mucilage was molded and lyophilized to achieve 3D porous form. After lyophilizing, the scaffolds were crosslinked with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) to maintain their microstructure. The scaffolds were characterized by field emission scanning electron microscope (FE-SEM), Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), dynamic mechanical analysis (DMA), thermogravimetric analysis (TGA), and Brunauer–Emmett–Teller (BET) analysis and as well as the swelling, liquid uptake, and porosity tests. The extraction yield of mucilage was found to be 6.28 ± 0.40% (n=3). The swelling ratio of and PBS uptake of the cross-linked scaffolds was determined to be 12680 ± 388.82% (n=3) and 220.35 ± 12.34 μL (n=3), respectively. The porosity of the cross-linked scaffolds was found as 83.43 ± 2.84% (n=3) by liquid displacement analysis. The total surface areas of the non-cross-linked and cross-linked scaffolds were calculated to be 9.416 m^2/g and 27.195 m^2/g by BET analysis. SEM micrographs have demonstrated that cross-linked scaffolds possess an interconnected highly porous structure. Expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) were seeded onto the scaffold. Cell viability was evaluated for 3rd, 7th and 10th days by the MTT test. The test confirmed that the scaffold had no cytotoxic effect on hAMSCs. SEM analysis and histochemical staining shown that hAMSCs were attached to the scaffolds,

formed spheroid-like morphology, and grown. Take into consideration of these results, it is believed that the scaffolds would have a possible usage in regenerative medicine and tissue engineering applications.

Keywords: Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Seed, Biomaterial, Tissue Engineering, Mesenchymal Stem Cells, Mucilage, Regenerative Medicine.

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 xv
TABLOLAR DİZİNİ xvii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1. Doku Mühendisliği 3
1.2. Kök Hücreler 4
1.3. Biyomalzemeler 9
1.3.1. Sentetik Polimerler 10
1.3.2. Doğal Polimerler 11
1.4. Bitkisel Müsilaj 13
1.5. Ayva 16
1.5.1. Ayva Meyvesi 17
1.5.2. Ayva Çekirdeği 19
1.5.3. Ayva Çekirdeği Müsilajı 20
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 22
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 30
3.1. Materyal 30
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar 30
3.2. Yöntem 31
3.2.1. Ayva Çekirdeklerinin Elde Edilmesi 31
3.2.2. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstraksiyonu 31
3.2.3. Ayva Çekirdeği Müsilajı Temelli İskelelerin Hazırlanması 32
3.2.4. İskelelerin Karakterizasyonu 33
3.2.5. Şişme ve Sıvı Tutma Testleri 34

3.2.6. Gözeneklilik Testi 35
3.2.7. İskelelerin Fonksiyonel Gruplarının Belirlenmesi 35
3.2.8. İskelelerin Yüzey Alanlarının Belirlenmesi 35
3.2.9. Mekanik ve Termal Analizler 35
3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları 36
3.2.11. İskeleler Üzerine Hücre Ekilmesi 36
3.2.12. Ekilen Hücrelerin İskeleler Üzerinde Canlılığının Belirlenmesi 37
3.2.13. İskelelerin Yüzey Morfolojisinin ve Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi 38
3.2.14. Histokimyasal Karakterizasyon 38
3.2.15. İstatiksel Analiz 39
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 40
4.1. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstraksiyon Verimi 40
4.2. Ayva Çekirdeği Müsilajı Temelli İskelelerin Optimizasyonu 41
4.3. Şişme Davranışı ve Sıvı Tutma Kapasitesi 42
4.4. Gözenekliliğin Belirlenmesi 43
4.5. Çapraz bağlama İşleminin Fonksiyonel Gruplar Üzerine Etkisi 44
4.6. Çapraz Bağlama ile Yüzey Alanındaki Değişiklikler 45
4.7. Çapraz Bağlama İşleminin Mekanik ve Termal Özellikler Üzerindeki Etkisi 46
4.8. İskelelerin Hücrelere Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 48
4.9. İskelelerin Yüzey Morfolojisi ve Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışlar 50
4.10. Histokimyasal Karakterizasyon 53
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımlar (Fernandez-Yague ve diğerleri, 2015; Tverdokhlebov, Bolbasov, & Shesterikov, 2012)…….. 4
Şekil 1.2. (A) Kök hücrelerin (turuncu) kendini yenilemesi ve farklılaşmaya yönelecek hücreleri (yeşil) üretmesi, (B) kök hücrelerin asimetrik bölünmesi (Morrison & Kimble, 2006)……...5
Şekil 1.3. Embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesi ve farklılaşabildikleri hücre tipleri (Meregalli, Farini, & Torrente, 2011)……...6
Şekil 1.4. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi ve farklılaşma kapasiteleri (Amini Mahabadi ve diğerleri, 2018; Meregalli, Farini, & Torrente, 2011)……..7
Şekil 1.5. Mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve farklılaşabildikleri hücre tipleri (Macrin, Joseph, Pillai, & Devi, 2017; Pham, 2016)……...8
Şekil 1.6. İskeleye tutunan hücrelerin (mavi çekirdekle kırmızı içerisinde) kendileri (sarı) ve iskele ile kimyasal (yeşil) uyarılarla etkileşimi (Shoichet, 2010)…….10
Şekil 1.7. Sentetik polimerlerden bazılarının moleküler yapıları (Mahapatro & Singh, 2011; Zou ve diğerleri, 2018)……11
Şekil 1.8. Polisakkaritlerin bazılarının moleküler yapısı (Tiwari, Patil, & Bahadur, 2018)...12
Şekil 1.9. Mısırın dışarıdaki kökleri tarafından üretilmiş müsilaj (Van Deynze ve diğerleri, 2018)……...14
Şekil 1.10. Gamlar ve müsilajların ortak özelliklerini ve farklılıklarının özeti (Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013)……15
Şekil 1.11. (A) Ayva ağaçları, (B) altın elma olarak da bilinen ayvayı elinde tutan Herkül heykeli (Abdollahi, 2019)……17
Şekil 1.12. Ayva ağacının meyvesi ve yaprakları (Sharma, Joshi, & Rana, 2011)…….18
Şekil 1.13. Ayvanın çeşitli bölümlerinde yer alan monosakkaritler ve organik asitlerin bir kısmının moleküller yapısı (Muhammad U. Ashraf, Muhammad, Hussain, & Bukhari, 2016)……...19
Şekil 1.14. Ayva meyvesinin çekirdeği……20
Şekil 1.15. (A) Ayva çekirdeği müsilajı, ayva çekirdeği müsilajı içeriğinde yer alan selüloz (B) ve hemiselülozun (C) basit yapısı (Hakala ve diğerleri, 2014; Yahia, Carrillo-López, & Bello-Perez, 2019)……...21
Şekil 1.16. Ayva çekirdeği müsilajının içeriği (Charrez, Qiao, & Hebbard, 2015; Constable & Dilworth, 2003; Hakala ve diğerleri, 2014; Huffman, 2003; Langan ve diğerleri, 2014; Ramasahayam, Koppuravuri, Arora, & Chowdhury, 2015) (Galaktoz ve mannoz https://www.chegg.com/homework-help/galactose-mannose-constitutional-isomers-stereoisomers-b-dra-chapter-24-problem-10p-solution-9780077274290-exc‘den alınmıştır).....21
Şekil 3.1. Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstraksiyonu……32
Şekil 3.2. EDC/NHS mekanizması: 1) Karboksil grubu, 2) Amin grubu (Bart ve diğerleri, 2009)……...33
Şekil 3.3. MTT testinin prensibi (Sukhramani ve diğerleri, 2011)……37
Şekil 3.4. MTT testi, SEM analizi ve hematoksilen & eozin boyama öncesi iskelelerin temsili görüntüsü……39
Şekil 4.1. Optimizasyon çalışmaları, (A) farklı konsantrasyonlarla hazırlanan Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler, (B) NaHCO3 içeren Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ile NaHCO3 içermeyen iskelelerin karşılaştırılması ve (C) Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin çapraz bağlama sürelerinin karşılaştırılması….42
Şekil 4.2. Şişme testi öncesi ve sonrası kuru ve ıslak formlarda çapraz bağlı ayva çekirdeği

müsilajı temelli iskeleler…….43
Şekil 4.3. FT-IR analizi ile fonksiyonel grupların karşılaştırılması, (A) Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler, (B) Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler..45
Şekil 4.4. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin DMA grafiği……...47
Şekil 4.5. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin TGA eğrileri……..48
Şekil 4.6. iAMKH' lerin iğsi yapılarını gösteren mikroskobik görüntü (Ölçek: 200 µm)…49
Şekil 4.7. (A) MTT test sonuçları, (B) iAMKH' lerin 3., 7, ve 10. günlerde mikroskobik ve makroskobik görüntüleri (Ölçek: 100 µm)……..50
Şekil 4.8. SEM analizi ile gözenekliliğin belirlenmesi, çapraz bağsız iskelelerin (A) x100 ve (B) x250 büyütmede ve çapraz bağlı iskelelerin (C) x100 ve (D) x250 büyütmede SEM mikrografileri (Ölçek 100 µm)……...51
Şekil 4.9. iAMKH' lerin iskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (A) x750, (B) x1500, (C) x2500 büyütme, 7. gün SEM mikrografları (D) x750, (E) x1500, (F) x2500 büyütme, 10. gün SEM mikrografları (G) x750, (H) x1500, (I) x2500 büyütme (Ölçek 10 µm, sarı oklar hücreleri, beyaz oklar ise gözenek liflerini göstermektedir)…….53
Şekil 4.10. (A) Çapraz bağlı iskelelerin, (B) iAMKH' lerin 3. gün, (C) iAMKH' lerin 7. gün ve (D) iAMKH' lerin 10. gün H&E boyamaları (Ölçek: 200 µm, kırmızı oklar hücreleri, sarı oklar ise gözenek liflerini göstermektedir)……54

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Müsilajların kullanım alanları (Chaudhary, Sharma, & Rana, 2014; Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013)……16
Tablo 4.1. Su ile farklı yöntemlerle ekstrakte edilen müsilajların ekstraksiyon verimleri….40
Tablo 4.2. BET analizini özetleyen tablo……..46

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Çok disiplinli bilimler olan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, son biyoteknolojik ilerlemelere paralel olarak gelişen ve hasarlı doku ve/veya organları iyileştirmek için biyomalzemeleri, büyüme faktörlerini ve kök hücrelerini birleştirir. Bir yandan malzeme bilimcileri, hücre infiltrasyonu ve anjiyojenezi teşvik etmek için mekanik bütünlüğü yüksek gözeneklilikle birleştiren geniş bir fiziksel parametreye sahip biyouyumlu iskeleler üretirken, diğer yandan ise biyokimyacılar, hücre kültürü ve *in vivo* uygulamalar için uygun, yüksek miktarda saflaştırılmış, biyoaktif sitokinler üretmektedirler. Tüm bu gelişmelere rağmen, kök hücrelerin kullanılabilirliği rejeneratif tıp alanında çalışan bilim insanları ve klinisyenler için bazı zorluklar yaratmaktadır (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007). Bu zorluklardan bazıları, hücre fonksiyonlarını düzenleyen yeni sinyaller ve koşullar hakkında bilgilerin elde edilmesi ve bu bilgilerin kök hücre uygulamalarına yönelik kullanılabilmesidir (Fernandes, Diogo, & Cabral, 2013).

Tanım olarak bir kök hücre, kendini yenileyebilme kabiliyeti ve çoklu soy yolları boyunca farklılaşma kabiliyeti ile karakterize edilen hücrelerdir (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007). Kök hücre kaynakları arasında embriyonik kök hücreler (EKH' ler), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH' ler) ve doğum sonrası (postnatal) yetişkin kök hücreler (YKH’ ler) bulunmaktadır. EKH' ler geniş kapsamlı kendini yenileme ve çoğalma yeteneğine sahiptir ve aynı zamanda her tür somatik dokuya farklılaşma potansiyeline sahiptir. iPKH’ ler, deri fibroblastları gibi farklılaşmış hücrelerden türetilmektedir, oluşumları bir embriyo kaynağına bağlı değildir ve EKH’ ler ile aynı potansiyele ve özelliklere sahip görünmektedirler. Bu nedenle, hem EKH' lerin hem de iPKH' lerin terapötik potansiyelleri, otomatik olarak tekrar üretilebilirlikleri ve pluripotent olmaları nedeniyle muazzam olmasına rağmen, pratik kullanımlarında hala bazı sınırlamalar vardır. Bu sınırlamaların bazıları, teratoma oluşumunun hücresel düzenlenmesi, etik endişeler, EKH' ler ile ilgili immün endişeler ve iPKH' ler ile ilgili genetik manipülasyon zorluklarıdır. Buna karşılık, YKH’ ler, doğası gereği immüno-uyumludur ve kullanımları ile ilgili etik kaygılar yoktur. Multipotent mezenkimal kök hücreler (MKH' ler), çeşitli postnatal organlarda ve bağ dokularında mevcut olan hematopoetik olmayan mezodermal türevli hücreleridir. Kemik iliği kaynaklı MKH' lere benzer özelliklere sahip MKH'ler, trabeküler kemik, periosteum, sinoviyal membran, iskelet kası, cilt, perisitler, periferik kan, süt dişleri, periodontal ligament ve göbek kordonu gibi farklı doku kaynaklarından izole edilmiştir. Bu

kaynaklardan türetilen kök hücre popülasyonu değerli olsa da ortak sorunlar arasında az sayıda hasat edilen hücre ve hasat edilebilen sınırlı miktarda doku bulunmasıdır. Bu nedenle, hemen hemen tüm yetişkin kökenli kök / progenitör (öncül) hücreler, etkinlik ve güvenlik gereksinimlerini karşılamak için preklinik veya klinik kullanımı öncesinde en azından bir dereceye kadar *ex vivo* çoğaltılma veya ileri manipülasyona gerek duymaktadır. Buna karşılık, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKMH' ler) olarak adlandırılan adipoz dokusundaki multipotent kök hücreler şimdiye kadar tanımlanan en umut verici kök hücre popülasyonlarından biridir çünkü, insan adipoz dokusu her yerde bulunur ve çok az donör bölgesi morbiditesi veya hasta rahatsızlığı ile kolayca büyük miktarlarda elde edilir. Bu nedenle, otolog AKH' lerin hem araştırma araçları hem de hücresel terapötikler olarak kullanılması uygun olup, yaralanma ve hastalığın preklinik ve klinik çalışmalarında hem güvenli hem de etkili olduğu gösterilmiştir (Mizuno, Tobita, & Uysal, 2012). İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal hücreler (iAMKH' ler) ise adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahip olmasından dolayı, farklı klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Zanicotti, Duncan, Seymour, & Coates, 2018).

Doku mühendisliği amacına ulaşmak için, 3-boyutlu (3B) doku oluşumunu desteleyecek iskele de denilen uygun ve geçici bir hücre dışı matriks (HDM) yapıları oluşturur. Oluşturulan iskeleler, biyouyumlu, biyobozunur, oldukça gözenekli yapı (aynı zamanda birbirine bağlı) ve mekanik olarak dayanıklı olma gibi spesifik özelliklere sahip olmalıdır. İskele malzemesi olarak doğal ve sentetik polimerler kullanılabilir (Tsioptsias & Panayiotou, 2008). Polivinil alkol, poli glutamik asit, poliüretanlar, poli kaprilakton, polietilen glikol gibi sentetik polimerler ve nişasta, kitosan, kollajen, jelatin, albümin gibi doğal polimerler sıklıkla biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Islam ve diğerleri, 2016). Sentetik polimerler olağan üstü yapısal ve fiziksel dayanıklılığa sahip olmasına rağmen, doğal polimerler biyolojik olarak aktiftir ve genellikle hücre tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik eder. Bu yüzden, doğal polimerlere ilgi artmaktadır. Polisakkaritler, glikozidik bağlarla birbirine bağlanan monosakkaritlerden oluşan, her zaman her yerde bulunabilen doğal polimerlerdir. Düşük toksisiteye, iyi biyouyumluluğa, düşük maliyete ve memeli dokulardaki HDM' i oluşturan biyoaktif glikozaminoglikanlara kimyasal benzerliğe sahiptirler. İskele üretimi için nişasta ve kitosanın yanı sıra aljinatlar, selüloz, pektin, hyalüronik asit ve agaroz da kullanılmaktadır (Ninan ve diğerleri, 2013). Polisakkaritlerin keşfedilmemiş bir kaynağı da bitkisel müsilajdır. Genellikle gıda katkısı veya ilaçlarda yardımcı madde olarak kullanılan bitkisel müsilaj, anti bakteriyel, anti inflamatuar ve hücre büyümesini teşvik edici gibi önemli biyolojik özellikler

göstermektedir. Bu yüzden, doku mühendisliği alanında bitkisel müsilaj dikkat çekici bir biyomalzeme olmuştur. En iyi karakterize edilmiş bitkisel müsilaj kaynaklarından bazıları, keten, nane ve fesleğen tohumları ile ayva çekirdeğidir (Urena-Saborio ve diğerleri, 2018).

Bu tez çalışmasında, ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstrakte edilmiştir. Ayva çekirdeği müsilajı ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılması amacıyla 3B iskeleler üretilmiştir. Elde edilen ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler şişme, sıvı tutma, gözeneklilik testleri de dahil olmak üzere alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM), attenuated total reflectance Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR), dinamik mekanik analiz (DMA), termogravimetrik analiz (TGA), Brunauer–Emmett–Teller (BET) analizleri ile karakterize edilmiştir. İskelelerin fiziksel yapısını korumak için çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Satın alınan iAMKH'ler, özel besi yeri ile kültüre edilip çoğaltıldıktan sonra, çapraz bağlı iskeleler üzerine ekilmiştir. Ekilen hücrelerin iskeleler üzerindeki canlılıkları, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin iskeleler üzerindeki davranışları SEM analizi ve Hematoksilen ve Eozin boyama ile değerlendirilmiştir.

1.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, ilk olarak 1988' de Doğa Bilimleri Vakfı (Birleşik Devletler)' nın desteklediği toplantının katılımcıları tarafından "normal ve patolojik memeli dokularda yapı-fonksiyon ilişkisinin temel bir anlayışına ve doku/organ fonksiyonunun tamiri veya rejenerasyonu için biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerinin ve yöntemlerinin uygulanması" olarak tanımlanmıştır. Şu an en çok bilinen tanımı ise, mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini, doku fonksiyonlarını yenileyen, koruyan veya iyileştiren biyolojik ikamelerin gelişimine uygulayan disiplinler arası bir alandır. Bu tanımlardan yola çıkarak doku mühendisliği, rejeneratif tıbbın organ değişimi veya hasar görmüş organların onarımı için yeni tedavi alternatifleri sunabilecek ana yaklaşımlarından biri olarak kabul edilmektedir (Elitok, Gunduz, Gurses, & Gunduz, 2018; Ma, 2004).

Doku mühendisliğinde üç yaklaşım vardır: (1) istenilen fonksiyonu sağlayan hücrelerin yerine izole edilmiş hücreler veya hücre ikamelerinin kullanılması, (2) hedeflenen bölgelere büyüme veya farklılaştırma faktörleri gibi doku oluşturucu içeriklerin taşınması ve (3) 3B iskelelerde hücrelerin büyümesidir (Şekil.1.1). Hücreler ve doku oluşturucu faktörler hasarlı bölgeler küçük olduğunda işe yaramaktadır. Hasar oranı büyüdüğünde ise

bu iki yol yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden iskeleler, hücrelerin büyümesini, HDM' in ve diğer moleküllerin sentezlenmesini ve fonksiyonel doku ve/veya organların oluşumunu sağladığından önemlidir (Ma, 2004).



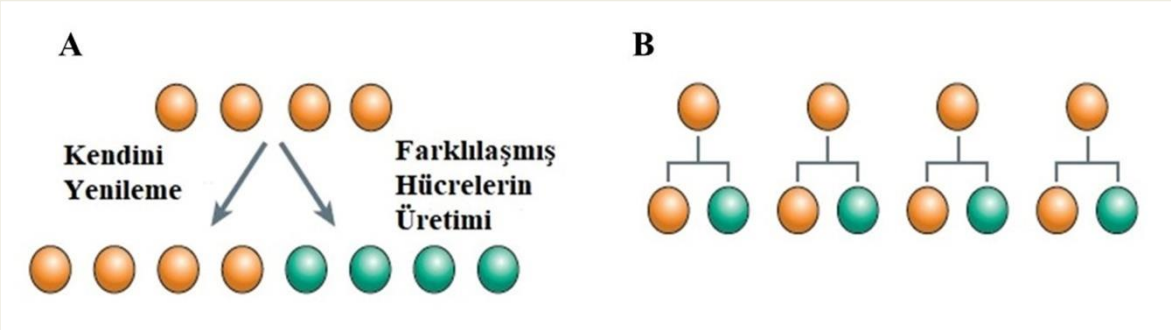
Şekil 1.1. Doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımlar (Fernandez-Yague ve diğerleri, 2015; Tverdokhlebov, Bolbasov, & Shesterikov, 2012)

1.2. Kök Hücreler

Tüm yaşayan dokuların yapı taşları olan hücreler, doku ikameleri yaratmanın başlangıç noktasıdır. Hücre manipülasyonu ve kök hücre farklılaşması ile ilgili bilgilerin artması, tüm doku mühendisliği uygulamaları için daha fazla hücre kaynakları sağlayan yeni vaatlerin kapısını sağlamıştır. Otolog (donör ve alıcı aynı kişi) hücreler, immün yanıtlar oluşturmayarak bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçları ve bu ilaçların yan etkilerini ortadan kaldırdığından doku mühendisliği için favori hücre tipidir. Ancak, kaynakları sınırlıdır ve istenilen dokuyu oluşturmak için uzun kültür periyoduna ihtiyaç duymaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için allojenik (donör ve alıcı aynı kişi değil, aynı türe ait) veya zenojenik (donör ve alıcı farklı türlere ait) hücre kaynaklarının kullanılması önerilmiştir ancak bu kaynaklar, immün ret, hastalıkların geçişi, donör uyumsuzluğu ve etik endişeler gibi ciddi engellerle ilişkilendirilmektedir (Mhanna & Hasan, 2017).

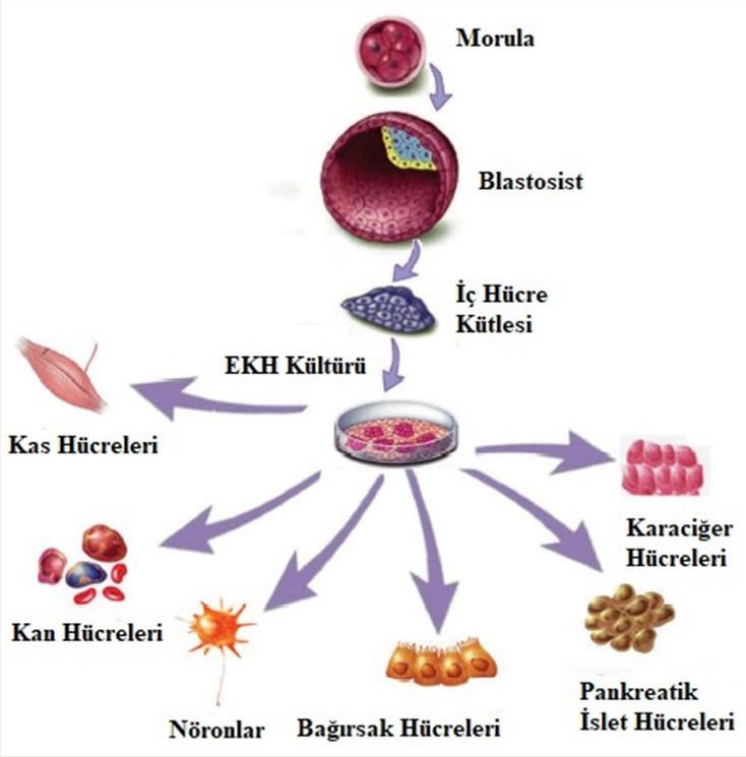
Doku mühendisliğinde kök hücre uygulamaları çoğalmaktadır ve klinikte uygulamaları da bulunmaktadır. "Kök hücre" tanımı 19. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Bilim insanları kök hücreleri, kendini yenileme yeteneğine sahip, yüksek çoğalma potansiyeli gösteren ve özelleşmiş hücrelere çoklu farklılaşabilen hücreler olarak tanımlamaktadır.

Kendini yenileme işlemi, kök hücrenin biri farklılaşacak olan (asimetrik bölünme) ve diğeri ana hücre ile aynı olacak (simetrik) iki hücreye bölünmesi ile meydana gelir (Şekil 1.2). Aynı olan hücreler, ana hücrenin gelişimsel potansiyelini korumaktadır. Kök hücreler, kaynaklarına göre embriyonik ve yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılabilir (Kallmeyer, 2013).



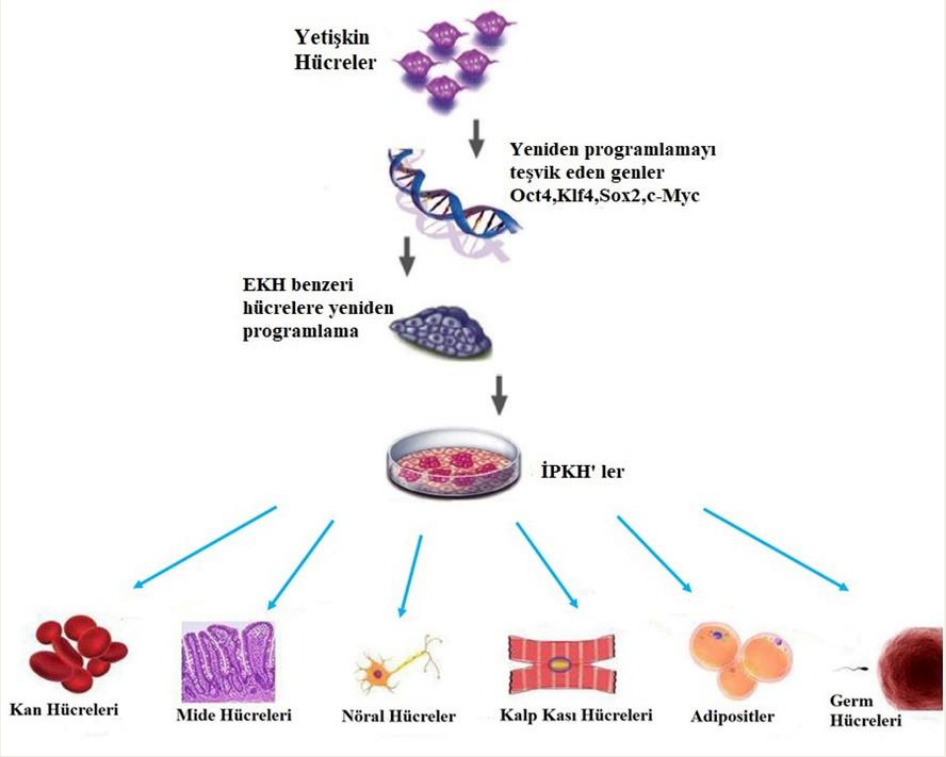
Şekil 1.2. (A) Kök hücrelerin (turuncu) kendini yenilemesi ve farklılaşmaya yönelecek hücreleri (yeşil) üretmesi, (B) kök hücrelerin asimetrik bölünmesi (Morrison & Kimble, 2006)

Embriyonik kök hücreler (EKH' ler), oosit (dişi gamet) döllenmesini takiben 5. günde gelişmekte olan embriyo blastosistin iç hücre kütlesinden elde edilir ve pluripotenttir yani vücutta herhangi bir hücre tipini üretme kapasitesini koruyarak farklılaşmamış bir durumda kültür içerisinde tüm üç germ tabakasının hücrelerine çoğaltılabilir (Şekil 1.3). Telomeraz adı verilen bir protein ürünü, kromozomların telomer uçlarının her hücre bölünmesinde tutulmasını ve hücrelerin yaşlanmamasını sağlayan yüksek düzeyde bir genom ifade eder ve bu durum EKH' lerin ölümsüz olmasını sağlar. EKH' ler, ilk olarak farelerden daha sonra ise primatlardan elde edilmiştir. 1988 yılına kadar insan balstosistlerinden EKH' ler elde edilmemiştir. İnsan EKH hatları, insan blastosist türevli olma kriterlerini yerine getirmiş, farklılaşmamış çoğalma göstermiş ve üç germ tabakasının tümünü oluşturabilerek normal karyotip ve yüksek telomeraz etkinliği sergilemiştir. İnsan EKH' leri implantasyon öncesi embriyolardan elde edildikleri için kullanımları oldukça tartışmalıdır (Boyer ve diğerleri, 2005; Kallmeyer, 2013; Wert & Mummery, 2003).



Şekil 1.3. Embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesi ve farklılaşabildikleri hücre tipleri (Meregalli, Farini, & Torrente, 2011)

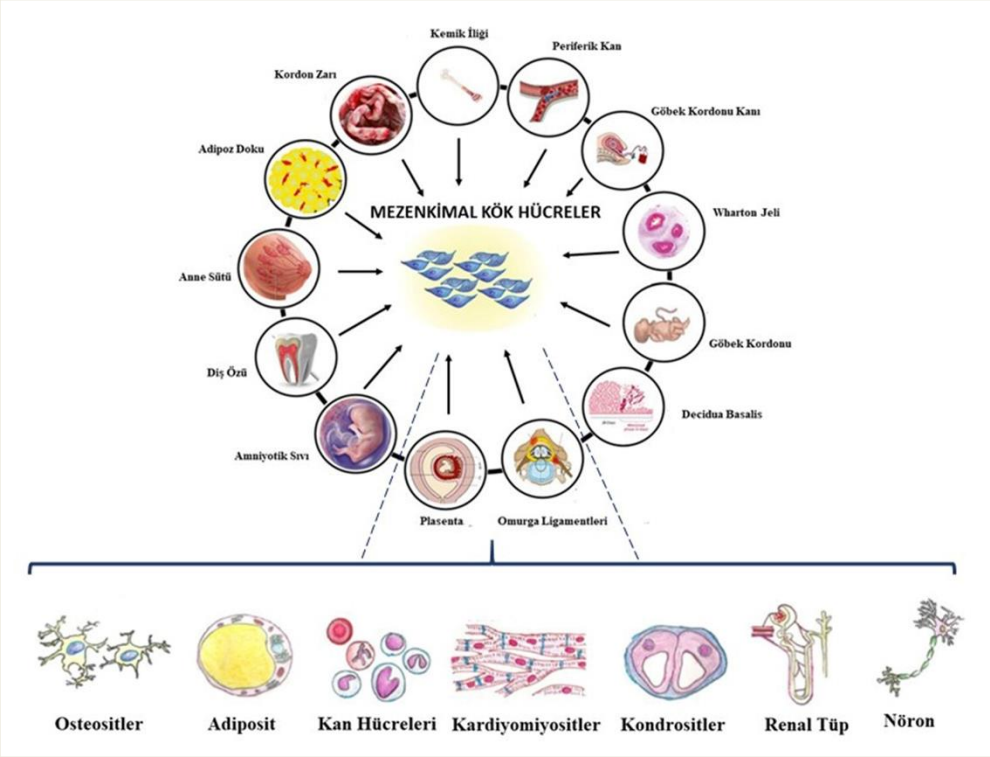
Oct3/4, Sox 2 ve Nanog dahil transkripsiyon faktörleri, EKH' in pluripotent özelliğini korumasını sağlamaktadır. Tümörlerde sıklıkla upregüle edilen Stat3, E-Ras, Klf4, c-myc ve β-Katenin gibi çeşitli genlerin, EKH' lerin fenotipinin uzun süreli korunmasına ve kültürde hızlı çoğalmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. 2006'da Yamanaka ve Takahashi bu bilgilerden yola çıkarak fare embriyonik ve insan somatik hücrelerinden ilk defa indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH' ler) de denilen EKH benzeri hücrelere somatik hücreleri geri dönüştürmüşlerdir (Şekil 1.4) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Yeniden programlanmış insan iPKH' leri, insan EKH' lerinde olduğu gibi yüzey antijen ekspresyonu ve pluripotent genlerin epigenetik durumunu, morfolojisini, çoğalma hızını ve telomeraz aktivitesini sergilemektedir. Ayrıca, insan iPKH' leri üç germ tabakasının hücre tiplerine *in vitro* ve *in vivo* olarak farklılaşma yeteneğine sahiptir (Takahashi ve diğerleri, 2007).



Şekil 1.4. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi ve farklılaşma kapasiteleri (Amini Mahabadi ve diğerleri, 2018; Meregalli, Farini, & Torrente, 2011)

Dünyanın her yerinde bilim insanları, rejeneratif tıp için büyük potansiyele sahip dengeli, güvenli ve yüksek oranda ulaşılabilir kök hücre kaynağı araştırmaktadır. Kültür sırasında fare kemik iliğinden izole edilen hücreler, plastik yapışma özelliklerini sergilemiş ve koloni oluşturan birim-fibroblastlar olarak adlandırılan iğ şeklindeki kolonileri oluşturmuştur. Mezodermden gelişen özel hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı bu hücreler, mezenkimal kök hücreler (MKH' ler) olarak adlandırılmıştır. MKH' ler, sıçangillerden insanlara kadar farklı kaynaklardan yetişkin dokularında bulunur. Hücre terapisinde, rejeneratif tıpta ve doku onarımında önemi vurgulanan, kendini yenileyebilen, multipotent, kolay ulaşılabilir olan ve *in vitro* kültürde (istisnai genomik stabilite ve birkaç etik konu dışında) çoğaltılabilen hücrelerdir (Şekil 1.5). Öncelikli olarak mezodermal soyda farklılaşma kapasitelerine odaklanıldıktan sonra, MHK' ler şu an hasarlı ve hastalıklı dokular üzerinde dolaylı modülatör etkilerin yanı sıra doğrudan rejenerasyona izin veren parakrin aktivitelerine atfedilen olumlu etkileriyle de tanınmaktadırlar. MKH' ler, doku onarımını destekleyen, endojen doku progenitörlerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran ve inflamatuar / immün reaksiyonları azaltan parakrin faktörleri salgılarlar (Ceccaldi ve diğerleri, 2017; Ullah, Subbarao, & Rho, 2015). *In vitro*' da kültürlenen MKH' ler,

spesifik ve benzersiz işaretlere sahip değillerdir. Bu yüzden, Hücresel Terapi için Uluslararası Dernek kültürlenen MKH' lerin tanımlanması için en az üç kritere sahip olmaları gerektiğini önermiştir. Bu kriterlerden ilki plastiğe tutunma, ikicisi CD73, CD90 ve CD105' in ekspresyonu, CD11b veya CD14, CD19 veya CD 79α, CD45 ve HLA-DR ekspresyonunun olmaması ve sonuncusu ise adipositlere, osteositlere ve kondrositlere farklılaşabilme potansiyelleridir (Dominici ve diğerleri, 2006).



Şekil 1.5. Mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve farklılaşabildikleri hücre tipleri (Macrin, Joseph, Pillai, & Devi, 2017; Pham, 2016)

İlk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden sonra neredeyse tüm yetişkin dokularda (örn., adipoz doku, sinovyum, dermis, periosteum, süt dişleri), periferik kanda ve organlarda (örn., karaciğer, akciğer, dalak) MKH' ler bulunmuştur (da Silva Meirelles, 2006; Kassis ve diğerleri, 2006). Kemik iliği, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH' ler) olarak adlandırılan koloni oluşturan, fibroblast benzeri bir hücre popülasyonu içerir. Kİ-MKH' ler çoklu soylara (osteojenik, kondrojenik, adipojenik, nörojenik ve miyojenik soylar) farklılaşabildiklerinden, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanım için yetişkin kök hücreler olarak büyük ilgi çekmişlerdir (Andrades, 2013). Ancak, Kİ-MKH' lerin toplanması, kemik iliği aspirasyon prosedürü ile bağlantılı muhtemel ağrı ve morbidite ve sınırlı sayıda MKH 'ler içermesinden

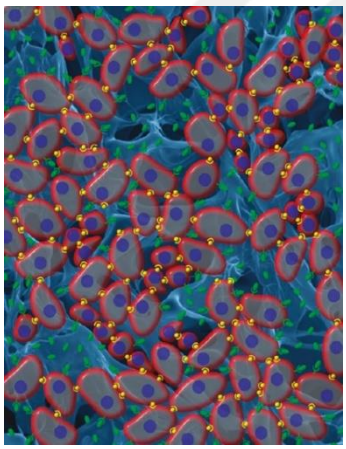
(hasat edilen kemik iliği hücrelerinin sadece nispeten küçük bir miktarı (%0.001-0.01) MKH' lerdir) dolayı sınırlıdır. Kİ-MKH' lerin aynı zamanda çoğalma sırasında erken yaşlanma belirtileri gösterdiği bildirilmiştir (Mohamed-Ahmed ve diğerleri, 2018). Bundan dolayı araştırmacılar yeni MKH kaynakları araştırmaya başlamışlardır.

Uzun yıllar boyunca yağın, öncelikle ve sadece depolama ve üretim için uykuda olan bir enerji rezervuarı olduğu varsayılmıştır. Son yıllarda, liposakşın aspiratının stromal vasküler fraksiyonu (SVF) içinde mevcut olan heterojen hücre karışımı bilim dünyasının ilgisini çekmiştir. Bu hücreler, bu alanda çalışan uluslararası bir araştırmacılar panelinin önerdiği şekilde yağ, kemik, kıkırdak, kas, sinir ve diğer henüz tanımlanmayan dokuların hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip AMKH' ler olarak adlandırılmaktadır. Kökenleri nedeniyle, bu hücreler embriyonik kök hücrelere ilişkin ateşli tartışmalara neden olan etik problemlere sebep olmamaktadır. AMKH' ler, morfoloji, büyüme, transkripsiyonel ve hücre yüzeyi profilleri, in vitro ve in vivo gelişimleri açısından Kİ-MKH' lere oldukça benzemektedir (Tholpady ve diğerleri, 2006). Adipoz dokusundan kültüre edilmemiş SVF' deki kök hücrelerin, genellikle tüm hücrelerin %3' üne kadar ulaştığı ve bunun kemik iliğindeki kök hücrelerin sıklığından 2.500 kat daha fazla olduğu açıklanmıştır (Fraser, Zhu, Wulur, & Alfonso, 2008). Yapılan çeşitli araştırmalar, AMKH' lerin çoklu hücre tipi mezodermal, endodermal ve epidermal kökenli çoklu hücre tiplerine, yani kondrositler, osteoblastlar, fibroblastlar, adipositler, düz kas hücreleri, nöronlar, kardiyomiyositler, hepatositlere ve endotelyal hücreleri gibi hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Baer ve diğerleri, 2010). İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH' ler) kolayca erişilebilir bir otolog kök hücre kaynağıdır, Kİ-MKH' lerden daha yüksek mezenkimal kök hücre sıklığına sahiptir ve insan EKH' leri, iPKH' ler dahil olmak üzere birçok kök hücresi türünün büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Mei ve diğerleri, 2017). Bu bağlamda, kolay ulaşılabilir, daha az invazif yöntemlerle elde edilebilir ve bol miktarda bulunabilir olması ile farklı hücre tiplerine farklılaşabilmesinden dolayı iAMKH' ler doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir kök hücre tipidir.

1.3. Biyomalzemeler

1987' de Williams tarafından bir tıbbi sistemde kullanılacak ve biyolojik sistemlerle etkileşime giren cansız malzeme olarak tanımlanan biyomalzemeler, doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerin tutunabileceği, büyüyebileceği ve çoğalabileceği iskele yapıları için gereklidir (Moatary ve diğerleri, 2017; Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2013).

Hücreler iskelenin malzeme yüzeyi ile kimyasal gruplar (ligandlar) aracılığıyla etkileşime girer ve böylece iskele temel görevi olan hücre büyümesini ve 3B doku oluşumunu destekler (Şekil 1.6). İdeal olarak bir iskele, biyouyumlu olmalı, biyobozunur malzeme ile yapılmalı, doku ve organlara fiziksel destek sağlayan ve aynı zamanda fonksiyonlarını geliştirmek için uygun bir biyoaktif mikro çevre sağlayan HDM' i taklit etmeli, hücre göçüne rehberlik etmeli ve besin ile oksijen taşınmasını sağlamalıdır (Bombaldi de Souza ve diğerleri, 2019; Kirdponpattara ve diğerleri, 2015; Lee & Kim, 2011; O'Brien, 2011). Bunlara ek olarak bir iskele ayrıca, toksik olmamalı, immünojenik olmamalı, optimum mekanik özelliğe sahip olmalıdır. Aynı zamanda, iskele içinde ve iskele ile yerel çevre arasında hücrelerin, gazların, metabolitlerin, besin maddelerinin ve sinyal moleküllerinin taşınması için yeterli gözeneklilik ve morfolojiye sahip olmalıdır (Kumari & Dutta, 2010). 3B iskeleler, kemik rejenerasyonu, sinir rejenerasyonu, kas rejenerasyonu, tendon / ligament rejenerasyonu ve çok daha fazla uygulamalar için geliştirilmektedir. Bu iskeleleri üretmek için, sentetik ve doğal polimerler, geniş çapta özelliklerinden ve biyolojik etkinliklerinden dolayı popüler biyomalzemeler olmuştur (Stratton ve diğerleri, 2016).

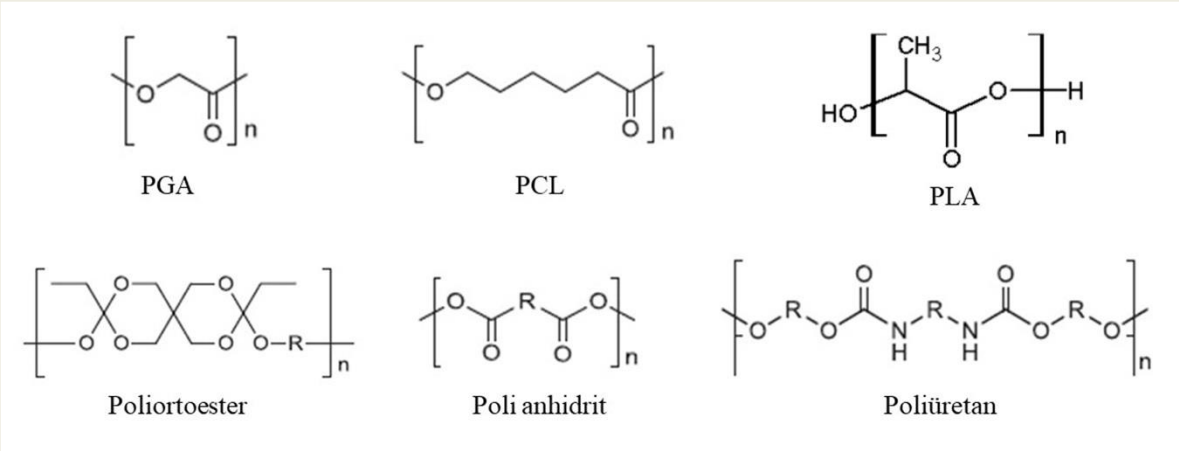


Şekil 1.6. İskeleye tutunan hücrelerin (mavi çekirdekle kırmızı içerisinde) kendileri (sarı) ve iskele ile kimyasal (yeşil) uyarılarla etkileşimi (Shoichet, 2010)

1.3.1. Sentetik Polimerler

Biyomedikal uygulamaların teknolojik ihtiyaçlarını karşılamak için iyi tanımlanmış mekanik ve bozunma özelliklerine sahip çok sayıda sentetik polimerler geliştirilmiştir (Shelke, James, Laurencin, & Kumbar, 2014). Biyobozunur olan ana sentetik polimerler, polyesterleri, poli anhidriti, poliortoesteri, polikaprolaktonu, polikarbonatı ve polifumaratı içerir. Doku mühendisliği uygulamaları (örn., iskeleler şeklinde 3B yapıların oluşturulması

gibi) için geniş kapsamlı kullanılan sentetik polimerler, polikaprolakton (PCL), poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLA) ve bunların poli [laktik-ko- (glikolik asit)] (PLGA) kopolimerleri gibi polyesterlerdir (Şekil 1.7). Bu polyesterler, cerrahi sütürler ve bazı implante edilebilir cihazlar gibi belirli insan klinik kullanımları için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi' nin onayını almışlardır (Chen, Ushida, & Tateishi, 2002; Stratton ve diğerleri, 2016). Aynı zamanda bu polimerler, mekanik esneklik, düşük antijenite, kolay işlenebilirlik ve düşük dereceli kronik kalıcılık dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Ancak, sentetik polimerler iskelelerde istenen biyolojik etkinlik, biyouyumluluk ve hücre tanıma sinyallerinden yoksundur. Ayrıca, toksisiteye, inflamasyona ve immün tepkiye neden olabilmektedirler (Lee & Kim, 2011; Shelke, James, Laurencin, & Kumbar, 2014). Bu yüzden, araştırmacılar iskelelerin üretimi için doğal polimerlere yönelmektedir.

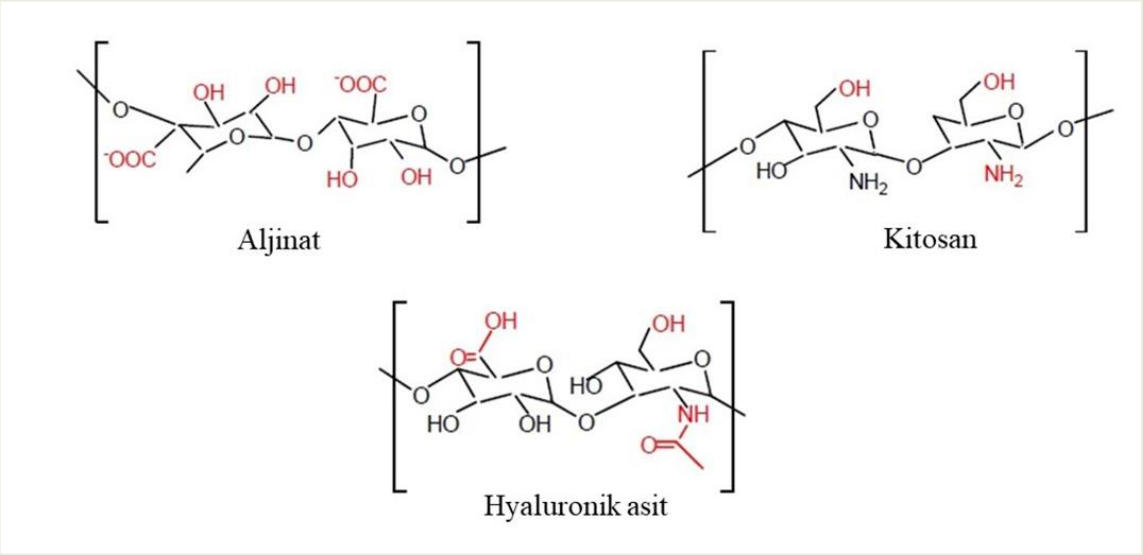


Şekil 1.7. Sentetik polimerlerden bazılarının moleküler yapıları (Mahapatro & Singh, 2011; Zou ve diğerleri, 2018)

1.3.2. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, çeşitli ihtiyaçları karşılamak için doğal bolluk, göreceli izolasyon kolaylığı ve kimyasal modifikasyon için alan dahil sayısız avantaja sahiptir. Bunlara ek olarak, biyolojik ortamlarda enzimatik ve/veya hidrolitik bozulmaya uğrayarak vücut dostu bir bozunma yan ürünü açığa çıkarırlar. Polisakkaritler, bilinen biyouyumlulukları ve biyoaktiviteleri nedeniyle, çeşitli ilaç dağıtımı ve doku rejenerasyon uygulamaları için kayda değer araştırmalarda ilgi alanına sahip önemli bir biyomalzemeler sınıfıdır. Genellikle bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere yenilenebilir kaynaklardan izole edilirler ve saflaştırılırlar. Çeşitli biyomedikal uygulamalar için selüloz, kitin/kitosan,

nişasta, aljinat, hyalüronik asit (HA), pullulan, guar gamı/zamkı, ksantan gamı/zamkı ve glikozaminoglikan (GAG) yaygın olarak kullanılan polisakkaritlerdir (Şekil 1.8). Polisakkarit yapısında bulunan serbest hidroksil, karboksilik ve amin grupları, kimyasal olarak polimerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmeyi mümkün kılar. Polisakkarit temelli gözenekli iskeleler, lif matrisleri, hidrojeller ve mikro ve nano partiküller, çeşitli doku rejenerasyonu uygulamaları için geliştirilmiştir (Shelke, James, Laurencin, & Kumbar, 2014).



Şekil 1.8. Polisakkaritlerin bazılarının moleküler yapısı (Tiwari, Patil, & Bahadur, 2018)

Sinoviyal sıvının ve HDM' in bol miktarda sülfatlanmamış bir GAG bileşeni olan HA olarak da bilinen hyaluronan, yalnızca hareketli eklem yüzeylerinde yağlama sağlamaz. Aynı zamanda, kondrosit proliferasyonunun, göçünün ve farklılaşmanın korunması yoluyla kıkırdak onarımını ve rejenerasyonunu kontrol eder. HA sadece kıkırdak rejenerasyonu için kullanılmamaktadır. Park ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada kemik büyümesi için kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) iletiminde gözenekli HA iskeleleri kullanmış ve *in vitro*' da BMP-2' nin iskele yapılarından aktif bir biçimde sürekli olarak salındığını göstermiştir (Collins & Birkinshaw, 2007; Park ve diğerleri, 2011; Shelke, James, Laurencin, & Kumbar, 2014).

Doğrusal bir polisakkarit olan kitosan, hazır bulunabilmesi, benzersiz fizikokimyasal, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında büyük potansiyel taşır. Kitosan, hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemek ve sonunda bozulmasından sonra yeni doku oluşumunu kolaylaştırmak için liyofilize gözenekli iskeleler

formunda imal edilmektedir (Ji & Shi, 2013). Yang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada liyofilize ederek elde ettikleri kitosan iskelelerin *in vitro*' da 28 günlük kültürden sonra neredeyse bozulduğunu ve ektikleri NIH3T3 (fare embriyonik fibroblast hücre hattı) hücrelerin iskelelere tutunduklarını gözlemlemişlerdir (Yang ve diğerleri, 2010).

1.4. Bitkisel Müsilaj

Genellikle "salgı" olarak adlandırılan müsilaj, gelişme sırasında bitki tarafından salgılanan polisakkaritleri (özellikle pektinler veya hemiselülozlar) veya proteoglikanları (örneğin, yoğun şekilde glikozillenmiş edilmiş arabino-galaktan proteinleri) içine alan geniş kapsamlı bir terimidir. Müsilaj, yaralanma ve patojenik hücre duvarı degradasyonundan sonra salgılanan zamklara (gamlara) benzer şekilde salgılanmaktadır. Her ikisi de bitki hidrokolloidleridir. Bunlar ayrıca yarı saydam amorf maddeler ve bir monosakkarit veya karışık monosakkarit polimerleridir ve birçoğu üronik asit ile değerlendirilir. Gamlar ve müsilajlar, viskoz bir çözelti veya jel oluşturmak için suyla birleştirilen hidrofilik moleküller içerirler ve çeşitli yapısal ve metabolik fonksiyonları yerine getirdikleri bitki, deniz yosunu, mantar ve diğer mikrobiyal kaynak çeşitlerinde yüksek miktarlarda bulunur. Bitki kaynağı, diğer kaynaklara göre en büyük miktarı sağlar. Müsilajlar kaynağına göre; hücre içi müsilaj (çiçek soğanı, meyve eti gibi), hücre membranı müsilajı (dal, kök gibi) ve salgılayıcı tüyler (yaprak gibi) olmak üzere üçe ayrılır. Müsilajlar, toprak içinden kök uzantısını kayganlaştırmak veya topraktaki iyonlar ve/veya mikroplarla etkileşimi teşvik etmek için kökler tarafından salgılanır ve iletim kanalında polen tüpünün büyümesini sağlarlar. Tohum kabuğu müsilajları (TKM' ları), ayıpençesigiller (*Acanthaceae*), ıspanakgiller (*Amaranthaceae*), papatyagiller (*Asteraceae*), gülgiller (*Rosaceae*) ve menekşegiller (*Violaceae*) gibi geniş sayıda (100'den fazla) anjiyosperm (kapalı tohumlu bitki) ailesinde bulunmaktadır (Haruna, Aliyu, & Bala, 2017; Western, 2012). Pek çok anjiyospermin tohum ve/veya meyveleri (diyasporları) ile müsilaj üretimi, miksodiyaspori olarak bilinen yaygın bir fenomendir. Çoğu miksospermöz bitkilerde pektin içerikli müsilaj, tohum/meyve kabuğunun bütünleyici bir parçası olan müsilaj salgılayan hücreler (MSH' ler) ile üretilir. Müsilaj katmanı, tohumun farklılaşması sırasında MSH' lerin özelleşmiş apoplastında (boşlukta) biriktirilir (Kreitschitz & Gorb, 2018; Ranocha, Francoz, Burlat, & Dunand, 2014). Müsilajların aşırı hidrofilik olmaları polisakkarit ve asidik niteliklerinden dolayıdır. Kuru tohumların su ile ıslanması üzerine, hızla hidratlanan müsilaj genleşir, yüzeysel dış primer hücre çeperi yırtılır, tohumu saran viskoz mukoza salınır ve böylece hidrojeller veya hatta süper emici polimerler oluşturulur. Bu durumda, TKM sadece tohumu çevreleyen

epidermal hücrelerini içeren birincil hücre duvarlarından geçmez, aynı zamanda jel benzeri zarf şeklinde tohumun etrafını sarar ve su tutmasını sağlar (Kreitschitz & Gorb, 2018; Ranocha, Francoz, Burlat, & Dunand, 2014; Western, 2012). Tipik olarak tüm bitki hücresi duvarları birkaç ortak özelliği paylaşır. Üç ana polisakkarit grubundan, yani, pektin ve hemiselülozlardan oluşan matris fazı için mekanik çerçeveyi oluşturan selüloz mikro-iplikçiklerinden oluşurlar. Bu bileşenlerin tümü, tipik olarak müsilajda bulunur ve çeşitli bitki taksonlarının müsilaj diyasporlarında tespit edilmiştir (Kreitschitz & Gorb, 2018).



Şekil 1.9. Mısırın dışarıdaki kökleri tarafından üretilmiş müsilaj (Van Deynze ve diğerleri, 2018)

Müsilajlar tipik olarak, yüksek oranda dallanmış hidrofilik polisakkaritlerin (molekül ağırlığı> 200,000 Da) değişen ayrıntılı yapısına sahiptir. Kimyasal olarak, müsilajlar gamlara (zamklara) ve pektine benzer, ancak bazı fiziksel özelliklerde farklılık gösterir. Örneğin, gamlar yapışkan koloidal dispersiyonlar oluşturmak için suda şişerken, müsilaj kaygan, sulu koloidal dispersiyonlar oluşturur. Müsilajlar ayrıca bitkilerin normal metabolik ürünüdür, oysa gamlar patolojik ürünlerdir (Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013). Şekil 1.10' da gamlar ve müsilajların ortak özellikleri ile birbirleri arasındaki farklar özetlenmiştir.



Şekil 1.10. Gamlar ve müsilajların ortak özelliklerini ve farklılıklarının özeti (Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013)

Aktif bir bileşen olarak, bitki müsilajları çökeltici özelliğe sahiptir ve öksürük önleyici olarak kullanılır. Laksatif özelliği de bulunmaktadır. Müsilaj uygulamaları, farmasötik endüstrisinde koyulaştırıcılar, su tutma ajanları, süspanse edici ajanlar ve dağıtıcılar olarak kullanımları için daha da genişlemiştir (Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013). Tablo 1.1 'de müsilajların farklı kullanım alanları özetlenmiştir. Bunlara ek olarak, geleneksel tıpta ishal, hemoraji ve lokal inflamasyon ile nodal cüzzamda yumuşatıcı ve yatıştırıcı ajanlar olarak alındığı bilinmektedir. Geleneksel tıpta kullanımlarına örnek olarak, bamya müsilajı bağırsak yoluyla emilen kan şekerlerinin emilme hızını düzenlerken, suda çözülemeyen çemenotu müsilajı diyabet, hazımsızlık, karaciğer büyümesi ve kronik öksürük tedavisinde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, su tutma ve stabilizasyon ile dondurma, et ürünleri, çabuk puding, süt ürünleri, şekerlemeler, fırınlanmış ürünler ve soslar için stabilizatör olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, kozmetiklerde, dokumacılıkta (boya koyulaştırıcı olarak), litografide, boyalarda, kâğıt endüstrilerinde (hafif kâğıt üreticileri için ayırıcı madde ve bağlayıcı olarak) ve seramikler ile şekerlemelerde kıvamlaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Literatürde en iyi karakterize edilen bitkisel müsilaj kaynakları sarı hardal, keten, fesleğen, çiya tohumları ve ayva çekirdeğidir (Haruna, Aliyu, & Bala, 2017; Soukoulis, Gaiani, & Hoffmann, 2018).

Tablo 1.1. Müsilajların kullanım alanları (Chaudhary, Sharma, & Rana, 2014; Wadhwa, Nair, & Kumria, 2013)

FARMASÖTİK KATKILAR	GIDA ENDÜSTRİSİ	TERAPÖTİK AJANLAR
Kıvamlaştırıcı Ajan	Dondurma	Antifungal
Jelleştirici Ajan	Et Ürünleri	Mukoadesifler
Bağlayıcı Ajan	Hazır Puding	İmmünostimülasyon
Dağıtıcı Ajan	Süt Ürünleri	ADE* İnhibitörü
Süspanse Edici Ajan	Şekerleme	Yara İyileşmesi
Film Oluşturucu	Meşrubatlar	Hipolipedemik
Kaplayıcı Ajan	Unlu Mamuller	Anti Kanser
Emülgatör	Soslar	Anti Diyabetik
Matris Oluşturucu	-	-
Granülatör Ajanı	-	-

*Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

1.5. Ayva

Gülgiller (Rosaceae) ailesinin *Cydonia* cinsinin tek üyesi olan ayva (*Cydonia oblonga* Miller veya *Cydonia vulgaris* Persoon), Güneybatı Asya, Türkiye ve İran'daki kayalık yamaçlara özgü, Orta Doğu, Avrupa ve Güney Afrika'da besin ve tıbbi bitki olarak yetiştirilen çok yıllık bir ağaçtır (Şekil 1.11 (A)) (Ghafourian, Tamri, & Hemmati, 2015; Noshad, Nasehi, & Anvar, 2017). Orta Doğu'da çok geniş bir tarihe sahip ayvanın, Cennet Bahçesi'nin hikayesinde geçen yasak meyve olabileceği belirtilmektedir. Ayva için kullanılan eski İncil ismi "Altın Elma" olarak tercüme edilmektedir. Ayva ekimi, bir zamanlar Mezopotamya olarak bilinen şu anki Irak bölgesinde, günümüzdeki elmanın (*Malus domestica*) ekiminden çok daha eski ve yaygın bir pratiktir (Şekil 1.11 (B)). Eski Yunan inanışına göre, aşk tanrıçası Afrodit'e kutsal olan meyvenin ayva olabileceği söylenmektedir. Gerçekten de Paris'in Afrodit'e verdiği ve Truva'nın çöküşüne yol açan Hesperides'in altın elmasının bir ayva olduğuna inanılmaktadır (Karar ve diğerleri, 2014).



Şekil 1.11. (A) Ayva ağaçları, (B) altın elma olarak da bilinen ayvayı elinde tutan Herkül heykeli (Abdollahi, 2019)

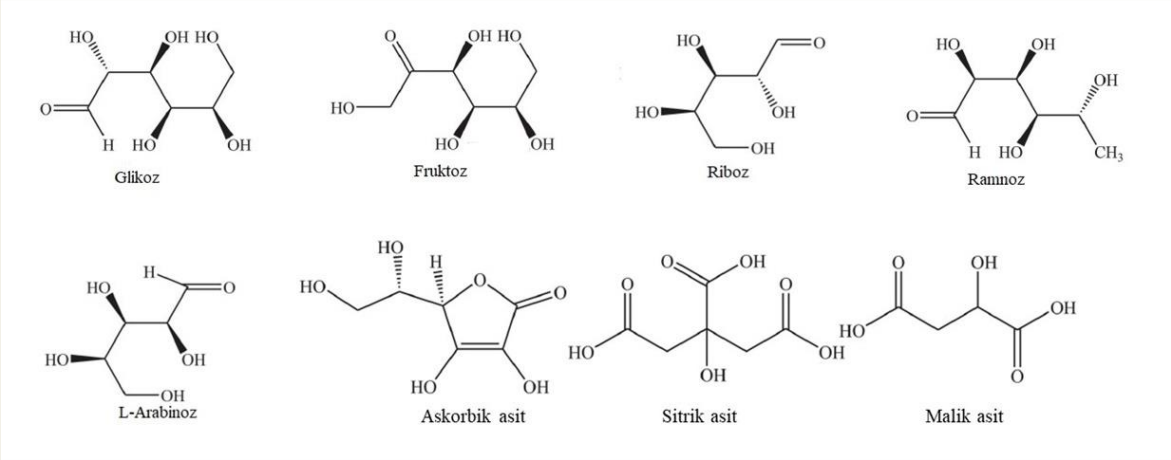
1.5.1. Ayva Meyvesi

Günümüzde ayva meyveleri, antioksidan ve anti ülseratif özellikler gibi sağlığı teşvik edici etkileri için iyi, düşük maliyetli ve yaygın olarak bulunan bir diyet kaynağı olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.12). Aynı zamanda, fenolik bileşenler için ekonomik ve doğal bir kaynak olarak sayılmaktadır (Karar ve diğerleri, 2014; Oliveira ve diğerleri, 2007). Meyve, malik asit (%12 ± 0,8), indirgen şekerler (%5,0 ± 1,0), tanenler (%0,8 ± 0,02), C vitamini (16,8 ± 0,8 mg/100 mg), pektin (%1,8 ± 0,1) ve bunlara ek olarak potasyum (248,0 ± 0,02 mg/100 mg), sodyum (8,0 ± 0,03 mg/100 mg), kalsiyum (18,0 ± 0,02 mg/100 mg) ve fosfor (26,0 ± 0,04 mg/100 mg) gibi mineralleri içermektedir (Rop ve diğerleri, 2011; Sharma, Joshi, & Rana, 2011). Meyvelerin ve sebzelerin kalp hastalıkları, yaşlanma ve kanser risklerini azalttığı iyi bilinmektedir (Fattouch ve diğerleri, 2007). Bu sağlık faydalarının sebebi ise, fenolik bileşenlerin güçlü antioksidan potansiyellerine ve bitkilerde var olan flavanoidlere atfedilmektedir (Branca Maria Silva ve diğerleri, 2004). 2002' de Silva ve ark. yaptıkları çalışmada, ayvanın meyvesinde antioksidanların ve meyvenin kabuğunda ise flavanoidlerin varlığını göstermişlerdir. Bunlara ek olarak, kabukta ve meyvenin etli kısmında askorbik, malik ve sitrik asit gibi organik bileşenlerin varlığını da doğrulamışlardır (Branca M. Silva ve diğerleri, 2002). Bir başka çalışmada, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile meyvede ramnoz, mannoz, D-glikoz, L-arabinoz ve galaktoz monosakkaritleri bulunmuştur (Hopur ve diğerleri, 2012). Şekil 1.13' de ayva içerisinde yer alan monosakkaritlerin ve organik asitlerin moleküler yapıları yer almaktadır. Ayrıca, meyvedeki polisakkaritlerin tirozin fosfat aktivitesini inhibe etmesi ile tip II diyabeti ve obeziteyi tedavi etme kapasitesi gösterilmiştir (Yıldırım, Oktay, & Bilaloğlu, 2014). Yüksek

performans anyon değişimi kromatografisi ile gerçekleştirilen bir çalışmada, geç bahar döneminde dona maruz kalan üç farklı ayva çeşidinin meyvelerinin karbonhidrat metabolizmaları incelenmiştir. Sonuçta, don olayının üstesinden gelmek için ayvaların karbonhidrat içeriklerinde değişiklikler yaparak kendilerini korudukları belirlenmiştir (Akšić ve diğerleri, 2015). Polisakkarit ve fenolik bileşenlerin yanı sıra meyvede amino asitlerin varlığı da kanıtlanmıştır. Meyvede toplam amino asitlerin %75-85' ini L-Aspartik asit, L-glutamik asit, L-sistein, hidroksiprolin ve L-serin oluşturmaktadır. Meyve kabuğunda ve etli kısımlarda benzer 21 amino asitler bulunmaktadır (Branca M. Silva ve diğerleri, 2004; Branca Maria Silva ve diğerleri, 2004). Ayva yaprakları da biyoaktiflerin varlığı nedeniyle hiperkolestrolamide spermatojenez üzerine koruyucu etki (Ashrafi ve diğerleri, 2013), anti-fungal (Forootanfar ve diğerleri, 2012), renoprotektif ve hepatoprotektif potansiyel (Jouyban ve diğerleri, 2011), anti-aterojenik (Khademi, Danesh, Mohammad Nejad, & Soleimani Rad, 2013), kolon kanser hücrelerine karşı anti-proliferatif etki (Carvalho ve diğerleri, 2010) ve antioksidan potansiyel (Costa ve diğerleri, 2009) gibi medikal uygulamalara sahiptir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Ayva ağacının meyvesi ve yaprakları (Sharma, Joshi, & Rana, 2011)



Şekil 1.13. Ayvanın çeşitli bölümlerinde yer alan monosakkaritler ve organik asitlerin bir kısmının moleküller yapısı (Muhammad U. Ashraf, Muhammad, Hussain, & Bukhari, 2016)

1.5.2. Ayva Çekirdeği

Hidrokolloidler, gıda sistemlerinde jelleştirme maddeleri, yapı modifikasyonu ve stabilizatörler gibi çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılır. Güvenlik, bulunabilirlik ve düşük işlem maliyetlerine göre, bitki çekirdekleri ve tohumları yeni hidrokolloid kaynakları olarak iyi bir potansiyele sahiptir. Ayva çekirdekleri de hidrokolloid kaynaklarından biridir. Ayva çekirdekleri, kahverengi olup 7 mm uzunlukta, 5 mm genişlikte ve oval şeklindedir (Şekil 1.14). Çekirdek içi, glikozit amigdalin, tanen, müsilaj (yaklaşık %22), sodyum karbonat (%1,3) ve yağ (%14-19) içerir (Jouki, Mortazavi, Yazdi, & Koocheki, 2014; Khare, 2007). Çekirdek, güvenilir bir müshil, kan durdurucu ve anti-inflamatuardır (Tamri, Hemmati, & Boroujerdnia, 2014). Kuzey ve merkez Portekiz' den toplanan ayvaların çekirdeklerinin liyofilize edilmesi ile yapılan bir çalışmada, HPLC-DAD (diyot dizisi dedektörü ile HPLC), HPLC-UV (HPLC- ultraviyole) ve alev iyonlaşma detektörlü gaz kromatografisi kullanılarak fenoliklerin, serbest amino asitlerin ve organik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Çekirdekte toplam amino asitlerin %60-75' ini L-Aspartik asit, L-glutamik asit ve L-asparjin oluşturmaktadır (Branca M. Silva ve diğerleri, 2005).

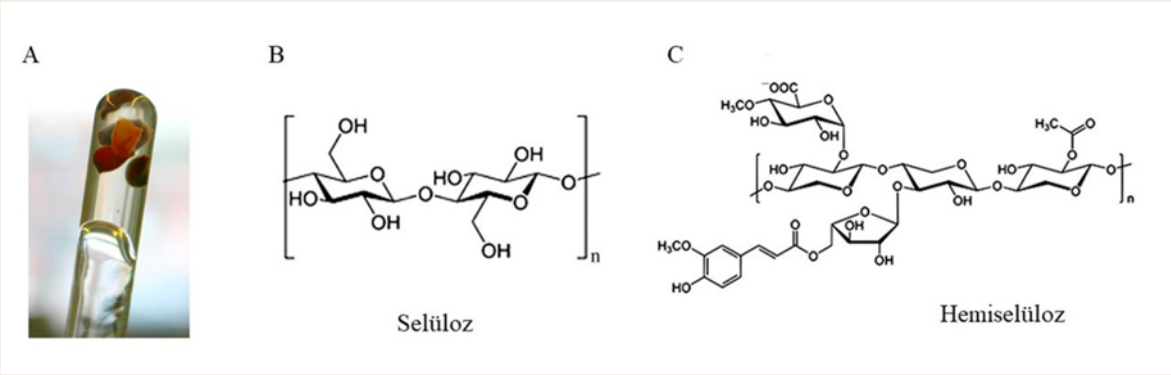


Şekil 1.14. Ayva meyvesinin çekirdeği

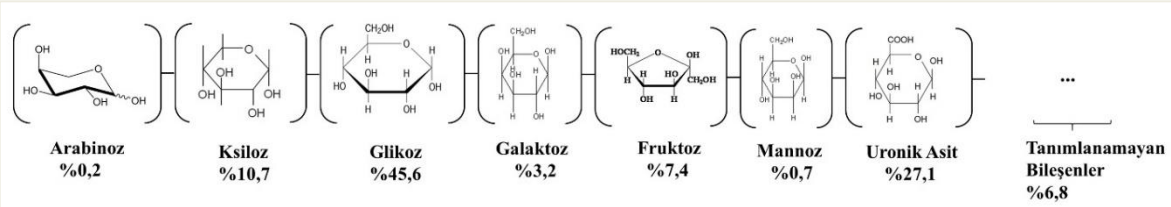
1.5.3. Ayva Çekirdeği Müsilajı

Suyla temas ettiğinde ayva çekirdekleri suyu hemen emer, yapışkan ve tatsız bir sıvı olan ayva çekirdeği müsilajını (Şekil 1.15 A) salgılar (Jouki, Mortazavi, Yazdi, & Koocheki, 2014). Ayva çekirdeği müsilajı, alındığında yatıştırıcı ve dinlendirici bir etkiye sahiptir ve özellikle çocuklarda solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, harici olarak küçük yanıklara da uygulanmaktadır (Tamri, Hemmati, & Boroujerdnia, 2014). En eski çalışmaya göre ayva çekirdeği müsilajı, metoksiüronik asitlerin doğal oluşumuna bir örnek ve daha kolay hidrolize olmaya hazır polisakkaritli selülozik fraksiyonun bir kompleksidir. Ayva çekirdeği müsilajının asidik hidrolizi, inorganik tuzlar, yaklaşık %33 selülozik çökelti, küçük miktarda arabinoz, aldobiyonik asit karışımı, ksiloz ile kombine olmuş metillenmiş ve metillenmemiş heksüronik asitlerin karışımını içermektedir. Zeisel analizi, ayva çekirdeği müsilajının %72 monometillenmiş ve %28 metillenmemiş heksüronik asit içerdiğini göstermektedir (Renfrew & Cretcher, 1932). Ayva çekirdeği müsilajının farklı bileşenlerini araştırmak için yapılan bir başka araştırmada, asidik hidroliz L-arabinoz, D-ksiloz ve aldobiyoüronik asitlerin varlığını ortaya çıkararak ayva çekirdeği müsilajının bir selüloz ve suda çözünür polisakkarit karışımı olduğunu göstermiştir (Smith & Montgomery, 1959). Bu çalışmadan yola çıkan Lindberg ve ark. (1990), yüksek oranda gluküronik asit içeren kısmen O-asetilenmiş (4-O-metil-D-glukurono)-D-ksilan olarak ayva çekirdeği müsilajının suda çözünen kısmının yapısını açıklamıştır. Hidrolize göre, ayva çekirdeği müsilajı arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz ve glikoz içermektedir. Karbazol metodu üronik asidin varlığını da doğrulamıştır (%35) (Şekil 1.16). Şeker analizi, ayva çekirdeği müsilajında D-ksiloz, 4-O-metil glikoz ve D-glikozu ortaya çıkarmıştır. Metilasyon analizi ise, ayva çekirdeği müsilajında 2,3,4-tri-O-metil-D-ksiloz, 2,3-di-O-metil-D-ksiloz, 3-O-metil-D-ksiloz ve 2,3,4-tri-O-metil-D-ksilozun 4-O-metil-α-D-glukopiranozilüronik asit ve α-D-glukopiranozilüronik asit ile 2 pozisyonda

gözlenen (1→4)-β-D-ksilan temelinde dallanması gibi farklı şekerleri ve bunların miktarlarını açıklamıştır (Lindberg ve diğerleri, 1990). Ayva çekirdeği müsilajının aynı zamanda, yüklü üronik asitlerden oluşan (glukuronoksilan) büyük bir hemiselüloz fraksiyonu ve selüloz fibrillerini içerdiği belirtilmektedir (Şekil 1.15 B ve C). Bunlara ek olarak, karbohidrat bazlı bir fibril materyali olarak ayva çekirdeği müsilajının, kıkırdak ve diğer türlerde bulunan suyla-emici proteo-glikanlar ve kollajen fibril tarafından desteklenen hidrojel yapısındaki sinoviyal sıvıları ile benzerliklere sahip olabileceği düşünülmektedir (Hakala ve diğerleri, 2014).



Şekil 1.15. (A) Ayva çekirdeği müsilajı, ayva çekirdeği müsilajı içeriğinde yer alan selüloz (B) ve hemiselülozun (C) basit yapısı (Hakala ve diğerleri, 2014; Yahia, Carrillo-López, & Bello-Perez, 2019)



Şekil 1.16. Ayva çekirdeği müsilajının içeriği (Charrez, Qiao, & Hebbard, 2015; Constable & Dilworth, 2003; Hakala ve diğerleri, 2014; Huffman, 2003; Langan ve diğerleri, 2014; Ramasahayam, Koppuravuri, Arora, & Chowdhury, 2015) (Galaktoz ve mannoz https://www.chegg.com/homework-help/galactose-mannose-constitutional-isomers-stereoisomers-b-dra-chapter-24-problem-10p-solution-9780077274290-exc'den alınmıştır)

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Abeysekera ve Willison (1988) çalışmalarında, müsilajın ayva çekirdeğinden salgılanmadan önceki helikoidal yapısını gözlemlemişlerdir. Çekirdekler ayıklandıktan sonra fosfat tamponlu tuz çözeltisi içinde glutaraldehit ve kakodillenmiş tamponda osmiyum tetroksit ile fikse edilmiş, etanolle dehidralize edilmiş ve küçük çekirdekler bütün olarak LR White reçinesine gömülmüştür. Büyük çekirdeklerin yüzeyinden ince kesitler, küçüklerden ise kalın kesitler alınmıştır. Kalın kesit elektron mikroskobu ile görüntüleme için %2 sulu metilen mavisi ile, ince kesitler ise %2 sulu uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır. İnceleme sırasında örnekler üç faza ayrılmıştır: (I) olgunlaşmamış faz (çiçeklenme dönemi sonrası 1. ve 28. günlerde, çekirdek ve epidermis büyüme aşamasında), (II) geçiş fazı (çiçeklenmeden 7 hafta sonra, çekirdek neredeyse tam boyutta, epidermis tamamen gelişmiş ve periplazmada müsilaj formu oluşmaya başlamış) ve (III) olgun faz (çiçeklenmeden 8 hafta sonra, çekirdek sertleşmiş, büyümemekte ve epidermal periplazma tamamen müsilaj ile dolu). Olgun çekirdeklerin ıslandıklarında bol miktarda müsilaj salgıladığını ancak, olgunlaşmamış olanların müsilaj salgılamadıklarını belirtmişlerdir. Faz II' de müsilajın amorf ve mikrofibriller içerik olmak üzere iki morfolojik yapıya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, mikrofibrillerin oldukça düzensiz yapıda olduklarını belirtmişlerdir. Faz III, kesitlenen çekirdeklerin ıslandıklarında epidermisin müsilajı salgılamaya hazır duruma geldikleri ve sadece çok katmanlı çekirdek kabuğunun dış bölgelerinden müsilajın salgılandığını göstermiştir. Aynı zamanda, bu fazda helikoidal olarak düzenlenen mikrofibrillerin varlığını kanıtlamışlardır. Sonuç olarak, ayva çekirdeğinin geliştikçe periplazmasının müsilaj ile dolduğunu, çekirdek ıslandığında müsilajın hidrolize olarak salgılandığını, hidrolizasyonun ileri aşamasında dağınık mikrofibrillerle çekirdeğin etrafını sardığını ve mikrofibrillerin helikoidal düzenlenmesinin yayılması sonucu dağınık mikrofibriller yapının oluştuğunu belirtmektedirler (Abeysekera & Willison, 1988).

Reis ve ark. (1991) yaptıkları çalışmalarında, ayva çekirdeği müsilajından ekstrakte ettikleri selüloz ve glukuronoksilanın sıvı kristal tipi düzenlenmesini incelemişlerdir. 2-3 gün saf suda beklettikleri ayva çekirdeklerinden müsilajı ekstrakte etmişler ve sonrasında süzmüşlerdir. Müsilajın safsızlıklarından kurtulmak için santrifüj işlemini uygulamışlardır. Süpernatanta selülozik süspansiyon uygulanmıştır. Viskoz damla elde etmek için ise çökelti nazikçe 2-3 gün kurutulmuştur. Elde edilen viskoz damla, etanol serilerinden geçirilerek

dehidralize edilerek LR White metakrilata ve dehidrasyon işlemi yapılmadan suda çözünebilir melamin reçine (nanoplast) içine gömülmüştür. Işık mikroskobu ile inceledikleri örneklerde müsilajın ksilanlarca zengin gluküronik asit matrisinde dağınık olarak selüloz mikrofibrilleri içerdiğini gözlemlemişleridir. Sitokimyasal metotlarla selüloz ve glukuronoksilan arasındaki ilişkiyi de incelemişlerdir. Ayrıca, helikoidal benzeri bir yapı oluştuğunu da gözlemlemişleridir (Reis, Vian, Chanzy, & Roland, 1991).

Vignon ve Gey (1998) çalışmalarında lif kabağı meyvesinin fiberleri, hint keneviri kabuk lifi ve ayva çekirdeği müsilajından 4-O-metil-D-glukurono)-D-ksilanın izolasyonu ve ^{1}H ve ^{13}C nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopik incelemelerini gerçekleştirmişlerdir. Tolüen ve etanol ile yağ ve balmumları Soxhlet cihazı ile ayrıştırılan lif kabağı ve hint keneviri örneklerinden, amonyum oksalat ve sulu Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) Na_2 çözeltisi ile pektik selülozlar uzaklaştırılmıştır. Sodyum hidroksit (NaOH) ile kalan karışımlar ekstrakte edilmiş ve daha sonra NaOH' i nötralize etmek için hidroklorik asit eklenmiştir. Saf suya karşı diyalize edilen karışımlar liyofilize edilmiştir. Soğuk su ile 24 saat ekstrakte edilen müsilaj, önce santrifüjlenmiş ve sonrasında liyofilize edilmiştir. Kuru müsilaj saf su ile yeniden çözülmüş, setavlon ile çöktürülmüş, çöktürülme sonrası sodyum klorürde yeniden çözülmüş ve etanolle yeniden çöktürülmüştür. Kalan selülozlardan kurtulmak için NaOH ile glukuronoksilanın O-asetillenmesi gerçekleştirilmiştir. Nötralizasyondan sonra saf suya karşı diyalize edilmiş ve sonrasında fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlama sonucu diyalize ve liyofilize edilmiştir. Bu işlemler sonucunda tüm örneklerin 4-O-metil-D-glukurono-D-ksilanın izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İşlenmeyen müsilajın hidrolizatı, 8:54:4:34 oranlarında sırasıyla arabinoz (Ara), ksilan (Xyl), galaktoz (Gal) ve glikozdan (Glc) oluştuğunu ortaya koymuştur. Asetillenmiş alditol türevlerinin toplam hidrolizini ve gaz kromatografisi kütle spektroskopisi analizini takiben karboksil indirgemesi, üronik asidi 4-O-metil gluküronik asit olarak tanımlamıştır. Nötr şekerlerin oranları, karboksille indirgenmiş müsilajda çok az değişmiştir; 7:54:2:24:13 oranlarında sırasıyla Ara, Xyl, 4-O-metil-D-Glc, Gal ve Glc tanımlanmıştır. Müsilajın spektrumları incelendiğinde, anomerik bölgelerde karmaşık yapıların olduğu görülmüştür. Yüksek oranda değişen Xyl yapısı, Xyl kalıntılarının anomerik karbonuna göre sinyallerin çokluğu ile doğrulanmıştır. Karboksille indirgenmiş müsilaj, indirgeme sırasındaki O-asetil gruplarının kaybolması ve buna bağlı olarak karşılık gelen sinyallerin kaybolması nedeniyle biraz basitleştirilmiş bir spektrum vermiştir. Karboksille indirgemeye, 4-O-metil-α-D-Glc' un C-6 karbon atomlarına atanan karakteristik pikin dışındaki kimyasal kaymalardaki küçük değişiklikler eşlik etmiştir. Üronik asit oranı

kolorimetrik metotla müsilaj için yaklaşık %24 olarak belirlenirken, karboksille indirgenmiş müsilaj için %0,5' den az olarak bulunmuştur. Bu da indirgemenin etkisini doğrulamıştır. Üç farklı örnek için 4-O-metil-α-D-gluküronik asit kalıntılarının nispi miktarlarından dolayı NMR spektrumları farklı çıkmıştır (Vignon & Gey, 1998).

Hemmati ve Mohammadian 2000 yılında yaptıkları çalışmalarında yaralı tavşanlar ile çalışmışlardır. Bu çalışmada, hiçbir tedavi uygulanmayan yaralı tavşanlar ile yaralarına sadece eucerin krem uygulanan, yaralarına %1 fenition içeren eucerin krem uygulanan ve yaralarına %5, %10 ve %15 ayva çekirdeği müsilajı içeren eucerin krem uygulanan tavşanların yaralarının iyileşme hızlarını karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak yaralarına %10 ayva çekirdeği müsilajı içeren eucerin krem uygulanan tavşanların daha hızlı iyileştiklerini gözlemlemişlerdir. Buradan müsilajın doku hasarında doğal, iyileştirici bir ajana sahip olabileceğinin sonucunu çıkarmışlardır. Fenition içeren eucerin kremin yara iyileşmesi için etkili, ucuz ve kolay ulaşılabilir olmasına rağmen bu kremin yarada sürekli toksik etkilerinin kontrol edilmesi gerektiğini ancak müsilaj içeren kremin herhangi bir toksik etki yaratmadığını belirtmişlerdir (Ali A. Hemmati & Mohammadian, 2000).

Atalay (2013) yaptığı çalışmada, ekzisyon yaralı sıçanlara ayva çekirdeği müsilajı ve buğday rüşeym yağı uygulayarak yara kapanma sürelerini incelemiştir. Buğday rüşeym yağı uygulanan sıçan grubunda serum fizyolojik uygulanan kontrol grubundan daha hızlı yara iyileşmesi gözlerken, ayva çekirdeği müsilajı uygulanan sıçan grubunun yara kapanma süresi ile kontrol grubunun yara kapanma süresi arasında anlamlı bir farklılık olmadığını tespit etmiştir. Ayva çekirdeği müsilajının konsantrasyonunun yara iyileşmesi için yeterli olmadığından anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna, Hemmati ve ark. (2012) da yaptıkları bir çalışmayı inceleyerek karar vermiştir (Atalay, 2013).

Hemmati ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında, Trikotazin grubundan olan T-2 toksiniyle indüklenmiş dermal toksiteyle yaralanmış tavşanlar üzerinde ağırlıkça %5, %10 ve %15 oranında eucerinle karıştırılmış ayva çekirdeği müsilajlı kremler yara üzerine uygulanmıştır. Ayva çekirdeği müsilajı, kurutulmuş ayva çekirdekleri saf suyun içine atılıp ısıtılarak elde edilmiştir. Ilınmış müsilaj temiz havludan geçirilerek süzülmüştür. Daha sonra müsilaj fırınlanarak kurutulmuştur. Kurutulan müsilaj eucerin içine katılmıştır. Çalışmada ağırlıkça %15 oranında müsilaj içeren kremlerin yara iyileşmesinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Ali Asghar Hemmati ve diğerleri, 2012).

Jouki ve ark. (2014) çalışmalarında kekik yağı içeren ayva çekirdeği müsilajı filmlerinin fiziksel, termal, anti bakteriyel, antioksidan ve bariyer özelliklerini incelemişlerdir. Etanol ile yıkandıktan sonra etüvde kuruttukları çekirdeklerden müsilaj

ekstrakte etmişlerdir. Şişen çekirdeklerin yüzeyinden müsilajı sıyırmak için santrifüj işlemi uygulanmış ve daha sonra müsilaj süzülmüştür. %1 müsilaj, müsilajın ağırlanın %35' i kadar gliserol ile karıştırılarak film solüsyonu hazırlanmıştır. Kekik yağı ise hacimce %0 (kontrol), %1,5 ve %2 olacak şekilde film solüsyonuna eklenmiştir. Anti mikrobiyal filmler elde etmek için film solüsyonu petri kabına konulmuş ve oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Elde edilen filmler, kalsiyum nitrat hekzahidratın doymuş solüsyonu ile en az 48 saat kurutucuda şartlandırılmış ve anti mikrobiyal filmler elde edilmiştir. Antioksidan aktiviteleri için film örnekleri saf suda çözdürülmüş ve sonrasında 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) solüsyonuna eklenmiştir. Reoloji testi ile %1 müsilaj filminin yapay plastik özelliği gösterdiğini bulmuşlardır. %1,5 konsantrasyona kadar kekik yağının filmlerin akış davranışı indeksinde ve tutarlılık katsayılarında bir etkisi olmadığını gözlemlerlerken, %2 kekik yağı konsantrasyonlu filmlerin akış davranışı indeksini ve tutarlılık katsayılarında artış olduğunu bulmuşlardır. Kekik yağı konsantrasyonları arttıkça filmlerin kalınlığının, erime noktasının, su buharı geçirgenliğinin, oksijen geçirgenliğinin DPPH temizleme aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. L. monocytogenes, S. typhimurium, B. cereus, Y. enterocolitica, P. aeruginosa, S. aureus, E. coli, E. coli O157:H7, S. putrefaciens ve V. cholera bakteri suşlarına karşı müsilaj filminin herhangi bir etki göstermediğini ancak S. aureus, Y. enterocolitica ve S. putrefaciens bakteri suşlarında kekik yağlı müsilaj filmlerinin ciddi inhibisyon etki oluşturduklarını bulmuşlardır (Jouki, Yazdi, Mortazavi, & Koocheki, 2014).

Hakala ve ark. (2014) ayvadan elde ettikleri müsilajın güçlü nemlendirici ve kendini hizalama yeteneğine sahip çoğunlukla su, selüloz nanofibrilleri ve glukorononiksilanlar gibi hemiselülozları içerdiğini keşfetmişlerdir. Etanol yıkama ile hidrolize olan müsilajda büyük oranda selüloz, farklı oranlarda ise arabinoz, galaktoz, glikoz, ksiloz, mannoz, fruktoz ve üronik asit sakkaritleri içerdiğini gözlemlemişlerdir. Enzimle yapılan hidrolizde ise glikoz miktarını daha yüksek bulmuşlardır. Aynı zamanda ayva çekirdeği müsilajının karbonhidrat yapısının hidrolizinden kaynaklanabileceğini düşündükleri yağlayıcı özelliği olduğunu da keşfetmişlerdir (Hakala ve diğerleri, 2014).

Tamri ve ark. (2014) ayva çekirdeğini kuruttuktan sonra saf suya atmış ve daha sonra ısıtmıştırlar. Ilındıktan sonra temiz bir havludan geçirilerek müsilajı ayrıştırmışlar. Ayrılan müsilaj fırınlanarak kurutulmuştur. Kuru müsilaj, eucerin ile ağırlıkça farklı oranlarda (%5, %10, %20) karıştırılarak krem olarak hazırlandıktan sonra yara açılmış tavşanlar üzerinde denemiştir. Sonuç olarak, ayva çekirdeği müsilajının yarada doku tamirinde yer alan büyüme faktörlerinin seviyesini arttırdığını bulmuşlardır. Kontrol grubuyla %10 ve %20 müsilaj içeren krem uygulanan deney grubu arasında önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur. %20

müsilajlı kremin daha yüksek hidroksiprolin içeriğine, daha yüksek doku direncine ve daha yüksek seviyede yara sıvısında büyüme faktörüne sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu yüzden, %20 müsilajlı kremin yara iyileşmesini tetiklemede iyi bir potansiyele sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Tamri, Hemmati, & Boroujerdnia, 2014).

Ghafourian ve ark. (2015) yılında yaptıkları çalışmada, ayva çekirdeği müsilajının insan fibroblast hücrelerinin proliferasyonuna etkisini incelemişlerdir. Kurutulmuş ayva çekirdeklerinden elde ettikleri müsilajı etüvde kurutup toz formu elde etmişlerdir. Çalışmada kullanmak üzere son konsantrasyonları 50, 100, 200 ve 400 µg/ml olacak şekilde toz müsilajı yeniden saf suda çözmüşlerdir. İnsan deri fibroblast hücrelerini (HNFF) yeterli bolluğa ulaşana kadar inkübe etmiş ve daha sonra hücreleri toplamışlardır. Toplanan hücrelerin sayımı hemositometre ile yapılmıştır. Deneylerde kontrol grubuna 10 µl saf su eklenirken, diğerlerine 10 µl konsantrasyonları 50, 100, 200 ve 400 µg/ml olan müsilaj eklenmiştir. 12, 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler toplanmış, canlılık için MTT testi uygulanmıştır. Sonuçları incelediklerinde ayva çekirdeği müsilajının, insan fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. 50 µg/ml konsantrasyonlu müsilajın 72 saat sonra proliferasyonda ciddi artışa sebep olurken 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlu müsilajın ise 48 saat sonra proliferasyonda ciddi artışa sebep olduğunu bulmuşlardır. 400 µg/ml konsantrasyonlu müsilajın proliferasyona etkisi olmadığı ancak, sitotoksik etki göstermediğini de belirtmektedirler. Aynı zamanda, 50 µg/ml konsantrasyonlu müsilajın 72 saat sonra proliferasyonda artış göstermesine rağmen diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha büyük olduğunu da açıklamaktadırlar. Bu durumu, düşük konsantrasyonlarda bile müsilajın yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında etkili olmasına bağlamaktadırlar. Yara dokusu etrafında müsilajın fibroblastların proliferasyonunu, uygun integrin reseptörlerin eksprese edilmesini ve yara bölgesine fibroblastların göç etmesini uyarıyor olabilmesinden dolayı, ayva çekirdeği müsilajının büyüme faktörlerini içeriyor olabileceğini düşünmektedirler. Son olarak, müsilajın fenolik bileşenlerinin fibroblastların proliferasyonunu arttırmasını açıklıyor olabileceğini belirtmektedirler (Ghafourian, Tamri, & Hemmati, 2015).

Ayva çekirdeği müsilajı yaraya uygulandığında açık havada yüksek su içeriğinden dolayı hızlıca kurumakta ve yavaş yara iyileşmesine neden olabilecek yapısında yeterli gözenekliliğe sahip olmadığından hücre-hücre etkileşimini engelleyebilmektedir. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için 2019 yılında Aghmiuni ve ark., HDM' in fizikokimyasal ve biyolojik fonksiyonlarını taklit edebilecek PCL/ polietilen glikol (PEG) kopolimeri ile modifiye edilmiş ayva çekirdeği müsilajı tabanlı 3B bir iskele

tasarlamışlardır. Ayrıca, PCL/PEG, PCL-kitosan-PEG (PCP), kitosan ve ayva çekirdeği müsilajı iskeleleri de ayva çekirdeği müsilajının rolünü ve hücresel fonksiyonlar, şişme indeksi ve yara salgılarını emme kapasitesi üzerindeki biyolojik makro moleküllerin, doğal ve sentetik polimerlerin kombine etkisini incelemek için üretilmiştir. Hücre sinyalini ve hücrelerin nasıl indükleneceğini ve dermal yaraların nasıl tedavi edileceğini anlamak için iskelelerin fizikokimyasal ve mekanik özellikleri incelenmiştir. Daha sonra, iskelelerin insan dermal fibroblastlarının büyümesini teşvik etmedeki etkinliği ve ayrıca hücre tutunması, çoğalması ve iAMKH' lerin epidermal ve dermal keratinositlere farklılaşması SEM görüntüleme, gen ekspresyon ve immünohistokimyasal analizler ile değerlendirilmiştir. Ayva çekirdeği müsilajı, 2-3 hafta gölgede kurutulmuş ayva çekirdeklerinin gece boyu saf suda yumuşatılması ile çıkarılmıştır. PCL (%3 'lük) ve PEG (%10' luk) tozları gece boyu %70 asetik asit (40°C) ve saf suda (25°C) çözdürülmüştür. PCL/PEG, PEG-ayva çekirdeği müsilajı-PCL (PQSP) ve PCP solüsyonları hacimce sırasıyla 1:1,5 ve 1,5:2:1 olacak şekilde hazırlanarak gece boyu karıştırılmıştır. Polimer zincirleri arasındaki etkileşimi güçlendirmek için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit (EDC)/N-hidroksi süksinimit (NHS) çapraz bağlayıcı ajanları karışımlara eklenmiştir. Karışımlar, QSM ve kitosan 24 kuyucuklu hücre kültürü plastiğinde kalıplanmış, sırasıyla -20 °C ve -80 °C' da 48 saat dondurulmuştur. Gözenekli iskele formu elde edebilmek için dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. İskelelerin üzerine iAMKH' ler ekilerek, iskelelerin biyouyumluluğunu ve biyolojik etkinliğini belirlemek için hücre davranışı (tutunma, çoğalma ve büyüme) incelenmiştir. İskelelerin fizikokimyasal, mekanik ve fiziksel özellikleri incelendiğinde, PQSP iskelesinin 14 gün sonra daha az bozulduğunu (kalan kütle ~%76), daha yüksek şişme oranına (24 saat sonunda ~%443), elastik modülüs değerine (22.8 MPa) ve gözenekliliğe (~%92) ile düşük gözenek çaplarına (ortalama ~30 μm) sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Hücre davranışlarına bakıldığında ise, hücrelerin en çok PQSP iskelelerine, en az ise PCL/PEG iskelesine tutunduğunu belirtmektedirler. Bu durumun ise PCL/PEG iskelesinin hidrofobik yüzeye, basit polimer zincirlerine ve büyük gözenek çaplarına (ortalama ~142 μm) sahip olmasından dolayı kaynaklanabileceğini bildirmektedirler. PQSP iskelelerine tutunmanın fazla olmasını ise, ayva çekirdeği müsilajı ve PEG arasındaki amin ve amit gruplarının daha iyi etkileşmesiyle beraber elastik modülüse, gözenekliliğe ve substratların moleküler yapılarına bağlamaktadırlar. Ayrıca, PQSP ve ayva çekirdeği müsilajı iskelelerinde fibroblastların ve kök hücrelerin çoğalmasını uyaracak büyümeyi teşvik edecek faktörlerin varlığına inanmaktadırlar. İmmünohistokimya analizi ve gerçek zamanlı polimeraz zinciri reaksiyonu ile iAMKH' lerin keratinositlere farklılaşmaları incelenmiştir. Erken farklılaşma işaretleri

Keratin 10 ve 14 ile geç farklılaşma işareti Keratin 18' in ekspresyonlarının diğer iskelelere göre PQSP iskelelerde daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, PQSP iskeleleri yeterli gözenek büyüklülüğüne sahip bir gözenek ağı sağlayarak insan dermal fibroblastlarının çoğalmasını destekleyebilmektedir. Buna ek olarak, yüksek sıvı tutma kapasitesiyle yara salgılarını emebilecek yara örtüsü olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Izadyari Aghmiuni, Heidari Keshel, Sefat, & Akbarzadeh Khiyavi, 2020).

3B hücre kültürü platformu olarak kullanmak üzere Allafchian ve ark. 2019' da elektro eğirme iskelelerin üretimi için PCL ve ayva çekirdeği müsilajını kombinlemiştir. Bu amaca ulaşmak için öncelikle, 24 saat oda sıcaklığında manyetik balık ile saf suda karıştırarak ayva çekirdeklerinden elde ettiği müsilajı santrifüjlemiştir. Daha sonra liyofilize ettiği müsilajı öğüterek toz formuna getirmiştir. Toz formdaki PCL ve müsilaj ayrı ayrı sırasıyla %10 ve %2 konsantrasyonlarında olacak şekilde asetik asit/formik asit (hacimce 1:3 oranında) içerisinde çözdürülmüştür. Polimer çözeltileri farklı oranlarda PCL/müsilaj karışımı (80:20, 70:30, 60:40 ve 50:50 (v/v)) ile hazırlanmıştır. Elektro eğirme ile oluşturulan nanofiberlerin en düzgün yapıya ve küçük çaplara 80:20 ve 60:40 oranlarında karıştırdıkları PCL/müsilaj polimer çözeltisi ile sahip olduklarını keşfettiklerinden çalışmalara bu oranlar ile devam etmişlerdir. Saf PCL, PCL/müsilaj (80:20 ve 60:40) hibrid iskelelerin stres-gerinim profillerini incelediklerinde, saf PCL iskelesinin mekanik dayanımı fazla iken, müsilaj oranı arttığında iskelelerin mekanik dayanımlarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Gözeneklilik testi 60:40 oranında hazırlanan PCL/müsilaj hibrid iskelesini %90 gözenekliliğe sahip olduğunu göstermiştir. FT-IR analizi ile PCL ile müsilaj arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin oluşmadığını belirlemişlerdir. Temas açısı testi, doğal hidrofobik bir malzeme olan PCL' un yaklaşık 120° temas açısına sahip olduğunu göstermiştir. 80:20 ve 60:40 oranlarında hazırlanan hibrid iskelelerde ise temas açıları sırasıyla yaklaşık 40° ve 25°' dir. Hibrid iskelelerde temas açılarının azalmasını ise müsilajın hidrofilik yapısından kaynaklandığını belirtmektedirler. Vero hücrelerini kültürledikleri PCL ve hibrid iskeleler üzerinde hücresel davranışları SEM analizi ile incelediklerinde, mikrograflar hibrid iskeleler üzerinde hücrelerin küre formunu aldıklarını, saf PCL iskelesi üzerinde ise koni formunu aldıklarını gözlemlemişlerdir. MTT testi ile hücre canlılıkları incelendiğinde, canlılığın saf PCL iskelesine göre hibrid iskelelerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, hibrid iskeleler küçük çaplı gözenekleri, hidrofilik ve toksik olmayan yapıları ile hücrelere uygun bir ortam sağladıklarını göstermiştir (Allafchian, Jalali, Mousavi, & Hosseini, 2019).

Ayva çekirdeği müsilajının çeşitli yararları olmasına rağmen, rejeneratif tıp alanında bildiğimiz kadarıyla bu malzemeye çok az ilgi var ve doku mühendisliği alanında sentetik polimer katkı maddeleri ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, doğal ve yenilenebilir olmasından dolayı ayva çekirdeği müsilajının herhangi bir ilave malzemeye ihtiyaç duymadan rejeneratif çalışmalar için ideal bir aday olabileceğini kanıtlamak için ayva çekirdeği müsilajından gözenekli 3B fiziksel yapılar üretmeyi amaçladık.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Çalışmalar boyunca kullanılan ayva çekirdekleri, Çanakkale ilinde mevsiminde toplanan ayvalardan elde edilmiştir. Ayva çekirdekleri, ayvaların etli meyve kısımlarından ayrıldıktan sonra +4 °C'de buzdolabında (Siemens KG57NPW24N, Almanya) saklanmıştır.

Ayva çekirdeği müsilajı, ultra saf su (Merck-Millipore, Milli Q, Burlington, Massachusetts, ABD) ile Rotary-Evaporatör (Rotavapor R-200, Buchi, İsviçre) cihazı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte müsilaj, liyofilizatörde (LyoQuest -55, Telstar, İspanya) dondurularak kurutulmuştur. Mikro-mimarisinin korunması ve sağlamlık kazanması için çapraz bağlama işleminde N-hidroksi süksinimit (NHS) (Merck-Millipore) ve 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit (EDC) (Merck-Millipore) kimyasalları kullanılmıştır.

Satın alınan iAMKH'ler (Merck-Millipore Human Adipose Mesenchymal Stem Cell Kit, kat. no. SCC038, lot no. QVP1303200, ABD) hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Kök hücrelerin ekspansiyonu, özel besi yeri, penisilin-streptomisin ve fötal sığır serumu (Mesenchymal Stem Cell Medium, kat. no. 7501, lot. no. 26260, ScienCell, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmalarında steril hücre kültürü plastikleri (Corning, NY, ABD), pasajlama ve tripsinizasyon için Tripsin/EDTA çözeltisi (Merck T5266, E6511, ABD) kullanılmıştır. Class II A-2 laminar akışlı kabinde (Panasonic MCO-18AC-PE, Japonya) hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. %5 CO_2, %95 hava, %90 bağıl nem, 37 °C'da sıcaklık sağlayan inkübatörde (Telstar Bio II Advance, İspanya) kök hücreler kültürlenmiştir. Mikroskobik görüntülemelerde invert faz-kontrast mikroskobu (Zeiss, Primovert, Almanya) ve ışık mikroskobu (Zeiss, Primostar, Almanya) kullanılmıştır. Hücrelerin iskeleler üzerindeki canlılığı MTT testi (Cell Growth Determination Kit, MTT Based, CGD-1, lot. no. SLBK0829U, Merck, Darmstadt, Almanya) ile belirlenmiştir. Hücrelerin canlılık ve çoğalma seviyelerinin spektroskopik olarak ölçümü mikro plaka okuyucu (Thermo-Scientific, Multiskan™ μdrop™ plate, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

İskelelerin yüzey morfolojisinin ve hücrelerin davranışlarının incelenmesinde FE-SEM (JSM 7100 F EDS, Jeol, Japonya) cihazı kullanılmıştır. İşlem öncesi iskeleler, Altın-Paladyum ile kaplama cihazı (SC7620, Mini Sputter Coater, İngiltere) kullanılarak kaplanmıştır. İskelelerin termal karakteristiği TGA (TGA 8000, PerkinElmer, ABD),

mekanik dayanıklılığı DMA (DMA 8000, PerkinElmer, ABD), yüzey alanları BET analizi (Quadrasorb SI, Quantachrome, ABD) ve fonksiyonel grupları ATR-FTIR analizi (Nicolet IS50 Flex Gold Infrared Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. Histokimyasal karakterizasyon, Hematoksin ve Eozin boyası ile kesitlerin boyanması ile gerçekleştirilmiştir.

Deneylerde saf su (Tip I ve Tip III) çözeltilerin hazırlanmasında ve yıkama işlemlerinde kullanılmıştır. pH değerlerinin belirlenmesi pH metre (Mettler Toledo, ABD), tartımlar hassas terazi (Shimadzu ATX224, Japonya), çözeltilerin ve tamponların hazırlanması ultrasonik banyo (Elma S 30H, Almanya), çapraz bağlama ve yıkama işlemleri çalkalayıcı (Incu-Shaker Mini Benchmark, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

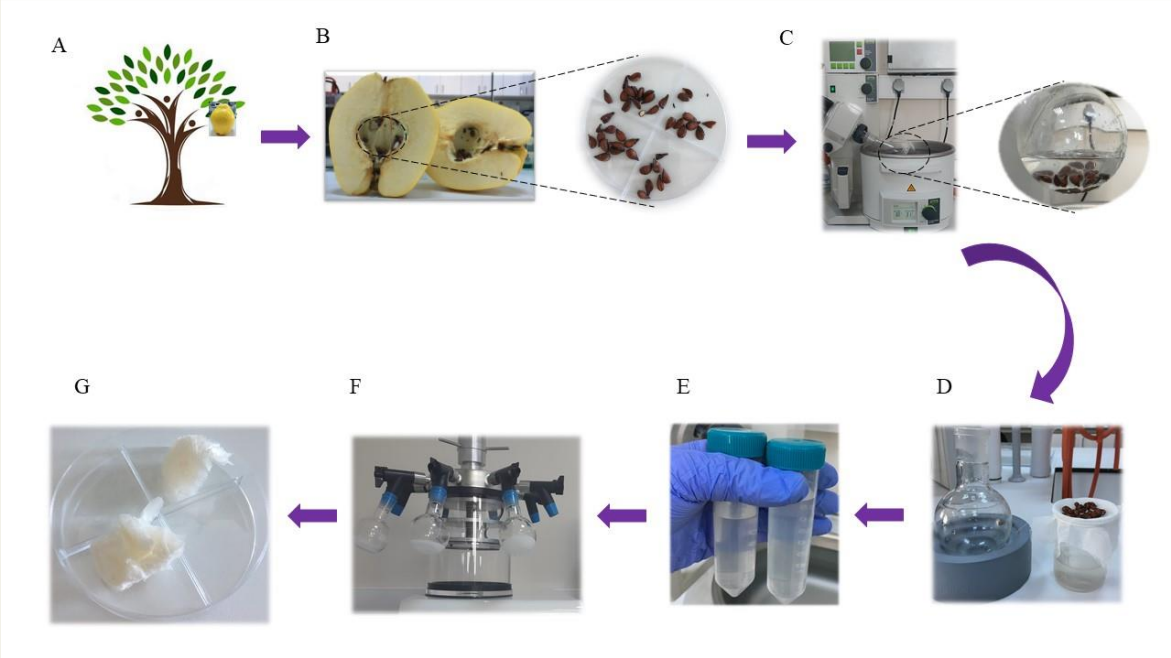
3.2.1. Ayva Çekirdeklerinin Elde Edilmesi

Ayva çekirdekleri, Çanakkale ilinde ekim, kasım, aralık ve ocak aylarında toplanan ayvalardan elde edilmiştir. Çekirdekler, meyvenin etli kısımlarından manuel olarak ayrılmıştır (Şekil 3.1 A ve B). Ayıklanan çekirdekler cam şişeler içerisinde +4 °C'da saklanmıştır.

3.2.2. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstraksiyonu

Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstrakte etmek için ultra saf su kullanılmıştır. Müsilaj elde edilmeden önce, cam balon içerisine 4 g ayva çekirdeği konulmuş ve üzerine 75 ml ultra saf su eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi, gece boyu, 30 °C'da, 6. kademe hızda Rotary cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1 C). Daha sonra, ayva çekirdeği müsilajı katı partiküllerden kurtulmak için üç kat gazlı bezden geçirilerek süzülmüştür (Şekil 3.1 D ve E). Süzülen müsilaj, cam balonlara alınmış ve -26 °C'da en az bir gece dondurulmuştur. Donan örnekler ise daha sonra gece boyu dondurularak kurutulmuştur (Şekil 3.1 F ve G). Kuru ayva çekirdeği müsilajı, 50 ml'lik tüplerde +4 °C'da saklanmıştır. Elde edilen müsilajın verimi denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır:

Yüzde Verim= Liyofilize Müsilaj (kuru ağırlık-mg) / Ayva Çekirdeği (nemli ağırlık-mg) x 100 (3.1)



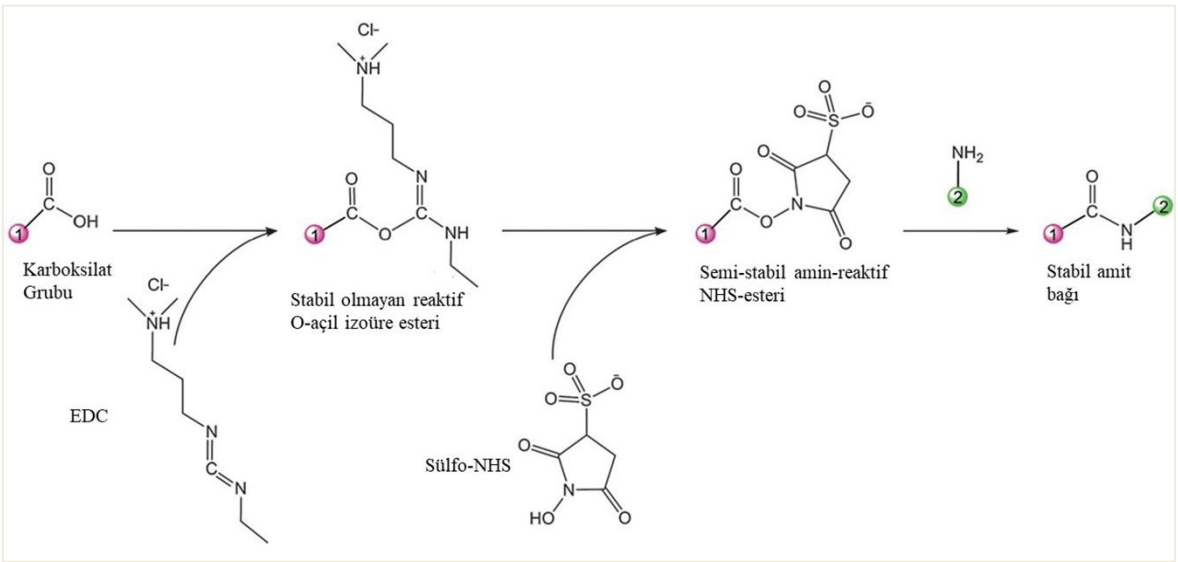
Şekil 3.1. Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstraksiyonu

3.2.3. Ayva Çekirdeği Müsilajı Temelli İskelelerin Hazırlanması

Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler 2 farklı yöntemle hazırlanmıştır. 1. yöntemde iskeleler hazırlanırken konsantrasyon optimizasyonu için, kuru müsilaj ultra saf suda farklı oranlarda çözdürülmüştür. 5 mg/ml ve 7,5 mg/ml konsantrasyonlarında müsilaj çözeltileri hazırlanmıştır. 2. yöntemde, 5 mg/ml konsantrasyonlu ayva çekirdeği müsilajı çözeltisine, ağırlıkça %1 ve %2 gözenek açıcı ajan sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) eklenmiştir. Her iki yöntemde de sıvı ayva çekirdeği müsilajı çözeltileri iskele formu alabilmeleri için, 48 kuyucuklu plastik kalıbın her bir kuyucuğuna 300 µl (5 mg/ml) ve 200 µl (7,5 mg/ml) olacak şekilde dökülerek kalıplanmıştır. Kalıplanan ayva çekirdeği müsilajı, -26 °C'da en az bir gece dondurulduktan sonra gece boyu liyofilize edilmiş ve iskele formunu almıştır.

Hazırlanan ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin, mikro-mimarisinin korunması ve iskelelere rijitlik kazandırmak için çapraz bağlama işlemi iki farklı yöntemle denemiştir. İlk yöntemde çapraz bağlayıcı ajan olarak kalsiyum klorür ($CaCl_2$) kullanılmıştır. 400 mM $CaCl_2$ çözeltisi hazırlanmış, 3 ml çözeltiye iskele eklenmiş ve çapraz bağlama işlemi gözlemlenmiştir. 2. yöntem, Sezgin Arslan'ın (2017) çalışmasındaki çapraz bağlama işleminde değişiklikler uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Buttafoco ve diğerleri, 2006; Sezgin Arslan, 2017). EDC, karboksil gruplarını, tipik olarak aminle reaktif NHS-esterlerin oluşturulması yoluyla birincil aminlerle birleştirmek için kullanılan sıfır uzunluklu bir çapraz bağlama maddesidir. EDC, bir amin-reaktif O-asil izoüre ara ürünü oluşturmak için

bir karboksil ile reaksiyona girer (Şekil 3.2). Bu ara ürün bir aminle karşılaşmadığında, karboksil grubunu hidrolize eder ve yeniden oluşturur. NHS varlığında EDC, karboksilik asit gruplarını aminle reaktif NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılır. Bu, EDC' i asit içeren bir moleküle karıştırarak ve NHS ilave ederek gerçekleştirilir. NHS grubuna bir sülfonik asit grubunun eklenmesi hem aktifleştirilmiş esterin hem de ayrılan grubun suda çözünürlüğünü arttırır, bu da aktivasyon sonrası substratların temizlenmesini kolaylaştırır. Buna dayanarak, öncelikle 0,05 M 2-(N-morfolino) etansülfonik asit (MES) (Sigma, kat. no. M 3885) %70'lik etil alkol (Sigma-Aldrich, kat. no. 32221) çözeltisi içerisinde çözdürülmüş ve daha sonra çözeltinin pH'ı 5,5 olarak ayarlanmıştır. 1 ml MES çözeltisi içerisine EDC (13,8 mg)/NHS (6,72 mg) kimyasalları eklenmiştir. Ultrasonik ile çözme işlemi katı partikül kalmayacak şekilde devam ettirilmiştir. Her bir iskele 1 ml çapraz bağlama solüsyonunun (etanol içerisinde MES + EDC/NHS) içerisine atılmıştır. Çapraz bağlama işlemi 30, 60, 90, 120 ve 240 dakika olacak şekilde oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 150 rpm dönme hızında iskelelere uygulanmıştır. Çapraz bağlanan iskeleler daha sonra 90 dakika çalkalayıcıda 150 rpm' de saf suda çalkalanmış ve fazla çapraz bağlayıcı ajanlardan arındırılmıştır. Yıkama işleminden sonra çapraz bağlı iskeleler, -26 °C'da dondurulmuş ve sonrasında gece boyu liyofilize edilmiştir.



Şekil 3.2. EDC/NHS mekanizması: 1) Karboksil grubu, 2) Amin grubu (Bart ve diğerleri, 2009)

3.2.4. İskelelerin Karakterizasyonu

Çapraz bağlı olmayan iskeleler, çapraz bağlı iskeleler ve hücreli iskeleler karakterize edilmiştir. Karakterizasyon, şişme, sıvı tutma, gözeneklilik testleri ve alan emisyonlu

taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM), attenuated total reflectance Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR), dinamik mekanik analiz (DMA), termogravimetrik analiz (TGA), Brunauer–Emmett–Teller (BET) analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Şişme ve Sıvı Tutma Testleri

Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin şişme davranışlarını gözlemlemek için Kaczmarek ve ark. (2018) çalışmasındaki yöntemde ufak değişiklikler yapılarak şişme testi uygulanılmıştır (Kaczmarek ve diğerleri, 2018). Öncelikle bu test için fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hazırlanmıştır. 500 ml 1X PBS hazırlanabilmesi için, ultra saf su içerisinde 1,35 g dibasic sodyum fosfat (Merck, 04272), 0,2425 g monobasic sodyum fosfat (Merck, 04269) ve 4,5 g sodyum klorür (Merck, 31434) ultrasonik yardımı ile çözdürülmüştür. Çözeltinin pH değerinin 7,4 pH değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Yeni hazırlanan PBS, üç ayrı kaba 10'ar ml olacak şekilde konulmuştur. 3 ayrı iskele kuru ağırlıkları (m_0) tartıldıktan sonra PBS içerisine atılmıştır. Çalkalayıcı 37 °C'ye ayarlandıktan sonra, iskeleler PBS içerisinde 1 saat döndürülmeden bekletilmiştir. 1 saat sonunda nazikçe fazla sıvısı alınan iskelelerin nemli ağırlıkları (m_1) ölçülmüştür. Yüzde şişme oranı denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Yüzde Şişme} = ((m_1 - m_0) / m_0) \times 100 \quad (3.2)$$

Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin içerilerine sıvı alabilme kapasiteleri, sıvı tutma testi ile belirlenmiştir. Bu testte de Kaczmarek ve ark. çalışmasındaki yöntemde küçük değişiklikler yapılmış ve yeni hazırlanan PBS (pH=7,4) kullanılmıştır. Test öncesinde darası alınan üç kaba 10'ar ml PBS konulmuştur ve PBS içeren kapların ağırlıkları (m_0) ölçülmüştür. İskeleler PBS içerisine atılmış ve 37 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcıda 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonunda iskeleler nazikçe alınmış ve kalan PBS kütlesi (m_t) tekrar ölçülmüştür. Yüzde sıvı miktarı denklem 3.3 ile bulunmuştur. Ayrıca, iskelelerin içerilerine aldıkları sıvı miktarı denklem 3.4 ile belirlenmiştir.

$$\text{Sıvı Tutma Yüzdesi} = ((|m_t - m_0|) / m_0) \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Sıvı Tutma (µL)} = (m_0 * \text{Sıvı Tutma Yüzdesi}) / 100 \quad (3.4)$$

3.2.6. Gözeneklilik Testi

Sıvı yer değiştirme tekniğine dayanan gözeneklilik testi, Kim ve ark. (2005) çalışmasına dayanarak gerçekleştirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2005). Test için öncelikle, hacmi bilinen hekzan cam silindir içerisine konulmuştur. Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin, hekzan içerisine atılmış ve 10 dk. bekletilmiştir. Hekzan ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin hacmi ölçülmüştür. Daha sonra, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler hekzan içerisinden alınmış ve kalan hekzanın hacmi ölçülmüştür. Yüzde gözeneklilik denklem 3.5 ile hesaplanmıştır. Denklemde, V_1 bilinen hekzan hacmini, V_2 10 dk. bekledikten sonra Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ve hekzanın hacmini ve V_3 ise Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler çıkarıldıktan sonra kalan hekzan hacmini göstermektedir.

$$\text{Yüzde Gözeneklilik} = ((V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)) \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.7. İskelelerin Fonksiyonel Gruplarının Belirlenmesi

Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin fonksiyonel grupları ATR-FTIR analizi ile belirlenmiştir. Analiz öncesi, çevredeki spektrumların iskeleler üzerindeki etkilerinden kurtulmak için ortamın spektrumları alınmıştır. Spektrumlar, 16 cm^{-1} çözünürlükte 64 defa tekrarlanarak 4000 cm^{-1} ila 650 cm^{-1} aralığında alınmış ve spektrum grafiği çizilirken arka plan spektrumlar elenmiştir.

3.2.8. İskelelerin Yüzey Alanlarının Belirlenmesi

Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin yüzey alanları ve gözenek hacimleri 77 °K' de nitrojen adsorpsiyon/yüzeyden salma eş sıcaklık eğrisi ile BET cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. 0,001 ila 0,99 göreceli basınç altında BET metodu kullanılarak yüzey alanları hesaplanırken, Barrett–Joyner–Halenda (BJH) metodu ile ise gözenek hacimleri hesaplanmıştır.

3.2.9. Mekanik ve Termal Analizler

Çapraz bağlama işleminin iskelenin mekanik ve termal özellikler üzerindeki etkisini belirlemek üzere DMA ve TGA analizleri uygulanmıştır. DMA analizi, dinamik mekanik analizatörün dikdörtgen gerginlik modunda 1 Hz. frekansta gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ve ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler, sırasıyla

11,0 mm x 7,1 mm x 2,4 mm ve 11,0 mm x 8,1 mm x 3,6 mm (uzunluk x genişlik x kalınlık) boyutlarında kesilmiştir. Sonrasında depolama modülüsü (E′) dakikada 1°C sıcaklık artışı ile 25-40 °C aralığında kaydedilmiştir. Diğer yandan TGA analizi ise, nitrojen gazı altında dakikada 20 ml nitrojen gaz akış oranı ve dakikada 10 °C sıcaklık artışı ile 30-800 °C aralığında gerçekleştirilmiştir. Her iki iskeleden de yaklaşık 3'er mg TGA analizi için kullanılmıştır.

3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, Class II A-2 laminar akışlı kabinde gerçekleştirilmiştir. Pasaj sayısı P5 olan -80 °C' da kriyotüplerde saklanan iAMKH 'in hücre çözme işlemi 37 °C' da gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin zarar görmemesi için küçük bir buz kristali yüzeye çıkana kadar hücreler çözdürülmüştür. %5 fötal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin, %1 büyüme faktörlü kokteyli ve %93 mezenkimal kök hücre medyumu içeren özel besi yeri ile oda sıcaklığında 300xg' de 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücreler kriyotüp içerisinde bulunan dimetilsülfoksitten (DMSO) uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant alınmış, çöken hücre pelleti üzerine 3 ml özel besi yeri eklenmiş ve karışım nazikçe pipetlenmiştir. 1 'er ml karışım 3 ayrı 9 'ar ml özel besi yeri içeren T75 doku kültürü plastiğine alınmıştır ve %5 CO_2, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem sağlayan bir inkübatörde hücreler kültüre edilmiştir. Yeterli bolluğa (%80) ulaştıkları ters-faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek belirlenmiştir. Daha sonra hücreler üzerine steril filtrasyondan geçirilmiş PBS içerisinde hazırlanan %0,25 Tripsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreleri yapıştıkları kültür kabından ayırarak besi yerine geçmelerini sağlayan tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tripsinizasyon işleminin gerçekleşebilmesi için 2-3 dakika 37 °C' da Tripsin-EDTA çözeltisini içeren hücreler inkübe edilmiş ve bu işlemi takiben hücreler pasajlanmıştır. 8 ml özel besi yeri eklenerek 15 ml'lik tüplere alınan hücreler oda sıcaklığında 300xg 'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Çöken hücrelere özel besi yeri eklenmiştir ve kalan hücreler hücre dondurma protokolü ile dondurulmuştur. Hücre dondurma protokolü; hücreler 800 µL FBS ve 500 µL tam besi yeri ile süspanse edilir ve daha sonra 150 µL DMSO eklenir. Kriyotüplerde hücreler -86 °C' da saklanır.

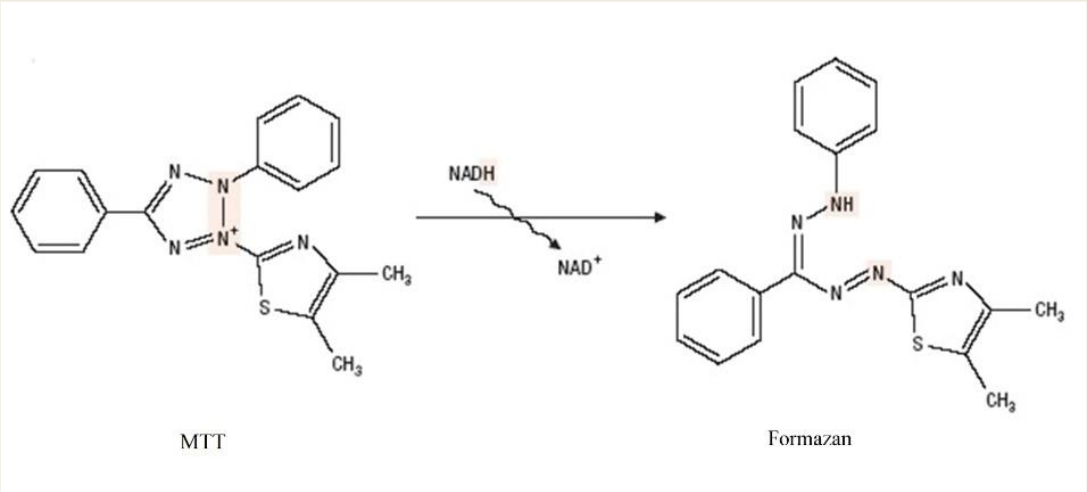
3.2.11. İskeleler Üzerine Hücre Ekilmesi

Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler laminar akışlı kabine alınmış ve 1 saat UV ışık (254 nm) altında sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra iskeleler 48 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine (48'lik well plate) alınmıştır. İskele başına 250,000 P6

hücre yoğunluğunda (150 µl) iAMKH'ler iskeleler üzerine ekilmiştir. Daha sonra, iskeleler üzerine 950 µL özel besi yeri ilave edilerek 48'lik well plate inkübatöre (%5 CO_2, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem sağlayan) konulmuştur. Özel besi yeri 2-3 günde bir değiştirilerek, iskeleler üzerinde 3., 7. ve 10. günlerde hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

3.2.12. Ekilen Hücrelerin İskeleler Üzerinde Canlılığının Belirlenmesi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür testi ya da kısaca MTT testi, hücre sitotoksisitesi, çoğalması veya canlılığını ölçmek için kullanılan basit bir kolorimetrik testtir. Suda çözünebilen MTT, suya sarımsı bir renk verir. Formazan, renksiz veya zayıf renkli tetrazolyum tuzlarının parlak renkli bir türevidir. MTT, dehidrogenazlar veya metabolik olarak aktif hücrelerdeki indirgenme ajanlarıyla indirgendiğinde mor-mavi renkli suda çözünemeyen formazan ürününü oluşturur (Şekil 3.3). Lipitte çözünebilen formazan, organik çözeltilerle ekstrakte edilir ve sonrasında spektrofotometre ile formazanın 570 nm' de absorbans değerleri ölçülür.



Şekil 3.3. MTT testinin prensibi (Sukhramani ve diğerleri, 2011)

Çalışmamızda, MTT testi ile iskeleler üzerindeki hücrelerin canlılık seviyeleri belirlenmiştir. Test öncesi, protokole göre MTT reaktifi ve besi yeri hacimleri hesaplanmıştır. Hesaplama sonrası iskelelerin besi yeri atılmıştır ve kalan besi yerinden kurtulmak için iskeleler 1-2 defa PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan iskeleler yeni bir 48'lik well plate içerisine alınmıştır. Ardından her bir iskele için 30 µl MTT reaktifi ve 270 µl serumsuz besi yeri içeren çözelti iskeleler üzerine eklenmiştir (Şekil 3.4). MTT reaktifini içeren iskeleler 4 saat boyunca %5 CO_2, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem sağlayan inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası iskeleler üzerindeki çözelti uzaklaştırılmıştır. Her bir

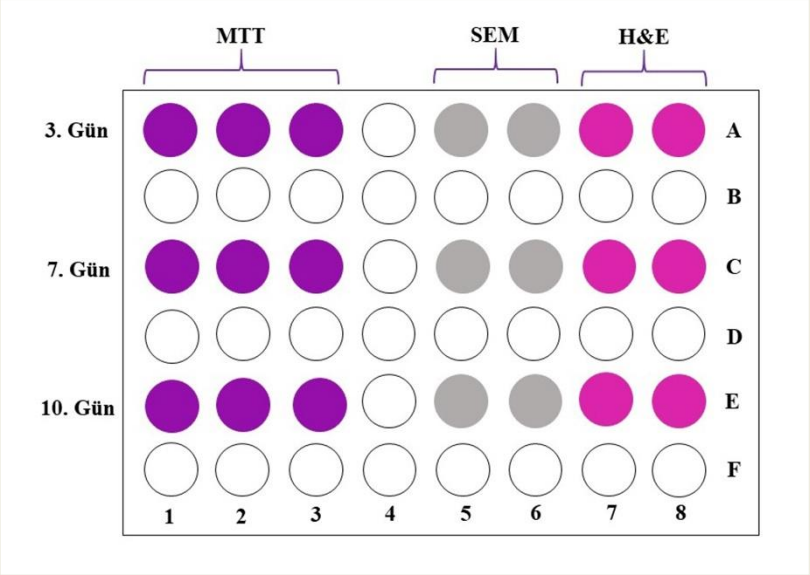
iskele için kit içerisinde yer alan MTT solüsyonu (0,1M HCL içinde su içermeyen izopropanol) 300 µl olacak şekilde eklenmiştir. Bu solüsyona geçen mor renkli formazan kristallerinin 570 nm' deki absorbansları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Belirtilen işlemler kültürün 3., 7. ve 10. günlerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. İskelelerin Yüzey Morfolojisinin ve Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi

Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin yüzey morfolojilerini belirlemek ve iskele üzerine ekilen hücrelerin davranışlarını belirlemek için FE-SEM analizi uygulanmıştır. Hücreli iskeleler ayrıca FE-SEM analizi öncesi %2,5 glutaraldehit (PBS içerisinde hazırlanmış) ile fikse edilmiştir (Şekil 3.4). Hücrelerin görüntülenebilmesi için, fiksatif içerinden alınan iskeleler bolca saf su ile yıkanarak fiksatif ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrası iskele içerisindeki sudan kurtulmak üzere iskeleler %50, %70, %80, %90, %95 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilmiştir ve sonrasında oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Analiz öncesi tüm iskeleler 90 saniye Altın-Paladyum ile kaplanmıştır. 10 kilovatta, farklı büyütme oranlarında ve yüksek vakum altında iletken tüm örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Histokimyasal Karakterizasyon

Hücresiz çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve hücreli iskelelerin histolojik karakterizasyonları yapılmıştır. Tüm iskeleler histolojik analiz öncesi en az 48 saat %10 nötr tamponlu formaldehitte bekletilmiştir (Şekil 3.4). Formaldehitten alınan iskeleler içerisindeki sudan kurtulmak (dehidrasyon) için iskeleler etil alkol serilerinden geçirilmiştir. Dehidrasyon işleminden sonra iskeleler ksilen çözeltisine konulmuş ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklara dönüşen iskelelerden otomatik mikrotomla 3-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler ksilenle deparafinize edildikten sonra yeniden hidrate edilmiştir. Hidratlanan kesitler hematoksilen & eozin boyama protokolü takip edilerek boyanmıştır. Boyalı kesitlerin görüntülenmesi ışık mikroskobuyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. MTT testi, SEM analizi ve hematoksilen & eozin boyama öncesi iskelelerin şematik gösterimi

3.2.15. İstatiksel Analiz

Çalışma boyunca istatiksel analizler Orijin Pro 8SR0 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, ABD) programı ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarının ± standart sapmaları Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programı ile belirlenmiştir. İstatiksel farklılıklar, ANOVA (one-way analysis of variance-tek yönlü varyans analizi) ve Tukey testi ile tespit edilmiştir. Farklılıkların istatiksel olarak anlamlılığı, $p \leq 0,05$ olduğu durumlarda kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstraksiyon Verimi

Çalışmamızda çözücü olarak su seçilmiştir çünkü, müsilaj gibi bitkisel kaynaklı polimerlerin elde edilmesinde su ve alkol (metanol, etanol gibi) sıklıkla kullanılan çözücülerdir. Çözücü olarak metanol seçildiğinde, farmasötik amaçla kullanılacak olan bitkisel fenolik bileşenlerin ekstrakte edildiği görülmektedir. Ancak, çözücü olarak su kullanıldığında ayva dahil keten, fesleğen, nane gibi pek çok bitkilerin tohumlarından müsilaj ekstrakte edilebilmektedir. Elde edilen müsilaj ise emülsiyon stabilatörü, yara iyileştirme ajanı olarak veya ağız yoluyla alınan ilaçların taşınması sisteminde kullanılır (Carvalho ve diğerleri, 2010; Costa ve diğerleri, 2009). Su ile ekstrakte ettiğimiz müsilajın ekstraksiyon verimi %6,28 ± %0,40 (n=3) olarak hesaplanmıştır. Ayva çekirdeği müsilajının farklı yöntemler kullanılarak su ile elde edilmesinin ardından ekstraksiyon veriminin belirlendiği farklı çalışmaları Tablo 1' de görülmektedir. Soukoulis ve ark. (2018) çalışmasına göre müsilaj ekstraksiyon verimi %3-35 arasında değişebilmektedir ve bu değişiklikler çekirdek/tohum boyutu, botanik kaynak, çekirdeklerin ve tohumların genotipi, çözücülerin pH değeri ve sıcaklıkları gibi pek çok etkenlerden dolayı kaynaklanabilmektedir (Soukoulis, Gaiani, & Hoffmann, 2018). Sonuç olarak, diğer çalışmalar ile karşılaştırdığımızda müsilaj sadece su ile daha az aşamalarda ekstrakte edilmiş ve ortalama bir verim elde edilebilmiştir. Bunu göz önüne alarak, literatüre zamandan ve maliyetten tasarruf edilebilecek yeni bir ekstraksiyon yöntemi kazandırdığımızı düşünmekteyiz.

Tablo 4.1. Su ile farklı yöntemlerle ekstrakte edilen müsilajların ekstraksiyon verimleri

Çekirdek/ Tohum	v/m*	Ekstraksiyon Yöntemi	Verim	Referans
Ayva	50:1	Liyofilize çekirdekler öğütülmüştür. Müsilaj, öğütülmüş çekirdeklerin saf suda 30 °C'da 24 saat boyunca ıslatılması ile ekstrakte edilmiştir. Karışım santrifüj edilmiş ve süzülmüştür.	%8	(Kirtil & Oztop, 2016)
Ayva	5:1	Çekirdekler saf su ile 6 saat ıslatıldıktan sonra, karışım 30 dakika 50 °C'da ısıtılmıştır. Karışım süzüldükten sonra saflaştırılmak için n-hekzan ve su ile yıkanmıştır. Saflaştırılan müsilaj santrifüjlenerek çöktürülmüştür ve çökelti olarak toplanmıştır.	%10,4	(Muhammad Umer Ashraf ve diğerleri, 2018)

Ayva	25:1	Saf su ile çekirdekler ıslatıldıktan sonra karışımı 15 °C'dan 65 °C' a kadar ısıtılmıştır. Benzer şekilde karışımın pH değeri 5,3' ten 8,6' a sırasıyla HCl ve NaOH solüsyonları ile çıkarılmıştır. Sonikasyon süresi 1 ile 12 dakika arasında olacak şekilde müsilaj ultrason ile çıkarılmıştır. Ekstrakte edilen müsilaj santrifüjlenmiştir.	%14,09	(Dehghan Sekachaei ve diğerleri, 2017)
Ayva	1:1	Sıcak saf su ile ıslatılan çekirdeklerden müsilaj, 30 dakika sürekli çıkarılmıştır. Süzülen müsilaj %90' lık etanol ile çöktürülmüş ve sıvı ekstrakt 20 saat dinlendirilmiştir. Daha sonra santrifüj işlemi uygulanmış ve sırasıyla etanol, aseton ve dietil eter ile yıkanmıştır.	%11,2	(Turkoz, Kusmenoglu, & Koca, 1998)
Ayva	20:1	Cam erlen içerisinde ıslatılan çekirdeklerden müsilaj, 3 saat 75 °C' da çıkarılmıştır. Süzülen müsilaj %96' lık etanol ile üç kez çöktürülmüş ve santrifüjlenmiş.	%10,97	(Fekri, Khayami, Heidari, & Jamee, 2008)
Keten	20:1	Cam erlen içerisinde ıslatılan çekirdeklerden müsilaj, 3 saat 75 °C' da çıkarılmıştır. Süzülen müsilaj %96' lık etanol ile üç kez çöktürülmüş ve santrifüjlenmiş.	%8,60	(Fekri, Khayami, Heidari, & Jamee, 2008)
Fesleğen	20:1	Cam erlen içerisinde ıslatılan çekirdeklerden müsilaj, 3 saat 75 °C' da çıkarılmıştır. Süzülen müsilaj %96' lık etanol ile üç kez çöktürülmüş ve santrifüjlenmiş.	%2,08	(Fekri, Khayami, Heidari, & Jamee, 2008)
Nane	20:1	Cam erlen içerisinde ıslatılan çekirdeklerden müsilaj, 3 saat 75 °C' da çıkarılmıştır. Süzülen müsilaj %96' lık etanol ile üç kez çöktürülmüş ve santrifüjlenmiş.	%1,88	(Fekri, Khayami, Heidari, & Jamee, 2008)

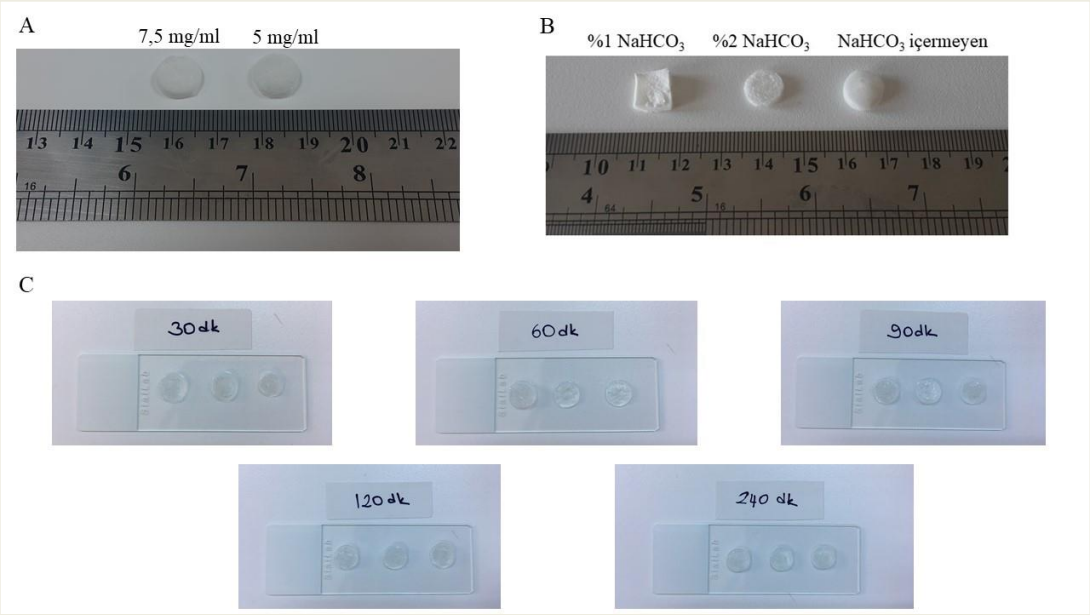
*v/m: suyun çekirdek/tohuma oranı

4.2. Ayva Çekirdeği Müsilajı Temelli İskelelerin Optimizasyonu

Farklı konsantrasyonlarda (5 mg/ml ve 7,5 mg/ml) hazırlanan ayva çekirdeği müsilajı çözeltisi ile elde edilen iskelelerin en iyi formu 5 mg/ml konsantrasyonda aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1 A). 7,5 mg/ml konsantrasyonlarında ayva çekirdeği müsilajı çok viskoz yapıda olduğundan, kalıplamada sıkıntılar yaşanmış ve istenilen iskele formuna ulaşılamamıştır. Bundan dolayı, çalışmanın devamında iskeleler 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ayva çekirdeği müsilajı çözeltisinden elde edilmiştir.

%1 ve %2 $NaHCO_3$ eklenerek hazırlanan iskelelerin ise fazla gözenekten dolayı kırılgan yapıda oldukları ve biçim olarak diğer iskelelere göre uygun formda olmadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1 B). Ayrıca, Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ekstra gözenek açıcı ajanlara ihtiyaç duymadan da gözenekli yapıda olduğu belirlendiğinden dolayı, çalışmanın $NaHCO_3$ eklenmeden devam edilmesine karar verilmiştir.

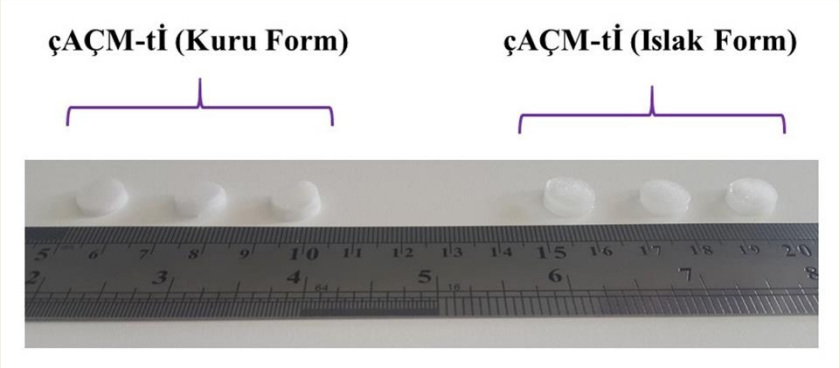
Çapraz bağlama işleminin süresi için en optimum sürenin 120 dakika olduğu görülmüştür. 30, 60 ve 90 dakika çapraz bağlamanın iskelelerin mikro-mimarisini korumada yeterli olmadığı ve doku mühendisliği için uygun bütünlük kazandıramadığı gözlemlenmiştir. 240 dakika çapraz bağlamanın ise aşırı olduğu ve yapıyı kırılgan hale getirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1 C). 120 dakika çapraz bağlama ile iskelelerin uygun bütünlük kazandığı gözlemlendiğinden çalışmaların devamında çapraz bağlama işlemi için bu süre kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Optimizasyon çalışmaları, (A) farklı konsantrasyonlarla hazırlanan Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler, (B) NaHCO3 içeren Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ile NaHCO3 içermeyen iskelelerin karşılaştırılması ve (C) Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin çapraz bağlama sürelerinin karşılaştırılması

4.3. Şişme Davranışı ve Sıvı Tutma Kapasitesi

Şişme oranı, iskelelerin sıvıları emebilme ve besin ve/veya atıkların değişimini sağlayabilme özelliğini tanımlar ve doku mühendisliği uygulamaları için üretilen iskelelerin sahip olmaları gereken en önemli özelliklerden biridir (Nasiri & Mashayekhan, 2017). Buradan yola çıkılarak, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler in şişme kapasitesi test edilmiş ve sonuçta %12680 ± 388,82 (n=3) şişme oranı bulunmuştur (Şekil 4.2). Bir diğer önemli test ise, iskelelerin hücre kültürü sırasında içerisine ne kadar besi yeri alabildiğini gösteren sıvı tutma veya PBS tutma testidir (Davidenko ve diğerleri, 2010). Bu test ile çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler 220 ± 12,3 µl PBS' i veya 10 ml PBS' in %2,19 ± 0,12 'sini (n=3) içerisine alabildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Şişme testi öncesi ve sonrası kuru ve ıslak formlarda çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler

Kitosan (CH) ve kitosan/agaroz karışımı ile üretilen 3B gözenekli yapı iskelelerinin 15 dakika PBS içerisinde kaldıktan sonra %1200 ila 800 arasında yüksek bir şişme oranına sahip olduğunu gösteren Felfel ve ark. (Felfel ve diğerleri, 2019) ya da balık kollajeni, aljinat ve kitooligosakkarit ile hazırladıkları iskelelerin 24 saat PBS içerisinde bekledikten sonra şişme oranlarının %470 ila %670 arasında değiştiğini gözlemleyen Chandika ve ark. (Chandika ve diğerleri, 2015) yaptığı çalışmalar gibi diğer polisakkarit bazlı iskelelerle karşılaştırıldığında, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerimizin üstün şişme ve sıvı alım seviyelerine sahip olduğu görülmektedir. Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin yüksek oranda şişmeye meyilli olmasının nedeni muhtemelen ayva çekirdeği müsilajının amino ($–NH_2$), karboksilik asit (–COOH), amit ($–CONH_2$), hidroksil (–OH) gibi fonksiyonel gruplardan oluşması ve ayrıca ayva çekirdeği müsilajına hidrofilik yapı veren glukuronoksilandır (Hussain, Muhammad, Haseeb, & Tahir, 2019).

4.4. Gözenekliliğin Belirlenmesi

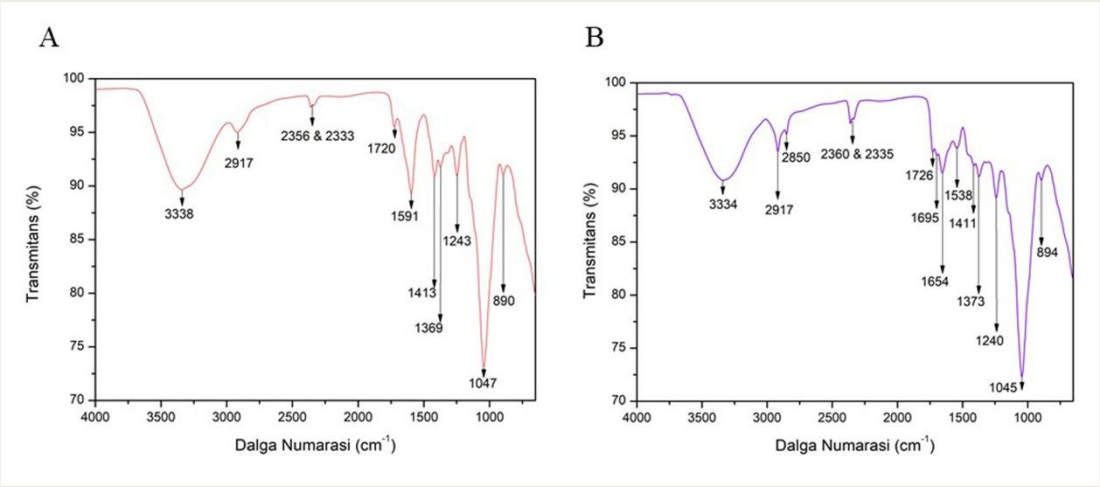
Mühendisliği yapılan iskelelerde gözenekliliğin önemli olma sebeplerinden biri, doğal HDM ortamının yapısını taklit eden hücresel yapı ağının, besin taşınması, hücre sinyalizasyonu ve proliferasyonu için birbirine bağlı gözenekli yapıya dayanmasıdır (Stratton ve diğerleri, 2016). Bu yüzden, çalışmamızda sıvı yer değiştirme tekniği kullanılarak çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin %83,43 ± 2,84 (n=3) oranında gözenekliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Angmiuni ve ark. 2020'de yaptıkları çalışmada PQSP ve ayva çekirdeği müsilajı iskelelerinin gözenekliliğini sıvı yer değiştirme metoduyla sırasıyla %92 ve %61 olarak belirlemiştir (Izadyari Aghmiuni, Heidari Keshel, Sefat, & Akbarzadeh Khiyavi, 2020). Bir başka çalışmada ise Li ve ark. (2005), $CaCl_2$ ile

çapraz bağlanan CH ve kitosan/aljinat iskelelerin gözenekliliğini sırasıyla %84,86 ± 2,18 ve %91,94 ± 0,90 olarak bulmuştur (Z. Li ve diğerleri, 2005). Bu sonuç, çapraz bağlayıcı ajan olarak EDC/NHS' i kullandığımızda $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış alternatiflerle kıyaslandığında çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin benzer bir gözenekliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, herhangi bir polimer ilavesi olmadan da iskelelerimiz yüksek gözenekliliğe sahiptir.

4.5. Çapraz bağlama İşleminin Fonksiyonel Gruplar Üzerine Etkisi

Çapraz bağlama işlemi öncesi ve sonrası fonksiyonel gruplardaki değişimleri incelemek üzere ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere ATR-FTIR analizi uygulanmıştır. Şekil 4.3' te ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin FT-IR spektrumları görülmektedir. 800-1200 cm^{-1} dalga numaraları arasındaki bölge, polisakkaritlerin "parmak izi bölgesi" olarak bilinmektedir. 3338 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 3334 cm^{-1}' de (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) görülen pikler serbest hidroksil gruplarının gerinim bağı ve karboksilik asidin bağlı O-H bantlarını göstermektedir. 2917 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 2850 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri ise metil gruplarının ($-CH_3$) C-H bağının gerinim modunu ve C-H absorpsiyonlarını (CH, CH_2 ve CH_3 gerinim ve eğilme titreşimleri) temsil etmektedir (Razavi, Cui, Guo, & Ding, 2014). 2330-2360 cm^{-1} bölgesi, her iki iskelenin de amino asit gruplarına sahip olduğunu göstermektedir. 1720 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 1726 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri karboksil gruplarının C=O titreşimlerini temsil etmektedir (Bellamy, 1955). Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerde görülen 1695 cm^{-1} ve 1654 cm^{-1} pikleri ise amit I' in C=O ve N-H gerinimlerini göstermektedir. 1591 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 1538 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri ise C-C ve C-N gerinimleri ve N-H eğilimi amit II varlığını göstermektedir. Bu iki pik aynı zamanda, müsilajda çeşitli amino gruplarıyla protein ve/veya glikoprotein içerdiğini de kanıtlamaktadır (Acevedo ve diğerleri, 2017; Mišurcová ve diğerleri, 2012). 1413 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 1411 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri ile C-OO simetrik gerinimleri görülmektedir. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler için 1369 cm^{-1} ve 1243 cm^{-1} pikleri, çapraz bağlı ayva çekirdeği

müsilajı temelli iskeleler için ise 1373 cm^{-1} ve 1240 cm^{-1} pikleri alifatik C-N bağlarının gerinim titreşimlerinin varlığını kanıtlamaktadır. Son olarak, keskin 1047 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 1045 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri ile 890 cm^{-1} (ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) ve 894 cm^{-1} (çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler) pikleri ise, sırasıyla C-O, C-O-C glikozidik, C-O-H bağlarının titreşimlerini ve β-D-monopiranoz yapılarını temsil etmektedir (Acevedo ve diğerleri, 2017; Razavi, Cui, Guo, & Ding, 2014). Bu bilgilerden yola çıkılarak, piklerdeki değişimlerin çapraz bağlama sonrası kimyasal bir reaksiyon ile ayva çekirdeği müsilajında yeni bağların oluşmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 4.3. FT-IR analizi ile fonksiyonel grupların karşılaştırılması, (A) Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler, (B) Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler

4.6. Çapraz Bağlama ile Yüzey Alanındaki Değişiklikler

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanan fiziksel yapıların yüzey alanlarının veya spesifik yüzey alanlarının belirlenmesi, kriyojenik sıcaklıkta (-196 °C) genellikle nitrojen gazı ile örneklerin alınan gaz adsorpsiyon verilerine Brunauere-Emmette-Teller (BET) teorisinin uygulanması ile gerçekleştirilir (Lapham & Lapham, 2017). BJH metodu ile ise gözenek hacimleri hesaplanabilir. Bu bağlamda, çapraz bağlama işlemi ile ürettiğimiz iskeledeki değişiklileri gözlemlemek üzere ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin önce BET analizi ile spesifik yüzey alanları ve sonrasında BJH metodu ile gözenek hacimleri belirlenmiştir. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin için spesifik yüzey alan değeri 9,416 m^2/g olarak bulunurken, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler için bu değer 27,195 m^2/g 'dır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği' nin (IUPAC)

sınıflandırmasına göre Tip II izosıcaklıkta iskelelerin nitrojen adsorpsiyonları, her iki iskelenin de makro gözenekli yapıda olduğunu göstermektedir (Tablo 4.2).

Moarty ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, kitin/kitosan/nano diyopsit iskelelerinin BET analizi ile yüzey alanlarını 18,509 m^2/g ve Teimouri ve ark. (2015) ise ipek fibroin/jelatin/nanohidroksiapatit iskelelerinin yüzey alanlarını 16,365 m^2/g olarak bulmuşlardır. Büyük yüzey alanları ve geniş gözenek hacimlerinin, iskele yüzeyine tutunarak maksimim hücre büyümesini sağlayarak iskelenin potansiyel uygulamalarının artacağını belirtmişlerdir (Moatary ve diğerleri, 2017; Teimouri ve diğerleri, 2015). Bu yüzden, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinin üstün yüzey alanına sahip olmasından dolayı doku mühendisliği uygulamaları için uygun olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.2. BET analizini özetleyen tablo

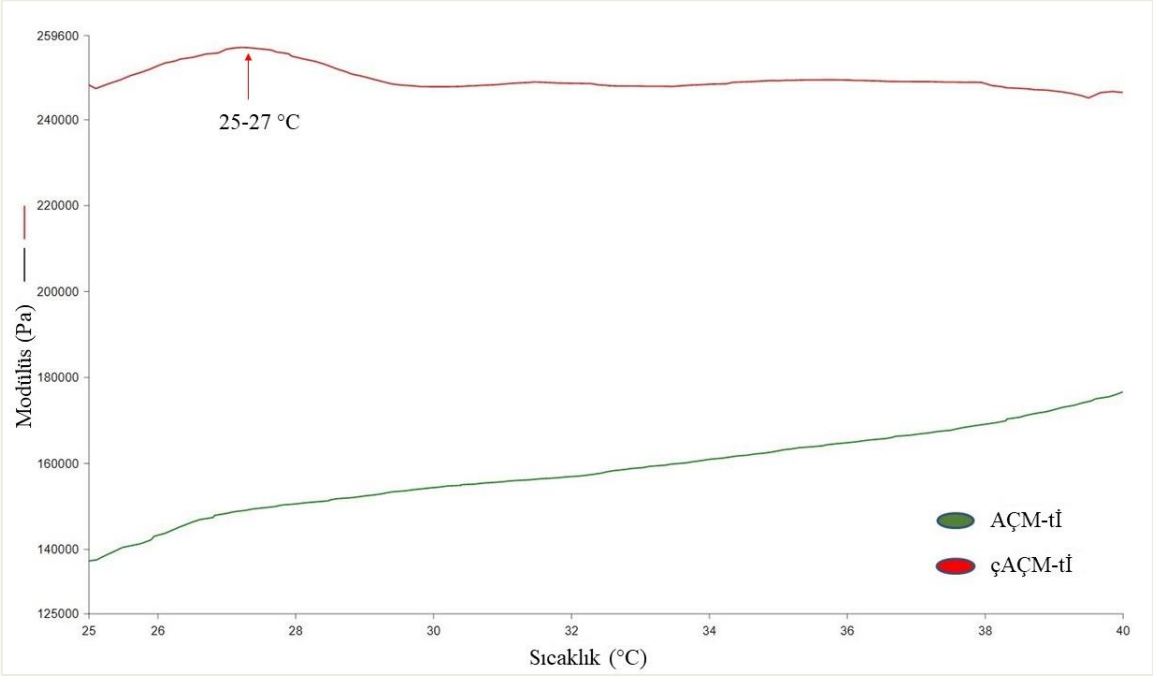
IUPAC Sınıflandırması Altında Toplam BET Yüzeyi			
İskele	Yüzey Alanı (m^2/g)	Gözenek Hacmi (ml/g)	Gözenek Boyutu
Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler	9,416	0,051	Makro gözenek
Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler	27,195	0,071	Makro gözenek

4.7. Çapraz Bağlama İşleminin Mekanik ve Termal Özellikler Üzerindeki Etkisi

Çapraz bağlama işleminin iskelelerin mekanik özelliklilerini nasıl etkilediğini belirlemek üzere DMA uygulanmıştır. Şekil 4.4 'te de görülebileceği üzere, sıcaklık yükseldikçe ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinin depolama modülüs (E′) değeri sürekli artmakta ve en yüksek değerine (176,12 kPa) 40 °C'da ulaşmaktadır. Diğer yandan, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler 25-27 °C sıcaklıkları arasında dönüm noktasına sahiptir. Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler maksimum E′ değerine (258,13 kPa) 27 °C'da ulaşırken, bu sıcaklıktan sonra E′ değeri azalmakta ve sıcaklık yükseldikçe çoğunlukla sabit kalmaktadır.

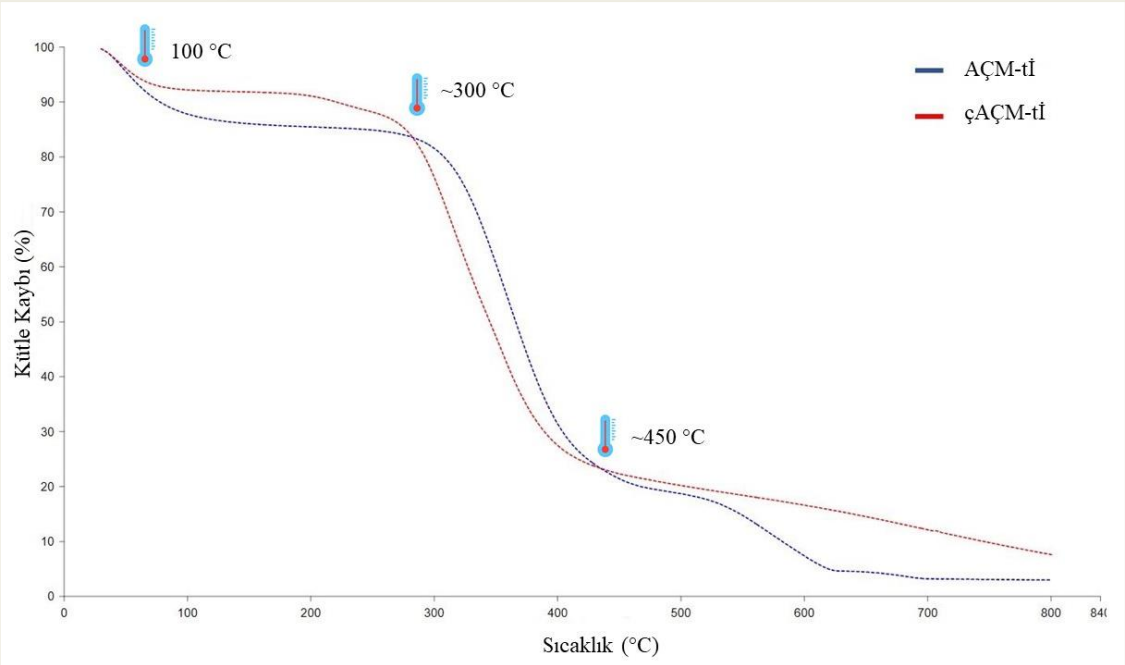
Çapraz bağlamanın mekanik özelliklere etkisi ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde, su kaynaklı poliüretan ve guar zamkı %20-80 oranlarında karıştırılarak biyo kompozit filmler elde edilmiştir. Elde edilen filmler Ca^{+2} ile çapraz bağladıktan sonra DMA analizi

gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlı filmlerin E′ değerinin çapraz bağsız filmlerinkinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun ise Ca^{+2} çapraz bağlayıcı ile iki polimer arasında oluşan kompakt yapıdan kaynaklandığı belirtilmektedir (Huang, Yu, & Xiao, 2006). Diğer yandan, Li ve ark. (2013) ise çalışmalarında CH ve hidroksiapatit ile hazırladıkları iskelelerini farklı derecelerde (%0, %10 ve %50) gluteraldehit (GTA) ile çapraz bağlamışlar ve çapraz bağlamanın mekanik özelliklerine etkisini DMA analizi ile tespit etmişlerdir. %10 derecede çapraz bağlanan iskelelerin en yüksek E′ değerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. %50 derecede çapraz bağlanan iskelelerin ise E′ değerinin %10 derecedekinden daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, depolama modülüsünün çapraz bağlama ile artmasının yapının daha az bozulmasını yani yapının rijit olmasını gösterdiğini belirtirken, aşırı çapraz bağlama işleminin sanılanın aksine örneğin dayanıklılığını azalttığını aktarmaktadırlar (Y. Li, Liu, Zheng, & Xu, 2013). Bu çalışmalardan yola çıkılarak, çapraz bağlama işleminin mekanik dayanımı arttırmıştır ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinin ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere göre daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin DMA grafiği

Çapraz bağlamanın termal özelliklere etkisi ise TGA ile belirlenmiştir. Şekil 4.5 'e bakıldığında ilk aşamada, yani 30-100 °C sıcaklık aralığında ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler de gözlenen sırasıyla yaklaşık %10 ve %5 kütle kaybı, su moleküllerinin (nemin) buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. Yaklaşık 300 °C'da başlayan olay ise polimer ünitelerinin dekompozisyonu ve depolimerizasyonundan kaynaklanıyor olabilir (Lima ve diğerleri, 2013). 300-450 °C sıcaklık aralığında gözlemlenen kayda değer kütle kaybı (~ %60-70) ise polisakkaritlerin bozulmasıdır. 450 °C 'dan sonra nihayetinde iskelelerin moleküler yapısı tamamen bozulmuştur (Fallacara ve diğerleri, 2018). 450-800 °C arasında ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinde kalan kütle sıfıra daha çok yaklaşırken, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinde ise kalan kütle %8 civarındadır. Sonuç olarak, çapraz bağlama sonucu dayanıklılığı artan çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere göre daha iyi termal kararlılığa sahip olduğu gözlemlenmektedir.

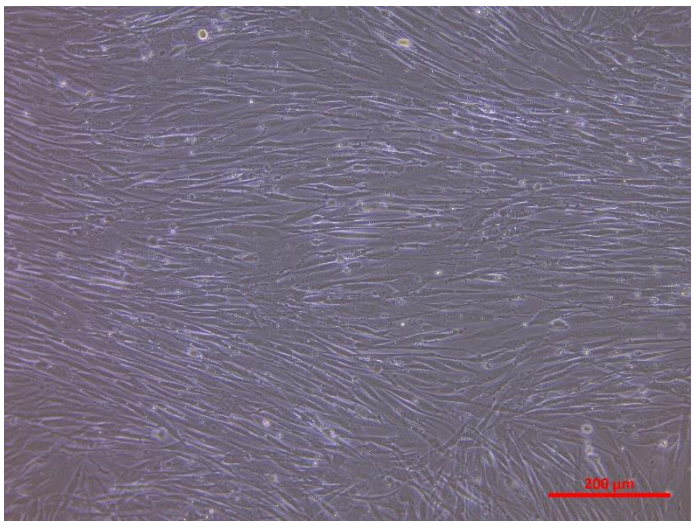


Şekil 4.5. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin TGA eğrileri

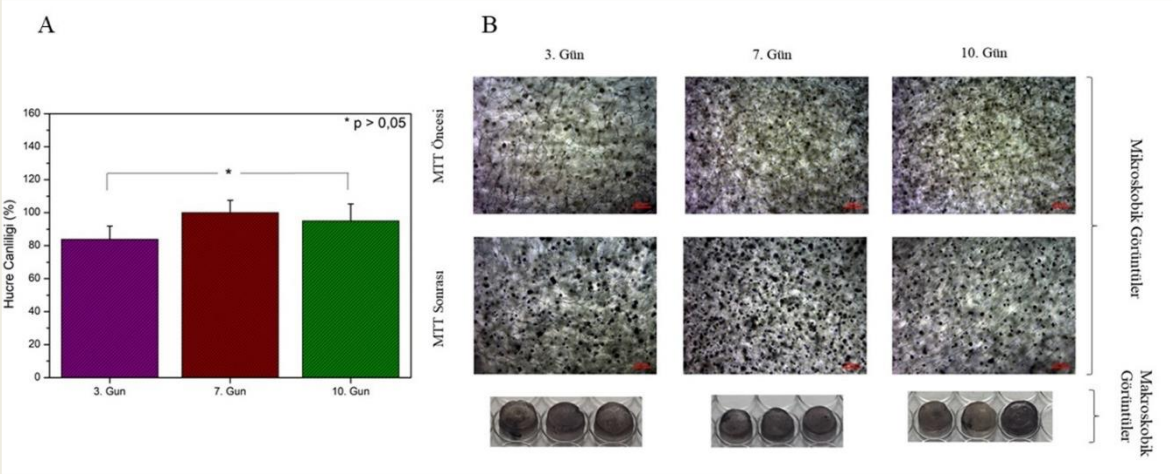
4.8. İskelelerin Hücrelere Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

iAMKH' ler özel besi yerinde çoğaltılmıştır (P5-P6) ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.7' de verilmiştir. T75 kültür plastiğine yapışmaları ve mezenkimal kök hücrelere özgü iğsi biçimleri görülebilmektedir (Şekil 4.6). Çoğalan iAMKH' ler iskeleler üzerine ekilmiş ve 10

gün inkübe edilmiştir. İskelelerin hücrelere istenmeyen etkileri ve toksik ürünlerini belirlemek ve hücrelerin canlılığını gözlemlemek üzere 3., 7. ve 10. günlerde MTT testi uygulanmıştır. MTT grafiği ile iskelelerin sitotoksik etki göstermediği ve canlılığın 7. günde en yüksek olduğu görülebilmektedir. 10. günde canlılıkta düşüş gözlemlenmiştir ve bunun da hücrelerin yeterli alana sahip olmadıklarından dolayı gerçekleştiği düşünülmektedir. ANOVA testi ise canlılıklarda anlamlı bir farlılık olmadığını belirtmektedir (Şekil 4.7 A). Ayrıca, MTT reaktifi ile boyanmış iskelelerin makroskobik ve mikroskobik görüntüleriyle de hücrelerin canlılıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.7 B). Görüntülerde iAMKH' lerin küresel bir yapı oluşturdukları da görülebilmektedir. Yapılan araştırmalar, MKH' lerin, hücre-hücre etkileşimlerini teşvik ederek küresel formlar almaları genel olarak artan fonksiyon sergilediklerini göstermektedir. MKH kürelerinin, HDM' ten hücre ayrılma ihtiyacından kaçınmaları, doğal ortamlarını korumalarına ve hücre yaşamı için gerekli sinyalleri sağlamalarına izin verdikleri görülmüştür. Bu durum, MKH kürelerinin tek tabakalı kültürde genişletilen hücrelerle karşılaştırıldığında iskemik koşullarda daha iyi yaşadıklarını ortaya koymaktadır. Ayrıca, küresel form oluşumu, MKH' lerin pro-anjiyojenik potansiyelini büyük ölçüde arttırır ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve anjiogenin dahil olmak üzere geniş bir büyüme faktörü dizisinin yükselişine neden olur. Böylece, *in vitro* kültürde MKH' lerin sağ kalmaları büyük ölçüde arttırılabilmekte ve küresel form almadan önce osteojenik indükleme uygulanırsa osteosit oluşum potansiyellerini arttırmaktadır (Murphy, Fang, & Leach, 2014).



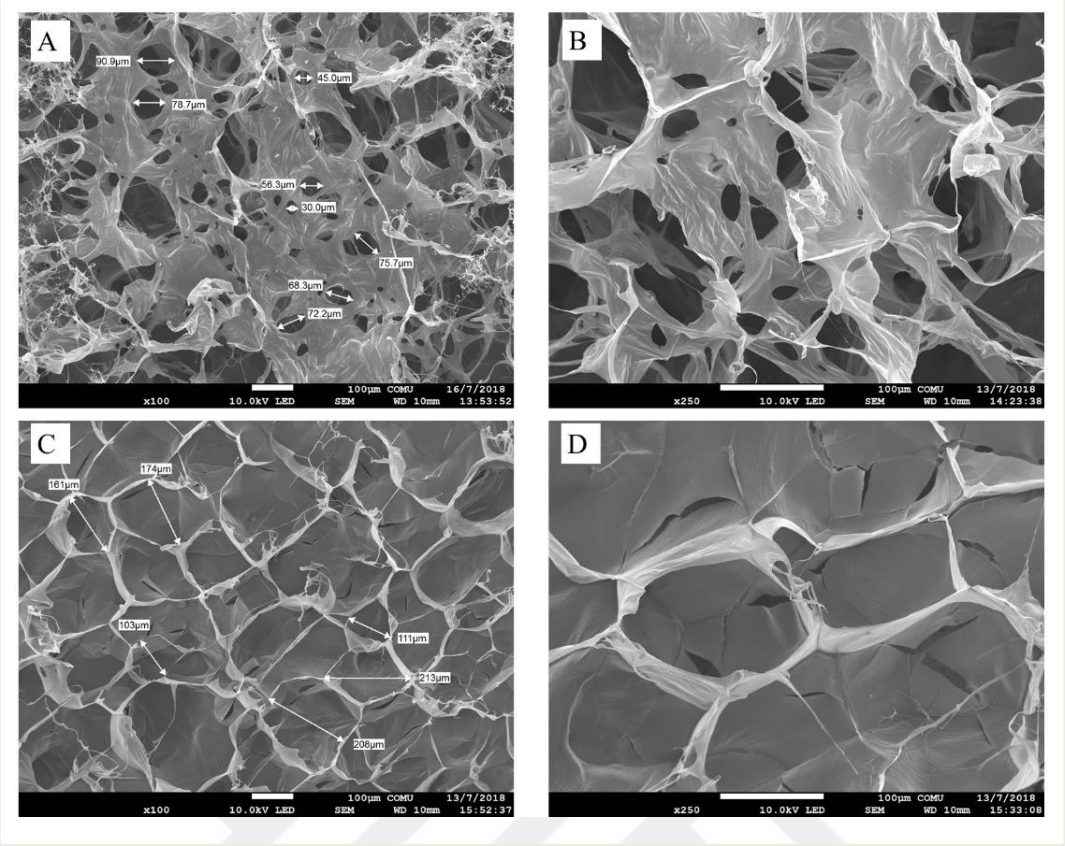
Şekil 4.6. iAMKH' lerin iğsi yapılarını gösteren mikroskobik görüntü (Ölçek: 200 µm)



Şekil 4.7. (A) MTT test sonuçları, (B) iAMKH' lerin 3., 7, ve 10. günlerde mikroskobik ve makroskobik görüntüleri (Ölçek: 100 µm)

4.9. İskelelerin Yüzey Morfolojisi ve Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Davranışlar

Doku mühendisliğinde kullanılacak olan iskelelerde aranan bir diğer önemli kriter de yeterli gözenek boyutlarına sahip olmalarıdır. Bunun nedeni, hücrelerin malzeme yüzeyinde yer alan kimyasal gruplarla etkileşime girerek iskeleye tutunmasıdır. Aynı zamanda birbiriyle bağlantılı gözenek yapısı ve en az 100-200 µm gözenek çapı, besin ve/veya atıkların transferini sağlayarak büyüyen hücrelerin iskele içerisinde çoğalmasını ve nihayetinde iskelede göç etmesini sağlar (Gilbert Triplett & Budinskaya, 2017). SEM analizi ise doku mühendisliği uygulamaları için hazırlanan iskelelerin yüzey morfolojisini belirlemede ve bu sayede gözenek boyutlarının incelenmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Bundan dolayı, ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin gözenek boyutları ve yüzey morfolojileri FE-SEM ile incelenmiş ve gözenek çapları ortalama 65 ± 18 µm (n = 8) ve 162 ± 43 µm (n = 6) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8 A ve C) ve bu sonuçlar BET analizinde yüzey alanı artışını doğrulamaktadır. Ayrıca, EDC/NHS ile çapraz bağlama sonrası iskelenin daha homojen birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.8 B ve D).

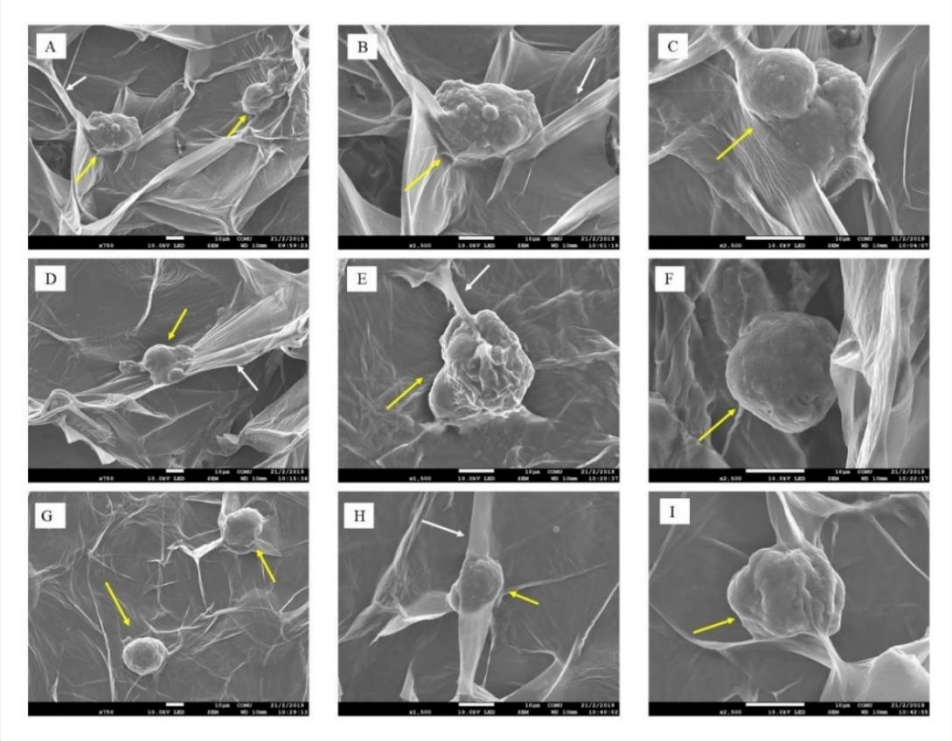


Şekil 4.8. SEM analizi ile gözenekliliğin belirlenmesi, çapraz bağsız iskelelerin (A) x100 ve (B) x250 büyütmede ve çapraz bağlı iskelelerin (C) x100 ve (D) x250 büyütmede SEM mikrografileri (Ölçek 100 µm)

Çapraz bağlamanın gözenek çaplarını etkilediğini gösteren bir çalışmada, CH GTA ve dimetil 3,3, ditiyo bis propiyonamit (DTBP) ile çapraz bağlanmış ve gözenek çapları SEM analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ortalama gözenek çapları, CH için 118 ± 12 µm, CH-DTBP içi 128 ± 12 µm ve CH-GTA için 139 ± 9 µm olarak gözlemlenmiştir (Adekogbe & Ghanem, 2005). Bir başka çalışmada ise, yüksek molekül ağırlıklı (YM) ve düşük molekül ağırlıklı (DM) CH, jelatin ve HA karışımı ile hazırladıkları iskeleleri EDC/NHS ile çapraz bağlamışlardır. Çapraz bağlama öncesi ve sonrası ile YM-CH ve DM-CH kullanılarak hazırlanan iskelelerin ortalama gözenek çapları SEM analizi ile karşılaştırılmıştır. Çapraz bağlanmamış YM-CH' in ortalama 94,8 ± 1,7 µm ve DM-CH' in ortalama 99,3 ± 1,7 µm gözenek çapına sahip olduğu belirlenirken, çapraz bağlı YM-CH' in ortalama 107,7 ± 2,6 µm ve DM-CH' in ortalama 123,4 ± 2,7 µm gözenek çapına sahip olduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlama işlemi ile daha büyük bir gözenek boyutuna sahip yeni oluşturulan altyapı ile morfolojik değişiklikler oluşmaktadır (Acevedo ve diğerleri, 2017). Bu morfolojik değişiklikler, ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği

müsilajı temelli iskelelerin arasındaki gözenek boyutu farklılıklarını açıklamaktadır.

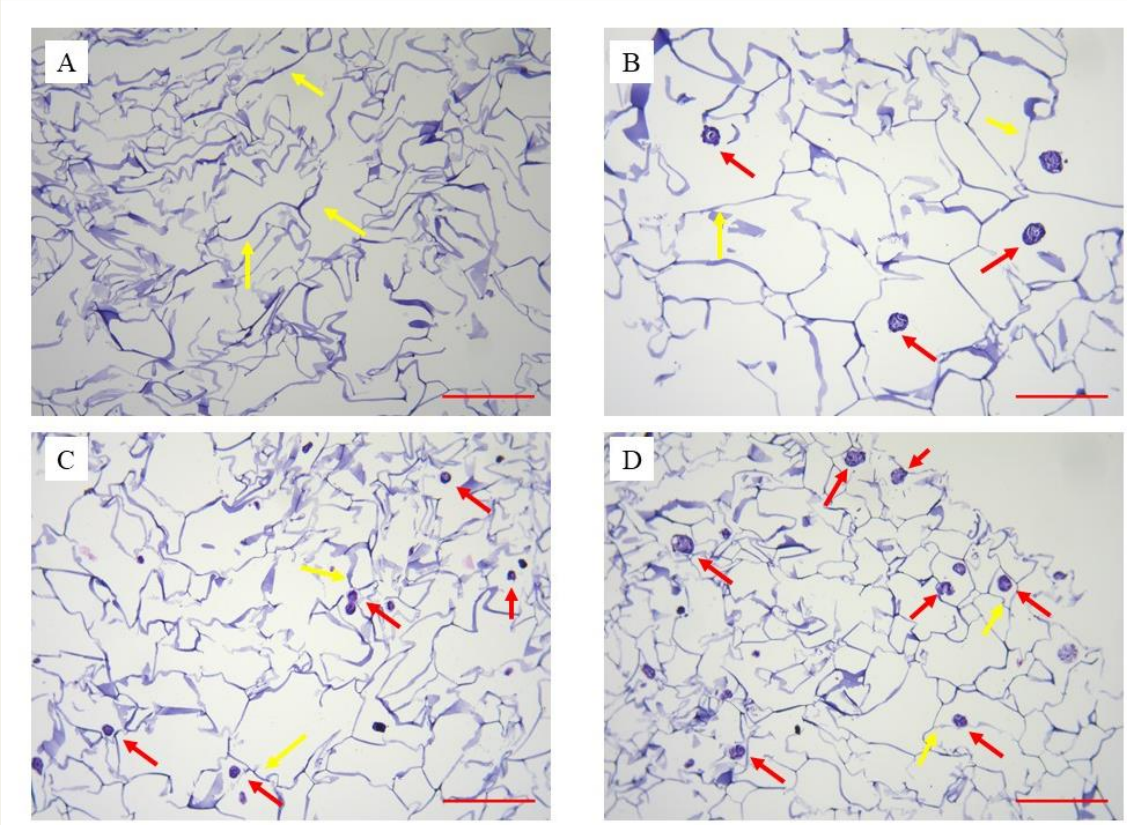
Doku mühendisliği uygulamaları için uygun gözenekli yapıya sahip olduğu belirlenen iskelelere ekilen hücrelerin, iskeleler üzerinde 3., 7. ve 10. günlerde tutunmalarını, çoğalmalarını ve büyümelerini gözlemlemek için de SEM analizi kullanılmıştır. Mikrografilerden 3. günde iAMKH' lerin çoğaldığı ve kültürün erken aşamalarında MTT reaktifi ile boyanan iskelelerde de gözlemlenen, hücrelerin küresel form oluşturdukları görülebilmektedir (Şekil 4.9 A-C). 7. ve 10. günlerde ise çoğalmaya devam ettikleri ve küresel formların arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.9 D-I). Ayrıca, hücrelerin bir araya gelirken üzerine tutundukları iskele lifini aralarına aldığı da görülebilmektedir (Şekil 4.10 E ve H). Non-fouling yüzeyler, protein adsorpsiyonu ve hücre yapışmasına direnç olarak tanımlanmaktadır (Hoffman, 1999). Non-fouling yüzeylere sahip hidrofilik biyomalzemeler, küresel formu yönlendirmek ve korumak için kümelerden hücrelerin yapışmasını ve göçünü önler (Gionet-Gonzales & Leach, 2018). Bu, iAMKH kürelerinin, tek katmanlı iAMKH' lere göre hücre canlılıklarını arttırmasına izin verir ve klinik potansiyellerini arttırır (Guo ve diğerleri, 2015). Sonuç olarak, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin mikro mimarisinin bir 3B niş oluşturduğuna ve hücreleri küre benzeri morfoloji oluşturmaya teşvik ettiğine inanıyoruz.



Şekil 4.9. iAMKH' lerin iskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (A) x750, (B) x1500, (C) x2500 büyütme, 7. gün SEM mikrografları (D) x750, (E) x1500, (F) x2500 büyütme, 10. gün SEM mikrografları (G) x750, (H) x1500, (I) x2500 büyütme (Ölçek 10 µm, sarı oklar hücreleri, beyaz oklar ise gözenek liflerini göstermektedir)

4.10. Histokimyasal Karakterizasyon

Histokimyasal karakterizasyon, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve hücreli iskelelerin hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10 A-D). iAMKH' lerin iskele üzerinde 3. günde tutundukları ve küresel form oluşturdukları görülmektedir (Şekil 4.10 B). 7. ve 10. günlerde ise iAMKH' lerin iskele üzerinde, küresel formda çoğaldıkları ve büyüdükleri görülmektedir (Şekil 4.10 C ve D). H&E boyama, SEM mikrografilerinde ve MTT reaktifi ile boyamada görülen küresel formları doğrulamaktadır. Sonuç olarak, iAMKH' lerin iskelelerin üzerine tutunması, çoğalmaları ve büyümelerinden dolayı, ürettiğimiz iskelelerin doku mühendisliği uygulamaları için uygun olduğunu düşünmekteyiz.



Şekil 4.10. (A) Çapraz bağlı iskelelerin, (B) iAMKH' lerin 3. gün, (C) iAMKH' lerin 7. gün ve (D) iAMKH' lerin 10. gün H&E boyamaları (Ölçek: 200 µm, kırmızı oklar hücreleri, sarı oklar ise gözenek liflerini göstermektedir)

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliği, hücreler, düzenleyici faktörler ve iskeleler olmak üzere üç farklı yaklaşımı ve bu yaklaşımların kombinasyonlarını hasarlı veya kaybedilmiş dokuların fonksiyonlarını yenilemek, iyileştirmek veya korumak için kullanır. Kendini yenileme yeteneğine sahip, multipotansiyel ve çoklu farklılaşma özelliği olan kök hücreler doku mühendisliği uygulamaları için en yaygın kullanılan hücrelerdir. Kaynaklarına göre ikiye ayrılmaktadırlar; embriyonik ve yetişkin. Ancak yakın zamanda, yetişkin hücrelere genetik manipülasyon uygulanarak bu hücrelerin embriyonik kök hücre özellikleri göstermesi sağlanmış ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olarak tanımlanmıştırlar. Mezenkimal kök hücreler, adlarını mezodermden gelişen özel hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı almış yetişkin kök hücrelerdir. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler çoklu soylara farklılaşabilmelerinden dolayı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanımları için ilgi çekmişlerdir. Ancak, elde edilen kemik iliği hücrelerinin sadece nispeten küçük bir miktarı olmaları ve başka sıkıntılar araştırmacıları yeni kaynaklara yönlendirmiştir. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler, adipoz dokuda bol miktarda bulunmakta ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere göre daha kolay toplanmaktadırlar. Aynı zamanda, çoklu hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Bu yüzden, uygulamalarda kullanımları yaygınlaşmaktadır. Hücreler ve düzenleyici faktörler kısıtlı alanda hasarlı dokuya etkili olmaktadır. Hasar büyüdükçe etkisiz kalmalarından dolayı iskelelere yönelim vardır. Geçici bir hücre dışı matriks yapıları oluşturmak için doku mühendisliği 3 boyutlu iskeleler üretir. İskeleler sentetik ve/veya doğal malzemelerden üretilebilir. Sentetik polimerler çeşitli avantajlara sahiptir ancak, bu polimerler hücreleri tanıma ve biyolojik etkinlik gibi doğal malzemelerde var olan özelliklerden yoksundurlar. Sayısız avantajlarından dolayı araştırmacılar doğal polimerlere daha çok ilgi duymaya başlamış ve dikkatlerini bu polimerlere yöneltmişlerdir. Doku mühendisliğinde kullanımı daha yeni keşfedilmeye başlayan polisakkarit sınıfından bitkisel müsilaj, geniş fizikokimyasal özelliklere sahip biyolojik makro moleküllledir. Bitkilerin çeşitli bölümleri tarafından üretilebilir. Müsilaj, tohumun etrafını hidrolizasyonu sonrası jel şeklinde zarf gibi saran malzemedir ve 100' den fazla kapalı tohumlu bitkilerin tohumlarında yer alan müsilaj salgılayıcı hücrelerin apoplastında yer almaktadır. Müsilajın polisakkarit ve asidik yapısı, tohumların su ile karşılaştığında müsilaj salgılamasına neden olmaktadır. Yapısal olarak gamlara (zamklara) benzemektedir. Ancak, patolojik bir ürün olan gamlardan

farklı olarak, bitkinin metabolik bir ürünü olan müsilaj doğal olarak salgılanmaktadır. En çok incelenen bitkisel müsilaj kaynaklarından bazıları fesleğen, keten, çiya, sarı hardal tohumları ve ayva çekirdeğidir. Gülgiller ailesine ait olan ayva ağacının meyvesi, yaprağı ve çekirdeği geleneksel tıpta pek çok hastalığı iyileştirmede sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, ayva çekirdeği müsilajının selüloz, hemiselüloz ve suda çözünebilir polisakkaritlerin karışımı olan helikoidal bir yapı olduğunu göstermiştir. Ayva çekirdeği müsilajının, anti bakteriyel, antioksidan, yara iyileştirme özelliklerinin yanı sıra, insan deri fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu da arttırdığı gösterilmiştir. Doku mühendisliği alanında ise sentetik polimer katkısı ile çalışmaları bulunmaktadır. Bundan dolayı, çalışmamızda ayva çekirdeği müsilajının kendisinin biyomalzeme olarak rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilirliği incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında, ayva çekirdeğinden elde edilen müsilaj kalıplanmış ve iskele formuna getirilmiştir. %7,5 ve %5 konsantrasyonlarında denenen müsilajın optimum konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiştir. Konsantrasyonun fazla olması viskoziteyi arttırmakta ve müsilajın kalıplanmasını zorlaştırmaktadır. İskelelerin gözeneklerini açmak için ajan olarak $NaHCO_3$ kullanılmıştır. Gözeneklerin fazla açılıp yapıyı oldukça kırılgan hale getirdiği görülmüştür. Bu yüzden, $NaHCO_3$ eklenmeden çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. İskelelerin dayanımını arttırmak ve rijitlik kazandırmak için CaCl ve EDC/NHS ile çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. $CaCl_2$' ün çapraz bağlama işlemi için yeterli olmadığı ve iskelelerin suda hemen dağıldığı gözlemlenmiştir. EDC/NHS ile yapılan çapraz bağlama işleminin başarılı olması üzerine, çapraz bağlama işlemi için süreler 30, 60, 90, 120 ve 240 dakika olarak denenmiş ve bunun sonucunda en uygun süre 120 dakika belirlenmiştir. Sürenin az olmasının yapıyı korumadığı, fazla olmasının ise yapıyı oldukça kırılgan hale getirdiği gözlemlenmiştir. İskelelerin ne kadar sıvı emebildiklerini gözlemlemek için şişme testi uygulanmış ve şişme kapasitesinin ~%12680 olduğu belirlenmiştir. Hücre kültürü için ne kadar besi yeri kullanılabileceğini hesaplamak için sıvı tutma testi uygulanmış ve iskelelerin 220 µl PBS' i tutma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiş ve hücre kültürü için besi yeri miktarı bu sonuca göre hesaplanmıştır. İskelelerin gözenekli yapıya sahip olması önemlidir. Bu bağlamda, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin %83 gözenekliliğe sahip olduğu sıvı yer değiştirme tekniğiyle belirlenmiştir. İskelelerin, hücrelerin tutunabileceği, büyüyebileceği ve çoğalabileceği yeterli gözenek alanına sahip olup olmadığını belirlemek üzere ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere SEM analizi uygulanmıştır. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ve çapraz

bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin sırasıyla ortalama 65 µm ve 162 µm gözenek çaplarına sahip oldukları belirlenirken, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ortalama gözenek çapının daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin birbirine bağlı gözenekli yapıya sahipken, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin homojen birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olduğu görülmüştür. FTIR analizi ile çapraz bağlama işlemi öncesi ve sonrası fonksiyonel gruplar belirlenmiş ve çapraz bağlama işlemi sırasında kimyasal reaksiyon sonrası oluşan yeni bağlar ile piklerdeki değişimler gözlemlenmiştir. BET analizi ile ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin ve çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerin yüzey alanları sırasıyla 9,416 m^2/g ve 27,195 m^2/g olarak belirlenmiş ve çapraz bağlama işlemi sonrası geniş yüzey alanının genişlediği görülmüştür. BET analizi, SEM analizinde de görülen çapraz bağlama işlemi sonrası gözenek çapındaki artışı doğrulamıştır. Çapraz bağlamanın iskeledeki mekanik ve termal özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla DMA ve TGA analizleri uygulanmıştır. Ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinde sıcaklık arttıkça ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinin depolama modülüs değeri sürekli artmakta ve 40 °C'da en yüksek 176,12 kPa değerine ulaşmaktadır. Çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskeleler ise 25-27 °C sıcaklıkları arasında dönüm noktasına sahiptir ve 27 °C'da en yüksek 258,13 kPa değerine ulaşmaktadır Bu noktadan sonra depolama modülüs değeri azalmakta ve sıcaklık yükseldikçe çoğunlukla sabit kalmaktadır. TGA analizi sonucu kalan kütle ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinde sıfıra daha çok yaklaşırken, çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinde ise %8 civarındadır. Bu yüzden, çapraz bağlama ile dayanıklılığı artan çapraz bağlı ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelerinin ayva çekirdeği müsilajı temelli iskelelere göre daha iyi termal kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik etkilerinin incelenmesi için iskeleler insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile etkileştirilmiş ve 3., 7. ve 10. günlerde yapılan MTT testi ile hücre canlılıkları gözlemlenmiştir. Hücrelerin maksimum canlılığa 7. günde ulaştıkları, 10. günde ise az da olsa canlılıkta düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın ise hücrelerin çoğalmak için yeterli alana sahip olmadığından gerçekleştiği düşünülmektedir. SEM analizi ile iskelelere tutunan hücrelerin davranışları incelenmiştir. 3. gün SEM mikrografilerinde iskelelerin hidrofilik yapısından dolayı hücrelerin bir araya gelerek küre form oluşturdukları gözlemlenmiştir. 7. ve 10. günlerde küre formlarının sayısının arttığı ve hücrelerin çoğalıp büyüdükleri görülmüştür. Küresel form oluşturan MKH' lerin, HDM' ten ayrılmadan kaçınarak doğal ortamlarını koruması ve hücrelerin yaşamaları için çeşitli büyüme faktörlerini arttırması ve gerekli sinyalleşmelere izin vermesi

ile *in vitro* ortamda sağ kalımlarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, küresel form alan iAMKH' lerin *in vitro*' da sağ kalabileceğini ve eğer osteojenik indüksiyon sağlanırsa osteojenik farklılaşma potansiyeli olabileceğini göstermektedir. Yapılan hematoksilen ve eozin boyamanın da SEM mikrografilerini doğruladığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, ayva çekirdeği müsilajının biyomalzeme olarak doku mühendisliği, özellikle kıkırdak ve kemik doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdollahi, H. (2019). A review on history, domestication and germplasm collections of quince (Cydonia oblonga Mill.) in the world. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *66*(5), 1041–1058. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10722-019-00769-7

Abeysekera, R. M., ve Willison, J. H. M. (1988). Development of helicoidal texture in the prerelease mucilage of quince (Cydonia oblonga) seed epidermis. *Canadian Journal of Botany*, *66*(3), 460–467. Erişim adresi: https://doi.org/10.1139/b88-071

Acevedo, C. A., Sánchez, E., Díaz-Calderón, P., Blaker, J. J., Enrione, J., ve Quero, F. (2017). Synergistic effects of crosslinking and chitosan molecular weight on the microstructure, molecular mobility, thermal and sorption properties of porous chitosan/gelatin/hyaluronic acid scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(18), 1–10. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/app.44772

Adekogbe, I., ve Ghanem, A. (2005). Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, *26*(35), 7241–7250. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.043

Akšić, M. F., Tosti, T., Nedić, N., Marković, M., Ličina, V., Milojković-Opsenica, D., ve Tešić, Ž. (2015). Influence of frost damage on the sugars and sugar alcohol composition in quince (Cydonia oblonga Mill.) floral nectar. *Acta Physiologiae Plantarum*, *37*(1), 1701. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s11738-014-1701-y

Allafchian, A., Jalali, S. A. H., Mousavi, S. E., ve Hosseini, S. S. (2019). Preparation of cell culture scaffolds using polycaprolactone/quince seed mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, (xxxx). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.096

Amini Mahabadi, J., Sabzalipoor, H., Kehtari, M., Enderami, S. E., Soleimani, M., ve Nikzad, H. (2018). Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells by inducers: A review. *Cytotherapy*, *20*(3), 279–290. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.01.002

Andrades, J. A. (2013). Regenerative Medicine and Tissue Engineering. Içinde J. A. Andrades (Ed.), *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. Erişim adresi: https://doi.org/10.5772/46192

Ashraf, Muhammad U., Muhammad, G., Hussain, M. A., ve Bukhari, S. N. A. (2016). 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

Ashraf, Muhammad Umer, Hussain, M. A., Bashir, S., Haseeb, M. T., ve Hussain, Z. (2018). Quince seed hydrogel (glucuronoxylan): Evaluation of stimuli responsive sustained release oral drug delivery system and biomedical properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *45*, 455–465. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.04.008

Ashrafi, H., Ghabili, K., Alihemmati, A., Jouyban, A., Shoja, M., Aslanabadi, S., Adl, F., Ghavimi, H., ve Hajhosseini, L. (2013). The effect of quince leaf (*Cydonia oblonga* miller) decoction on testes in hypercholesterolemic rabbits: A pilot study. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *10*(2), 277–282. Erişim adresi: https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i2.12

Atalay, C. (2013). *Ayva Çekirdeği Müsilaji Ve Buğday Ruşeym Yağının Sıçanlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Marmara University). Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/

Baer, P. C., Griesche, N., Luttmann, W., Schubert, R., Luttmann, A., ve Geiger, H. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy*, *12*(1), 96–106. Erişim adresi: https://doi.org/10.3109/14653240903377045

Bellamy, L. J. (1955). New Books. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *3*(2), 163–163. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf60048a619

Bombaldi de Souza, R. F., Bombaldi de Souza, F. C., Rodrigues, C., Drouin, B., Popat, K. C., Mantovani, D., ve Moraes, Â. M. (2019). Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. *Materials Science and Engineering: C*, *94*, 364–375. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.045

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Matthew, G. S., Zucker, J. P., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., ve Young, R. A. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, *122*(6), 947–956. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020

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

Carvalho, M., Silva, B. M., Silva, R., Valentão, P., Andrade, P. B., ve Bastos, M. L. (2010). First Report on Cydonia oblonga Miller Anticancer Potential: Differential Antiproliferative Effect against Human Kidney and Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(6), 3366–3370. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf903836k

Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Cussac, D., Duployer, B., Tenailleau, C., Bourin, P., Parini, A., Sallerin, B., ve Girod Fullana, S. (2017). Elaboration and evaluation of alginate foam scaffolds for soft tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, *524*(1–2), 433–442. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.060

Chandika, P., Ko, S.-C., Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Nguyen, V.-T., Jeon, Y.-J., Lee, B., Jang, C. H., Kim, G., Park, W. S., Chang, W., Choi, I.-W., ve Jung, W.-K. (2015). Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 504–513. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038

Charrez, B., Qiao, L., ve Hebbard, L. (2015). The role of fructose in metabolism and cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *22*(2), 79–89. Erişim adresi: https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0009

Chen, G., Ushida, T., ve Tateishi, T. (2002). Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, *2*(2), 67–77. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F

Collins, M. N., ve Birkinshaw, C. (2007). Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *104*(5), 3183–3191. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/app.25993

Constable, E. C., ve Dilworth, J. R. (2003). Transition Metal Groups 7 and 8. Içinde J. A. McCleverty & T. J. Meyer (Ed.), *COMPREHENSIVE COORDINATION CHEMISTRY II* (Second, C. 5, s. 847). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/05186-0

Costa, R. M., Magalhães, A. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Carvalho, M., ve Silva, B. M. (2009). Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (Cydonia oblonga) leaf: A comparative study with green tea (Camellia sinensis). *Food and Chemical Toxicology*, *47*(4), 860–865. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.019

da Silva Meirelles, L. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal

organs and tissues. *Journal of Cell Science*, *119*(11), 2204–2213. Erişim adresi: https://doi.org/10.1242/jcs.02932

Davidenko, N., Campbell, J. J., Thian, E. S., Watson, C. J., ve Cameron, R. E. (2010). Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *6*(10), 3957–3968. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.005

Dehghan Sekachaei, A., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Kashaninejad, M., ve Maghsoudlou, Y. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of quince seed gum through response surface methodology. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *19*(2), 323–333. Erişim adresi: https://www.semanticscholar.org/paper/Optimization-of-Ultrasound-assisted-Extraction-of-Sekachaei-Mahoonak/37e7f5c75559fa005d1eb1e5593143370a929cea

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., ve Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Elitok, M. S., Gunduz, E., Gurses, H. E., ve Gunduz, M. (2018). Tissue Engineering. Içinde *Omics Technologies and Bio-Engineering* (ss. 471–495). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00020-8

Fallacara, A., Marchetti, F., Pozzoli, M., Citernesi, U. R., Manfredini, S., ve Vertuani, and S. (2018). Formulation and Characterization of Native and Crosslinked Hyaluronic Acid Microspheres for Dermal Delivery of Sodium Ascorbyl Phosphate: A Comparative Study. *Pharmaceutics*, *10*(4), 254. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040254

Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., ve Cabras, P. (2007). Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (Cydonia oblonga Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(3), 963–969. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf062614e

Fekri, N., Khayami, M., Heidari, R., ve Jamee, R. (2008). Chemical Analysis of Flaxseed, Sweet Basil, Dragon Head and Quince Seed Mucilages. *Research Journal of Biological Sciences*, *3*(2), 166–170. Erişim adresi: https://doi.org/rjbsci.2008.166.170

Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., ve Grant, D. M. (2019). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from

chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, *204*, 59–67. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002

Fernandes, T. G., Diogo, M. M., ve Cabral, J. M. S. (2013). Characteristics of stem cells. Içinde *Stem Cell Bioprocessing* (ss. 1–32). Erişim adresi: https://doi.org/10.1533/9781908818300.1

Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., ve Biggs, M. J. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *84*, 1–29. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005

Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F., ve Faramarzi, M. A. (2012). Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, *9*(1), 27. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/1735-2746-9-27

Fraser, J. K., Zhu, M., Wulur, I., ve Alfonso, Z. (2008). Adipose-Derived Stem Cells. Içinde D. J. Prockop, D. G. Phinney, & B. A. Bunnell (Ed.), *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols* (C. 449, ss. 59–67). Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/5482656_Adipose-Derived_Stem_Cells

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

Gilbert Triplett, R., ve Budinskaya, O. (2017). New Frontiers in Biomaterials. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *29*(1), 105–115. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.011

Gimble, J. M., Katz, A. J., ve Bunnell, B. A. (2007). Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Research*, *100*(9), 1249–1260. Erişim adresi: https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09

Gionet-Gonzales, M. A., ve Leach, J. K. (2018). Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials*, *13*(3), 034109. Erişim adresi: https://doi.org/10.1088/1748-605X/aab0b3

Guo, X., Li, S., Ji, Q., Lian, R., ve Chen, J. (2015). Enhanced viability and neural differential potential in poor post-thaw hADSCs by agarose multi-well dishes and spheroid culture. *Human Cell*, *28*(4), 175–189. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s13577-015-0116-4

Hakala, T. J., Saikko, V., Arola, S., Ahlroos, T., Helle, A., Kuosmanen, P., Holmberg, K., Linder, M. B., ve Laaksonen, P. (2014). Structural characterization and tribological evaluation of quince seed mucilage. *Tribology International*, *77*, 24–31. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.triboint.2014.04.018

Haruna, S., Aliyu, B. S., ve Bala, A. (2017). Plant gum exudates (Karau) and mucilages, their biological sources, properties, uses and potential applications: A review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *9*(2), 159. Erişim adresi: https://doi.org/10.4314/bajopas.v9i2.30

Hemmati, Ali A., ve Mohammadian, F. (2000). An Investigation into the Effects of Mucilage of Quince Seeds on Wound Healing in Rabbit. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *7*(4), 41–46. Erişim adresi: https://doi.org/10.1300/J044v07n04

Hemmati, Ali Asghar, 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

Hoffman, A. S. (1999). Non-Fouling Surface Technologies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *10*(10), 1011–1014. Erişim adresi: https://doi.org/10.1163/156856299X00658

Hopur, H., M. Asrorov, A., Qingling, M., Yili, A., Ayupbek, A., Nannan, P., ve A. Aisa, H. (2012). HPLC Analysis of Polysaccharides in Quince (Cydonia Oblonga Mill. var. maliformis) Fruit and PTP1B Inhibitory Activity. *The Natural Products Journal*, *1*(2), 146–150. Erişim adresi: https://doi.org/10.2174/2210316311101020146

Huang, Y., Yu, H., ve Xiao, C. (2006). Effects of Ca2+ crosslinking on structure and properties of waterborne polyurethane-carboxymethylated guar gum films. *Carbohydrate Polymers*, *66*(4), 500–513. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.001

Huffman, F. G. (2003). URONIC ACIDS. Içinde *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (ss. 5890–5896). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01221-9

Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T., ve Tahir, M. N. (2019). *Quince Seed Mucilage: A Stimuli-Responsive/Smart Biopolymer*. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95990-0_19

Islam, A., Yasin, T., Gull, N., Khan, S. M., Sabir, A., Munawwar, M. A., Shafiq, M., Jamil, T., ve Raza, M. H. (2016). Fabrication and performance characteristics of

tough hydrogel scaffolds based on biocompatible polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *92*, 1–10. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.010

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*(xxxx), 668–679. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.008

Ji, C., ve Shi, J. (2013). Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(7), 3780–3785. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.010

Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., ve Koocheki, A. (2014). Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *International Journal of Biological Macromolecules*, *66*, 113–124. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.026

Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., ve Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, *36*, 9–19. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.030

Jouyban, A., Shoja, M. M., Sadighi, A., Ghabili, K., Ardalan, M. R., Khoubnasabjafari, M., Agutter, P. S., ve Tubbs, R. S. (2011). The effect of quince leaf decoction on renal injury induced by hypercholesterolemia in rabbits: A pilot study. *Journal of Medicinal Plant Research*, *5*(21), 5291–5295. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/236331364_The_effect_of_quince_leaf_decoction_on_renal_injury_induced_by_hypercholesterolemia_in_rabbits_A_pilot_study

Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Gołyńska, M., Polkowska, I., Szponder, T., Nehrbass, D., ve Osyczka, A. M. (2018). In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 938–944. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.175

Kallmeyer, K. (2013). *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human tissues By Karlien Kallmeyer Masters of Science (Immunology) In the Faculty of Health Sciences Department of Immunology* (Yüksek Lisans Tezi).

University of Pretoria.

Karar, M. G. E., Pletzer, D., Jaiswal, R., Weingart, H., ve Kuhnert, N. (2014). Identification, characterization, isolation and activity against Escherichia coli of quince (Cydonia oblonga) fruit polyphenols. *Food Research International*, *65*(PA), 121–129. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.040

Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., ve Gorodetsky, R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, *37*(10), 967–976. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705358

Khademi, F., Danesh, B., Mohammad Nejad, D., ve Soleimani Rad, J. (2013). The Comparative Effects of Atorvastatin and Quince Leaf Extract on Atherosclerosis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *15*(8), 639–643. Erişim adresi: https://doi.org/10.5812/ircmj.4030

Khare, C. P. (2007). *Indian Medicinal Plants An Illustrated Dictionary*. Erişim adresi: https://www.springer.com/gp/book/9780387706375

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

Kirdponpattara, S., Khamkeaw, A., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., ve Phisalaphong, M. (2015). Structural modification and characterization of bacterial cellulose–alginate composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 146–155. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.059

Kirtil, E., ve Oztop, M. H. (2016). Characterization of emulsion stabilization properties of quince seed extract as a new source of hydrocolloid. *Food Research International*, *85*, 84–94. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.019

Kreitschitz, A., ve Gorb, S. N. (2018). The micro- and nanoscale spatial architecture of the seed mucilage—Comparative study of selected plant species. *PLOS ONE*, *13*(7), e0200522. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200522

Kumari, R., ve Dutta, P. K. (2010). Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(2), 261–266. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.009

Langan, P., Sangha, A. K., Wymore, T., Parks, J. M., Yang, Z. K., Hanson, B. L., Fisher,

Z., Mason, S. A., Blakeley, M. P., Forsyth, V. T., Glusker, J. P., Carrell, H. L., Smith, J. C., Keen, D. A., Graham, D. E., ve Kovalevsky, A. (2014). L-Arabinose Binding, Isomerization, and Epimerization by D-Xylose Isomerase: X-Ray/Neutron Crystallographic and Molecular Simulation Study. *Structure*, *22*(9), 1287–1300. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.002

Lapham, D. P., ve Lapham, J. L. (2017). Gas adsorption on commercial magnesium stearate: Effects of degassing conditions on nitrogen BET surface area and isotherm characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, *530*(1–2), 364–376. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.003

Lee, H., ve Kim, G. (2011). Cryogenically fabricated three-dimensional chitosan scaffolds with pore size-controlled structures for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *85*(4), 817–823. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.001

Li, Y., Liu, T., Zheng, J., ve Xu, X. (2013). Glutaraldehyde-crosslinked chitosan/hydroxyapatite bone repair scaffold and its application as drug carrier for icariin. *Journal of Applied Polymer Science*, *130*(3), 1539–1547. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/app.39339

Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., ve Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *26*(18), 3919–3928. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.062

Lima, P. A. L., Resende, C. X., de Almeida Soares, G. D., Anselme, K., ve Almeida, L. E. (2013). Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(6), 3389–3395. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.026

Lindberg, B., M., M., N., N., R.M., A., R.G., B., ve J.H.M, W. (1990). An unusual (4-O-methyl-o-glucurono)-o-xylan isolated from the mucilage of seeds of the quince tree (Cydonia oblonga). *Carbohydrate Research*, *207*, 307–310.

Ma, P. X. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, *7*(5), 30–40. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0

Macrin, D., Joseph, J. P., Pillai, A. A., ve Devi, A. (2017). Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence. *Stem Cell Reviews and Reports*, *13*(6), 741–756. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s12015-017-9759-8

Mahapatro, A., ve Singh, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle

for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, *9*(1), 55. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55

Mei, H., González, S., Nakatsu, M. N., Baclagon, E. R., Chen, F. V., ve Deng, S. X. (2017). Human adipose-derived stem cells support the growth of limbal stem/progenitor cells. *PLOS ONE*, *12*(10), e0186238. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186238

Meregalli, M., Farini, A., ve Torrente, Y. (2011). Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases. Içinde A. Gholamrezanezhad (Ed.), *Stem Cells in Clinic and Research* (ss. 437–468). Erişim adresi: https://doi.org/10.5772/24013

Mhanna, R., ve Hasan, A. (2017). Introduction to Tissue Engineering. Içinde A. Hasan (Ed.), *Tissue Engineering for Artificial Organs* (1. bs., ss. 1–34). Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/9783527689934.ch1

Mišurcová, L., Škrovánková, S., Samek, D., Ambrožová, J., ve Machů, L. (2012). Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. Içinde *Advances in Food and Nutrition Research* (C. 66, ss. 75–145). Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00003-3

Mizuno, H., Tobita, M., ve Uysal, A. C. (2012). Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *STEM CELLS*, *30*(5), 804–810. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/stem.1076

Moatary, A., Teimouri, A., Bagherzadeh, M., Chermahini, A. N., ve Razavizadeh, R. (2017). Design and fabrication of novel chitin hydrogel/chitosan/nano diopside composite scaffolds for tissue engineering. *Ceramics International*, *43*(2), 1657–1668. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.06.068

Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., ve Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 168. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1

Murphy, K. C., Fang, S. Y., ve Leach, J. K. (2014). Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell and Tissue Research*, *357*(1), 91–99. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00441-014-1830-z

Nasiri, B., ve Mashayekhan, S. (2017). Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. *Biologicals*, *48*, 39–46. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.008

Ninan, N., Muthiah, M., Park, I.-K., Elain, A., Thomas, S., ve Grohens, Y. (2013). Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 877–885. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.067

Noshad, M., Nasehi, B., ve Anvar, A. (2017). Effect of active edible coating made by quince seed mucilage and green tea extract on quality of fried shrimps: physicochemical and sensory properties. *Nutrition and Food Sciences Research*, *4*(4), 31–38. Erişim adresi: https://doi.org/10.29252/nfsr.4.4.5

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, *14*(3), 88–95. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X

Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., ve Silva, B. M. (2007). Phenolic Profile of Cydonia oblonga Miller Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7926–7930. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf0711237

Park, J. K., Shim, J.-H., Kang, K. S., Yeom, J., Jung, H. S., Kim, J. Y., Lee, K. H., Kim, T.-H., Kim, S.-Y., Cho, D.-W., ve Hahn, S. K. (2011). Solid Free-Form Fabrication of Tissue-Engineering Scaffolds with a Poly(lactic-co-glycolic acid) Grafted Hyaluronic Acid Conjugate Encapsulating an Intact Bone Morphogenetic Protein-2/Poly(ethylene glycol) Complex. *Advanced Functional Materials*, *21*(15), 2906–2912. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/adfm.201100612

Pham, P. Van. (2016). Stem Cell Processing. Içinde P. Van Pham (Ed.), *Stem Cell Processing*. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40073-0

Ramasahayam, S., Koppuravuri, S. H., Arora, L., ve Chowdhury, S. R. (2015). Noninvasive Blood Glucose Sensing Using Near Infra-Red Spectroscopy and Artificial Neural Networks Based on Inverse Delayed Function Model of Neuron. *Journal of Medical Systems*, *39*(1), 166. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10916-014-0166-2

Ranocha, P., Francoz, E., Burlat, V., ve Dunand, C. (2014). Expression of PRX36 PMEI6 and SBT1.7 is controlled by complex transcription factor regulatory networks for proper seed coat mucilage extrusion. *Plant Signaling and Behavior*, *9*(11), 9–14. Erişim adresi: https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977734

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., ve Lemons, J. E. (2013). Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. Içinde *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit). Erişim adresi:

https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4

Razavi, S. M. A., Cui, S. W., Guo, Q., ve Ding, H. (2014). Some physicochemical properties of sage (Salvia macrosiphon) seed gum. *Food Hydrocolloids*, *35*, 453–462. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.022

Reis, D., Vian, B., Chanzy, H., ve Roland, J.-C. (1991). Liquid crystal-type assembly of native cellulose-glucuronoxylans extracted from plant cell wall. *Biology of the Cell*, *73*(2–3), 173–178. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/0248-4900(91)90100-2

Renfrew, A. G., ve Cretcher, L. H. (1932). Quince Seed Mucilage. *The Journal of Biological Chemistry*, *97*, 503–510.

Rop, O., Balík, J., Řezníček, V., Juríková, T., Škardová, P., Salaš, P., Sochor, J., Mlček, J., ve Kramářová, D. (2011). Chemical characteristics of fruits of some selected quince (Cydonia oblonga Mill.) cultivars. *Czech Journal of Food Sciences*, *29*(No. 1), 65–73. Erişim adresi: https://doi.org/10.17221/212/2009-CJFS

Sezgin Arslan, T. (2017). *Keratin Temelli İskele Üretimi ve Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Etkinliğinin Değerlendirilmesi* (Yüksk Lisans Tezi, Canakkale Onsekiz Mart University). Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/

Sharma, R., Joshi, V. K., ve Rana, J. C. (2011). Nutritional composition and processed products of Quince (Cydonia oblonga Mill.). *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *2*(3), 354–357.

Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T., ve Kumbar, S. G. (2014). Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, *25*(5), 448–460. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/pat.3266

Shoichet, M. S. (2010). Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules*, *43*(2), 581–591. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/ma901530r

Silva, Branca M., Andrade, P. B., Ferreres, F., Domingues, A. L., Seabra, R. M., ve Ferreira, M. A. (2002). Phenolic profile of quince fruit (Cydonia oblonga Miller) (pulp and peel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(16), 4615–4618. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf0203139

Silva, Branca M., Andrade, P. B., Ferreres, F., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. P. P., ve Ferreira, M. A. (2005). Composition of Quince (Cydonia oblonga Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Natural Product Research*, *19*(3), 275–281. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/14786410410001714678

Silva, Branca M., Casal, S., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. P. P., ve Ferreira, M. A. (2004). Free Amino Acid Composition of Quince (Cydonia oblonga

Miller) Fruit (Pulp and Peel) and Jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(5), 1201–1206. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf030564x

Silva, Branca Maria, Andrade, P. B., Gonçalves, A. C., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., ve Ferreira, M. A. (2004). Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (Cydonia oblonga Miller). *European Food Research and Technology*, *218*(4), 385–389. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00217-003-0845-6

Smith, F., ve Montgomery, R. (1959). Chemistry of Plant Gums and Mucilages and some related Polysaccharides. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, *63*(11), 1044–1044. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/lipi.19610631110

Soukoulis, C., Gaiani, C., ve Hoffmann, L. (2018). Plant seed mucilage as emerging biopolymer in food industry applications. *Current Opinion in Food Science*, *22*, 28–42. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.004

Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., ve Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, *1*(2), 93–108. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.11.001

Sukhramani, P. S., Sukhramani, P. S., Tirthani, S. R., Desai, S. A., ve Suthar, M. P. (2011). Biological cytotoxicity evaluation of spiro [azetidine-2 , 3 ’ -indole] -2 ’, 4 (1 ’ H) -dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre*, *3*(5), 236–243. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/279778205_Biological_cytotoxicity_evaluation_of_spiroazetidine-2_3%27-indole-2%27_41%27H-_dione_derivatives_for_anti-lung_and_anti-breast_cancer_activity

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., ve Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi, K., ve Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Tamri, P., Hemmati, A., ve Boroujerdnia, M. G. (2014). Wound healing properties of quince seed mucilage: In vivo evaluation in rabbit full-thickness wound model. *International Journal of Surgery*, *12*(8), 843–847. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.06.016

Teimouri, A., Azadi, M., Emadi, R., Lari, J., ve Chermahini, A. N. (2015). Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application. *Polymer Degradation and Stability*, *121*, 18–29. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.08.004

Tholpady, S. S., Llull, R., Ogle, R. C., Rubin, J. P., Futrell, J. W., ve Katz, A. J. (2006). Adipose Tissue: Stem Cells and Beyond. *Clinics in Plastic Surgery*, *33*(1), 55–62. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cps.2005.08.004

Tiwari, S., Patil, R., ve Bahadur, P. (2018). Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. *Polymers*, *11*(1), 1. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/polym11010001

Tsioptsias, C., ve Panayiotou, C. (2008). Preparation of cellulose-nanohydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. *Carbohydrate Polymers*, *74*(1), 99–105. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.022

Turkoz, S., Kusmenoglu, S., ve Koca, U. (1998). Studies on The Seeds of Cydonia oblonga Miller. *Acta Pharmaceutica Turcica*, *40*(1), 39–42. Erişim adresi: http://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf_450.pdf

Tverdokhlebov, S. I., Bolbasov, E. N., ve Shesterikov, E. V. (2012). Scaffold Materials Based on Fluorocarbon Composites Modified with RF Magnetron Sputtering. Içinde *Osteogenesis* (ss. 83–116). Erişim adresi: https://doi.org/10.5772/34697

Ullah, I., Subbarao, R. B., ve Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, *35*(2), 1–18. Erişim adresi: https://doi.org/10.1042/BSR20150025

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

Van Deynze, A., Zamora, P., Delaux, P.-M., Heitmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., Graham, D., Maeda, J., Gibson, D., Schwartz, K. D., Berry, A. M., Bhatnagar, S., Jospin, G., Darling, A., Jeannotte, R., Lopez, J., Weimer, B. C., … Bennett, A. B. (2018). Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLOS Biology*, *16*(8), e2006352. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352

Vignon, M. R., ve Gey, C. (1998). Isolation, 1H and 13C NMR studies of (4-O-methyl-d-

glucurono)-d-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. *Carbohydrate Research*, *307*, 107–111.

Wadhwa, J., Nair, A., ve Kumria, R. (2013). Potential of Plant Mucilages in Pharmaceuticals and Therapy. *Current Drug Delivery*, *10*(2), 198–207. Erişim adresi: https://doi.org/10.2174/1567201811310020006

Wert, G. de, ve Mummery, C. (2003). Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Human Reproduction*, *18*(4), 672–682. Erişim adresi: https://doi.org/10.1093/humrep/deg143

Western, T. L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*, *22*(1), 1–25. Erişim adresi: https://doi.org/10.1017/S0960258511000249

Yang, B., Li, X., Shi, S., Kong, X., Guo, G., Huang, M., Luo, F., Wei, Y., Zhao, X., ve Qian, Z. (2010). Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 860–865. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.044

Yıldırım, A., Oktay, M., ve Bilaloğlu, V. (2014). The Antioxidant Activity of the Leaves of Cydonia vulgaris. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *31*(1), 23–27. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/284667021_The_antioxidant_activity_of_the_leaves_of_Cydonia_vulgaris

Zanicotti, D., Duncan, W., Seymour, G., ve Coates, D. (2018). Effect of Titanium Surfaces on the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *33*(3), e77–e87. Erişim adresi: https://doi.org/10.11607/jomi.5810

Zou, Y., Zhang, L., Yang, L., Zhu, F., Ding, M., Lin, F., Wang, Z., ve Li, Y. (2018). "Click" chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *273*(December 2017), 160–179. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.023

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ekin ŞİMŞEK

Doğum Yeri : Düzce

Doğum Tarihi : 20.09.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, 2016

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

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

1) SCI

Şimşek E., Karaca B., Arslan Y.E., "Bioengineered 3D physical constructs from quince seed mucilage for human adipose-derived mesenchymal stem cells", Journal of Bioactive and Compatible Polymers

b) Bildiriler

1) Uluslararası

Arslan Y.E., Şimşek E., "3-Dimensional bioscaffolds from quince seed mucilage for human adipose-derived mesenchymal stem cells", III. International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Piriştine, KOSOVA, 12-14 Eylül 2019, p. 49

2) Ulusal

Arslan Y.E., Şimşek E., "Ayva Çekirdeği Müsilajının Doku Mühendisliğinde Biyoiskele Olarak Kullanımının Araştırılması", 13. Kimya Mühendisliği Kongresi, VAN, TÜRKIYE, 3-6 Eylül 2018, ss.7518-7518

Şimşek E., Arslan Y.E., "İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İçin Bitkisel Müsilaj Kaynaklı 3-Boyutlu Doku Mühendisliği İskelelerinin Üretimi", 3. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, İstanbul, TÜRKIYE, 12-14 Nisan 2019, ss.6-6

c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Ayva (*Cydonia oblonga Miller*) Çekirdeği Müsilajının Biyomalzeme Olarak Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıpta Kullanımı. Proje kodu: FYL-2018-2517. Çalışma Süresi: 2018-2020, araştırmacı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

İLETİŞİM

E-posta Adresi : simsekekin@gmail.com

ORCID : 0000-0002-8501-7746