T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN SERİSİN/KERATİN TEMELLİ HİBRİT YAPILARININ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF BEYZA DEMİRAY

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

ÇANAKKALE – 2024

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN SERİSİN/KERATİN TEMELLİ HİBRİT YAPILARININ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF BEYZA DEMİRAY

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-4479

ÇANAKKALE – 2024

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Elif Beyza DEMİRAY tarafından Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **30/07/2024** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Yumuşak Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Serisin/Keratin Temelli Hibrit Yapılarının Geliştirilmesi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN (Danışman)	……
Doç. Dr. Elif KARACAN YELDİR	……
Doç. Dr. Burak DERKUŞ	…….

Tez No : 10599801
Tez Savunma Tarihi : 30/07/2024

Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

../../20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Elif Beyza DEMİRAY

30/07/2024

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgileriyle bana ışık tutan, değerli önerileriyle destek olan ve bu çalışmanın hayata geçirilmesi sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN'a,

Araştırmanın her bir aşamasında görüşleriyle beni destekleyen, beni doğru yönde yönlendiren, bilgi ve uzmanlığını benimle paylaşan değerli Dr. Tuğba Sezgin ARSLAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında ve günlük yaşamda fikirleri ve desteğiyle yanımda olan değerli laboratuvar arkadaşlarım Berk Deniz TOSUNOĞLU, Tuğçe KURT, Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU, Doğaç TAMTÜRK, Fikri Mert ŞİMŞEK ve Görkem SARUHAN'a,

Hayatımın her aşamasında ve eğitim sürecim boyunca bana her daim destek veren, bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen kıymetli annem Serap DEMİRAY, aslan babam Sedat DEMİRAY, sevgili kardeşlerim Ecrin Sena DEMİRAY ve Ömer Efe DEMİRAY'a,

Çalışmanın başarılı bir şekilde yürütülmesinde ve gerçekleştirilen analizlerde bilgi birikimi ve olanaklarını paylaşan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Kodu: FYL-2023-4479). BAP birimine de ayrıca teşekkür ederim.

Elif Beyza DEMİRAY

Çanakkale, Temmuz 2024

ÖZET

YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN SERİSİN/KERATİN TEMELLİ HİBRİT YAPILARININ GELİŞTİRİLMESİ

Elif Beyza DEMİRAY
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
30/07/2024, 86

Yapay kas malzemelerinin geliştirilmesi, rejeneratif tıp, tıbbi cihazlar, robotik ve yapay zekâ alanlarındaki çeşitli uygulamalar için büyük umut vaat etmektedir. Önemli ilgi ve ilerlemelere rağmen, biyomalzemelerde iskelet kaslarının tüm özelliklerini kopyalamak zorlu bir süreç olmaya devam etmektedir. Burada, iskelet kaslarının esnekliğinden ilham alarak, ilk kez ipek serisin (İS) ve yün keratin (YK) birlikte kullanılarak biyolojik olarak parçalanabilir ve elastik özelliklere sahip hidrojel bazlı bir iskele üretilmiştir. Ayrıca, üretilen İS-YK malzemesinin miyojenik farklılaşma derecesi incelenmiştir. Bu iskele, yerinde kabarcık oluşturma protokolüne dayalı olarak EDC/NHS kullanılarak oluşturulmuştur. Serisin ve EDC/NHS reaksiyonu sırasında CO_2 kabarcıkları ortaya çıkmış ve hidrojel içinde hapsolmuştur. Farklı protein konsantrasyonları denenerek, konsantrasyon farklılıklarının mekanik direnç ve gözeneklilik üzerindeki etkileri araştırılmıştır. S4K2 en iyi esnekliği, gözenekliliği ve biyouyumluluğu sağlamaktadır. %75'lik gerilme ile kendi ağırlığının 2500 katından fazlasını kaldırabilen yapay kas malzemesi, 50 döngü içerisinde gerilime uyum sağlamaktadır. Ayrıca, İS-YK hidrojellerinin yüksek *in ovo* biyouyumluluğu yumurta içine implante edilerek gösterilmiş ve damarlanma oranı üzerindeki etkileri VEGF ile karşılaştırılmıştır. Bu gözlemlere ek olarak, S4K2 nanokompozitin C2C12 hücre hattı üzerindeki etkisi in vitro olarak analiz edilmiştir. qPCR analizi sonuçlarına göre, miyoblastların proliferasyonu ve miyojenik farklılaşması MyoD, MyoG ve α-aktin seviyeleri ile belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmada, çevremizde kolayca bulunabilen proteinleri kullanarak yumuşak doku rejenerasyonu için *in-situ* kabarcık stratejisi ile biyouyumlu ve elastomerik akıllı hidrojel bazlı bir iskele geliştirmek için kolay bir strateji öneriyoruz.

Anahtar Kelimeler: Kas dokusu mühendisliği, Hidrolize yün-keratin, Su ile ekstrakte edilmiş ipek serisin, *İn-situ* kabarcık oluşturan hidrojel hapsetme, Miyogenez

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SERICIN/KERATIN-BASED HYBRID STRUCTURES FOR SOFT TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Elif Beyza DEMIRAY
Canakkale Onsekiz Mart University
School of Graduate Studies
Master of Science Thesis in Bioengineering
Advisor: Assoc. Prof. Yavuz Emre ARSLAN
30/07/2024, 86

The development of artificial muscle materials holds great promise for a variety of applications in regenerative medicine, medical devices, robotics, and artificial intelligence. Despite significant interest and advances, replicating the full properties of skeletal muscles in biomaterials remains a challenging process. Here, inspired by the flexibility of skeletal muscles, we create a hydrogel-based scaffold with biodegradable and elastic properties using silk sericin (S) and wool keratin (K) together for the first time. Besides, we examine the degree of myogenic differentiation of the generated S-K material. This scaffold was fabricated using EDC/NHS based on the *in-situ* bubble formation protocol. During the reaction of sericin and EDC/NHS, CO_2 bubbles appeared and were trapped within the hydrogel. By trying different protein concentrations, the effects of concentration differences on mechanical resistance and porosity were investigated. S4K2 provides the best elasticity, porosity, and biocompatibility. Artificial muscle material, which can lift more than 2500 times its own weight with 75% strain, adapts to the tension within 50 cycles. The high *in Ovo* biocompatibility of S-K hydrogels was demonstrated by implanting them into the egg, and their effects on the vascularization rate were compared with VEGF. In addition to these observations, the effect of S4K2 nanocomposite on the C2C12 cell line was analyzed *in vitro*. According to the results of qPCR analysis, proliferation and myogenic differentiation of myoblasts were determined by MyoD, MyoG and α-actin levels. In conclusion, in this study, we propose a facile strategy to develop a biocompatible and elastomeric smart hydrogel-based scaffold with *in-situ* bubble strategy for soft tissue regeneration using proteins readily available in our environment.

Keywords: Muscle tissue engineering, Hydrolyzed wool-keratin, Water-extracted silk sericin, *in-situ* bubble-forming hydrogel entrapment, Myogenesis

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ETİK BEYAN…… ii
TEŞEKKÜR…… iii
ÖZET …… iv
ABSTRACT …… vi
İÇİNDEKİLER …… viii
SİMGELER ve KISALTMALAR……..…… xi
TABLOLAR DİZİNİ…… xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...…… xiv

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ 1

1.1. İnsan Yumuşak Dokusu...…… 3
1.1.1. İskelet Kasları…… 6
1.2. Kas Doku Mühendisliği (KDM) ve Biyomalzemeler....……..…….. 8
1.3. Biyomalzemeler İçin Yenilenebilir Doğal Kaynaklar....…… 11
1.3.1. Serisin…… 14
1.3.2. Keratin…… 17

İKİNCİ BÖLÜM
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 20

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM 21

3.1. Materyal …….....…….....…….....…… 21
3.2 İS Ekstraksiyonu ……..... 22
3.3. YK Ekstraksiyon ve Saflaştırma Süreci……..... 22
3.4. Protein Ekstraktlarının Biyokimyasal Analizleri……..... 23
3.5. İS/YK Hidrojel Bazlı Biyoiskelelerin Hazırlanması…… 28

3.6. İS-YK Hidrojellerinin Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Analizi…… 30
3.7. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD)…… 30
3.8. Termogravimetrik Analiz (TGA)……... 30
3.9. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi…… 30
3.10. Şişme Testi…… 31
3.11. Temas Açısı Analizi…….. 31
3.12 İS-YK Hidrojellerinin Reolojik Ölçümleri…… 31
3.13. İS-YK Hidrojellerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi…… 32
3.14. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopi (EDS) Analizi…… 33
3.15. Hidrojel Bazlı Biyoiskeletlerin In vitro Biyobozunma Çalışması…… 34
3.16. In Ovo Civciv Koryoallantoik Membran (CAM) Deneyi…… 34
3.17. Hücre Kültürü Çalışmaları…… 35
3.17.1. Hücreler ve Kültür Koşulları…… 35
3.17.2. Hücre Canlılığı ve Çoğalma Testi…… 36
3.17.3. Histokimyasal Analizler…… 37
3.17.4. Miyojenik Farklılaşma Üzerine Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri…… 37
3.18. İstatiksel Analiz…… 38

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI 39

4.1. İS ve YK Ekstraktlarının Biyokimyasal Değerlendirmeleri…… 39
4.2. Serisin/Keratin Hidrojel Bazlı Biyoiskele ve Fiziko-kimyasal Değerlendirmeler…… 42
4.3. Reolojik Analiz…… 44
4.4. Mikromekanik Test…… 47
4.5. ATR-FTIR Sonuçları…… 50
4.6. XRD Analizi…… 51
4.7. Termal Kararlılık…… 53

4.8. Morfoloji, Gözeneklilik, Islanabilirlik Özellikleri ve EDS Analizi……... 54
4.9. Şişme Testi ve Enzimatik Bozunmanın In Vitro Değerlendirmesi…… 57
4.10. *İn Ovo* CAM Analizi……. 58
4.11. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Histokimyasal Değerlendirmeler…… 60
4.12. Miyojenik Farklılaşma ile İlgili Gen İfadeleri…… 65

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER 68

KAYNAKÇA ..…… 71

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAM	Civciv Korioallantoik Membran
HDM	Hücre Dışı Matriks
KDM	Kas Dokusu Mühendisliği
HSK	Hacimsel Kas Kaybı
3B	3 Boyutlu
İS	İpek Serisin
YK	Yün Keratini
İS-YK	İpek Serisini ve Yün Keratini Hidrojel Bazlı İskelesi
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N′-ethilkarbodiimit hidroklorür
NHS	N-hidroksisüksinimit
HC	Histokimya
MRF	Kas Düzenleyici Faktör
C2C12	Fare Miyoblast Hücreleri
PVA	Polivinil Alkol
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
PCL	Polikaprolakton
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na_2SO_3	Sodyum Sülfit
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
-SH	Serbest Sülfidril Grubu
RFU	Bağıl Floresan Birimi
BSA	Sığır Serum Albümini
USS	Ultra Saf Su
NaCl	Sodyum Klorür
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
MA	Moleküler Ağırlık
APS	Amonyum Per Sülfat
TEMED	Tetrametiletilendiamin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
H&E	Hemotoksilen ve Eozin

TCP	Doku Kültürü Polistireni
MT	Masson Trikrom
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HA	Hyaluronik Asit
PEGDA	Poli(etilen glikol) Diakrilat
K	Kelvin
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
w/v	Kütle/Hacim
v/v	Hacim/Hacim
µg	Mikrogram
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan bazı doğal malzemelerin avantajları ve dezavantajları.	13
Tablo 2	Serisinin amino asit bileşimi.	15
Tablo 3	SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	26
Tablo 4	CBB G-250 *b*oyama ve *b*oya *u*zaklaştırma *ç*özeltisinin *i*çeriği.	28
Tablo 5	QRT-PCR analizi için primer tasarımı.	38
Tablo 6	Numunelerin gerinim, stres ve Young modülü değerleri.	49
Tablo 7	S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin BET analizi ve gözenek boyutu sonuçları.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	İnsan vücudunda bulunan yumuşak dokular.	4
Şekil 2	Kalbin yüksek tansiyonu sonucu atardamar iç duvarı hasarı görmesi ve kaza sonucu aşil tendonu yırtılması.	6
Şekil 3	Serisinin kimyasal yapısı.	16
Şekil 4	Keratin proteininin α-(a) ve β- (b) formları.	18
Şekil 5	*Bombyx mori'den* su ile serisin ekstrakte edilmesi.	22
Şekil 6	Koyun yününden keratin ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemi.	23
Şekil 7	İS-YK hidrojellerinin hazırlanma aşamaları.	29
Şekil 8	Young modülünün grafiksel yöntemle belirlenmesi.	33
Şekil 9	Hücre kültürü deney setinin gösterimi.	36
Şekil 10	Lowry metodu ile çizdirilen BSA kalibrasyon grafiği.	39
Şekil 11	Qubit proteini (A) ve Sülfidril grup tahlili (B) için standart kalibrasyon eğrileri.	40
Şekil 12	Keratin, su ile ekstrakte edilmiş serisin ve Na_2CO_3 ile ekstrakte edilmiş serisinin SDS-PAGE modeli.	42
Şekil 13	*İn situ* kabarcık oluşturma stratejisinin mekanizmasına genel bir bakış.	43
Şekil 14	Hidrojellerin stereomikroskop görüntüleri	44
Şekil 15	Hidrojel bazlı iskelelerin stereomikroskop görüntüleri.	44
Şekil 16	Beş farklı serisin/keratin hidrojelinin reolojik davranışı.	46

Şekil 17	Mikromekanik analiz sonuçları.	48
Şekil 18	S4K2 hidrojelinin sıkıştırma-serbest bırakma işlemi altında hızlıca toparlanmasının gösterilmesi.	50
Şekil 19	İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin FTIR spektrumları.	51
Şekil 20	İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin XRD spektrumları.	52
Şekil 21	İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin TGA eğrileri.	53
Şekil 22	S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin SEM mikrografları ve gözenek boyutu dağılım histogramları (A), EDS spektrumları (B).	55
Şekil 23	Temas açısı ölçümleri kullanılarak S4K2 hidrojelinin ıslanabilirlik performansının gösterilmesi.	57
Şekil 24	S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin şişme oranlarını (A) ve in vitro biyobozunurluk oranını (B) gösteren grafikler.	68
Şekil 25	S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı yapı iskelelerinin biyouyumluluğunu ve proanjiyogenezini değerlendirmek için *yapılan* in ovo CAM tahlili.	59
Şekil 26	İn Ovo CAM analizinin histolojik kesitleri.	60
Şekil 27	S4K2 hidrojel bazlı iskele için sito uyumluluk testi.	62
Şekil 28	1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı yapı iskelelerinde C2C12 hücre çoğalmasına ilişkin MTS tahlili sonuçları.	63
Şekil 29	1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskelelere ekilen C2C12 hücrelerinin 1000*x* büyütmelerindeki SEM fotoğrafları.	64

Şekil 30	1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskelelerde kültürlenen C2C12 hücrelerinin in vitro miyojenik farklılaşması için H&E, MT ve Sirius kırmızısı boyamanın histolojik görüntüleri.	65
Şekil 31	Miyojenik farklılaşma adımlarının şematik gösterimi	67

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

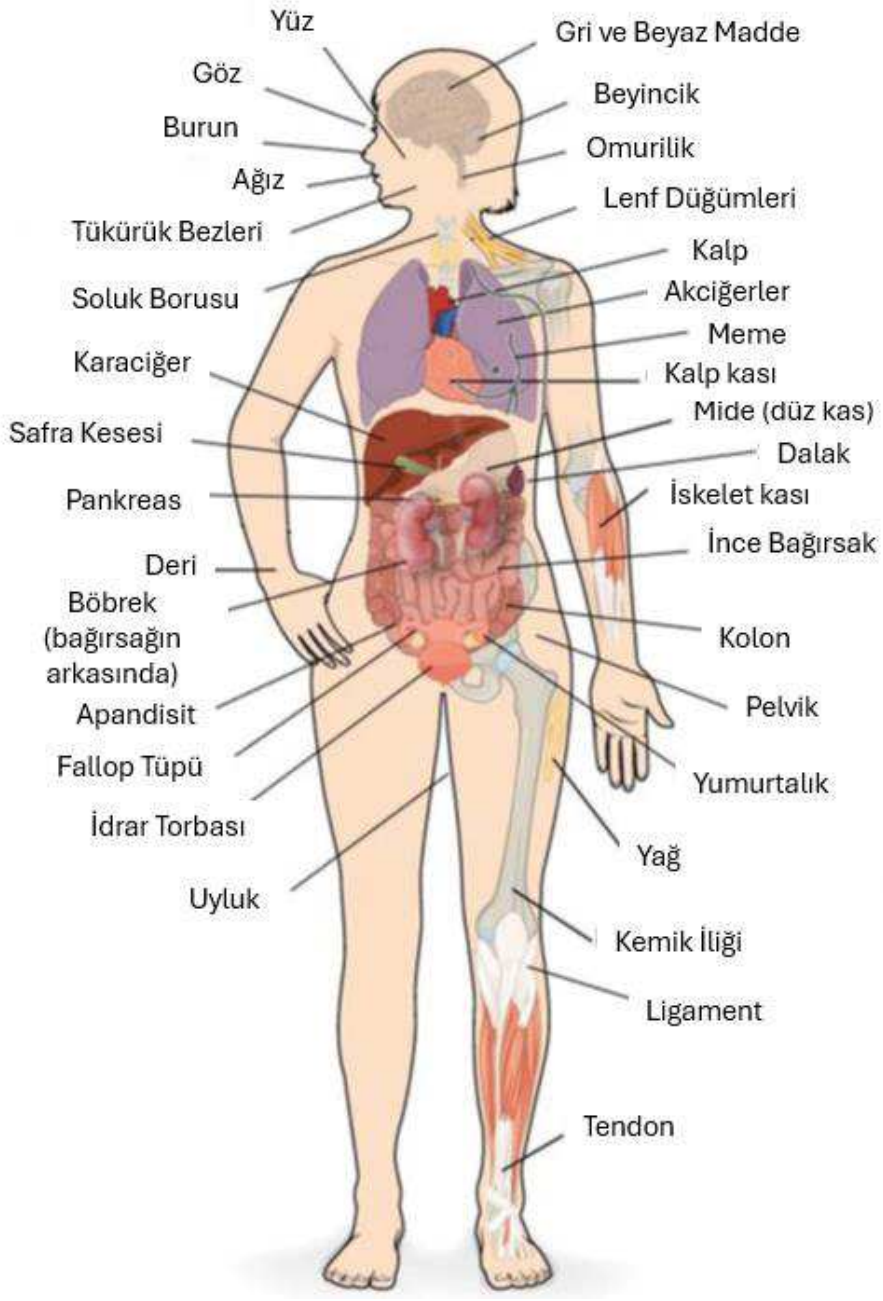
Canlı organizmanın %30-40'ını oluşturan iskelet kası, iskelet hareketi, duruşun korunması ve vücut ısısının düzenlenmesi gibi hayati fizyolojik işlevleri sağlayan, vücuttaki en büyük dinamik ve plastik dokudur (Shi vd., 2023; Volpi vd., 2022). Yumuşak bir doku olan kas dokusu, spor travması, mekanik ve biyokimyasal faktörler nedeniyle hasara karşı oldukça hassastır ve potansiyel olarak hareket kabiliyeti ve iç organ fonksiyonlarında bozulmaya neden olur (Demiray vd., 2023; Dong vd., 2020; Shi vd., 2023). İskelet kasları tipik olarak küçük yaralanmalarda yerleşik uydu hücrelerini aktive ederek kendi kendini iyileştirme kapasitesine sahiptir. Ancak, trafik kazaları, savaş veya tümör ablasyonunun neden olduğu hacimsel kas kaybında (HSK), bu rejeneratif kapasite yetersiz kalır ve kas fonksiyonunun onarılamaz kaybına neden olur (Carleton vd., 2021; L. Wang vd., 2015). Günümüzde, çeşitli kas dokusu hasarlarının tedavisinde cerrahi rekonstrüksiyondan yararlanılmaktadır. Ne yazık ki, düşük sağkalım oranları, donör bölgesi morbiditesi ve donör kaynaklarının yetersizliği gibi faktörler nedeniyle sınırlı fayda ve sonuçlar göstermiştir. Bu nedenle, kas yaralanmalarını tedavi etmek için etkili stratejilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Dong vd., 2020). Doku mühendisliği stratejileri, hasarlı veya hastalıklı iskelet kaslarını tedavi etmek için mevcut klinik standart yöntemlere umut verici alternatiflerdir. Aslında bu stratejiler, iyileşme sürecini potansiyel olarak destekleyebilecek ve hızlandırabilecek mühendislik ürünü bir iskele oluşturmayı amaçlamaktadır (Reid vd., 2020). Seçilen biyomateryal, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve hücresel çoğalma ve farklılaşmayı destekleme yeteneği gibi temel özelliklere sahip olmalıdır. Ayrıca, kasılma işlevselliğini desteklemek için uygun mikromekanik gücün sağlanması, doğal iskelet kası ortamlarını taklit etmek için çok önemlidir (Pollot vd., 2018). Son zamanlarda iskelet kası onarımı için hücreler ve büyüme faktörleri içeren çeşitli biyomateryaller geliştirilmiştir. Bazı ilerlemeler kaydedilmiş olsa da bu malzemelerin çoğu doğal hücre dışı matris (HDM) ile tutarlı döngüsel yükleme kuvvetlerini tolere edememektedir (Du vd., 2018). Şişmiş üç boyutlu (3B) malzemeler olan hidrojeller, doğal iskelet kasına çok benzeyen ayarlanabilir mekanik özellikleri nedeniyle kas dokusu mühendisliğinde hücre dışı substratlar olarak yaygın şekilde tercih edilmektedir (Fischer vd., 2021; Mantha vd., 2019). Uygun kimyasal ve mekanik özelliklerin yanı sıra hidrojeller, besin ve metabolit alışverişi yapmak ve hücre ve doku büyümesini kolaylaştırmak için 3B ortamlarında iyi bir şekilde birbirine bağlanmış

mikro ve/veya makrogözeneklere sahiptir. Özellikle makrogözenekli yapıları, fonksiyonel dokuların oluşturulmasında önemli bir husus olan vasküler büyüme için yeterli alan sağlayarak anjiyogenezi hızlandırır (Wang vd., 2020). Ayrıca, iyi tasarlanmış gözenekli 3B hidrojel bazlı iskeleler üretmek için dondurarak kurutma, kalıplama, elektrospinning, 3B baskı ve bir defekte doğrudan enjeksiyon dahil olmak üzere çeşitli teknikler kullanılabilir (Fischer vd., 2021). Hidrojeller tipik olarak bileşimlerine göre doğal, sentetik ve hibrit tipler olarak kategorize edilir. Doğal bazlı hidrojeller, hidrojellere genellikle biyouyumluluk, hücrelerle olumlu etkileşim ve doğal biyoaktivite gibi arzu edilen özellikler kazandırdıkları için popülerdir. Bununla birlikte, uzun süreli hücre kültürü uygulamaları sırasında çoğu doğal polimerin kullanılmasıyla ilgili zorluklar arasında hızlı bozunma oranları ve zayıf mekanik özellikler yer almaktadır (Maji vd., 2022). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, aminler, karboksil ve hidroksil grupları dahil olmak üzere biyopolimer tekrar birimleri içindeki çeşitli fonksiyonel grupların modifikasyonu, kimyasal, ışık, redoks ve termal gibi çeşitli çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak uygulanabilir. Oluşturulan hidrojellerin mekanik özellikleri, çapraz bağlama yöntemine, derecesine ve biyopolimer konsantrasyonuna büyük ölçüde bağlıdır (Muir vd., 2021). Kolajen, keratin, jelatin, kitosan, aljinat ve ipek gibi doğal biyopolimerlerden türetilen hidrojeller, uygun biyokimyasal özellikleri, doğal dokulara benzer esneklikleri ve doğada bol miktarda bulunmaları nedeniyle iskelet kası rejenerasyonu için kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Namjoo vd., 2023). Saç, tırnak, tüy, yün ve diğer epidermal uzantı yapıları gibi atık malzemelerden elde edilen keratin hidrojeller, iskelet kası rejenerasyonundaki potansiyel uygulamaları için kullanılmıştır (Lee vd., 2023). Passipieri ve arkadaşları, iskelet kası progenitör hücreleri ve/veya büyüme faktörleri için bir taşıyıcı görevi görmek üzere insan saçı keratin bazlı bir hidrojel geliştirmiş ve bir sıçan HSK hasarı modelinde fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmişlerdir. Ayrıca, keratin hidrojelin defekt bölgesine implantasyonu ile yeni kas dokusu oluşumunda önemli artışlar olduğunu bildirmişlerdir (Passipieri vd., 2017). Benzer şekilde, Baker ve arkadaşları, in vivo model HSK hasarının tedavisinde hücreler ve büyüme faktörleri içeren ve/veya içermeyen insan saçı bazlı keratin hidrojellerinin faydasını incelemiş ve iskelet kası rejenerasyonunu teşvik etmede umut verici sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir (Baker vd., 2017). İpek serisin (İS) ipekböceği Bombyx mori tarafından üretilen doğal bir polimerdir ve toplam koza ağırlığının %25-30'unu oluşturur. Koza kabuklarını oluşturmak için sakızlı yapısı sayesinde fibroin liflerini çevreler ve bir arada tutar (Meerasri vd., 2022). İS, hidrojeller, filmler, süngerler, iskeleler vb. gibi çeşitli

biyomalzemelere kolayca dönüştürülebilir. Benzersiz biyolojik aktiviteleri, düşük immünojenitesi ve uygun hücre-yapışma etkileşimine dayalı olarak çok sayıda biyomedikal ve farmasötik uygulamada kullanılmıştır (Saad vd., 2023). Song ve arkadaşları, şiddetli iskelet kası hasarının hızlı rejenerasyonu ve fonksiyonel onarımı için miR29-genetik olarak modifiye edilmiş miyoblastlar sağlayan bir serisin yaması tasarlamıştır. Bulgularına göre, serisin yaması nakledilen miyoblastların hayatta kalma ve çoğalma oranını artırmıştır. Dahası, serisin yaması, miyoblast füzyonuna izin vermek için optimum bir bozunma oranı ve oldukça gözenekli bir yapı sergilemiştir (Song vd., 2022). Bu çalışmada, yerinde kabarcık oluşturan hidrojel hapsetme sürecini kullanarak İS/YK'dan yeni gözenekli hidrojel bazlı biyoiskeleler üretmeyi amaçladık. Bu metodolojide, çapraz bağlı hidrojeller, proteinli karışımdaki -karboksil ve -amin fonksiyonel grupları arasında bir amid bağının oluştuğu iyi bilinen bir EDC/NHS birleştirme reaksiyonu yoluyla elde edildi. *İn situ* jel oluşumu sırasında, İS'deki karboksil gruplarının EDC/NHS ile aktive edilmesinin bir sonucu olarak CO_2 kabarcıkları oluşmuş ve bunlar daha sonra jel içinde hapsedilerek malzeme içinde gözenekli bir yapıya izin vermiştir. Farklı oranlarda İS ve YK içeren hidrojeller, mekanik ve reolojik davranışları ile sıkıştırma-toparlanma süreçlerine göre karşılaştırmalı olarak incelenmek üzere hazırlanmıştır. Hidrojellerin biyouyumluluğunu ve anjiyojenik tepkisini değerlendirmek için *in ovo* civciv korioallantoik membran (CAM) deneyi yapılmıştır. Geliştirilen hidrojellerin miyoblast sağkalımı ve miyojenik farklılaşma kapasitesi üzerindeki etkileri histokimyasal (HC) boyamanın yanı sıra gen ifadesi düzeyinde de test edilmiştir.

1.1. İnsan Yumuşak Dokusu

İnsan vücudunun kütlesinin çoğunluğunu oluşturan yumuşak dokular esnektir, jel benzeri bir matris içine gömülü lif katmanlarından oluşur ve kemiklerin aksine sertleşmeden kalır. Bunlar deri, kaslar, bağ dokuları ve çeşitli fonksiyonel organlar olarak sınıflandırılır (Al-Mayah, 2018; Hiltner vd., 1985). Deri, dış etkenlere karşı koruyucu bir bariyer işlevi görür ve aynı zamanda insan vücudunda en yaygın olarak bulunan yumuşak dokudur. Kaslar, bağlar ve tendonlar gibi bağ dokuları tarafından kolaylaştırılan stabilite ve hareketlilik sağlamaktadır. Fonksiyonel organlar ise beyinden plantar yağa kadar uzanır ve çeşitli yumuşak dokuları kapsamaktadır. İnsan vücudunun uzunluğu ve genişliği boyunca mevcut olan başlıca yumuşak dokular şekil 1'de gösterilmiştir (Singh vd., 2021).

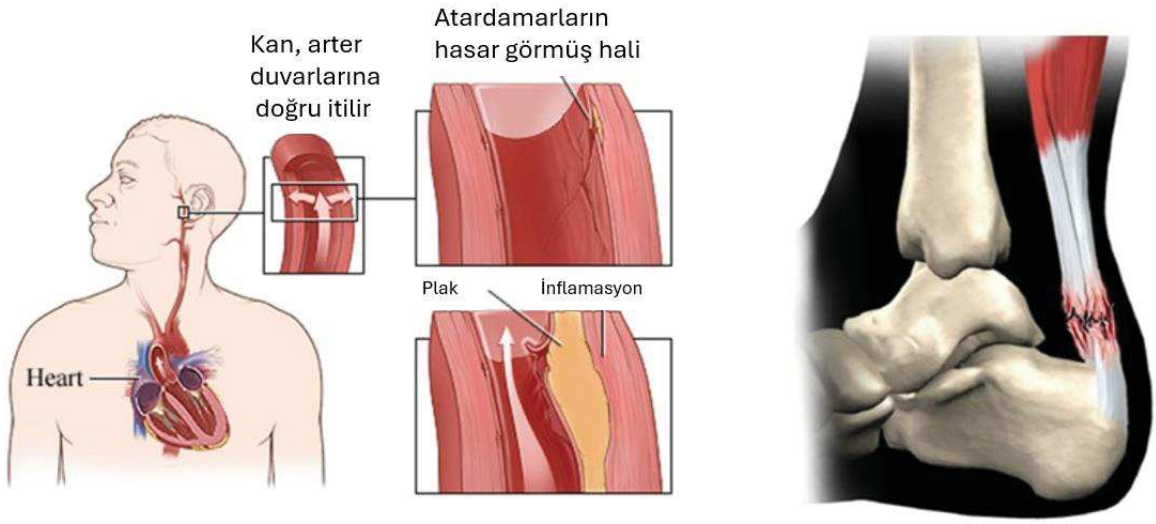


Şekil 1. İnsan vücudunda bulunan yumuşak dokular. (Singh vd., 2021) kaynağından çoğaltılmıştır.

Yumuşak dokunun yapısal elemanı hücreler tarafından salgılanan hücre dışı matristir. Hücre dışı matrisin işlevi, hücre ankrajı için mekanik destek, hücre büyümesinin kontrolü, hücre farklılaşmasının sürdürülmesi, doku mikro ortamının oluşturulması, düzenleyici moleküllerin depolanması ve sunulmasıdır. Hücre dışı matrisin bileşenleri

kolajen ve elastin içermektedir. Kolajen doku kuvvetinin önemli bir bileşenini sağlarken, elastin lifleri dokulara elastik bir esneklik kazandırmaktadır (Kular vd., 2014).

İnsan vücudunun eklemlerindeki yumuşak dokular, özellikle arteriyel düz kaslar, bağlar ve tendonlar, egzersiz, kaza veya ameliyat sırasında uygulanan hastalık veya aşırı kuvvet nedeniyle hasar alabilmektedir. Örneğin, insan atardamarının iç duvarı yüksek tansiyondan zarar görebilir ve bunun sonucunda plak gelişebilir ya da bir tendon hasar görebilir veya yırtılabilir (Şekil 2) (Li, 2016). Yumuşak doku hasarı, yaralanma veya başarısızlık davranışı bilgisi, yapay yumuşak doku karakterizasyonu için çok faydalıdır (Miller vd., 2022; Rausch vd., 2017). Yumuşak doku karakterizasyonu, yumuşak biyolojik dokuların davranışını yöneten malzeme özelliklerinin tanımlanması işlemidir. Bu malzeme özellikleri hakkındaki bilgi, araştırmacıların bir malzemenin doğal tepkilerini daha iyi anlamalarını ve ayırt edici özelliklerinden nasıl etkili bir şekilde yararlanabileceklerini anlamalarını sağlar. Yumuşak dokuların en çok araştırılan malzeme özellikleri mekanik özelliklerdir ve sıklıkla mühendislik malzemelerinde ölçülebilir (Arnold vd., 2023). Belirli bir yumuşak dokunun yapısı ve dolayısıyla özellikleri, mevcut bileşenlerin kimyasal ve fiziksel yapısına ve bunların bağıl miktarlarına bağlıdır. Ayrıca liflerin, hücrelerin ve temel maddenin bir yapı içinde nasıl organize edildiğine bağlı olarak dokuların mekanik özellikleri de farklılık göstermektedir. Mekanik özellikler arasında Young modülü (gerilme veya basınçtaki esnekliğin ölçüsü), kayma modülü (elastik kayma sertliğinin ölçüsü), karmaşık modül (titreşim koşulları altında gerilimin gerilime oranı) ve nihai güç (bir malzemenin dayanabileceği maksimum stres) yer almaktadır. Yumuşak dokuların mekaniğini tam olarak anlamak için mekanik özelliklere ihtiyaç duyulduğundan dolayı, yumuşak doku karakterizasyonunun tıbbi alanda birçok önemli uygulaması vardır (Navindaran vd., 2023). Rejeneratif tıpta biyomateryaller vücuttaki hasarlı dokuları onarmak veya değiştirmek için geliştirilmektedir. Bu yapay malzemelerin fizyolojik fonksiyonları geri getirmede başarılı olabilmesi için doğal dokularla benzer mekanik özellikler sergilemeleri gerekmektedir (Bonferoni vd., 2021). Hücreler rejenerasyon, farklılaşma ve dönüşüm gibi süreçleri kolaylaştırmak için mikro ortamlarından mekanik ipuçları aldığından, benzer mekanik özellikler hücre davranışı için de çok önemli olmaktadır (Vining vd., 2017).



Şekil 2. Kalbin yüksek tansiyonu sonucu atardamar iç duvarı hasarı görmesi ve kaza sonucu aşil tendonu yırtılması. Resim (Li, 2016) kaynağından alınmıştır.

1.1.1. İskelet Kasları

Kaslar, spesifik kasılma özellikleriyle diğer yumuşak dokulardan ayrılabilir. Organizmanın farklı bileşenlerine etki eden esnek kısalma mekanizmaları olarak işlev görürler. İşlevlerine bağlı olarak üç kas türü tanımlanabilir: iskelet kasları, düz kaslar ve kalp kası. İskelet kaslarının uçları ayrı kemiklere bağlı olup iskeletin hareketinden sorumluyken, aynı zamanda, insan vücudunun en dinamik ve esnek dokularından biridir (Maurel vd., 1998). İnsan organizmasındaki iskelet kası, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını, tüm vücut proteinlerinin %50-75'ini ve tüm vücut protein dönüşümünün %30-50'sini oluşturarak önemli bir rol oynamaktadır. Kas dokusunun içeriği su, protein ve diğer maddelerden oluşmaktadır. Yaklaşık %75'i su, %20'si protein ve geri kalan %5'i inorganik tuzlar, mineraller, yağlar ve karbohidratlar gibi diğer maddelerden oluşmaktadır (Frontera vd., 2015). İskelet kası, kan damarları ve sinirlerle donatılmıştır, bu da onu verimli bir şekilde enerji üretmek ve hücresel dengeyi korumak için önemli olan metabolik ve düzenleyici işlevler için bir merkez haline getirir. Bu unsurlar arasındaki kusursuz etkileşim, kas sağlığının korunması ve sorunsuz motor fonksiyonların kolaylaştırılması için hayati önem taşır. İster genetik faktörler ister çevresel etkiler nedeniyle olsun, bu uyumdaki bozulmalar kas sağlığı ve performansında düşüşe yol açar. Bu düşüş genellikle kas liflerinin kaybı,

motor yeteneklerin azalması ve hatta ciddi vakalarda ölüm olarak kendini göstermektedir (Mukund vd., 2020). Mekanik açıdan bakıldığında, iskelet kasının temel işlevi kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürmek, böylece kuvvet ve güç üretmektir. Metabolik açıdan bakıldığında ise iskelet kası, karbohidratlar ve amino asitler gibi temel substratlar için bir depolama alanı görevi görerek bazal enerji metabolizmasına katkıda bulunmaktadır (McCuller vd., 2023).

Kasların büyük çoğunluğu mezodermden, özellikle iskelet kasları paraksiyel mezodermden türetilir. Mezodermal hücreler, mitoza uğrayarak postmitotik miyoblastları oluşturan miyojenik hücreleri oluşturur. Miyojenik farklılaşma, somatik mezodermdeki miyoblastlar tarafından başlatılan iskelet kası gelişimindeki koordineli bir süreçtir (McCulleer vd., 2023; Lechpammer vd., 2021). Normalde hareketsiz olan miyoblastlar, kas yaralanması gibi faktörlere yanıt olarak hücre döngüsüne yeniden girebilir (Mademtzoglou vd., 2022). MYF5 ve MYOD1 olmak üzere iki kritik kas düzenleyici faktörün (MRF'ler) aktivasyonunu tetiklemektedir. Bu MRF'ler, omurgalı embriyosunun farklı bölgelerinde, baş, epaksiyel, hipaksiyel ve uzuv gövdesi kasları dahil olmak üzere çeşitli kas progenitörlerinin gelişimini yönlendirmede önemli bir rol oynamaktadır (Pownall vd., 2002). Aktivasyonları, kas soyuna kesin bir bağlılık anlamına gelmektedir. İlginç bir şekilde, MYOD1 ifadesi farklılaşma süreci boyunca devam ederken, MYF5 ifadesi farklılaşma başladıktan sonra durmaktadır.

Farklılaşma ilerledikçe, bir sonraki MRF dalgası, yani MYOG ve MRF4 devreye girmektedir. Bu MRF'ler, miyoblastları miyositlere dönüşen terminal farklılaşmalarına doğru yönlendirmektedir. Bu aşamada miyositler, kas kreatin kinaz ile miyozin ve aktin gibi kasılma proteinlerini kodlayanlar da dahil olmak üzere bir dizi kasa özgü geni ifade etmeye başlamaktadır. Bu geçiş, miyoblast farklılaşmasının işlevsel kas hücrelerine dönüşmesinin doruk noktasını oluşturur (Mukund vd., 2020). Miyoblastlar, çoğalma sonrasında farklılaşarak tek çekirdekli miyositleri oluştururlar ve bunlar daha sonra kas proteinlerini eksprese eden çok çekirdekli miyotüpleri oluşturmak üzere birleşirler. Miyotüpler α-actin, miyozin, troponin ve diğer kas proteinlerini eksprese etmektedir. Kritik transkripsiyon faktörleri arasında miyojenik farklılaşmayı düzenleyen Myf5, MyoD, MyoG, MRF'ler ve MEF2 bulunur. Myf5 miyoblast çoğalmasını etkilerken MyoD, farklılaşma için gereklidir. Myogenin ise hücrelerin geri dönüşü olmayan hücre döngüsüne girdiğini ve farklılaşmanın başladığını işaret etmektedir (Jang vd., 2013). Bu kas proteinlerinin hepsi birleşerek kas

lifleri olan miyofibrilleri oluşturur. Her bir miyofibril, sarkomer adı verilen temel hücresel birimiyle birlikte bir kas hücresini temsil etmektedir. Miyofiber demetleri fasikülleri oluşturur ve fasikül demetleri kas dokusunu oluşturur; her katman hücre dışı matris tarafından art arda kapsüllenir ve hücre iskeleti ağları tarafından desteklenir (Squire, 2001).

1.2. Kas Doku Mühendisliği (KDM) ve Biyomalzemeler

İskelet kasları genellikle küçük yırtılmalar, gerilme veya toksinler gibi küçük hasarları kendi kendine iyileştirebilir. Ancak, travmatik yaralanmalar, kas sinirlerinin hasar görmesi veya iskelet kaslarının dejeneratif hastalıkları gibi daha ciddi hasarlar için doğal iyileşme kapasiteleri yetersiz kalabilir (Costantini vd., 2017). Normal şartlar altında rejenerasyon süreci, çoğalmaya uğrayan ve daha sonra miyoblastlara farklılaşan, sonuçta miyofiberleri oluşturacak şekilde kaynaşan ve bozulmamış kas dokusuna entegre olan yerleşik multipotent kök hücrelerin aktivasyonunu içermektedir. Ancak, daha büyük hasarlarla karşılaşıldığında, doğuştan gelen rejenerasyon süreci engellenebilir. Bu durumda, fibröz skar dokusu oluşur, bu da doğal biyolojik bileşimin ve mikro yapının kaybolmasına ve sonuç olarak ciddi fonksiyonel bozulmaya yol açmaktadır (Nakayama vd., 2019). İskelet kası iyileşmesi için tedavi seçenekleri arasında mevcut klinik standart, sağlıklı otolog dokuların aşılanmasından oluşmaktadır. Ancak bu yaklaşım, donör dokusunun yetersizliği, fonksiyon kaybı ve morbiditesi gibi çeşitli sınırlamaları da içermektedir (Liu vd., 2018). Bu durumda KDM mevcut standart tedaviye daha uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. KDM stratejileri, rejenerasyon sürecini geliştirebilecek ve hızlandırabilecek in vitro biyo-yapay yapılar oluşturmak için potansiyel bir yol sunmaktadır. Bir iskelet kası dokusu yapısını etkili bir şekilde tasarlamak için KDM, uygun bir biyomalzeme substratını uygun bir iskele tasarımıyla bütünleştirmeyi amaçlamaktadır (Alarcin vd., 2021). İskelet kası doku mühendisliği alanı genel olarak *in situ, in vivo* ve *in vitro* doku mühendisliği altında üç ana yaklaşıma ayrılabilmektedir. Bu metodolojiler karmaşıklık açısından çeşitlilik göstermekte ve vücudun doğal rejeneratif süreçlerini geliştirmeyi ya da hasarlı kasın yerini alacak mühendislik ürünü dokular üretmeyi amaçlamaktadır (Carnes vd., 2020). *In situ* doku mühendisliği, yaralanma bölgesine aselüler bir biyomalzeme iskele yerleştirilmesini ve biyofiziksel/biyokimyasal ipuçlarını manipüle ederek endojen rejenerasyona rehberlik edilmesini içermektedir. Ayrıca, konakçı hücrelere ipuçları sağlayarak endojen

rejenerasyonu yönlendirmek için biyomateryallerin sitokinler veya parakrin sinyal hücreleri ile kombinasyonu halinde kullanılmaktadır (Kwee vd., 2017). Bir adım daha ileri giderek, *in vivo* doku mühendisliği, öğretici biyomalzeme iskelelerin nakilden hemen önce hücrelerle tohumlanmasına ve rejenerasyon sürecine katkıda bulunmalarına izin vermektedir. Bu yöntem hücre etkinliğini korurken, düşük canlılık, kalıcılık ve bağışıklık reddine yatkınlık gibi zorlukları da beraberinde getirmektedir (Grounds, 2018; McCullen vd., 2011). Daha karmaşık olan *in vitro* doku mühendisliği, işlevsel bir doku mühendisliği yapısının oluşturulmasını ve implantasyonunu kapsamaktadır. Bu, iskelelerin, biyolojik faktörlerin ve hücrelerin birleştirilmesini ve hücreler kasılabilir miyofiberlere dönüşene kadar *in vitro* ortamda yetiştirilmesini gerektirmektedir. Farklılaşma süreci genellikle biyokimyasal ipuçları, mekanik ve elektriksel stimülasyonun bir kombinasyonuna dayanmaktadır. İmplantasyondan önce *in situ* ve *in vivo* tekniklere kıyasla daha fazla işlevsellik sergilemesine rağmen, *in vitro* doku mühendisliği yapılarının dezavantajları bulunmaktadır (Carnes vd., 2020). Üretilen kasılma kuvvetleri genellikle doğal kas dokusunda bulunanlardan daha düşüktür ve oksijen ve besin difüzyonundaki sınırlamalar, boyut kısıtlamalarını veya genişletilmiş hücre canlılığı için karmaşık bir vasküler ağın kurulmasını gerektirmektedir (Rademakers vd., 2019). Bunlara ek olarak; gözenek boyutu ve yüzey yapısı gibi diğer fiziksel sinyaller, nakledilen hücrelerin hayatta kalması ve büyümesi için çok önemlidir. Hücrelerin yeterli oksijen ve besin alabilmeleri için tipik olarak bir kan damarının 200 μm içinde olmaları gerekir. Bu nedenle, hücre iskelesi için kullanılan malzemeler, uygun besin alışverişini sağlamak için 100 ila 500 μm arasında gözeneklere sahip olmalıdır (Bružauskaitė vd., 2016; Sachlos vd., 2003) Aljinat gibi malzemelerdeki daha büyük makro gözeneklerin (400-500 μm), daha küçük mikro gözeneklere veya nano gözeneklere kıyasla kas hücrelerinin canlılığını ve hareketini iyileştirdiği bulunmuştur (Hill vd., 2006). Ciddi kas yaralanmaları için, sağlıklı kas dokusunun hizalanmış yapılarını taklit eden iskeleler faydalı olabilmektedir. Önemli kas kaybına neden olan yaralanmalarda doku rejenerasyonu için doğal ipuçları bulunmayabilir. Bu durumlarda, sağlıklı kas dokusuna benzeyen desenlere sahip iskeleler yardımcı olabilir. Kas hücreleri mikro oluklar, mikro fiberler veya diğer desenli yüzeyler üzerinde büyütüldüğünde hizalanma eğilimindedir (Cezar vd., 2015). Son zamanlarda, kas hücrelerinin büyümesini ve hizalanmasını teşvik etmek için fibrin mikro iplik demetleri kullanılmış ve kısmi kalınlıktaki kas defektlerinin başarılı bir şekilde yenilenmesine yol açmıştır (Page vd., 2011).

Üretilen biyomalzemeler arasında hidrojel bazlı biyomateryaller, daha yüksek su içeriği, biyokimyasal ipuçları ve ayarlanabilir fiziksel ve mekanik özellikler gibi benzersiz biyomimetik özellikler sunan iskelet kası dokusu mühendisliği için umut verici adaylar arasındadır (Naahidi vd., 2017). Ayrıca, hidrojeller gelişmiş mikrofabrikasyon teknikleri kullanılarak çeşitli tasarım konfigürasyonlarına kolayca işlenebilmektedir (Zorlutuna vd., 2012). Bu bağlamda, fiber bazlı doku mühendisliği teknikleri hidrojel mikrofiberlerin oluşturulmasını sağlayarak, uygun kas dokusu gelişimi için son derece hücre uyumlu bir mikro ortam ve yapılandırılmış yönlülük sağlamak için en uygun platform olarak hizmet vermektedir (Volpi vd., 2022). Dahası, hidrojel mikrofiberler hem bağımsız yapılar olarak hem de tam ölçekli 3B iskelet kası doku yapılarını yeniden yapılandırmak için birleştirilebilen yapı taşları olarak işlev görebilmektedir (Kim vd., 2024; Volpi vd., 2022). Örneğin, Cheema ve arkadaşları miyoblastları 7 gün boyunca 3B kolajen jellerde yetiştirerek farklı gelişim aşamalarında miyoblastlar tarafından üretilen kasılma kuvvetlerindeki değişimleri araştırmıştır (Cheema vd., 2003). Başlangıçta, miyoblastlar jel içinde yuvarlak bir morfolojiyi koruduğu için kasılma kuvvetleri düşük kalmış, ancak miyoblastlar hizalandıkça ve tek eksenli gerilim altında miyotüpler oluşturdukça önemli ölçüde artmıştır. Çeşitli araştırma grupları bu modeli geliştirerek 3B kolajen jellerdeki memeli kas hücrelerinin kültürde uzun süre muhafaza edilebileceğini göstermiştir. Bu kültürler daha yüksek hücre füzyon verimliliği, çizgili çok çekirdekli miyofiber oluşumu ve miyotendinöz bağlantı oluşumu belirtileri sergilemektedir (Nakamura vd., 2017). Protein bazlı iskelelerle ilgili bir zorluk, bağışıklık sisteminin reddedilmesi ve yabancı cisim tepkisinin başlatılmasıdır; bu da birçok in vivo çalışmanın bağışıklık sistemi yetersiz hayvan modellerinde yapılmasına neden olmaktadır. Örneğin, Ma ve arkadaşları iskelet kası kusurlarını tedavi etmek için murin miyoblastları ile tohumlanmış gözenekli bir kolajen iskele kullanmışlardır. Vaskülerizasyon, innervasyon ve miyofiber oluşumu gözlemlediklerini bildirmişlerdir; ancak, iskele-doku greftinin başarılı entegrasyonu sadece bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlarda görülmüştür (Ma vd., 2011).

Çok yönlü biyomateryaller olan aljinatlar, sertlik ve parçalanabilirlik gibi özellikler üzerinde hassas kontrol sağlamak için kimyasal olarak modifiye edilebilir (Sun vd., 2013). Gözenekli kriyojeller olarak, ilaç salan aljinat iskeleler miyoblastların dışa doğru göçünü kolaylaştırmış, yeni miyofiberler oluşturarak ve kas kasılma kuvvetlerini geri kazandırarak kas rejenerasyonuna doğrudan katılmıştır (Borselli vd., 2011; Qazi vd., 2015). Gerçekten de kas hücrelerinin dışa doğru göçünün sonraki kas rejenerasyonu için hayati önem taşıdığı

kanıtlanmıştır. Yakın zamanda Wang ve meslektaşları, farelerde yaralı tibialis anterior kaslarının yakınına minimal invaziv olarak enjekte edilen bir şekil hafızalı aljinat iskeleyi tanıtmıştır. Bu iskele, yerinde miyoblastlar ve büyüme faktörleri ile rehidre edildi. Büyüme faktörü ve miyoblast yüklü iskele fibrozisi azaltmış, kas kuvvetlerini iyileştirmiş, yeni miyofiberler oluşturmuş ve nakledilen hücreler konak dokuya entegre oldukça zamanla bozunmuştur (Wang vd., 2014).

1.3. Biyomalzemeler İçin Yenilenebilir Doğal Kaynaklar

Tıbbi uygulama için doğal ve sentetik polimer bazlı biyomalzemelerin kullanımı, tıp endüstrisinden her yıl milyonlarca hastayı farklı implante edilebilir cihazlar ve doku grefti kullanarak tedavi etmeye yönelik yüksek talepler nedeniyle muazzam bir şekilde artmıştır. Bu artış, biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu, çevre dostu ve ekonomik olan doğal polimer malzemelerin kullanımına yönelik bir ilgi kayması yaratmıştır. Doğal polimerik malzemeler, çok çeşitli kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikler sunarak kimyada esnekliğin önemli bir avantajını sağlamaktadır (Manesa vd., 2022). İskelet kas dokusu mühendisliğinde kullanılan birçok doğal biyomateryal bulunmaktadır. Bu doğal malzemelerin bazı örnekleri ve bu örneklerin avantaj ve dezavantajları tablo 1'de verilmiştir. Doğal bir biyomateryal olan kolajen, mükemmel biyobozunurluğa, biyolojik sistemlerle biyouyumluluğa ve düşük antijeniteye sahiptir. Ayrıca, çapraz bağlama sırasında ve sonrasında ayarlanılabilir mekanik özelliklere sahip olabilen kolajen böylece hücre büyümesini de teşvik etmektedir (Kozan vd., 2023; Rezvani Ghomi vd., 2021). Ma ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kolajen kompozit bir iskeleye fare miyoblastları (C2C12) ekilmiştir. C2C12 hücreleri iskele içerisinde hayatta kalabilmiş, göç edebilmiş ve iskeleler zamanla bozulmuştur. Bu sonuçlar, hücre tohumlu iskelelerin, kusurlu kas dokusuna implante edildikten sonra vasküler gelişimi teşvik etmek için ideal olduğunu göstermiştir (Ma vd., 2011). Başka bir çalışmada da tip I kolajen iskelelerin C2C12 miyoblastları ile tohumlandığını ve bunun sonucunda iskelenin gözenekleri içinde hizalanmış miyotüplerin oluştuğunu göstermiştir. Bu miyotüpler yalnızca sağlam bir farklılaşma geçirmekle kalmamış, aynı zamanda laminin immün boyamasıyla kanıtlandığı üzere hücre dışı matrislerini (HDM) de salgılamışlardır (Kroehne vd., 2008).

Aljinatlar, sertlik ve bozunabilirlik gibi parametrelerde daha sıkı kontrol sağlamak üzere kimyasal olarak değiştirilebilmeleri ve farklı formlarda kullanılabilmeleri nedeniyle çok yönlü biyomateryallerdir (Liu vd., 2012; Shapiro vd., 1997). Mevcut bir çalışmada, aljinat iskelelere eklenen hücreler ile Matrigel gibi diğer malzemelerden yapılmış iskelelere eklenen hücreler karşılaştırıldığında, aljinat iskelelerde bulunan hücrelerin daha yüksek seviyelerde desmin ve miyosin ifade ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, aljinattan yapılan iskelelerin miyoblast farklılaşmasının tüm aşamalarını desteklediğini öne sürmüştür (Yi vd., 2017). Wang ve arkadaşları, büyüme faktörü ve miyoblast yüklü aljinat iskelesini farelerin yaralı kaslarına enjekte etmiştir. Bu iskele kas kuvvetlerini iyileştirmiş, fibrozisi azaltmış ve içerisindeki hücreler konakçı doku ile bağlandıkça zamanla bozulmuştur (L. Wang vd., 2014). Aljinat, kas rejenerasyonu için büyüme faktörlerini etkili bir şekilde taşıyabilse ve miyoblast kültürünü geliştirebilse de aljinatın modifiye edilmemiş parçalanamayan yapısı genellikle yabancı cisim reaksiyonunu tetiklemektedir (Balakrishnan vd., 2014).

Kitosan antitümörojenik, antibakteriyal ve antifungal olduğu için oldukça faydalıdır. Jana ve arkadaşları bir çalışmalarında kitosan ile gözenekli bir yapı iskelesi oluşturmuştur. Miyotüp oluşumu C2C12 hücreleri ile denenmiştir ve analiz sonucunda kitosan konsantrasyonu yüksek olan malzemelerde miyotüplerin yüksek bir çapa sahip olduğu bulunmuştur (Jana vd., 2013). Kheradmani ve arkadaşları kitosan ve polivinil alkol (PVA)'ü birlikte kullanarak nano lifli bir iskele tasarlamıştır. Oluşturulan iskele, mekanik olarak uygun, hücrelerin daha fazla besin maddesi üretmesine izin veren ve iyi derecede şişme özelliğine sahiptir. Bu özellikler sayesinde kitosan/PVA iskelesi, iskelet kasının yeterli sürede ve en az hasarla onarımını kolaylaştırmıştır (Kheradmandi vd., 2016).

Fibrin, doku onarımını kolaylaştıran HDM proteinidir. Ayrıca gıda ve ilaç idaresi (FDA) onaylı fibrin doku yapıştırıcı bulunmaktadır. Fibrin, kendisiyle etkileşime giren hücrelerin 2 veya 4 hafta içerisinde kendi ECM proteinlerinin üretilmesine izin vermiştir (Marcinczyk vd., 2017). Page ve arkadaşları, ince fibrin lifleri üretmiştir ve liflerin içerisine kas hücrelerini ekmiştir. Hücre yüklü mikro ipliklerin nakli, yeni kas lifi oluşumuna katkıda bulunmuştur (Page vd., 2011). Borschel ve arkadaşları ise fibrin hidrojellerin içerisine miyoblastları ekleyerek in vivo ortamda femoral damarların yanına nakletmiştir. Sonucunda, olgun miyotüplerden oluşan vaskülerize bir kas dokusu oluşmuştur (Borschel vd., 2006).

Tablo 1

İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan bazı doğal malzemelerin avantajları ve dezavantajları (Kozan vd., 2023)

Biyomalzeme	Avantajlar	Dezavantajlar
Kolajen	Miyotüp oluşumunu ve revaskülerizasyonu destekler.	Mekanik dayanımı düşüktür.
Aljinat	Büyüme faktörlerinin sürekli salınımı, bağışıklık tepkisini düzenler.	Hücreler aljinat iskele üzerine ekildiğinde daha düşük seviyelerde miyojenik genler ifade edilir.
Kitosan	Antimikrobiyal özellikler gösterir.	Mekanik dayanım çok yüksek olabilir.
Fibrin	Yüksek düzeyde iskelet kası gen ekspresyonuna neden olur.	Çok hızlı bozunur.
Jelatin	Üstün mekanik özellikler gösterir, yavaş bozunur.	Canlı organizmada kök hücreleri kabul etmiyor.

Jelatin immünojenik olmayan ve biyobozunur bir proteindir. Ayrıca hücre yapışmasını ve çoğalmasını da desteklemektedir (Acevedo vd., 2019). Ju ve arkadaşları, gözenekli jelatin iskelesi oluşturmuş ve bu iskelelerin infiltrasyonu ve vaskülarizasyonu indüklediğini görmüştür. Her iki olay da iskelet kası yenilenmesi için faydalı bulunmuştur (Ju vd., 2014). Haas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada jelatin ve kolajen birlikte kullanılarak bir sünger tasarlanmıştır. Jelatin oranı fazla olan iskeleler daha yüksek gözenek boyutu ve sıkıştırma modülüne sahiptir. Mekanik özellikleri istenilen sonuçlar vermesine rağmen, kolajen konsantrasyonuna sahip iskeleler hücre çoğalmasını daha fazla desteklemiştir (Haas vd., 2019). Ayrıca jelatin, sentetik bir polimer olan polikaprolakton (PCL) ile karıştırılmış ve nanofiberler elde edilmiştir. Sadece PCL içeren nanotüplerde miyotüp oluşumuna rastlanmazken, jelatin ilavesi ile miyojenik genlerin ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Kim vd., 2010). Sentetik polimerler biyouyumluluktan yoksun olduklarından, onları doğal malzemelerle karıştırmak oldukça yaygın ve mantıklı bir uygulamadır (Riboldi vd., 2005).

Ancak tüm bu geliştirilen malzemelere rağmen, yenilenen dokular yaralanmamış kasların mekanik gücünü %100 geri getirememiştir. Ortaya çıkan mekanik kuvvet en fazla %20

olabilmiştir (Jana vd., 2013). Bu da kas doku mühendisliği stratejilerinin %100'e ulaşıncaya kadar gelişmeye devam etmesi gerektirdiğini ifade etmektedir.

1.3.1. Serisin

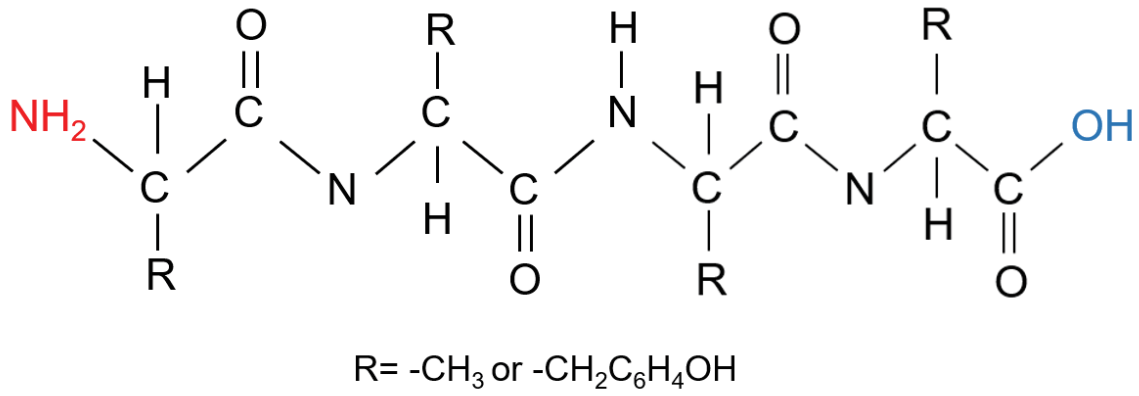
Doğal polimerlerin önemli bir örneği olan İS, ipek kozalarından elde edilen yapısal lifli bir polimerdir. İS, ipek üretimi sırasında gam giderme işleminin bir yan ürünü olan ve genellikle atık olarak atılan proteindir. Dünya çapında 50.000 ton/yıl serisinin gam giderme sürecinden kaynaklanan atık sulara atıldığı tahmin edilmektedir. Bu tür protein atıkları, atık olarak atılan protein molekülünü parçalayan mikroorganizmaların ve söz konusu işlemde kullanılan diğer kimyasal maddelerin ürettiği yüksek oksijen ihtiyacından kaynaklanan çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle, bu proteinin geri kazanılması ve geri dönüştürülmesi, çevresel ve ekonomik bir mücadeleyi temsil etmektedir. İS'in tekstil endüstrisi atık sularından geri kazanılması ve yeniden kullanılmasıyla hem çevresel sorunlar azaltılmakta hem de yüksek düzeyde ticari getiri elde edilmektedir (Arango vd., 2021). *Bombyx mori* ipek kozasından serisinin çıkarılması ve kullanılması için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar arasında yüksek sıcaklık, asidik (örneğin sitrik asit çözeltisi), alkali (örneğin sodyum karbonat çözeltisi) ve üre kullanımı bulunmaktadır. Gam giderme koşulları, özellikle sıcaklık, basınç, kimyasal katkı maddesi ve ısıtma süresi gibi faktörler, İS moleküler ağırlığını belirleyici şekilde etkilemektedir. Bu nedenle, İS'in moleküler ağırlığı, ekstraksiyon koşulları tarafından kontrol edilebilir (Kunz vd., 2016). Serisin, moleküler ağırlığı 20 ila 400 kDa arasında değişen hidrofilik bir proteindir. Aynı zamanda, esas olarak serin (%32), aspartik asit (%18) ve glisin (%16) dahil olmak üzere 18 farklı amino asitten oluşmaktadır (Tablo 2). Yüksek oranda polar amino asit sekansı, serisini iyi bir nemlendirici ajan yapmakta ve ona jelleşme özellikleri vermektedir. Amino asit yan zincirlerinin polar grupları (karboksil, hidroksil ve amino grupları) ve organik bileşimi, çözünürlüğü ve yapısal organizasyonu, çapraz bağlama, kopolimerizasyonlar ve diğer polimerlerle kombinasyonlar sağlamaktadır (Şekil 3) (Kunz vd., 2016). Bu özellikler ile birlikte, biyouyumlu bir biyopolimer olan İS, doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzeme olarak kullanımının temelini oluşturmaktadır (Bascou vd., 2022). İS, doku rejenerasyonu bağlamında hücresel davranışı düzenleme kabiliyeti nedeniyle biyomalzemelerin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Geliştirilen biyomalzemeye anti-enflamatuar ve anti-oksidatif özellikler kazandırmaktadır. Ek olarak İS; hücresel yapışmayı

güçlendirmeye, hücresel proliferasyonu uyarmaya ve kolajen sentezini artırmaya hizmet etmektedir (Silva vd., 2022).

Tablo 2

Serisinin amino asit bileşimi (Lalit Jajpura, 2015)

Amino Asit			
İsim	Kısaltma	Sembol	Oran (%)
Serin	Ser	S	33
Aspartik Asit	Asp	D	15
Glisin	Gly	G	14
Glutamik Asit	Glu	E	8
Treonin	Thr	T	8
Alanin	Ala	A	5
Lizin	Lys	K	4
Tirozin	Tyr	Y	3
Valin	Val	V	3
Arjinin	Arg	R	3
İzolösin	Ile	I	1
Lösin	Leu	L	1
Fenilalanin	Phe	F	1
Histidin	His	H	1
Prolin	Pro	P	1



Şekil 3. Serisinin kimyasal yapısı. (Çapar vd., 2015)

Dinescu ve arkadaşları, hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat ile geliştirilmiş bir kolajen-serisin yapı iskelesinin, kıkırdak doku mühendisliği amacıyla insan yağından türetilen kök hücreler için geçici bir fiziksel destek olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (Dinescu vd., 2013). Xie ve ark. ise ilk kez bir sıçan sinir yaralanması modelinde periferik sinir rejenerasyonu için saf serisin kondüitinin kullanıldığını bildirmiştir. Bu serisin/silikon sinir kılavuz kanalı, otolog sinir aşısına benzer bir fonksiyonel iyileşme sağladığından, hasarlı periferik sinirleri onarmak için otolog sinir aşılarına bir alternatif olarak kullanılabilmektedir (Xie vd., 2015).

Tao ve ekibi, gümüş nanopartiküller, serisin ve PVA'dan oluşan süngerlerin çeşitli özelliklerini incelemiştir. Bu süngerler yüksek gözeneklilik, fare fibroblast (NIH/3T3), insan embriyonik böbrek (HEK-293), ve fare makrofaj (RAW264.7) hücrelerine uyumlu, iyi ıslanabilir, higroskopik ve sağlam mekanik özelliklere sahiptir. Ayrıca, S. aureus, E. coli ve P. aeruginosa bakterilerine karşı etkili antibakteriyel aktivite gösterirler. Wistar fareleri üzerinde yapılan deneyler, bu kompozit sargının yara iyileşmesini desteklemek için kolajen birikimini teşvik edebildiğini öne sürmektedir (Tao vd., 2019).

Siritientong ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir klinik çalışmada serisin salan biyoaktif yara sargısının, klinik olarak mevcut Bactigras® yara sargısına kıyasla kısmi kalınlıkta deri grefti donör bölgelerinin tedavisinde daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bactigras® 14 ± 5.2 günde tam iyileşme gösterirken serisin salan yara örtüsü 12 ± 5.0 günde iyileşme göstermiştir. Ayrıca serisin salan örtü, tedavi sırasında ağrıyı önemli ölçüde

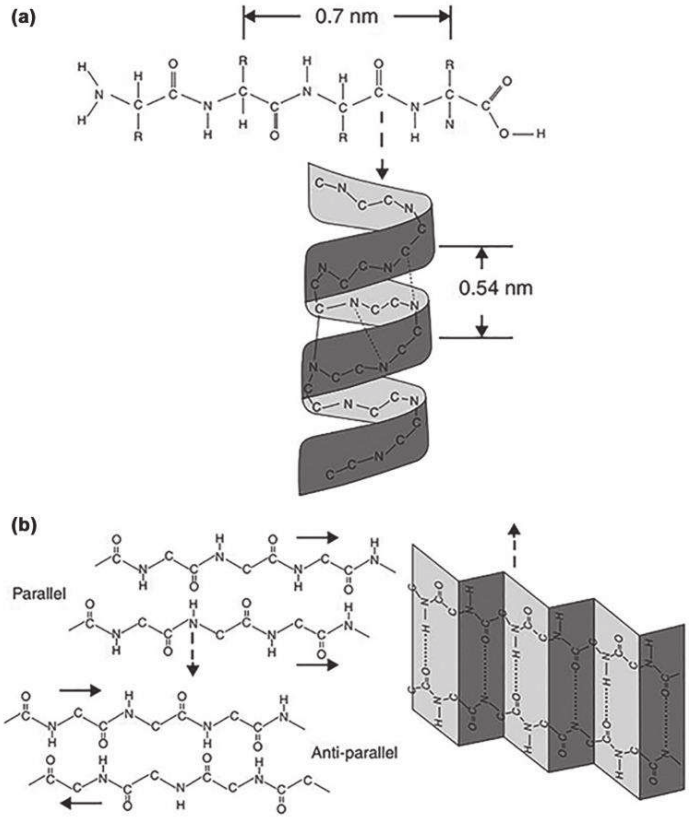
azaltmıştır (Siritientong vd., 2014). Başka bir klinik çalışmada, serisin bazlı bir krem, serisin içermeyen bir kremle karşılaştırıldığında, üremik kaşıntısı olan hemodiyaliz hastalarında 6 hafta sonra hidrasyonu iyileştirmiş ve kaşıntıyı azaltmıştır (Aramwit vd., 2012).

İS'in, deri ve kemik doku mühendisliği alanlarında çalışmaları olmasına rağmen, kas dokusu mühendisliği çalışmalarında kullanımına ilişkin makaleler hala sınırlıdır. Mevcut bir çalışmaya göre, serisin iskelet kası rejenerasyonunu hızlandırmakta, gözenekli yapısı hücrelerin hayatta kalma ve çoğalma kabiliyetini artırmakta ve fibroblast infiltrasyonunu azaltarak anti-fibrotik etki sağlamaktadır. Ayrıca, daha önceki bulgular serisin içeren iskelenin *in vivo* bozunma süresinin yaklaşık 8 ila 12 haftayı kapsadığını göstermiştir. Bu süre, iskelet kası kök hücresi olarak bilinen miyoblast füzyonunu yeterince barındırırken, serisin iskelesinin biyoaktivitesini aktif olarak göstermesini sağlamaktadır. Bu durumlar, serisin iskelesinin iskelet kası onarımında optimal bir hücre taşıyıcısı olarak işlev gördüğünü doğrulamaktadır (Song vd., 2022).

1.3.2. Keratin

Keratin proteinlerinin çeşitli ekstraksiyonu, saflaştırılması, karakterizasyonu ve uygulanması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yıllar geçtikçe tırnaklardan, tavuk tüylerinden, kuş gagalarından, keçi boynuzlarından ve insan saçından keratin elde edilmiştir. Diğer önemli keratin kaynağı ise koyun yünüdür. Ağırlıkça %95'e kadar keratin içeren yün, kozmetik ve biyomedikal alanlarda önem kazanan ara filament proteinlerinin saf bir kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yün ve insan saçından hazırlanan keratin biyomateryalleri hemostatik ve hücre bağlama potansiyeline sahip hücre bağlama motiflerine sahiptir. Keratin, kendiliğinden bir araya gelme ve polimer oluşturma konusunda kendine özgü bir yeteneğe sahiptir (Idrees vd., 2020). Keratin proteinleri liflidir, uzun polipeptit zincirleri ve birbirine bağlanan liflerle karakterize edilmektedir. Bu zincirler keratinin temel yapısını oluşturmakta ve zincirlerin heliksler halinde kıvrıldığı α-konformasyonunu ya da zincirlerin yan yana kıvrımlı tabakalar halinde bağlandığı β-konformasyonunu benimsemektedir. Bu yapısal farklılık, keratinleri α- ve β-formları olarak sınıflandırır ve β-keratin daha fazla sertlik sergiler. α-formu yün, kıl, pençe, toynak, boynuz ve stratum corneum gibi memeli

dokularında baskınken, β-formu tüyler, gagalar, pençeler, pullar ve sürüngen pençeleri gibi kuş ve sürüngen sert dokularında yaygındır (Şekil 4) (Chilakamarry vd., 2021).



Şekil 4. Keratin proteininin α-(a) ve β- (b) formları.

Keratin yüksek miktarda sistin, glisin, prolin ve serin amino asitlerini içermektedir. Ancak lizin, histidin ve metionin bakımından düşüktür (Korniłłowicz-Kowalska vd., 2011). Keratinin karakteristik özelliği, diğer proteinlere göre yüksek sistein içermesidir. Yüksek sistein içeriği hem mekanik hem de kimyasal direnç sağlarken, keratin proteini aynı zamanda yüksek bir termal dirence de sahiptir (Chilakamarry vd., 2021). Yapısında keratin bulunan malzemelerden keratini elde etmek için birçok yöntem bulunur. Bunlar; oksidasyon, indirgeme, alkali ekstraksiyonu, sülfitolizis ve mikrodalga ışınlamasıdır (Feroz vd., 2020). Alkali yöntemde keratini parçalamak için çok sayıda güçlü kimyasal kullanılmakta ve keratinin yapısına zarar verilmektedir. Diğer bir yöntem ise keratindeki sistin bağlarını kırmak için merkaptoetanol gibi maliyetli ve potansiyel olarak zararlı kimyasalların kullanılmasını içermektedir. Daha ucuz bir alternatif sodyum sülfürdür, ancak yine de büyük

miktarlarda üre gerektirmekte ve keratin özelliklerini değiştirebilmektedir. İyonik sıvılar daha çevreci bir yaklaşım sunmakta, ancak hassas koşullar gerektirmektedir. Sonucunda; suda çözünmeyen keratin elde edilebilmektedir. Formik veya perasetik asit gibi asitlerin kullanıldığı oksidasyon teknikleri de keratini modifiye etmek için kullanılmıştır (Shavandi vd., 2017).

Keratin'in genel kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar, biyomateryallerin geliştirilmesine yol açmıştır. Keratin bazlı biyomateryaller kendi kendine düzenlenme, biyouyumluluk, biyolojik parçalanma ve hücresel proliferasyonu destekleme konusunda kendine özgü bir yeteneğe sahiptir (Feroz vd., 2020). Yeni biyomateryal geliştirmek için kaplamalar dahil olmak üzere farklı formlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Donato vd., 2020). Örneğin; keratin filmlerle kaplanmış polistiren hücre kültürü plakaları, hücre büyümesini kaplanmamış kültür plakalarına göre daha iyi desteklemektedir (Ghosh vd., 2017). Doku mühendisliği uygulamalarında sünger keratinin faydasını açıklamak için hidroksiapatit ilavesiyle keratin sünger üretimi optimize edilmiştir. Süngerler, osteoblast hücrelerinin farklılaşma modelini olumlu yönde etkilemiş ve değiştirmiştir (Tachibana vd., 2005). Başka bir çalışmada Yıldız ve arkadaşları silikon ve bor kaynaklarını kullanarak keratin/kolajen proteinleri ile filmler üretmiştir. Malzemenin doku uyumluluğunu etmek için CAM testi yapılmıştır. Histolojik ve mikroskobik değerlendirmelere göre hücre yapışması ve çoğalması malzeme implante edilen bölgede artmış; bu da malzemenin doku mühendisliğine uyumlu bir malzeme olduğunu kanıtlamıştır (Yildiz vd., 2024). Cal ve arkadaşları kolajen ve keratin kullanarak sol-jel reaksiyonları ile kriyojel sentezlemiştir. Bu kriyojeller gelişmiş mekanik özellikleri ile insan adipoz mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını da kolaylaştırmıştır (Cal vd., 2021).

İS'ye benzer şekilde, yün keratin malzemeleri de kas doku mühendisliği için tercih edilebilmektedir. Literatürde yer alan bir çalışmada, keratin hidrojel implantasyonu, kemirgen kasında HSK'den sonra fonksiyonel sonuçlarda fizyolojik olarak anlamlı iyileşmelerle sonuçlanmıştır (Passipieri vd., 2017). Başka bir çalışmada keratin, enjekte edilebilir bir hücre ve ilaç dağıtım aracı olarak hizmet etme kapasitesi nedeniyle HSK onarımı için uygun bir aday olmuştur (Baker vd., 2017).

İKİNCİ BÖLÜM
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Keratin ve serisin birçok farklı malzeme ile eşleştirilebilir. Her iki protein de doku mühendisliği ürünü oluşması için oldukça etkilidir (Mowafi vd., 2023). Ancak bildiğimiz kadarıyla ikisinin bir malzemede birleştiği çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Az sayıda bulunan bu çalışmalara örnek olarak; Chen ve arkadaşları tarafından ipek serisin filmini güçlendirmek için, yün keratininin yapıya eklenmesiyle moleküler ağ yeniden tasarlanmıştır. Bu çalışmanın amacı; yün keratinin serisin içerisine eklenmesiyle malzemeyi ne kadar güçlendireceğini araştırmaktır. Serisin, keratin ile birleştirilince kompozit membranların elastikiyeti artmıştır. Bunun dışında, kompozit filmler ultraviyole radyasyonu emebilmiş ve altındaki malzemeleri foto degradasyondan koruyabilmiştir. Ayrıca malzemelerin biyouyumluluğu nedeniyle doku mühendisliği, biyomedikal alanlar ve paketleme uygulamalarında biyomalzemeler olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Chen vd., 2018).

Başka bir çalışmada; Vineis ve arkadaşları sentezledikleri jelatin, keratin ve serisin elektro eğrilmiş nanoliflerinin fiziko-kimyasal özellikleri, in vitro çalışmalarda kullanımlarını doğrulamak için değerlendirmiştir. In vitro sonuçlar, serisin ve keratinin insan mezenkimal kök hücre proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkisini %50 artış oranıyla doğrulamıştır. Bu artış, proteinler arasındaki özel fiziksel etkileşime doğrudan atfedilebilen in vitro stabilitenin arttırılmasıyla ilişkilidir. Bu bulgular, doku mühendisliği için nanoyapılı platformlar olarak serisin/keratin/jelatin ile zenginleştirilmiş elektroeğrilmiş liflerin kullanımını önermektedir (Vineis vd., 2021).

Thonpo ve arkadaşları, keratin çözeltisi hazırlamış ve bu çözeltiyi ayrı ayrı jelatin, serisin, kolajen ve nişasta ile karıştırmıştır. Doğal keratin filmi α-heliks yapısından oluşmaktaydı, serisin ve nişasta ile birleştikten sonra rastgele sarmal yapıların içeriğinde diğer proteinlere göre artış olmuştur. Bu sonuç filmlerin, özellikle de keratin/nişasta karışımının çözünmesini arttırmıştır. Ayrıca 2:1 keratin/serisin oranına sahip filmlerde daha yüksek kırılganlık bulunmuştur (Thonpho vd., 2016). Bu çalışmalarda sunulan örnekler ve serisin ile keratinin sağladığı avantajlar göz önüne alındığında, bu iki bileşenin birlikte kullanılmasının olumlu sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

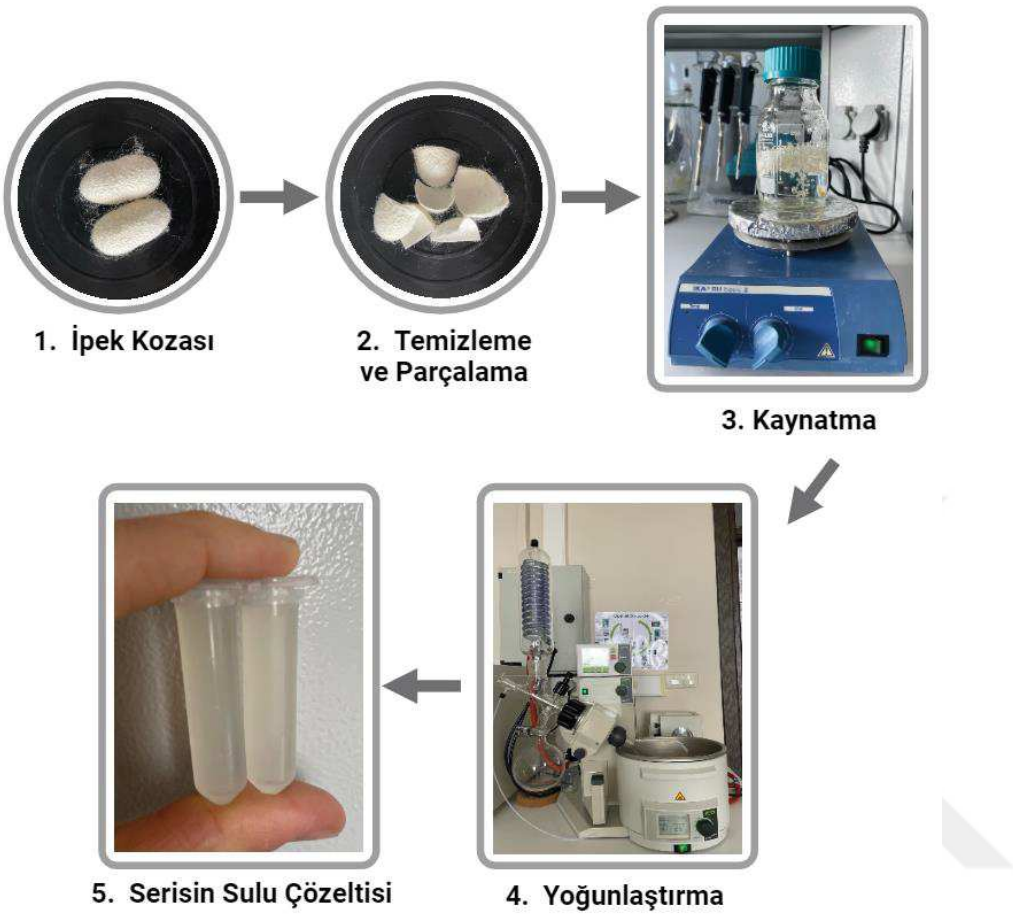
3.1. Materyal

Bombyx mori ipekböceği kozaları Koza Han'dan (Bursa, Türkiye) satın alınmıştır. Ham yün örnekleri Çanakkale'deki yerel yün tedarikçileri tarafından sağlanmıştır. N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 8.00907.0025), N-hydroxysuccinimide (NHS, %98), Tritirachium'dan proteinaz K (liyofilize toz, ≥30 ünite/mg protein) Merck (Almanya) tarafından satın alınmıştır.

Deneyler ve analizlerde kullanılan cihazların marka ve model bilgileri ise ilgili bölümlerde belirtilmiştir.

3.2. İS Ekstraksiyonu

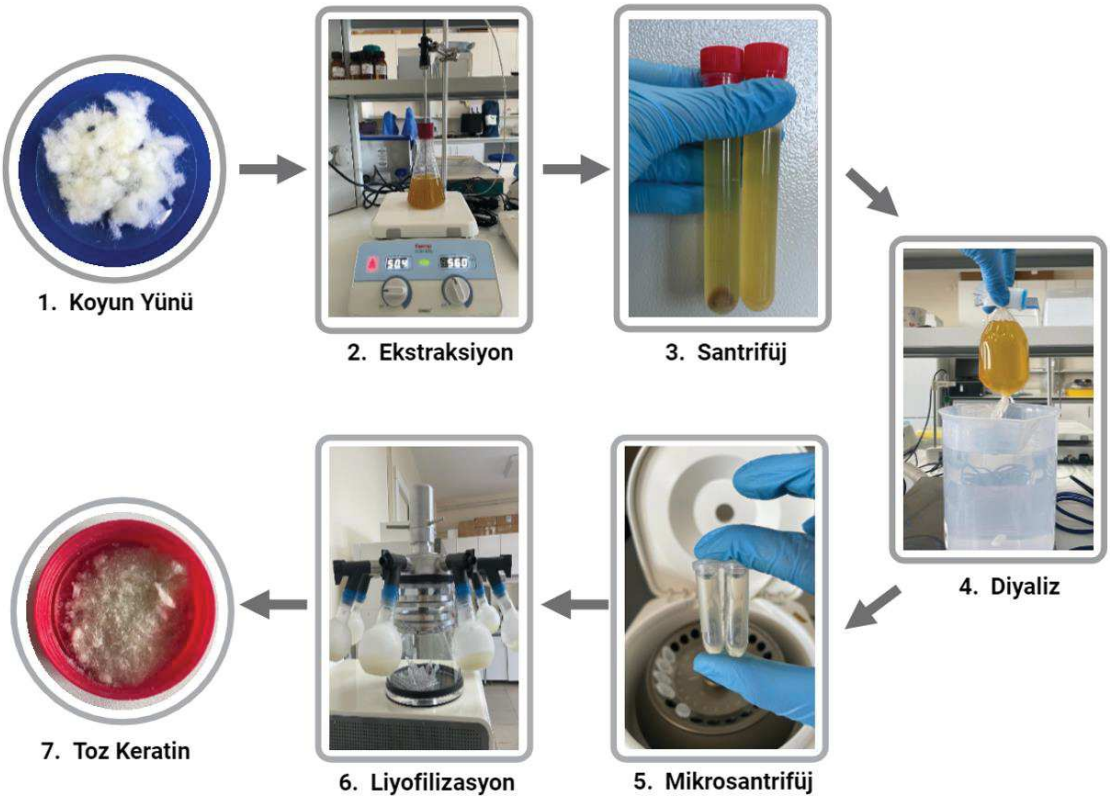
İS, *Bombyx mori* ipekböceğinden daha önce tarif edilen yöntemle ve küçük bir modifikasyonla elde edilmiştir (Noosak vd., 2022). Kısaca, ipek kozaları (4 g) küçük parçalar halinde doğranmış, ardından 1 L deiyonize su içinde 100˚C'de 120 dakika kaynatılmıştır. Elde edilen karışım daha sonra çözünmeyen partikülleri uzaklaştırmak için süzülmüştür. Çözelti bir döner buharlaştırıcı (Buchi rotavapor R-210, İsviçre) kullanılarak 43 mbar'lık düşük basınç altında ve 25°C'de nihai konsantrasyon %6 (w/v) elde edilene kadar buharlaştırılmıştır. Viskoz İS stok çözeltisi kullanılmadığı zamanlarda 4°C'de saklanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. *Bombyx Mori'den* su ile serisin ekstrakte edilmesi.

3.3. YK Ekstraksiyon ve Saflaştırma Süreci

Keratin, grubumuz tarafından tarif edilen yönteme göre bir sülfitoliz reaksiyonu kullanılarak yün örneklerinden ekstrakte edilmiştir (Cal vd., 2021). Kısaca, yağı alınmış ve temiz yün lifleri küçük parçalar halinde kesilmiş ve ardından sodyum hidroksit (NaOH) (%5, w/v) ve sodyum sülfit (Na_2SO_3) (%5, w/v) içeren bir alkali ekstraksiyon çözeltisine (100ml) tabi tutulmuştur. Reaksiyon 50 ºC'de 2 saat boyunca dinamik koşullar altında tezgah üstü çalkalayıcı inkübatörde (Benchmark Scientific, Incu-Shaker Mini, ABD) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyondan sonra elde edilen karışım, filtrasyon, santrifüjleme ve diyaliz gibi saflaştırma adımlarından geçirilmiştir. Diyalizat daha sonra liyofilize edilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere ≤-20 ºC'de toz olarak saklanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Koyun yününden keratin ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemi.

3.4. Protein Ekstraktlarının Biyokimyasal Analizleri

YK'deki protein içeriği Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) ile Qubit Protein BR Assay Kit (Invitrogen, A50668) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. Kısaca, keratin ekstraktları ultra saf suda çözülerek 1-20 mg/ml konsantrasyonlarında ayrı ayrı stok çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir YK çözeltisi kitteki gerekli reaktiflerle karıştırılmış ve karanlık bir yerde oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Floresan okumaları tamamlandıktan sonra, YK konsantrasyonları üzerinden bağıl floresan birimleri (RFU) ölçülerek bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bilinmeyen numunelerin protein içeriği daha sonra elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

YK ekstraktlarında kopan disülfit bağına bağlı olarak oluşan toplam serbest tiyol (-SH grupları) içeriği, daha önce bildirilen yöntemlere göre Ellman reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Arslan vd., 2017; Cal vd., 2021). Harici L-sistein standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden elde edilen aşağıda verilen

Denklem (1) YK ekstraktında bulunan serbest -SH gruplarının miktarını hesaplamak için kullanılmıştır:

$$Serbest\ SH\ Grupları\ \frac{(mmol)}{Keratin(mg)} = \frac{\left[\left(\frac{OD412}{eğim}\right)x(Seyreltme\ Faktörü\ x\ Toplam\ Hacim)\right]}{Keratin\ Ağırlığı\ (mg)} \quad (1)$$

Lowry protein tahlili, sığır serum albümini (BSA) standart kalibrasyon grafiği yöntemi kullanılarak İS konsantrasyonunu belirlemek için uygulanmıştır (Cal vd., 2021). Kaynatmadan elde edilen İS proteininin toplam konsantrasyonunu belirlemek için Lowry yöntemi uygulanmıştır (Lowry vd., 1951). Lowry yönteminin temelinde, peptit bağları tarafından indirgenmiş olan Cu^{+} iyonlarının Folin–Ciocalteu reaktifi ile reaksiyonu bulunmaktadır. Bu reaksiyon, bazik ortamlarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle (Tyr, Trp, Cys) arasında oluşmaktadır. Tepkimelerde kullanılacak olan A (0,571 g NaOH ve 2,86 g Na_2SO_3-100 ml ultra saf su (USS) içerisinde, B (1,4232 g $CuSO_4.5(H_2O)$- 100 ml USS içerisinde) ve C (1,34 g $NaK(COO)_2\ (CHOH)_2.4H_2O$ - 100 ml USS içerisinde) çözeltileri önceden hazırlanmıştır. A, B ve C çözeltilerinin sırasıyla 100:1:1 oranlarında karıştırılmasıyla Lowry çözeltisi elde edilmiştir. Deneyin ikinci aşamasında kullanılacak olan Folin-Ciocalteau reaktifi ise 6 ml USS ile 5 ml Folin Ciocalteu's Fenol reaktifinin karıştırılmasıyla oluşturulmuştur.

BSA çözeltisi, %0,9 (w/v) sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içinde 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış ve stok çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözelti seyreltilerek 0,01-0,1 mg/ml aralığında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Ardından, 0,5 ml protein çözeltisine 0,7 ml Lowry çözeltisi eklenmiş ve iyice vortekslenerek karıştırılmıştır. Bu karışım, karanlık bir ortamda 20 dakika bekletilmiştir. 20 dakika sonunda, çözelti üzerine 100 µl Folin-Ciocalteau reaktifinden ilave edilmiştir ve yine karanlık bir ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemler protein çözeltileri dışında bir de kör çözeltisi için hazırlanmıştır. Kör çözeltisinin içerisinde protein haricindeki diğer standart çözeltiler bulunmaktadır. Çözeltilerin inkübasyon süreleri bittiğinde tepkime tamamlanmış ve tepkime sonucunda protein miktarının artmasına bağlı olarak mavi renk şiddetinin de arttığı çözeltiler oluşmuştur. Sonuç olarak kör çözeltisine karşı protein çözeltilerinin absorbansları 650 nm dalga boyuna sahip bir spektrofotometre cihazında (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Serisin

çözeltisinin absorbans sonuçları hazırlanan kalibrasyon grafiğinde yerine konulmuş ve serisinin konsantrasyon miktarı hesaplanmıştır.

Ayrıca, YK ve İS ekstraktlarındaki polimer zincirlerinin moleküler ağırlık (MA) dağılımını belirlemek için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Bu amaçla, Laemmli yöntemi kullanılarak %4 yükleme ve %12,5 ayırma jelleri hazırlanmıştır. Jel hazırlığı aşamasında, jel düzeneği kurulmuş ve dikey elektroforez sistemi oluşturulmuştur. Amonyum persülfat (APS) ve Tetrametiletilendiamin (TEMED) dışındaki çözeltiler belirtilen miktarda (Tablo 3) sırasıyla bir beher içerisinde karıştırılmıştır. Homojen bir karışım elde edildikten sonra, yürütme jelindeki polimerizasyonu başlatması için APS; reaksiyonu hızlandırması için TEMED eklenerek jel çözeltisi hızla mikropipet yardımıyla jel düzeneğine aktarılmıştır. Jel aktarılırken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir. Hava ile temas eden jel yüzeyinin kurumaması ve düzgün polimerleşme oluşabilmesi için jel üzerine %99,9'luk 2-propanol eklenilmiş ve 1 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda alkol uzaklaştırılmış, jel overlay çözeltisi ile yıkanmış ve filtre kâğıdı ile kurulanmıştır. Yükleme jelinin çözeltileri belirtilen miktarlarda yine bir beher içerisinde karıştırılarak yürütme jelinin üzerine aktarılmıştır. Ardından, proteinleri jel içine yükleyebilmek için kuyucuk oluşturmak amacıyla tarak aparatı yaklaşık 1 cm aralıkla yükleme jeli üzerine takılmıştır. Jelin polimerizasyonu için 30 dakika süre tutulmuş ve süre sonunda jel düzeneği elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin ıslanabildiği ve tankın dolum hattı çizgisine ulaşabildiği kadar 1X yürütme tamponu tank içerisine eklenmiştir. Tarak, tamponla ıslanan jelden dikkatlice çekilerek protein yükleme kuyucukları hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3

SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri (jel kalınlığı: 0,75 mm)

<table>
<tr><th colspan="2">Çözelti</th><th colspan="2">Oran/Miktar</th></tr>
<tr><th>İsim</th><th>İçerik</th><th>Yürütme Jeli (%12,5) (10 ml)</th><th>Yükleme Jeli (%4) (5 ml)</th></tr>
<tr><td>Akrilamid/Bisakrilamid</td><td>%30 (w/v) Akrilamid ve %0,8 (w/v) Bisakrilamid sulu çözeltisi</td><td>4,16 ml</td><td>0,66 ml</td></tr>
<tr><td>Yürütme jeli tamponu</td><td>4X yürütme jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi) (pH 8,8)</td><td>2,5 ml</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Yükleme jeli tamponu</td><td>4X yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi) (pH 6,8)</td><td>-</td><td>1,26 ml</td></tr>
<tr><td>%10 SDS</td><td>%10 (w/v) SDS'in ultra saf sudaki çözeltisi</td><td>100 µl</td><td>50 µl</td></tr>
<tr><td colspan="2">USS</td><td>3,185 ml</td><td>3 ml</td></tr>
<tr><td>APS</td><td>%10 (w/v) APS'nin ultra saf sudaki çözeltisi. (Taze hazırlanmalıdır)</td><td>50 µl</td><td>25 µl</td></tr>
<tr><td>TEMED</td><td>TEMED (Merck-Millipore) (Ticari olarak satın alınmıştır)</td><td>5 µl</td><td>5 µl</td></tr>
<tr><td colspan="4">Ek Çözeltiler</td></tr>
<tr><td>İsim</td><td colspan="3">İçerik</td></tr>
<tr><td>1X Yürütme Tamponu</td><td colspan="3">• 0,025 M Tris, • 0,192 M glisin
• %0,1 (w/v) SDS • (pH 8.3)
Hazırlanan çözelti, oda sıcaklığında saklanabilir ve kullanılan tampon en az 3 kere süzülerek tekrar kullanılabilir.</td></tr>
<tr><td>2X Numune Hazırlama Tamponu</td><td colspan="3">• 0.125 M Tris-HCl • %2 SDS
• %25 (v/v) gliserol • %0,01 (w/v) bromofenol blue
• (pH 6.8)</td></tr>
<tr><td>Merkaptoetanollü Numune Tamponu</td><td colspan="3">Hazırlanan tampon ışıktan korunmalıdır. Porsiyonlanarak -26 °C'de saklanmalıdır. Daha önceden hazırlanmış -26 °C'de saklanan 2X numune hazırlama tamponu (950 µl) ile 2-merkaptoetanol (50 µl) karışımıdır. Bu karışım kullanımdan önce taze olarak hazırlanmalıdır.</td></tr>
</table>

Jel polimerizasyonunun tamamlanma süresi beklenilirken kuyucuklara yüklenilecek BSA, keratin, sodyum karbonat (Na_2CO_3) ile kaynatmadan (0.02 M Na_2CO_3 ile 15 dakika) (SK-İS) ve USS içerisinde (tez çalışmasında kullanılan) kaynatmadan elde edilen İS'ler hazırlanılmıştır. Ana BSA stoğu 0,2 mg/ml; keratin ve SK-İS stoğu 10 mg/ml; İS stoğu ise 50 mg/ml olacak şekilde hazırlanılmıştır. Gün içinde hazırlanan merkaptoetanollü numune tamponuyla 1:1 oranında seyreltilmek üzere protein stoklarından ve numune tamponundan 50 µl çekilmiş, ardından bir ependorf içerisinde karıştırılmıştır. Örnekler 100 °C sıcaklığa sahip bir blok ısıtıcıda denatüre olmaları amacıyla 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Denatürasyon süresi tamamlandıktan sonra, ependorflar soğutulmuş ve kuyucukların içerisine yüklenilmeye başlanmıştır. İlk kuyucuğa protein marker (Biorad, Precision Plus Protetein Dual Xtra Standarts; Katalog numarası: 161-0377) ve devamında sırasıyla BSA, YK, SK-İS ve İS örneklerinden kuyucuklara 5 µl eklenmiştir. Bu yüklenen miktar sonucunda kuyucuklarda BSA'dan 0,5 µg, İS'ten 125 µg, YK ve SK-İS'ten ise 25 µg bulunmaktadır. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra, 15mA sabit akım ve 10°C'de 2 ila 2,5 saatlik bir yürütme işlemi başlatılmıştır.

Yürütme işlemi protein bantlarının jel sonuna ulaşmasıyla tamamlanmıştır. İki cam arasındaki jel, çeşme suyu altında yırtılmamasına dikkat edilerek camlardan ayrılmış ve saf su içerisine alınmıştır. SDS'ten arındırılması amacıyla 10 dakika süre tutularak 3 tur saf su ile yıkama yapılmıştır. Bu yıkama işlemleri süresi içerisinde jelin boyanması için kolloidal Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 boyası hazırlanılmıştır (Tablo 4). Boyama çözeltisi, manyetik karıştırıcı üstünde bir balık yardımı ile sürekli bir şekilde karıştırılmıştır. Alüminyum sülfat-(14-18)-hidrat, ultra saf su içinde çözündürülmüş ve bu çözelti etanol ile karıştırılmıştır. Üzerine CBB G250 toz formu eklenmiş, 5 dakika boyunca homojen çözünmesi için karıştırılmıştır ve çözeltinin renginin çivit-mavi olduğu gözlenmiştir. Bu işlemden sonra çözelti içerisine ortofosforik asit ilave edilmiştir. Son olarak, boyanın hacmi ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlemlerin sonucunda, kolloidal parçalara sahip ve petrol yeşili renginde kullanıma hazır jel boyama çözeltisi elde edilmiştir. Jelin saf su ile yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanılan boyama çözeltisi jelin üzerine dökülmüştür. Jeldeki bantların tamamının boyanması için jel, gece boyunca hafifçe çalkalanarak boyama işlemine bırakılmıştır. Bu işlem sonunda, jel üzerindeki fazla boyadan kurtulmak için 2 kez 10 dakika saf su ile yıkama yapılmıştır. Boyanan jeldeki bantların sabitlenmesi ve belirgin hale getirilmesi için tablo 4'te verilen boya uzaklaştırma çözeltisi hazırlanılmıştır. Jel bu çözelti içerisinde 1 saat bekletildikten sonra tekrar saf su ile yıkama

işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Jel, tüm bu işlemler sonucunda jel Biorad (Gel Doc XR+, ABD) görüntüleme cihazı kullanılarak incelenmiştir.

Tablo 4

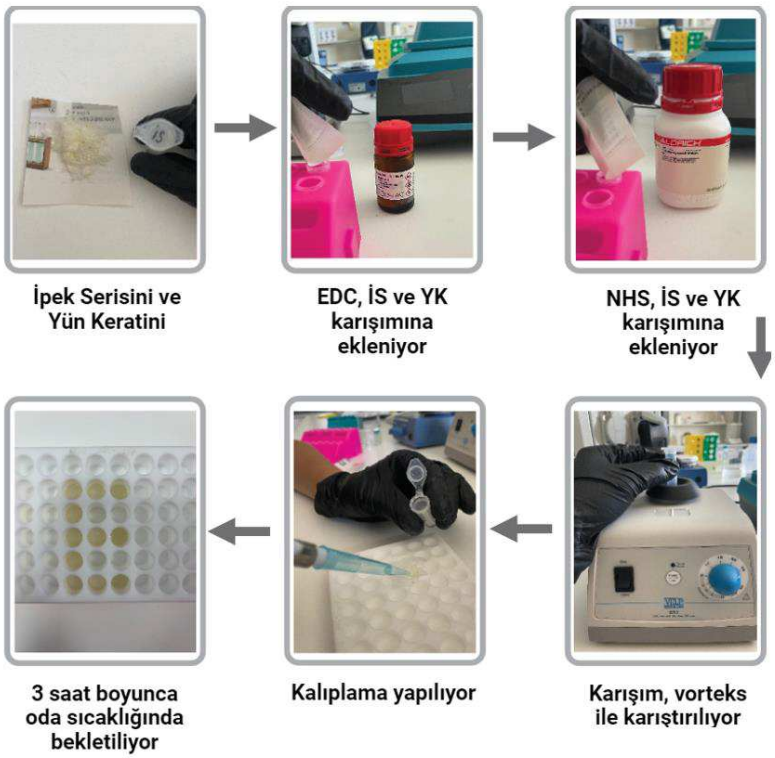
CBB G-250 boyama ve boya uzaklaştırma çözeltisinin içeriği

CBB G-250 Çözeltisi	**Toplam Hacim (100 ml)**
CBB G-250 (%0,02 (w/v))	20 mg
Alüminyum sülfat-(14-18)-hidrat (%5 (w/v))	5 g
Etanol (%96) (%10 (v/v))	10 ml
Ortofosforik asit (%85) (%2 (v/v))	2,35 ml
USS	87,65 ml
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	**Toplam Hacim (100 ml)**
Etanol (%96) (%10 (v/v))	10 ml
Ortofosforik asit (%85) (%2 (v/v))	2,35 ml
USS	87,65 ml

3.5. İS/YK Hidrojel Bazlı Biyoiskelelerin Hazırlanması

Gözenekli 3B İS/YK hidrojel tabanlı biyoiskelelerin elde edilmesi için, NHS/EDC birleştirme reaksiyonu yoluyla *in situ* kabarcık oluşturan hidrojel hapsetme işlemi, daha önce bildirilen yöntemde olduğu gibi orta düzeyde bir değişiklikle uygulanmıştır (L. Wang vd., 2020). İlk olarak, İS stok çözeltisi (%6 (w/v)) USS ile seyreltilerek %2 (w/v), %3 (w/v) ve %4 (w/v) konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Ardından YK %1 (w/v), 1 ml İS çözeltisi (%2 (w/v)) içinde vorteksle karıştırılarak konsantrasyonda çözülmüştür. Böylece toplam 30

mg protein içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiye 82,8 mg EDC ve 20,16 mg NHS eklenmiş, kuvvetlice karıştırılmış ve hemen özel yapım 48 kuyucuklu politetrafloroetilen (PTFE) içine kalıplanmıştır. EDC/NHS ilavesiyle saniyeler içinde CO_2 kabarcıkları oluşmuş ve bu da jelleşmenin başladığını göstermiştir. Elde edilen jel olgunlaşma için üç saat boyunca oda sıcaklığında dinlenmeye bırakılmıştır. Ardından, olgunlaşan hidrojeller damıtılmış suyla iyice yıkanmış, -40 °C'de dondurulmuş ve gece boyunca liyofilize edilmiştir. Bu işlemlerin sonunda, gözenekli bir S2K1 hidrojel bazlı biyoiskele elde edilmiştir. S2K1 iskelesi bağlamında, S ve K serisin ve keratini temsil etmekte olup, 2 ve 1 sayısal değerleri yüzde olarak ilgili kütle oranlarını göstermektedir. Spesifik olarak, S2K1 hidrojel bazlı iskele %2 (w/w) İS ve %1 (w/w) YK içermektedir. Çeşitli protein miktarlarının ortaya çıkan hidrojellerin yapısal ve mekanik özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak ve optimum oranı belirlemek için, aynı reaksiyon adımları izlenerek farklı miktarlarda YK ve İS içeren S4K2, S2K4, S6K3 ve S3K6 hidrojel bazlı biyoiskeleler de hazırlanmıştır (Şekil 7). Ayrıca, EDC/NHS miktarları toplam protein içeriği ile orantılı olarak artmıştır. İS ve YK hidrojel ağı arasındaki *in situ* kabarcık oluşturma stratejisinin reaksiyon mekanizması da bulgular bölümünde anlatılmıştır.



Şekil 7. İS-YK hidrojellerinin hazırlanma aşamaları.

3.6. İS-YK Hidrojellerinin Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Analizi

Malzemelerin yapısal analizi, spektrumların Nicolet IS50 Flex Gold Infrared Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında 2 cm^{-1} spektral çözünürlükle 4000-500 cm^{-1} dalga sayıları taranarak kaydedildiği ATR-FTIR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD)

XRD çalışmaları, malzemelerin kristallik derecesini belirlemek için Cu-Kα radyasyonuna (λ = 1.54056 Å, 45 kV ve 40 mA) Å) 5-70° 2θ açı aralığında ve 0.02°/dak tarama hızında maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8. Termogravimetrik Analiz (TGA)

TGA, kuru azot akışı altında 10 °C/dak ısıtma hızıyla 30-800 °C arasında ısıtılan numunelerin kütle kaybını belirlemek için PerkinElmer cihazı (TGA 8000, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.9. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

Hidrojel bazlı biyoiskeletlerin toplam yüzey alanları, Quadsord SI BET cihazı (Quantachrome Instruments, Anton-Paar GmbH, Avusturya) ile çok noktalı BET yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 90°C'de bir gaz giderme işleminin ardından, numuneler 77 K'de 0,01-0,99 P/P0 bağıl basınç aralığında bir azot gazı atmosferine tabi tutulmuştur.

3.10. Şişme Testi

Hidrojel bazlı biyoiskelelerin şişme kabiliyeti, 24 saat boyunca fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (10ml, pH 7.4) içine daldırılarak değerlendirilmiştir. Örneklerin şişme oranları (%) daha sonra aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Şişme\ Oranı\ (\%)\ \left(\frac{mg}{mg}\right) = \frac{k_{ıslak} - k_{kuru}}{k_{kuru}}\ x\ 100 \quad (2)$$

Burada $k_{ıslak}$ şişmiş hidrojelin ağırlığı ve k_{kuru} hidrojelin başlangıç ağırlığıdır.

3.11. Temas Açısı Analizi

Malzeme yüzeyinin ıslanabilirlik özelliklerini değerlendirmek için Attension Theta Optik Tansiyometre (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) kullanılarak temas açısı ölçümü yapılmıştır. İşlem, motorlu bir şırıngadan 5 µl suyun ± 1° hassasiyetle malzeme yüzeyine dağıtılması ve ardından su emme oranlarının kaydedilmesiyle tamamlanmıştır.

3.12. İS-YK Hidrojellerinin Reolojik Ölçümleri

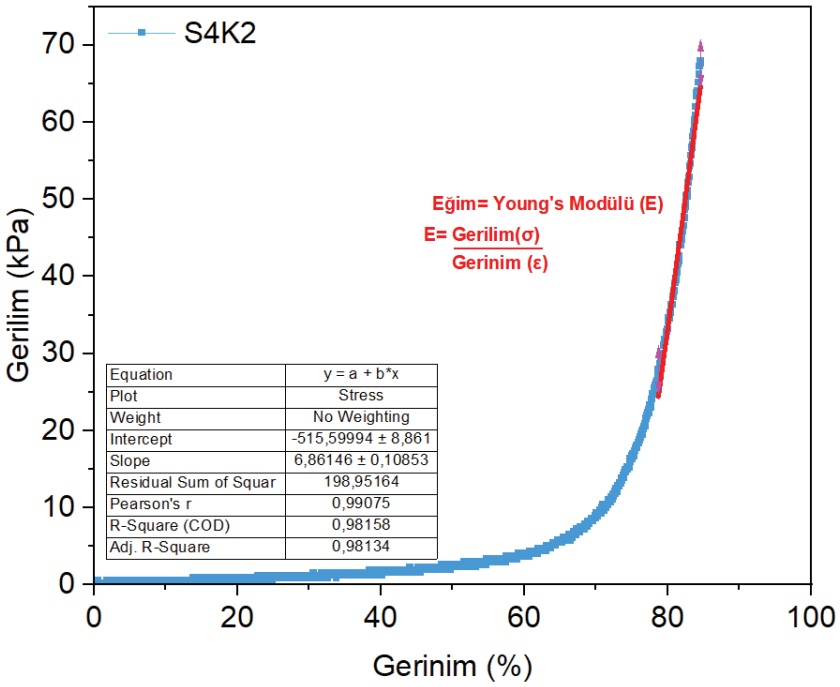
Reolojik ölçümler, jel yapısı ve mekanik davranışının temel yönlerini ortaya çıkarmak için DHR 2 Reometre (TA Instruments, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, olgunlaşmış hidrojeller 40 mm çapında çapraz çizgili paralel plakalar arasına 1,0 mm boşluk bırakılarak yerleştirilmiştir. Daha sonra kullanılacak gerinim değerini seçmek üzere doğrusal viskoelastik bölgeyi (DVB) belirlemek için 1Hz frekans ve 25 º C'de %0,01-100 arasında bir salınım genliği taraması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, sıcaklığın İS-YK hidrojellerinin kayma depolama modülü (G') değeri üzerindeki etkisini araştırmak için sıcaklık taramalı salınım testi ile G' izlenmiştir. 25 ºC'de 0.1-100 Hz frekans aralığında lineer viskoelastik bölge (LVB) içinde %4 kullanılarak salınımlı frekans taraması gerçekleştirilmiştir. 25-40 ºC arasındaki sıcaklık taraması 1 °C/dak ısı hızı, %4 gerinim ve 1Hz frekans ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak, jel oluşumu, jel öncesi formdaki her bir numune reometre plakasına eklendikten sonra DVB içinde %7,5 gerinim, 1Hz frekans ve

25ºC'de 30 dakika boyunca uygulanan bir zaman taraması protokolü ile izlenmiştir. Depolama modülü (G') (Pa) ve kayıp modülü (G") (Pa) kaydedilmiştir.

3.13. İS-YK Hidrojellerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Islak hidrojellerin tek eksenli sıkıştırma testleri, bir mikromekanik test cihazı (Univert CellScale Biomaterials Testing, Kanada) kullanılarak mekanik dayanıklılığı değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Hidrojeller (silindirik, ø = 4,31 mm; h = 7 mm) iki plaka arasına yerleştirilmiş ve 50N yük hücresi ile 0,05 mm/s hızında ilk kalınlıklarının %85-90'ına kadar sıkıştırılmıştır.

Islak hidrojellerin esnekliğini değerlendirmek için, 50 yükleme/boşaltma döngüsü ile %75 stres altında 9 mm/dak gerilme hızıyla döngüsel bir sıkıştırma testi de gerçekleştirilmiştir. Bu test, hidrojellerin genel şekil hafızası davranışının bir göstergesi olarak şekil stabilitesini ve şekil geri kazanım oranlarını ölçmek için kontrollü kuvvet modunda gerçekleştirilmektedir. Tüm ölçümler oda sıcaklığında yapılmış ve Young modülü ve sıkıştırma mukavemeti değerleri gibi birçok malzeme özelliğini ortaya çıkaran gerilme-gerinim eğrilerini elde etmek için kuvvet-deplasman verileri işlenmiştir. Young modülü değerleri, verilen grafiksel yöntem kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 8). Ayrıca, tüm deneyler boyunca 5 Hz frekansında çalışan tripoda monte edilmiş bir kamera (Logitech, HD 1080p) kullanılarak numunelerin gerçek zamanlı görüntülemesi yapılmıştır.



Şekil 8. Young modülünün grafiksel yöntemle belirlenmesi.

3.14. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopi (EDS) Analizi

Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japonya) analizi, hidrojel bazlı biyoiskelelerin gözenek yapısını, ortalama gözenek boyutunu ve gözenek boyutu dağılımını belirlemek için yapılmıştır. Öte yandan, malzeme yüzeyinin kantitatif element bileşimi FE-SEM cihazının bir parçası olan EDS ile belirlenmiştir.

Hücre yüklü biyoiskelelerin görüntülenmesinden önce, örnekler PBS (pH 7.2-7.4) içinde hazırlanan %2.5 (v/v) glutaraldehit içinde en az 24 saat süreyle sabitlenmiş, damıtılmış suyla yıkanmış, kademeli bir etanol serisiyle (%50-100) dehidre edilmiş ve ardından havada kurutulmuştur. Tüm numuneler, yüksek vakumda 10kV'de farklı büyütme seviyelerinde yüksek kaliteli ve çözünürlüklü görüntüler elde etmek için Altın/Paladyum (Au (%80)-Pd (%20)) püskürtme yöntemiyle kaplanmıştır. SEM görüntüleri ImageJ yazılımı (Sürüm 6.0.0.260 NIH) kullanılarak işlenerek rastgele seçilen bir numunedeki 20-40 gözenekten ortalama gözenek boyutu ve dağılımı da hesaplanmıştır.

3.15. Hidrojel Bazlı Biyoiskeletlerin In vitro Biyobozunma Çalışması

Hidrojel bazlı biyoiskelelerin in vitro biyobozunurluk testleri daha önceki çalışmalarımızda açıklanan yöntem izlenerek gerçekleştirilmiştir (Cal vd., 2021; Yildiz vd., 2024). S4K2 ve S2K4 numunelerinin biyolojik bozunabilirliğe yatkınlıklarını ölçmek için üç zaman noktasında analiz başlatılmıştır. İlk olarak kriyojellerin başlangıç ağırlıkları (k_{ilk}) belirlenmiş ve steril 24 kuyucuklu well-plate içerisine yerleştirilmiştir. Üzerine 1 ml Tris-HCl tamponundan (0.02 M, pH 8.0) eklenip 37°C'de 3, 7 ve 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu tampon, protein bozunması için proteinaz K (%0,01 (w/v)) ve mikrobiyal kontaminasyonu durdurmak için sodyum azid (%0,05 (w/v)) içermektedir. Enzimatik çözelti her iki günde bir değiştirilmiştir. İnkübasyon süresi bittiğinde, numuneler çözeltiden çıkarılmış ve saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra örnekler dondurulmuş, liyofilize edilmiş ve tekrar tartılmıştır (k_{son}). Bozunma oranı (%) aşağıda verilen denklem 3 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Kütle\ Kaybı(\%) = \left(\frac{k_{ilk} - k_{son}}{k_{ilk}}\right) x\ 100 \quad (3)$$

3.16. *İn Ovo* Civciv Koryoallantoik Membran (CAM) Deneyi

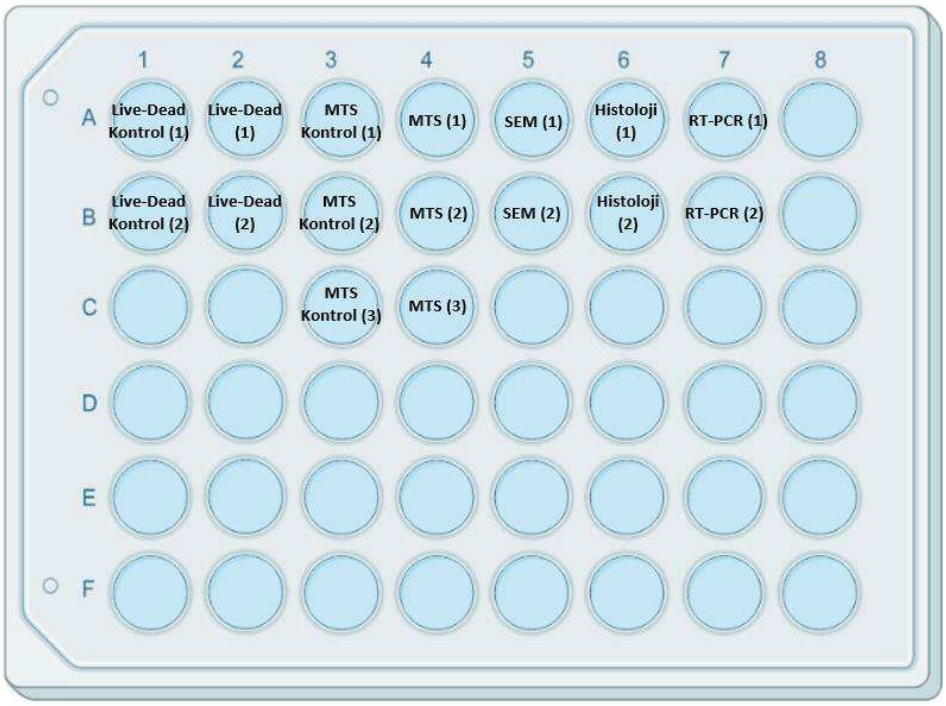
İn ovo CAM deneyi, hidrojel bazlı iskelelerin proanjiyojenik özelliklerini ve biyouyumluluğunu araştırmak için *in vivo* alternatif bir hayvan modeli olarak daha önce çalışmalarımızda küçük değişikliklerle tarif edildiği şekilde kullanılmıştır (Isik vd., 2023; Samancioglu vd., 2023; Yildiz vd., 2024). Yerel bir çiftlikten (Çanakkale, Türkiye) satın alınan döllenmiş tavuk yumurtaları sıcaklık kontrollü koşullarda laboratuvarımıza getirilmiş ve %20 etanol ile temizlenmiştir. Yumurtalar 3 gün boyunca her 120 dakikada bir döndürülerek 37,5 ºC'de ve %60 bağıl nemde cebri çekişli sabit nemli inkübatörde (Brinsea Ovation 28 Advance Ex, İngiltere) dikey olarak inkübe edilmiştir. Embriyonik gelişimin üçüncü gününde (EDD3), yumurtanın sivri ucundan bir pencere açılmış ve yumurta içeriğinin dehidrasyonunu ve mikrobiyal kontaminasyonunu önlemek için bu açıklık temizlenmiş parafilm ile kapatılmıştır. Pencereli yumurtalar, canlılıkları günlük olarak kontrol edilerek aynı koşullar altında yedi gün daha inkübe edilmiştir. EDD10'un sonunda,

sterilize edilmiş örnekler CAM yüzeyindeki merkezi allantoik damarlar arasına yerleştirilmiş ve dijital kameralı (Axiocam 105 color, Zeiss) bir stereo mikroskop (Stemi 305, Zeiss) kullanılarak görüntülenmiştir. Örneklerin anjiyojenik etkilerini değerlendirmek için, 10 µl vasküler endotelyal büyüme faktörü (10 ng/µl, VEGF) ve PBS ile doyurulmuş filtre diskleri de sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak kullanılmıştır. Test süresinin sonunda (EDD14), CAM-iskele komplekslerinin görüntüleri, greftleri çevreleyen sırasıyla 1 mm ve 2 mm hayali alan içinde bulunan foveal ve parafoveal bölgeler arasındaki vasküler yoğunluğu elde etmek için Image J yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Ardından, kan damarı indeksleri EDD14'teki vasküler yoğunluğun EDD10'a oranı olarak hesaplanmıştır. Görüntülemeden sonra, CAM-biyomateryal kompleksleri eksize edilmiş ve rutin protokollerle hematoksilen ve eozin boyama (H&E) ve SEM analizi için hazırlanmıştır (Samancioglu vd., 2023). Ayrıca, gelişimlerinin 15. gününe ulaşmamış civciv embriyoları ağrı hissetmezler ve 17. günden önce canlı sayılmazlar (Ribatti, 2017; Sokolenko vd., 2022). Tüm deneyler 14 gün içinde tamamlandığı için etik onaya gerek duyulmamıştır.

3.17. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.17.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Hidrojel bazlı iskeleler, hücre ekiminden önce sterilizasyon için 60 dakika boyunca UV ışığına (254 nm) maruz bırakılmıştır. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, VA, ABD) satın alınan C2C12 fare miyoblast hücreleri (ATCC®, CRL-1772TM) Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamında (DMEM, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, ABD), standart kültür koşulları (%5 CO_2, %95 nem ve 37 °C) altında %5 fetal sığır serumu (FBS, GibcoBRL), %1 L-glutamin (%1) ve antibiyotik-antimikotik solüsyonu (%1) ile desteklenmiştir. 5-6 pasajdaki miyoblast hücreleri, canlılık ve çoğalma testleri (100.000 hücre/iskele), histolojik boyama (250.000 hücre/iskele) ve gen ekspresyonu çalışmaları (250.000 hücre/iskele) gibi farklı deney düzenekleri için değişen hücre yoğunluklarında biyoiskele yüzeyine ekilmiştir. Hücre yüklü iskeleler, her 2-3 günde bir eşit hacimde taze ortamla değiştirilerek 1, 3 ve 7 gün boyunca aynı kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Ek olarak, doku kültürü polistireni (TCP) her bir deney için kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Hücre kültürü deney setinin gösterimi.

3.17.2. Hücre Canlılığı ve Çoğalma Testi

Hidrojel bazlı biyoiskelelerin belirtilen zaman noktalarında hücre canlılığı ve çoğalması açısından biyouyumluluğunu değerlendirmek için, önceki bir çalışmada olduğu gibi canlı/ölü ve MTS deneyleri uygulanmıştır (Derkus vd., 2020). Canlı/ölü testi (Molecular Probes, Thermo Fisher, UK) için hücre yüklenmiş iskeleler PBS ile yıkandıktan sonra 4µM kalsein-AM (yeşil floresan işaretleyici) ve 2µM etidyum homodimer-1 (EthD-1, kırmızı floresan işaretleyici) ile 37 °C ve %5 CO_2'de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından, canlı hücreler (yeşil boyalı) ve ölü hücreler (kırmızı boyalı) sırasıyla 488 ve 527 nm uyarma dalga boylarına sahip bir floresan mikroskobu (Leica DMIL, Almanya) kullanılarak gözlemlenmiştir.

Ayrıca, hidrojel bazlı iskeleler üzerindeki hücre proliferasyonu MTS testi kullanılarak kantitatif olarak ölçülmüştür. Bu amaçla, PBS ile yıkanan hücre yüklü iskeleler 37 °C'de 1 saat boyunca MTS reaktifi ile inkübe edilmiştir. İskelelerdeki canlı hücre sayısına

ilişkin absorbans ölçümleri 490 nm'de bir spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.17.3. Histokimyasal Analizler

Hücresel yapılar ve hidrojel bazlı biyoiskelelere verilen yanıtlar histolojik analiz ile incelenmiştir. İlk olarak, PBS (pH 7.2-7.4) ile yıkanan örnekler bir gece boyunca %10 nötral tamponlu formalin solüsyonunda sabitlenmiş, etanol serileri ile dehidrate edilmiş ve parafine gömülmüştür. Kesitler (5 μm) poli-L-lisin mikroskop lamları (Thermo Scientific, Braunschweig, Almanya) üzerinde hazırlanmış ve histomorfolojik değerlendirme için H&E ile boyanmıştır. Ayrıca, biyoiskelelerin içindeki kolajen birikimi, önceki çalışmalarda tarif edilen rutin boyama protokolleri kullanılarak Masson trikrom (MT) ve Sirius kırmızısı boyaması ile kalitatif olarak analiz edilmiştir (Trensz vd., 2010; Yilmaz vd., 2021). Kesitlerin görüntüleri kameraya bağlı bir ışık mikroskobu (Axiocam 105 renkli kamera ile bütünleşmiş Zeiss Primostar, Jena, Almanya) aracılığıyla çekilmiştir.

3.17.4. Miyojenik Farklılaşma Üzerine Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri

RT-qPCR kullanarak hidrojel bazlı iskelelerin kas dokusu oluşumunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Spesifik olarak, kas yapıcı belirteçler Myogenin, α -Actinin ve MyoD'nin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. C2C12 hücrelerinin iskelelerde 5 ve 10 günlük kültürünün ardından RNA, bir GeneDireX kiti (ABD) kullanılarak ekstre edilmiş ve bir Bio-Rad kiti (ABD) kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. RT-qPCR, bir Bio-Rad CFX96 termal döngüleyici (ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen amplifikasyonu için elde edilen primer dizileri (Oligomer Bioteknoloji Jsc., Türkiye) Tablo 5'te detaylandırılmıştır.

Tablo 5

QRT-PCR analizi için primer tasarımı

Hedef Gen	**Oligonükleotit Dizileri**	
	5'/3'	**5'/3'**
MyoD	5-GGACTACACTGCCTTCTC-3	5-CAGCCTATACTTCAGCCTTTA-3
Myogenin	5-GGATATGTCTGTTGCCTTC-3	5-TGGGTGTTAGCCTTATGT-3
α-Actinin	5-GGACTACACTGCCTTCTC-3	5-CAGCCTATACTTCAGCCTTTA-3
GAPDH	5-TGTTCCAGTATGACTCCACT-3	5-TGGTGAAGACACCAGTAGAC-3

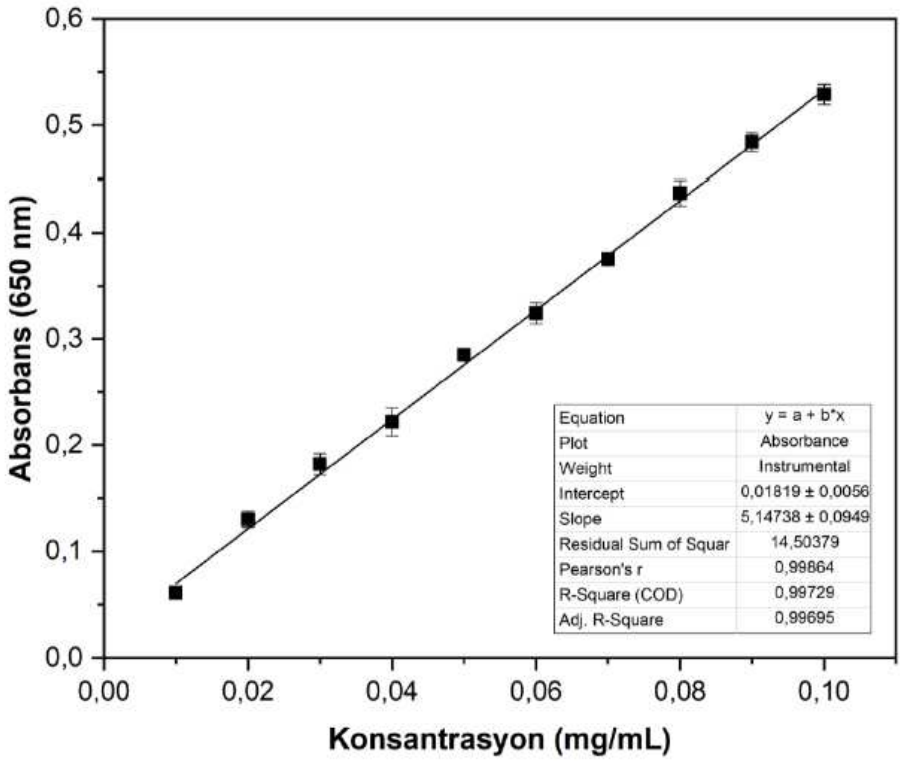
3.18. İstatiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuş ve MS Office Professional Plus 2016 kullanılarak işlenmiştir. Kantitatif analizler tüm deneyler için üç kopya olarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Origin Pro 2024 (v10.1.0.170, Learning Edition, Origin Lab Corporation, MA, USA) yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark için $p \leq 0.05$ kabul edilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

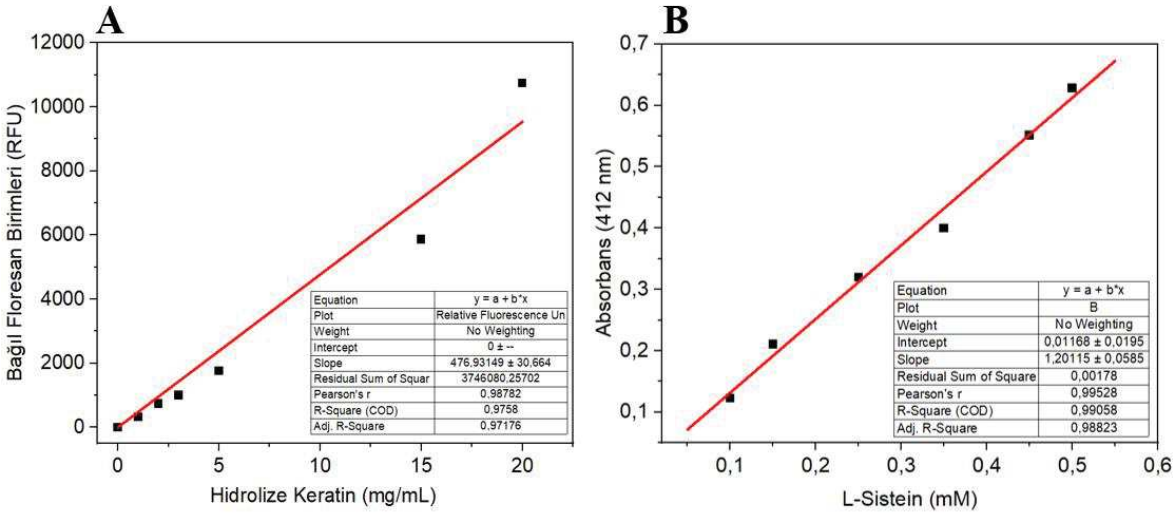
4.1. İS ve YK Ekstraktlarının Biyokimyasal Değerlendirmeleri

Rejenere İS çözeltisinin konsantrasyonu, verilen Lowry standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak %6,067±0,067 (w/v) olarak hesaplanmıştır (Cal vd., 2021) (Şekil 10). Su ile kaynatma, sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinde degumming, asidik ve alkali ortamlar, sabunda kaynatma ve enzimatik işlem gibi ekstraksiyon teknikleri serisin geri kazanımı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 2014). Bu çalışmada, herhangi bir kimyasal madde, karmaşık ekipman veya saflaştırma işlemi gerektirmeyen bir kaynatma yöntemi kullanılarak ipek kozalarından serisin ekstrakte edilmiştir. Ayrıca, ekstraksiyon yöntemi, zaman ve sıcaklık; peptit zinciri boyutu, amino asit içeriği ve yapısal konformasyon gibi biyokimyasal özelliklerin yanı sıra serisinin fizikokimyasal ve biyolojik aktivitesini de önemli ölçüde etkilemektedir (Seo vd., 2023).



Şekil 10. Lowry metodu ile çizdirilen BSA kalibrasyon grafiği.

Diyalizattaki keratin içeriği Şekil 11A'da verilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak 12,19±0,111 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Ek olarak, dondurularak kurutulmuş YK ekstresi yaklaşık %42,5 ± 0,27 verim sağlamıştır. Peptitlerdeki sistein kalıntıları arasında oluşan sülfit köprüleri, sistein tiyol (sistein-SH) ve S-sülfonatlı kalıntılar vermek üzere bir sülfitoliz reaksiyonu yoluyla kırılmıştır. Bu kalıntılar daha sonra serbest sülfhidril gruplarını ölçen Ellman reaktifi kullanılarak analiz edilmiş ve L-sistein kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem 1 kullanılarak 0,2 ± 0,07 mmol/mg keratin olarak bulunmuştur (Şekil 11B). Keratinin biyokimyasal özelliklerine ilişkin tüm bulgular önceki çalışmalarımızla yakın bir uyum içindedir (Cal vd., 2021; Yildiz vd., 2024).

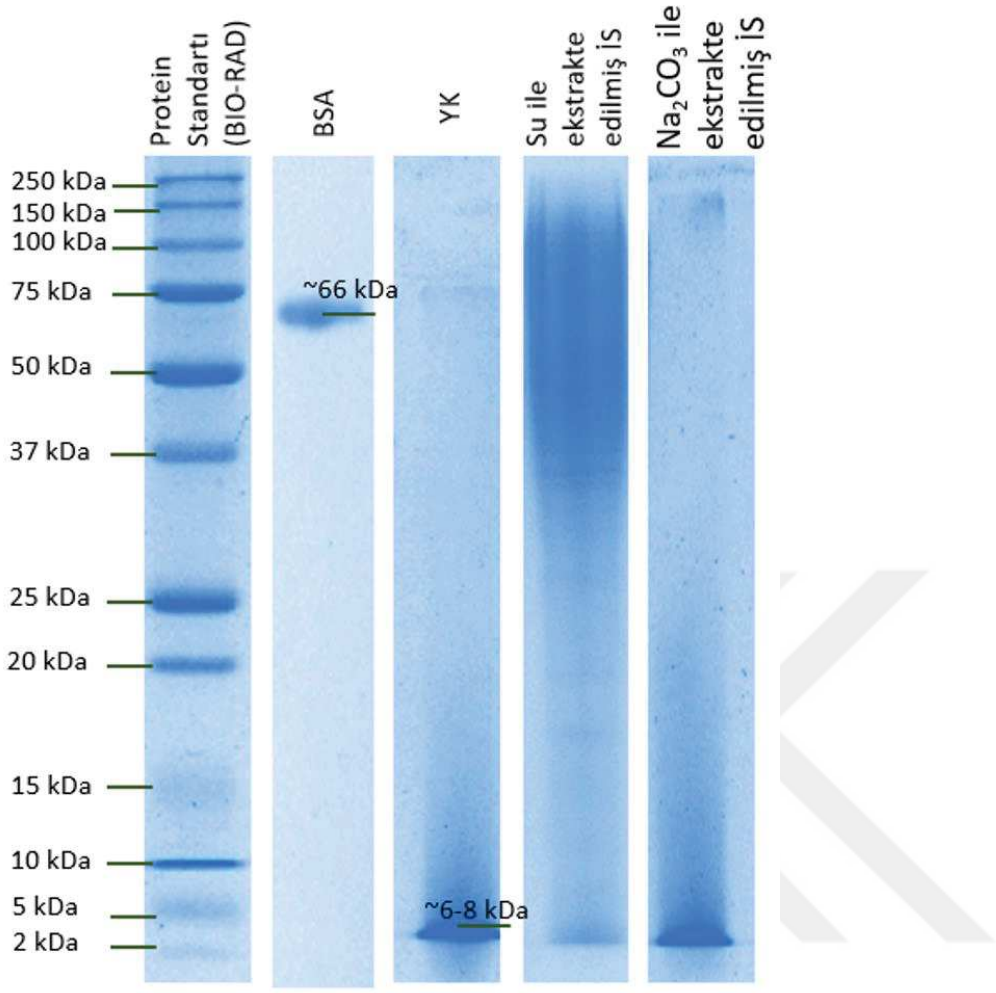


Şekil 11. Qubit proteini (A) ve Sülfidril grup tahlili (B) için standart kalibrasyon eğrileri.

İS ve YK ekstraktlarındaki peptit zincirlerinin moleküler ağırlık dağılımını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 12). Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin protein bütünlüğü üzerindeki etkisini araştırmak ve sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirmek için, sulu 0,02 M Na_2CO_3 çözeltisinin 15 dakika kaynatılmasıyla elde edilen Na_2CO_3 ile ekstrakte edilmiş İS de elektroforetik profile dahil edilmiştir. Su ile ekstrakte edilmiş İS'nin SDS-PAGE paterni, yaklaşık 200 kDa'da büyük bir yayılma bandı ve yaklaşık 20kDa'da belirgin bir bant gösterdi. Öte yandan, Na_2CO_3 ile ekstrakte edilen SS'de 6-20 kDa arasında yayılmış bir bant gözlenmiştir. Bu sonuçlar, serisinin sulu ortamda küçük fraksiyonlar halinde peptid bağlarının ayrılmasıyla hidrolize edilebileceğini göstermiştir.

Bazik çözelti protein hidrolizini teşvik eder, bu da Na_2CO_3 ile ekstrakte edilen İS'nin neden daha küçük bir molekül ağrılığına sahip olduğunu açıklar (Bascou vd., 2022). Ayrıca, dondurularak kurutulmuş her iki ekstraktın suda çözünürlüğü araştırılmış ve Na_2CO_3 ile ekstrakte edilen İS'nin soğuk suda kolayca çözündüğü, su ile ekstrakte edilen İS'nin ise sadece yaklaşık 65 ºC'deki sıcak suda çözündüğü ortaya çıkmıştır. Ayrıca, küçük fraksiyonlarla Na_2CO_3 ile ekstrakte edilmiş İS kullanılarak çapraz bağlı jeller elde etmek için birçok girişimde bulunulmuş, ancak hidrojel oluşumu sağlanamamıştır. Bu çözünürlük profili ve diğer maddelerle olan reaktivite, peptit zincir boyutlarıyla ilişkilidir ve serisinin kullanım alanını belirler. Düşük moleküler ağırlığı (≤20kDa) değerine sahip serisin biyomalzemeler, sağlık, cilt ve saç bakımı gibi kozmetik ürünlerinde; yüksek moleküler ağırlık (≥20kDa) değerine sahip serisin ise biyomalzemeler, polimerler, fonksiyonel biyo-membranlar ve hidrojeller gibi farklı formlarda doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir (Seo vd., 2023; Zhang, 2002). Belirtilen sonuçlara ve özelliklere dayanarak, hidrojel oluşumu için yüksek moleküler ağırlıklı peptitlere sahip su ile ekstrakte edilmiş İS kullanılmıştır.

YK ekstraktının SDS-PAGE modeli, yaklaşık 6-8kDa ağırlığa sahip küçük peptit fraksiyonları göstermekte ve ekstraksiyon sırasında yüksek alkali ortamın (pH 12-14) keratinin yapısal bütünlüğüne zarar verdiğini ortaya koymaktadır. Önceki çalışmamızda, keratindeki peptit zincirlerinin moleküler ağırlık dağılımı, matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF) analizi kullanılarak 2-3 kDa olarak daha doğru bir şekilde belirlenmiştir. Ayrıca, birçok farklı boyuttaki keratin fraksiyonunun, fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle hidrojel oluşumunu tetiklemek için önemli olduğu bildirilmiştir (Cal vd., 2021).

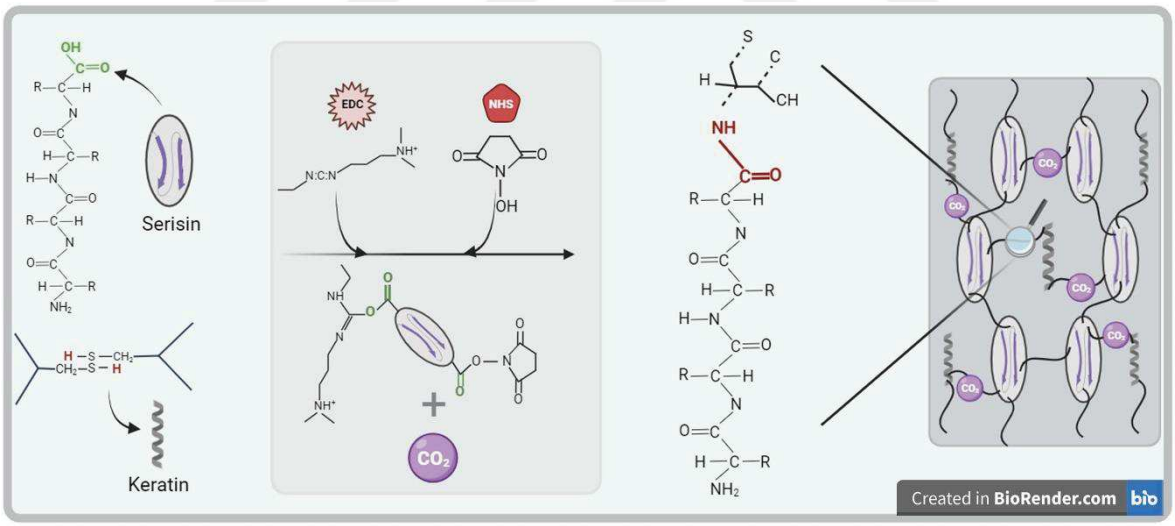


Şekil 12. Keratin, su ile ekstrakte edilmiş serisin ve Na_2CO_3 ile ekstrakte edilmiş serisinin SDS-PAGE modeli.

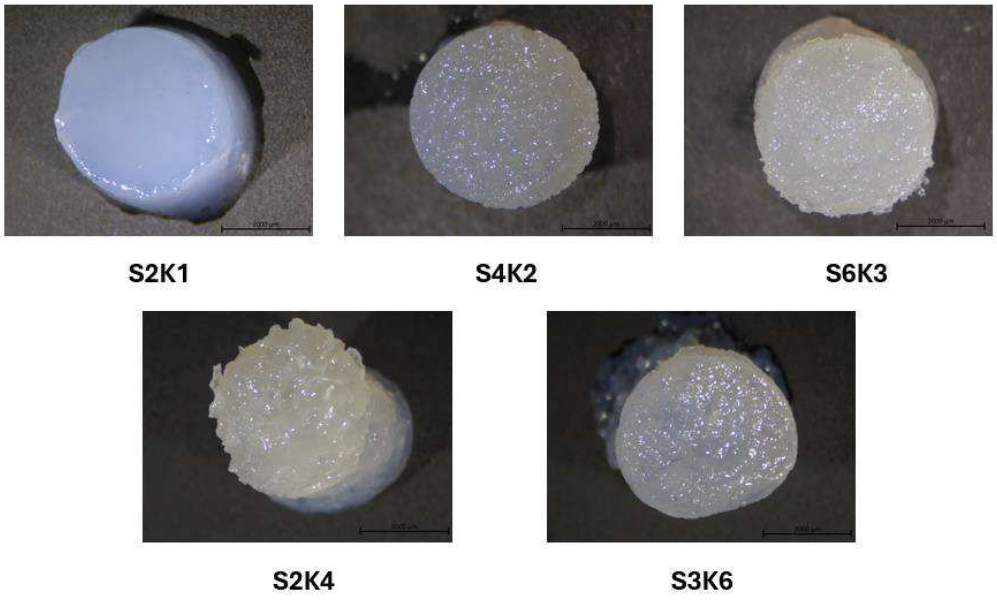
4.2. Serisin/Keratin Hidrojel Bazlı Biyoiskele ve Fiziko-kimyasal Değerlendirmeler

İS/YK hidrojelleri, proteinli yapı içindeki karboksil ve amin grupları arasında amid bağları oluşturmak için EDC/NHS reaktiflerinin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı *in-situ* kabarcık oluşturan hidrojel hapsetme stratejisi kullanılarak hazırlanmıştır. İşlem sırasında, karboksil gruplarının çapraz bağlayıcılar tarafından aktivasyonu saniyeler içinde CO_2 kabarcıklarının oluşmasına yol açmıştır (Şekil 13). Sol-jel dönüşümü 5-10 dakika içerisinde tamamlanmış ve bu arada CO_2 kabarcıkları viskoz jel içinde hapsolmuş ve malzeme içinde

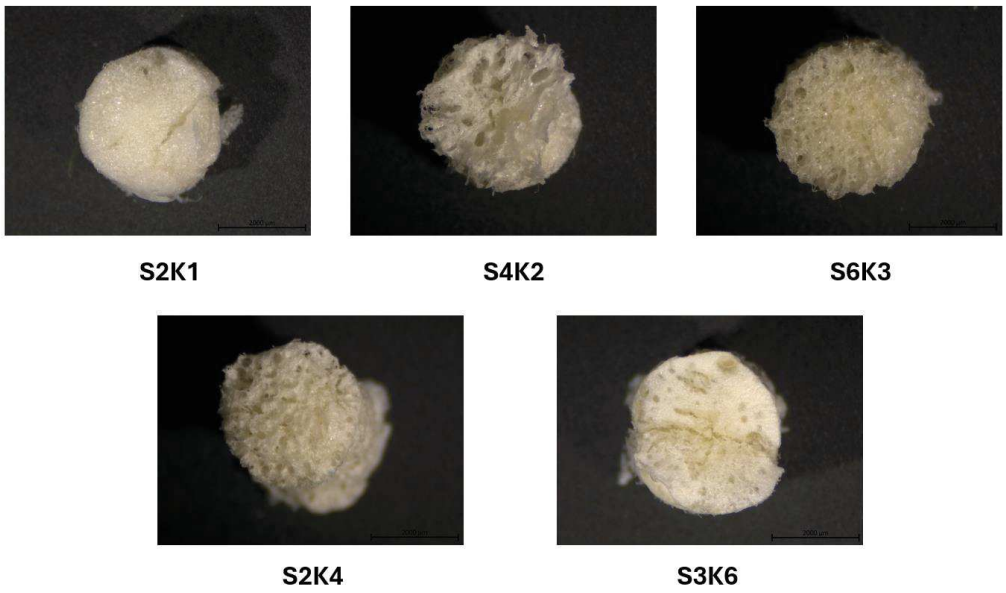
gözenekli bir ağ oluşmuştur. Hidrojeller olgunlaşma için üç saat boyunca oda sıcaklığında dinlenmeye bırakılmıştır. Bu deney düzeneğinde, YK ve İS tek başlarına veya en uygun yapısal, mekanik ve reolojik özelliklere sahip hidrojeli belirlemek için farklı oranlarda ve ağırlıklarda (S1K2, S2K1, S4K2, S2K4, S6K3, S3K6) birleştirilerek test edilmiştir (Şekil 14-15). Bunlar arasında, farklı ağırlıklara sahip ayrı YK ve İS kullanılarak hidrojeller elde edilemezken, işlenemeyecek kadar kırılgan bir yapıya sahip S1K2 hidrojeli elde edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Reaksiyonların her iki protein özütünün varlığına bağlı olması, küçük moleküler ağırlıklı keratin fraksiyonlarının, çoğu hidroksil ve karboksil gibi güçlü polar yan gruplara sahip olan daha yüksek moleküler ağrılıklı serisin peptit zincirleri tarafından çevrelenmesiyle çapraz bağlı bir hidrojel ağ yapısının oluştuğunu düşündürmüştür. Basitçe söylemek gerekirse, keratin, serisin içindeki büyük zincirleri bir araya getirmek için bir köprü görevi görmektedir. Öte yandan, her ikisini de tek başına kullanmak, yapılarındaki peptit parçaları arasındaki bağlantı reaksiyonlarını kolaylaştırmak için yetersizdir.



Şekil 13. *İn situ* kabarcık oluşturma stratejisinin mekanizmasına genel bir bakış.



Şekil 14. Hidrojellerin stereomikroskop görüntüleri.



Şekil 15. Hidrojel bazlı iskelelerin stereomikroskop görüntüleri.

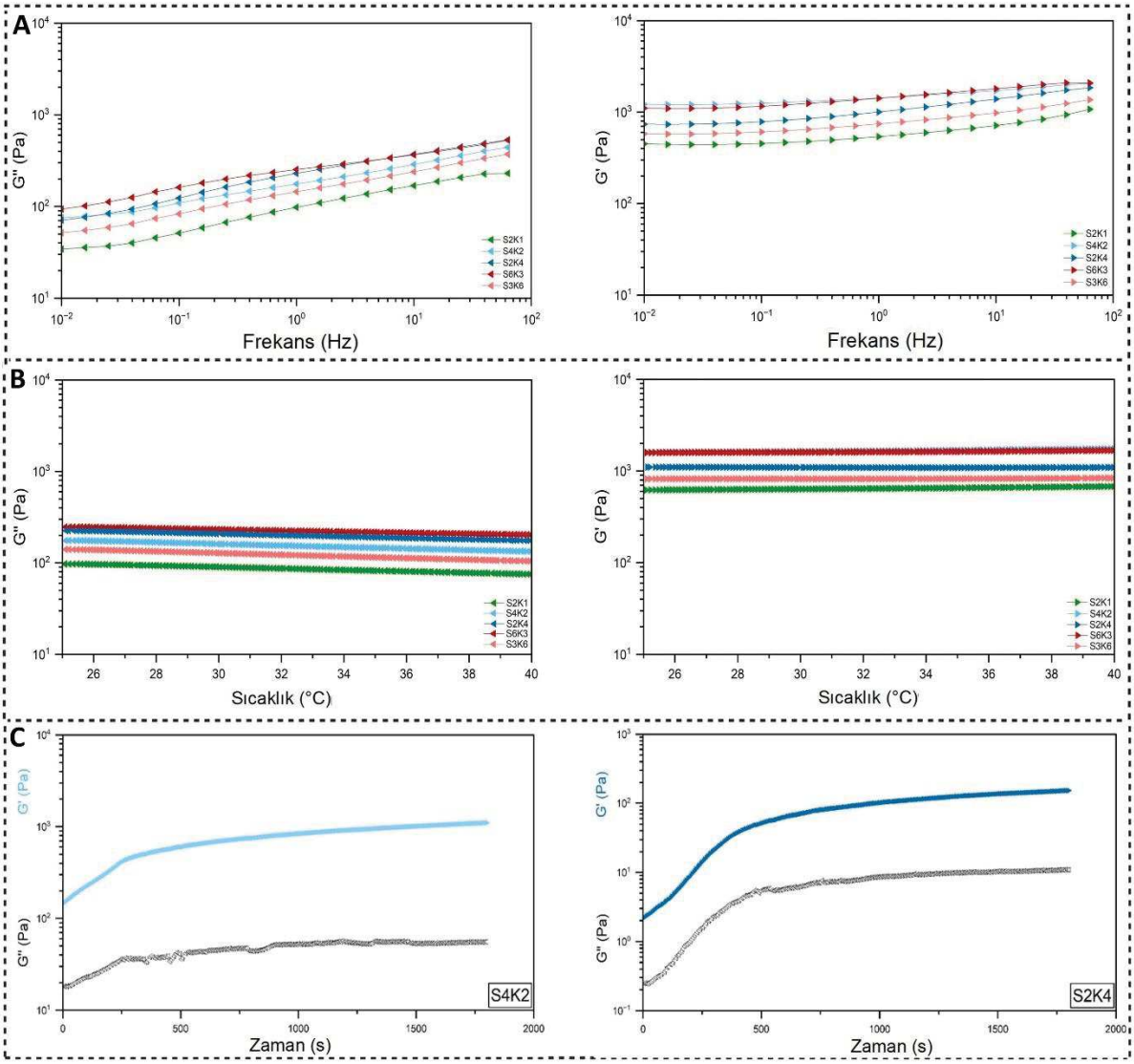
4.3. Reolojik Analiz

Dinamik salınımlı reoloji, farklı oranlarda ve ağırlıklarda İS ve YK proteinlerini içeren serisin/keratin hidrojellerinin viskoelastik davranışını değerlendirmek için

kullanılmıştır. Başlangıçta, LVR 1 Hz'de genlik taramasından %4'lük bir gerinim değerinde belirlenmiştir. Dinamik frekans, sıcaklık ve zaman taraması testleri sırasında, örneklerin sırasıyla jel katı benzeri (elastik) ve sıvı benzeri (viskoz) davranışını değerlendirmek için G' ve G" ölçülmüştür. Ayrıca, daha yüksek G' değerine sahip bir jel genellikle daha iyi mekanik ve yapısal özellikler sergilemektedir (Danu vd., 2020). Şekil 16, tüm olgunlaşmış hidrojeller için dinamik modüllerin (G' ve G") frekans bağımlılığını göstermektedir. G´, test edilen frekans aralığı boyunca G´´'den daha büyüktü ve bu da tüm örneklerin jel benzeri davranışını göstermektedir. Şekil 16A'dan hidrojellerdeki serisin ve toplam protein içeriğindeki artışın daha yüksek G' değerlerine yol açtığı açıkça görülmektedir. Ayrıca, S4K2 ve S6K3 için G' değerleri sırasıyla 1200 Pa ve 1100 Pa'dır, bu da S4K2 hidrojellerinin S6K3 hidrojellerinden biraz daha sert olduğunu göstermektedir. Bu gözlemler, belirli bir eşiğe ulaştıktan sonra, toplam protein miktarındaki daha fazla artışın jelin sertliğine önemli ölçüde katkıda bulunmadığını göstermektedir.

Olgunlaşmış hidrojellerin mekanik özelliklerini sıcaklığın bir fonksiyonu olarak belirlemek için 25-40 ºC'de 1 °C/dak ısı hızıyla salınımlı bir sıcaklık taraması gerçekleştirilmiştir (Şekil 16B). Artan sıcaklıkla birlikte G' ve G" değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir, bu da tüm örneklerin özellikle vücut sıcaklığı koşullarında 3B jel veya katı benzeri yapılarını koruduğunu göstermektedir.

Reolojik analiz ayrıca S2K4 ve S4K2 hidrojellerinin jelleşme sürecini 30 dakika boyunca izlemek için de kullanılmıştır. Bu amaçla, zamanın bir fonksiyonu olarak G' ve G" değerleri, numunelerin jel öncesi formları 25 ºC, 1Hz frekans ve %7,5 gerinimde salınımlı bir zaman taramasına tabi tutularak ölçülmüştür. Jelleşme sürecinin başlangıcında G', G" üzerinde baskındı ve jelleşme ilerledikçe her iki hidrojel için bu modüller hızla artmıştır (Şekil 16C). S2K4 ve S4K2 hidrojellerinde gözlenen her iki moduldeki keskin artış, çapraz bağlanma reaksiyonunun 10. ve 5. dakikalarında bir platoya ulaşarak reaksiyon kinetiğinin hidrojellerdeki artan serisin miktarıyla hızlandığını göstermiştir. Nihai ağ oluşumunun 25. dakikasında, S2K4'ten (100Pa) daha yüksek bir G' değerine (1000Pa) sahip olan S4K2, daha iyi mekanik dayanım sergilemiştir.



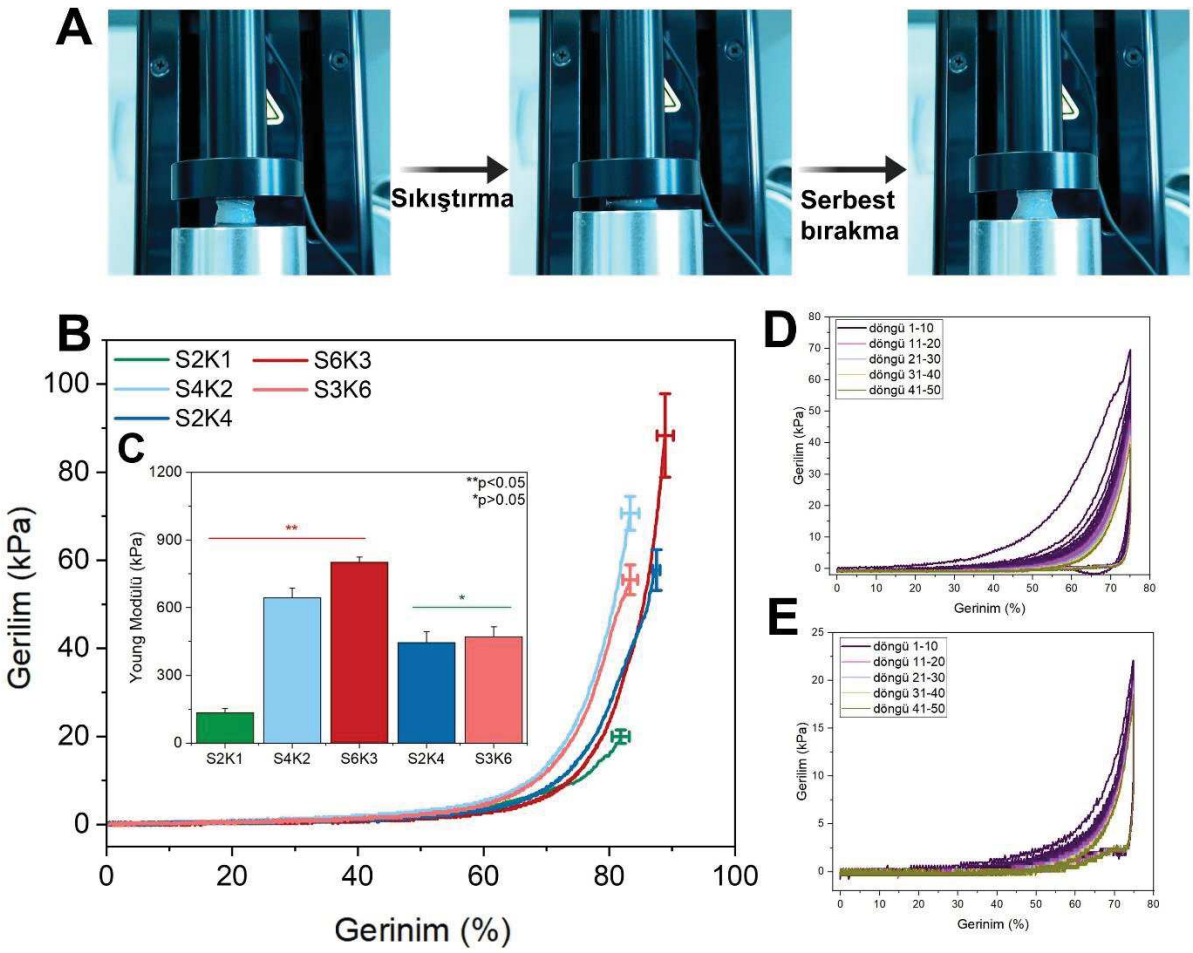
Şekil 16. Beş farklı serisin/keratin hidrojelinin reolojik davranışı. Grafikler frekans (A), sıcaklık (B) ve zaman (C) taramalarından elde edilen dinamik modül (G' ve G") değerlerini göstermektedir.

Ayrıca, S2K4 ile karşılaştırıldığında, jelleşme sırasında S4K2'deki elastik ve viskoz modül arasındaki fark önemli ölçüde daha fazladır, bu da daha jel-katı bir davranışa sahip olduğunu gösterir. Bir çalışmada, Vulpe ve arkadaşları hyaluronik asit (HA) ve/veya kolajene eklenen serisinin *in situ* çapraz bağlanma reaksiyonu yoluyla jelleşme üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yazarlar, reaksiyon kinetiğinin serisin varlığında daha hızlı hale geldiğini ve bunun da amid bağı oluşumuna olanak sağladığını göstermişlerdir (Vulpe vd.,

2016). Bu sonuçlar, yapıdaki daha yüksek serisin miktarının amid bağı oluşumunu hızlandırarak jelleşmeye önemli ölçüde katkıda bulunduğunun iyi bir kanıtıdır.

4.4. Mikromekanik Test

Hidrojellerin mekanik özellikleri tek eksenli sıkıştırma testleri ile incelenmiştir (Şekil 17). Tablo 6 basınç gerilimi, gerinim (%) ve Young modülü değerlerini özetlemektedir. Serisin/keratin hidrojellerindeki hem serisin oranı hem de toplam protein kütlesi arttıkça, basınç gerilmeleri ve Young modülü değerleri de artmıştır. S2K4 (57,1±0,71) ve S4K2 (69,33 ± 1,35) hidrojelleri ile S3K6 (52,45 ± 3,45 kPa) ve S6K3 (91,63 ± 9,46) hidrojelleri arasında gözlenen basınç gerilimi artışları artan serisin içeriğine bağlanmaktadır. Öte yandan, toplam protein kütlesindeki artış, benzer serisin oranına sahip olmasına rağmen S6K3'ün neden S4K2'den daha sağlam olduğunu açıklayabilir. Dahası, aynı serisin oranlarına sahip S2K4 ve S3K6 hidrojellerinin basınç gerilimi değerleri önemli ölçüde farklı değildir ($p<0.05$), bu da protein artışının tek başına mekanik dayanımı belirleyen bir faktör olmadığını göstermektedir. Ayrıca, S2K1 hidrojelleri, yetersiz toplam protein kütlesi nedeniyle 19,24 ± 1,52 ile diğerlerinden önemli ölçüde daha düşük basınç dayanımı göstermiştir. Tüm serisin/keratin hidrojelleri %81-89 aralığında karşılaştırılabilir suşlar sergilemiştir, bu da iyi bir sıkıştırma taşıma kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 17B) . Belirtildiği gibi, serisin çapraz bağlanma reaksiyonu sırasında amid bağı oluşumunu hızlandırarak bir hidrojel ağı oluşturmayı destekler. Mekanik mukavemet protein miktarına ve çapraz bağlanma yoğunluğuna bağlıdır (Yan vd., 2021). İpek serisine aljinat (Zhang vd., 2015) ve poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA) (Yan vd., 2021) eklenerek hidrojel elde edilen çalışmalarda da benzer mekanik test sonuçları bulunmuştur. Mekanik takviyedeki artışı, hidrojeldeki artan serisin oranına bağlamışlardır (Yan vd., 2021; Zhang vd., 2015). Bir başka çalışmada Wang ve arkadaşları, serisin hidrojellerinin yüksek basınç dayanımına sahip olduğunu göstermiş ve miyokard ve iskelet kası gibi dokuların yenilenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Wang vd., 2014).



Şekil 17. Mikromekanik analiz sonuçları. Beş farklı serisin/keratin hidrojeli için basınç testi görüntüleri (A), Gerinim-Gerilim eğrileri (B) ve Young modülü değerleri (C). S4K2 (D) ve S2K4 (E) hidrojelleri için 50 ardışık döngüsel sıkıştırma-serbest bırakma deneyine ilişkin döngüsel diyagramlar.

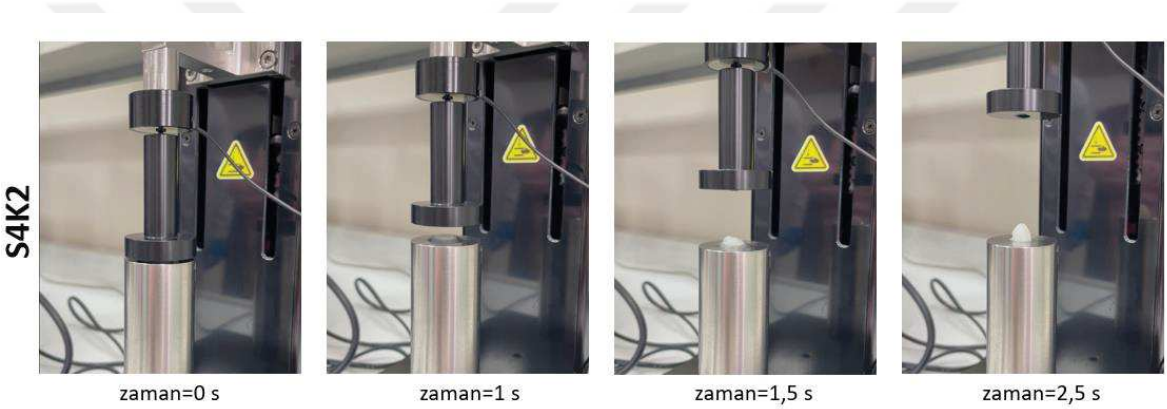
Tablo 6

Numunelerin gerinim, stres ve Young modülü değerleri

Örnek	Gerinim (%)	Gerilim (kPa)	Young Modülü (kPa)
S2K1	81.81 ±1.37	19.95 ±1.52	134.43 ±19.03
S4K2	83.33 ±1.43	70.68 ±3.83	644.14 ±42
S2K4	87.5 ±0.57	57.8 ±4.61	445.26 ±49.18
S6K3	88.89 ± 1.3	88.34 ±9.46	802.48 ±21.95
S3K6	83.33 ±1.19	55.59 ±3.39	471.9 ±43.25

Basınç gerilme-gerinim analizi sırasında, suya doymuş hidrojellerin sıkıştırma altında içerdikleri suyu serbest bıraktıklarını ve sıkıştırma kaldırıldıktan sonra etraflarındaki suyu emerek hızlı bir şekilde başlangıç şekline döndüklerini gözlemledik (Şekil 17A). Bu gözlem, gözenekli yapılara sahip hidrojellerin şişme ve su salma yetenekleri sayesinde elastik kuvvetlere sahip olduğunu göstermektedir. Tüm hidrojeller arasında S2K4 ve S4K2 hidrojelleri sıkıştırma testinden sonra şekillerini geri kazanabilmiştir (Şekil 18). Bu nedenle, her iki hidrojelin daha ileri mekanik davranışlarını incelemek için hidrojeller 50 ardışık döngü testine tabi tutularak döngüsel yükleme-boşaltma deneyleri yapılmış ve döngüsel diyagramlar elde edilmiştir (Şekil 17D ve E). Yükleme-boşaltma eğrileri arasındaki alan arttığında, birim hacim başına dağılan enerji artmakta ve bu da daha yüksek bir histerezis seviyesine neden olmaktadır. Tersine, bu alandaki bir azalma dağılan enerjinin ve histerezis seviyelerinin azalmasına yol açarak boşaltma sonrasında daha yüksek bir malzeme geri kazanım oranına işaret etmektedir (Ho vd., 2022). İlk döngüde, S4K2 hidrojeli, sıkıştırma altında hidrojel içindeki CO_2 kabarcıklarının aniden çıkarılması nedeniyle belirgin bir histerezis döngüsü göstermiş ve bu da yüksek dağılan enerjiye neden olmuştur (Şekil 17D). Bununla birlikte, 40 döngü içinde neredeyse sıfır histerezis gözlenmiştir, bu da belirgin bir enerji dağılımının olmadığını ve hidrojelin bütünlüğünü koruyarak orijinal şekline başarılı bir şekilde geri döndüğünü göstermektedir. Hidrojelin kalıcı deformasyonuna ve daha düşük

bir geri kazanım oranına işaret eden 41-50 döngüde histereziste bir artış gözlenmiştir. S2K4 hidrojeli de aynı yükleme ve boşaltma döngülerinde daha düşük stres değerleriyle benzer toparlanma özellikleri sergilemiştir (Şekil 17E). Ayrıca, S2K4 ilk döngüde S4K2'ye göre daha düşük bir histerezis döngüsüne sahipti. Daha az serisin içeriğine sahip S2K4 hidrojelinin içinde oluşan daha az CO_2 kabarcığının, sıkıştırma testi sırasında gözlemlenen daha düşük dağılmış enerjiye yol açtığı öne sürülebilir. Elastikiyeti ve uygun mekanik özellikleri göz önüne alındığında, S4K2 hidrojeli bu çalışmanın takip deneyleri ve analizi için seçilmiştir. Ayrıca, serisinin etkisini göstermek ve sonuçları karşılaştırmak için sonraki deneylerde S2K4 hidrojeli kullanılmıştır.

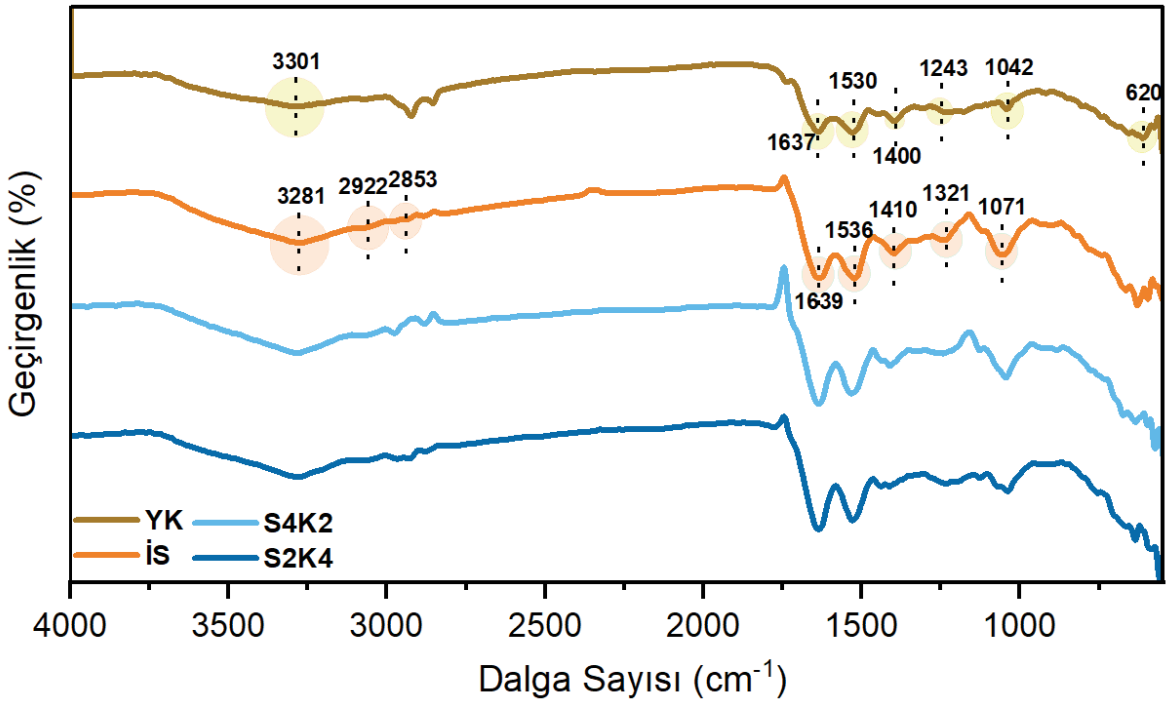


Şekil 18. S4K2 hidrojelinin sıkıştırma-serbest bırakma işlemi altında hızlıca toparlanmasının gösterilmesi.

4.5. ATR-FTIR Sonuçları

ATR-FTIR spektroskopisi, protein yapılarındaki tekrar eden birimlerin titreşimine dayanan fonksiyonel grupları tespit etmek için kullanılmıştır. Şekil 19 keratin, İS ve hidrojel bazlı iskelelerin karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir. 3200-3400 cm-1 arasında gözlenen Amid A bantları H-bağlı N-H germe titreşimine atfedilmiştir. Protein ve polipeptitlerin yapılarındaki konformasyonel değişiklikler açısından yorumlanan Amid I-III bantları da tüm spektrumlarda görülmektedir. 1600-1700 cm-1'deki amid I bandı ve 1500-1600 cm-1'deki amid II bantları sırasıyla C=O gerilmesine ve C-N gerilmesinin bazı katkılarıyla N-H deformasyonuna karşılık gelmektedir. Öte yandan, amid III bantlarını gösteren 1200-1300 cm-1'deki pikler C-N ve C-C germe absorpsiyonları ve N-H ve C-O

bükülme absorpsiyonları ile ilgilidir (Cal vd., 2021; Yildiz vd., 2024). Bunlar arasında amid I bandı özellikle serisin'in ikincil yapısının aydınlatılmasında yararlıdır (Zhang vd., 2015). Keratin ile karşılaştırıldığında serisinde daha güçlü bir amid I pikinin gözlemlenmesi, ikincil yapılardaki farklılıklara bağlanabilir. Ayrıca, S2K4 ve S4K2 hidrojellerindeki amid I pikinin yoğunluğu hafifçe artmıştır, bu da reaksiyondan sonra keratin/serisin bazlı hidrojel ağında yapısal dönüşümler meydana geldiğini göstermektedir.

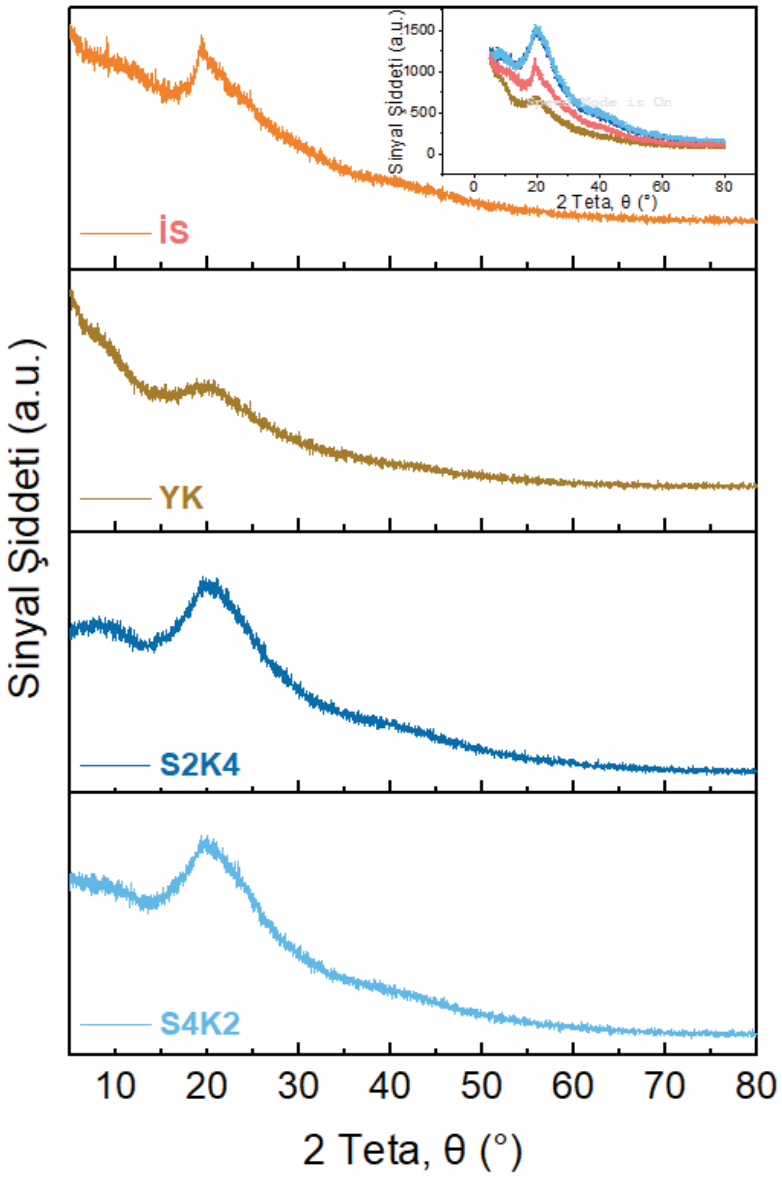


Şekil 19. İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin FTIR spektrumları.

4.6. XRD Analizi

Reaksiyondan sonra yapısal değişiklikleri daha iyi anlamak için XRD analizi de yapılmıştır. Şekil 20 tüm numunelerin XRD modelini göstermektedir. İS, 2θ= 19.2° civarında güçlü bir kristal yüzey kırınım piki sergilemiştir; bu pik, degumming işleminden sonra elde edilen İS ekstraktlarının amino asit kalıntılarındaki hidroksil grupları arasında oluşan moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklanan β-sheet yapısıyla ilişkilidir (Saha vd., 2019). YK'nın spektrumunda yaklaşık 2θ= 20.0°'de β-sheet yapısına işaret eden amorf bir kırınım piki görülmüştür. Öte yandan, doğal YK'nın α-sarmal yapılarına karşılık gelen

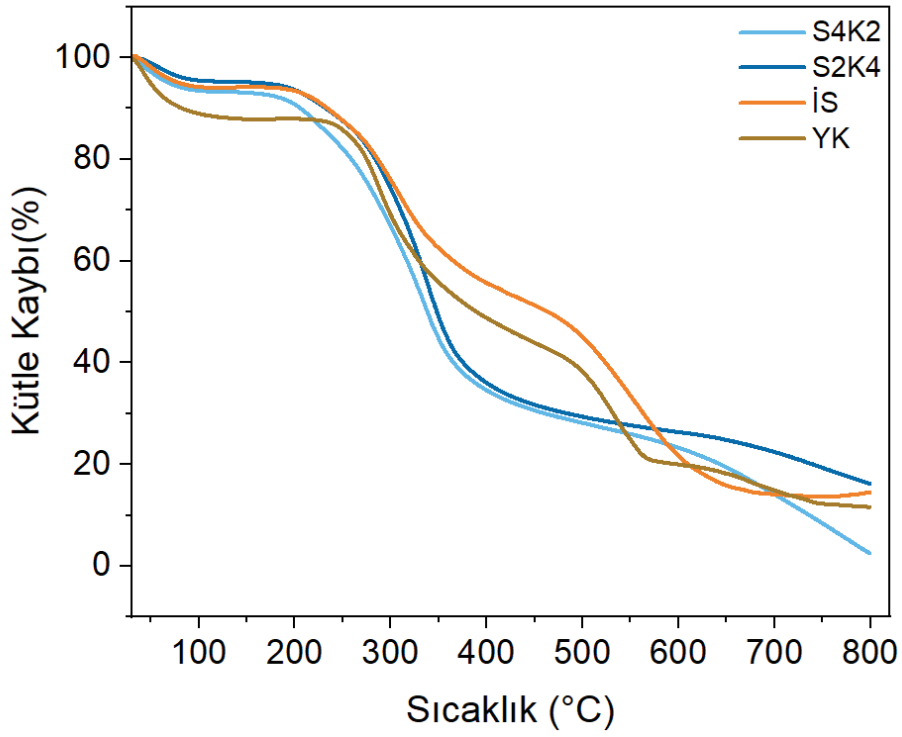
2θ= 9° civarındaki karakteristik pik, sülfitoliz reaksiyonu sırasında alkali bir işlemle YK ekstraktlarındaki bu yapıların zarar görmesi nedeniyle görülmemiştir (Wang vd., 2022; Yildiz vd., 2024). S2K4 ve S4K2 hidrojelleri 2θ= 19.8º civarında, saf YK ve İS'den daha yüksek yoğunlukta geniş ve amorf piklere sahipti ve bu da hidrojel hazırlamanın başarısını gösteriyordu. Hidrojel ağının oluşumu sırasında, küçük amorf YK fraksiyonları kristal yapıdaki serisin polipeptit zincirleri arasına dahil olmuş ve tüm hidrojelin amorf bir yapı olmasına neden olmuştur.



Şekil 20. İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin XRD spektrumları.

4.7. Termal Kararlılık

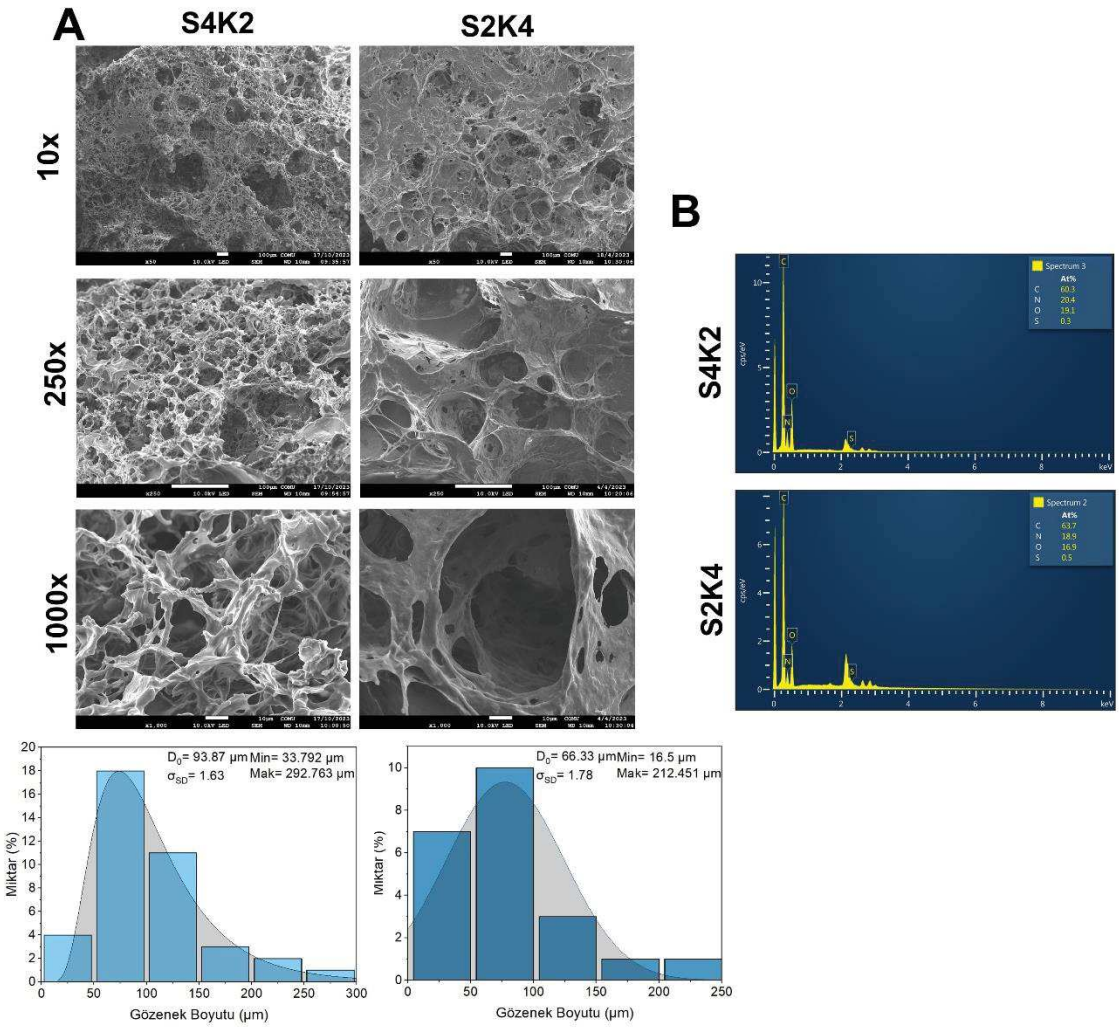
Tüm numunelerin termal bozunması TGA kullanılarak incelenmiştir (Şekil 21). S2K4 ve S4K2 hidrojellerinin termogravimetrik eğrileri iki ayrışma aşaması gösterirken, saf İS ve YK özütleri üç ayrışma aşaması göstermektedir. Ağırlık kaybının 100 ºC'nin altındaki ilk aşaması, bağlı suyun kaybına atfedilmektedir. Ağırlık kaybının 300 ila 600 °C sıcaklık aralığındaki ikinci ve üçüncü aşamaları, sırasıyla proteinlerin bozunması ve bozunan ürünlerin daha fazla pirolizinden kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2018; Wang vd., 2018). 500 ºC'de YK ve İS için ağırlık kayıpları %60 ve %50'dir. Ayrıca, S2K4 ve S4K2 hidrojelleri, aynı sıcaklıkta %70 ağırlık kaybıyla benzer termogramlara sahiptir. Kompozit hidrojeller, saf protein özütlerine kıyasla daha düşük termal stabilite sergilemiştir. Bu sonuç, XRD analizi ile doğrulandığı üzere kristallik derecesinin kaybı ile yakından ilişkilidir (Wang vd., 2018).



Şekil 21. İpek serisin, keratin, S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı iskelelerinin TGA eğrileri.

4.8. Morfoloji, Gözeneklilik, Islanabilirlik Özellikleri ve EDS Analizi

Hidrojel bazlı iskelelerin gözenek yapısını ve gözenek boyutu dağılımını araştırmak için SEM analizi kullanılmıştır (Şekil 22A). Tüm mikrograflar, birbirine bağlı gözenekli yapıları ve malzemeler içindeki yüksek gözenekliliği açıkça göstermekte ve hidrojel ağlarının *in situ* kabarcık oluşturan jelleşme süreci yoluyla başarılı bir şekilde hazırlandığını ortaya koymaktadır. Başka bir deyişle, hidrojel bazlı iskelelerin içinde gözenek oluşumu, NHS-EDC birleştirme reaksiyonu sırasında oluşan hapsolmuş CO_2 kabarcıklarının ve jellerdeki su içeriğinin liyofilizasyon tekniğiyle uzaklaştırılmasıyla sağlanmıştır. Ayrıca, SEM görüntülerinden hesaplanan S2K4 ve S4K2 iskelelerinin ortalama gözenek boyutları sırasıyla 66.33±1.78 μm ve 93.78 ±1.63μm olarak bulunmuştur. Şekil 22B'de sunulan EDS spektrumlarında, her iki hidrojel bazlı iskelede de karbon, oksijen, nitrojen ve sülfür tespit edilerek yapıdaki İS ve YK varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca, kükürt içeriği, su ile ekstrakte edilen İS ve YK'da bol miktarda bulunan metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitlerin yüksek konsantrasyonuna bağlanmaktadır (Seo vd., 2023; Yildiz vd., 2024).



Şekil 22. S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin SEM mikrografları ve gözenek boyutu dağılım histogramları (A), EDS spektrumları (B).

Ayrıca, Tablo 7'de görülebileceği gibi, BET analizi ile ölçülen yüzey alanı, SEM görüntülerinden elde edilen gözenek boyutu dağılım histogramlarındakilere benzer sonuçlar göstermiştir (Şekil 22). Öte yandan, S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin BET yöntemiyle hesaplanan toplam yüzey alanları sırasıyla 6,66 m^2/g ve 43,61 m^2/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, daha fazla serisin eklenerek daha büyük gözenek boyutlarına ve artan toplam yüzey alanlarına sahip hidrojellerin elde edildiğini göstermiştir. İskelet kası rejenerasyonuna yönelik malzemelerin tasarımı için, tüm iskele boyunca hücre beslenmesine, çoğalmasına ve göçüne izin veren optimum bir gözenek boyutuna sahip olmak önemlidir. Ayrıca, malzemenin gözenekliliği ve yapısı, etkili kas rejenerasyonu için çok önemli olan miyoblastların miyotüplere füzyonunu ve farklılaşmasını artırmak için uygun

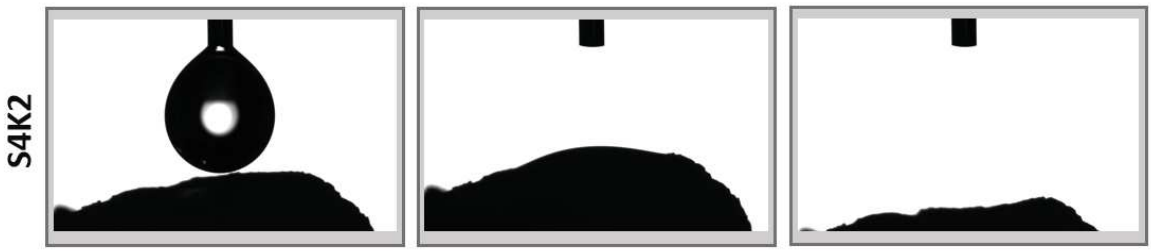
olmalıdır (Kozan vd., 2023; Velasco-Mallorquí vd., 2020). Birçok çalışma gözenek boyutunun çoğalma ve farklılaşma gibi miyoblast davranışları üzerindeki etkisini araştırmıştır. Kozan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, -20 ºC, -40 ºC, -60 ºC, -80 ºC ve -196 ºC gibi sıcaklıklarda uygulanan özel dondurma yöntemiyle 76-89 µm aralığında gözenek boyutlarına sahip kolajen süngerler üretilmiştir. Ayrıca -20ºC'de üretilen 88.9 ±17.6µm çapındaki kolajen iskelelerin miyoblast infiltrasyonu ve farklılaşması üzerinde en iyi destekleyici etkiyi gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Kozan vd., 2023). Bir başka çalışmada, iskelet kası rejenerasyonu için kriyojelasyon işlemi ile çapı 30 ila 75 µm arasında değişen gözeneklere sahip jelatin-karboksimetil selüloz materyalleri içeren kriyojeller üretilmiştir. Araştırmacılar, olgun miyotüplerin tipik olarak 30 µm'yi aşmayan bir genişliğe sahip olduğunu belirtmiş ve ayrıca hizalama yapılarına sahip kriyojellerinin miyoblast infiltrasyonunu ve iskelet kası miyotüplerine farklılaşmayı kolaylaştırmak için optimum gözenek boyutlarına sahip olduğunu bildirmiştir (Velasco-Mallorquí vd., 2020). Bu bulgulara dayanarak, S4K2 hidrojel bazlı iskelemizin uygun miyoblast davranışı için optimum gözenek boyutu ve yapısı sağlayabileceği sonucuna vardık.

Tablo 7

S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin BET analizi ve gözenek boyutu sonuçları

Örnek	**Toplam Yüzey Alanı, BET (m^2/g)**
S4K2	43.61
S2K4	6.66

Daha ileri analizler yoluyla malzeme yüzeyinin su tutma kapasitesini belirlemek için temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. S4K2 hidrojel bazlı iskele yüzeyinin ıslanabilirlik testi sırasında, yüzeydeki küçük bir damla su hemen emilmiş ve bu da yüksek hidrofilik doğasını göstermiştir (Şekil 23). Bu sonuçlar aynı zamanda şişme ve gözeneklilik özelliklerini de desteklemiştir.



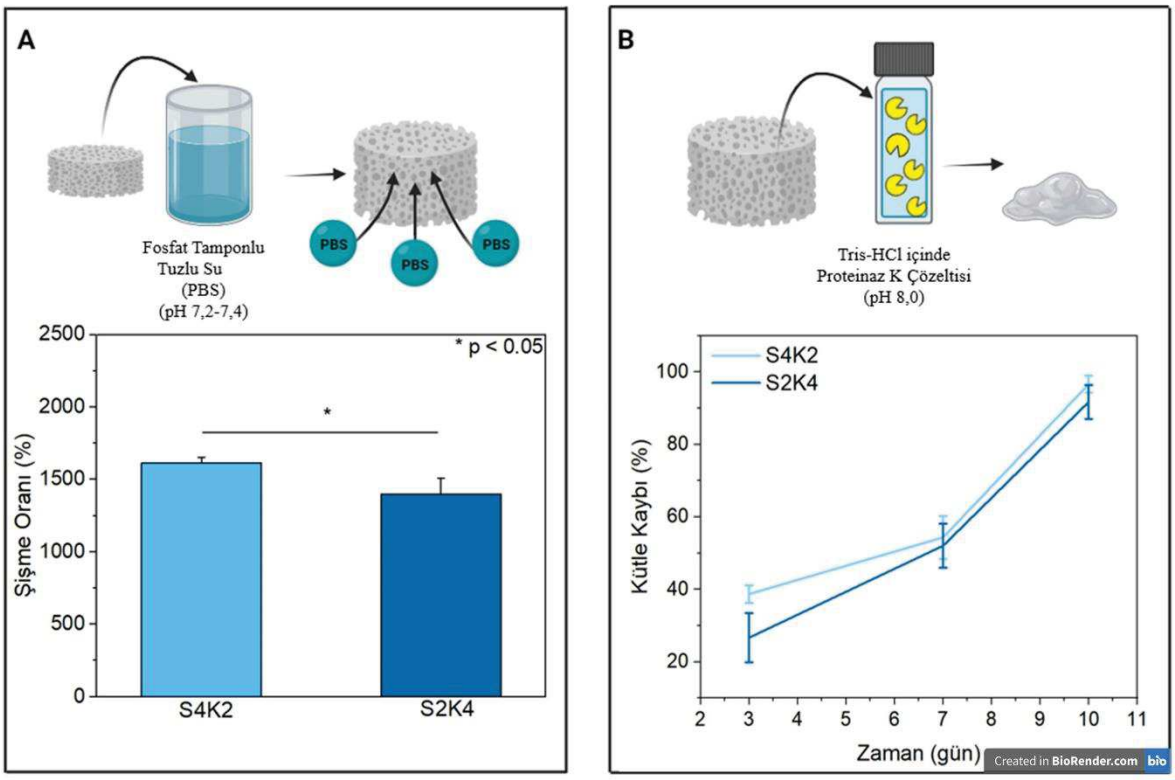
Şekil 23. Temas açısı ölçümleri kullanılarak S4K2 hidrojelinin ıslanabilirlik performansının gösterilmesi.

4.9. Şişme Testi ve Enzimatik Bozunmanın *In Vitro* Değerlendirmesi

Materyallerin şişme özellikleri, besinlerin ve diğer sıvıların hücre dışı ortamdan emilmesinde ve dolayısıyla hücrenin hayatta kalma oranını etkileyen bir diğer hayati faktördür. Bu özellikler malzemelerin gözeneklilik, hidrofilik karakter ve çapraz bağlanma oranı gibi çeşitli özelliklerine bağlıdır (Cal vd., 2021; Yilmaz vd., 2021). Bu nedenle, S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin şişme oranları PBS alım testi ile belirlenmiş ve sırasıyla 1400,17 ± 107,34 ve 1615,06±38,52% olarak bulunmuştur (Şekil 24A). İS içeriği arttıkça, S4K2 hidrojelinin gözenekliliği, yüzey alanı ve hidrofilik yapısı artmış, bu da S2K4 hidrojeline kıyasla daha yüksek bir şişme oranıyla sonuçlanmıştır.

Uygun biyoiskele, implantasyondan sonra hasarlı dokunun uygun şekilde yeniden şekillenmesini sağlamak için doğru fonksiyonel özellikler ve biyolojik bozunma oranı dengesini karşılamalıdır. Biyobozunur iskeleler, hücreleri yerinde tutana kadar yapısal bütünlüklerini korumalı ve yeni doku büyümesiyle eşleşen bir zamanda bozunmalıdır (Bitar vd., 2014). Bu nedenle, her iki hidrojel bazlı iskelenin bozunma oranları, 3, 7 ve 10 günlük inkübasyon için bir proteaz tedavisi izlenerek ağırlık kaybı yüzdesi olarak hesaplanmıştır (Şekil 24B). Her zaman noktasının sonunda, S4K2 hidrojeli S2K4 hidrojeline göre biraz daha yüksek bir bozunma oranı göstermiştir. 10. günde, S2K4 ve S4K2 hidrojellerinin toplam kütle kaybı sırasıyla %91,72 ± 4,67 ve %96,63 ± 2,43'e ulaşmıştır. Biyolojik bozunma süreci, gözenek boyutu, yüzey alanı, hidrofiliklik, gözeneklilik ve şişme oranı gibi çeşitli faktörlere bağlı olan karmaşık bir olgudur (Qasim vd., 2017). S4K2 hidrojelinin bozunma oranındaki hafif bir artış, bahsedilen malzeme özelliklerine bağlanabilir. S4K2 hidrojeli, üstün gözenek yapısı ve şişme oranı nedeniyle daha yüksek bir sıvı alım kapasitesi

sergilemiş, bu da onu hidrolitik saldırılara karşı daha duyarlı hale getirerek bozunma oranının artmasına neden olmuştur (Cal vd., 2021).



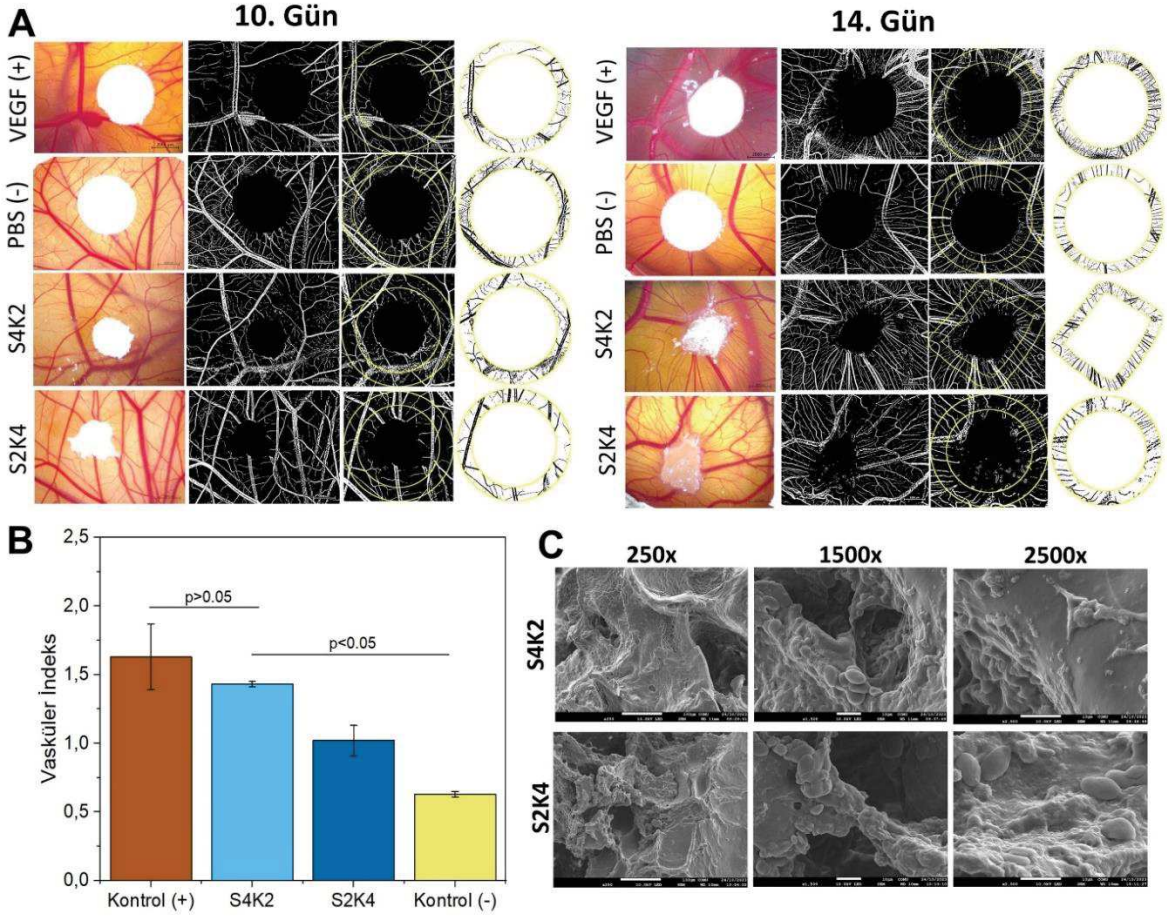
Şekil 24. S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin şişme oranlarını (A) ve *in vitro* biyobozunurluk oranını (B) gösteren grafikler.

4.10. *İn Ovo* CAM Analizi

İn ovo CAM deneyi, doku mühendisliği uygulamalarında, komşu hücrelere besin ve oksijen sağlayan yeni kan damarlarının oluşumunu içeren anjiyojenik yanıtın yanı sıra malzemelerin biyouyumluluğunu incelemek için değerli bir modeldir (Baptista-Silva vd., 2022). Bu nedenle, S2K4 ve S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin proanjiyojenik özellikleri ve biyouyumluluğu, mikroskobik ve histolojik gözlemler yoluyla CAM testi in vivo hayvan modeli kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 25). Stereomikroskopik görüntüler, her iki hidrojelin de CAM'de dört günlük inkübasyondan sonra yapısal bütünlüklerini koruduğunu ortaya koymuştur (Şekil 25A). Vasküler yoğunluk ve indeksler, ImageJ yazılımı ile elde edilen siyah-beyaz ölçekli ikili görüntülerde gösterilen alandan hesaplanmıştır (Şekil 25B).

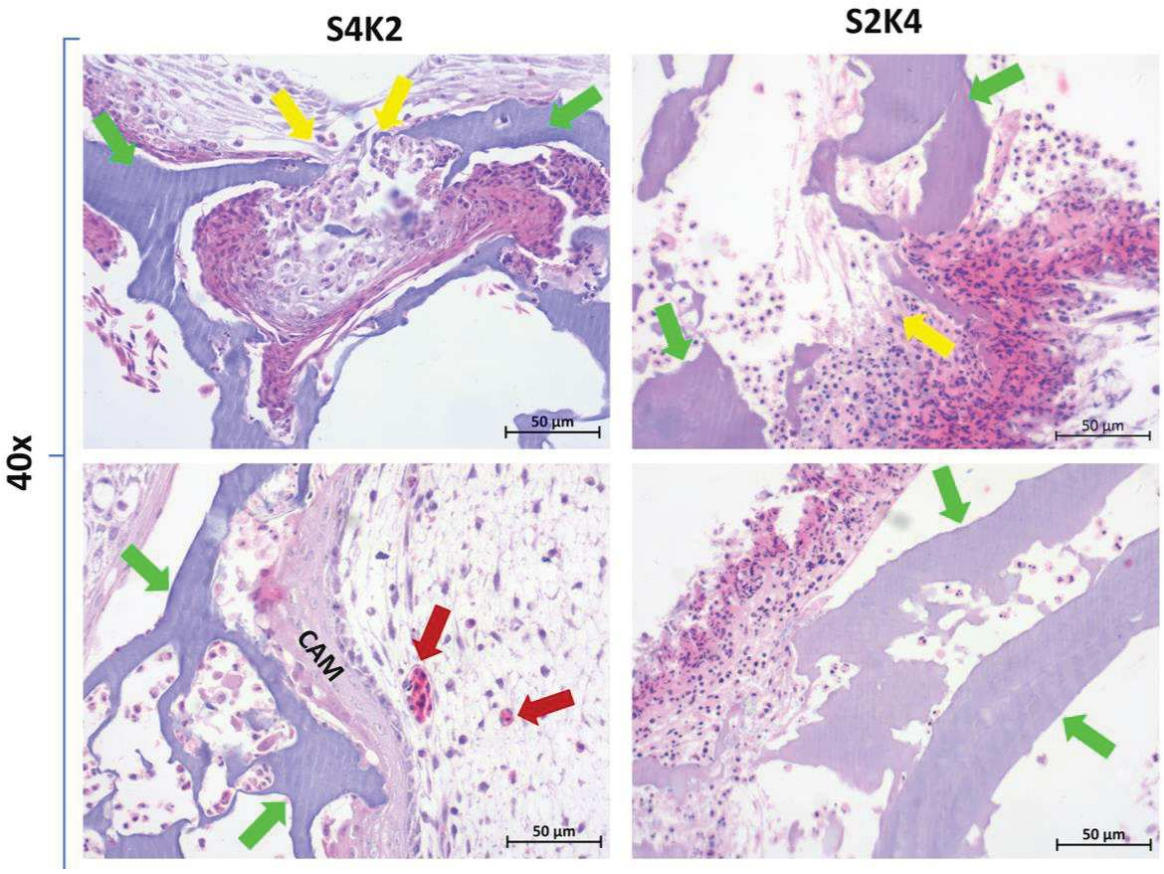
İstatistiksel analiz, S4K2 hidrojel bazlı iskele ile VEGF'nin (kontrol +) vasküler indeks değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Öte yandan, S4K2 hidrojel bazlı iskelenin indeksi S2K4 ve PBS'ye (kontrol -) göre sırasıyla 1,4 ve 2,27 kat daha yüksek bulunmuştur. S4K2 hidrojelinin daha yüksek yüzey alanı ve gözenekliliğine bağlı olarak hücresel infiltrasyonu ve yeni kan damarı oluşumunu artırdığını düşündük (Yildiz vd., 2024).

Şekil 25C'de gösterilen SEM mikrografları, her iki hidrojel-CAM doku kesitinde de hücresel göç, bağlanma ve mikrodamarların varlığını ortaya koymuştur.



Şekil 25. S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı yapı iskelelerinin biyouyumluluğunu ve proanjiyogenezini değerlendirmek için yapılan *in ovo* CAM tahlili. İmplante edilen malzemenin 10. Ve 14. günlerinde stereomikroskopik görüntüleri (A). 14.gündeki doku-CAM kompleksi bölümlerinin vasküler indeks grafiği (B), SEM mikrografları (C).

Mikroskobik gözlemlere benzer şekilde, H&E ile boyanmış CAM-hidrojel kompleksi kesitleri de hücresel ve vasküler yapıları göstermektedir (Şekil 26). Ek olarak, her iki hidrojel bazlı iskelenin de enflamatuar reaksiyonlar, nekroz veya diğer olumsuz doku yanıtları gibi herhangi bir yan etki göstermediğini ve böylece biyouyumluluklarını gösterdiğini doğruladık.

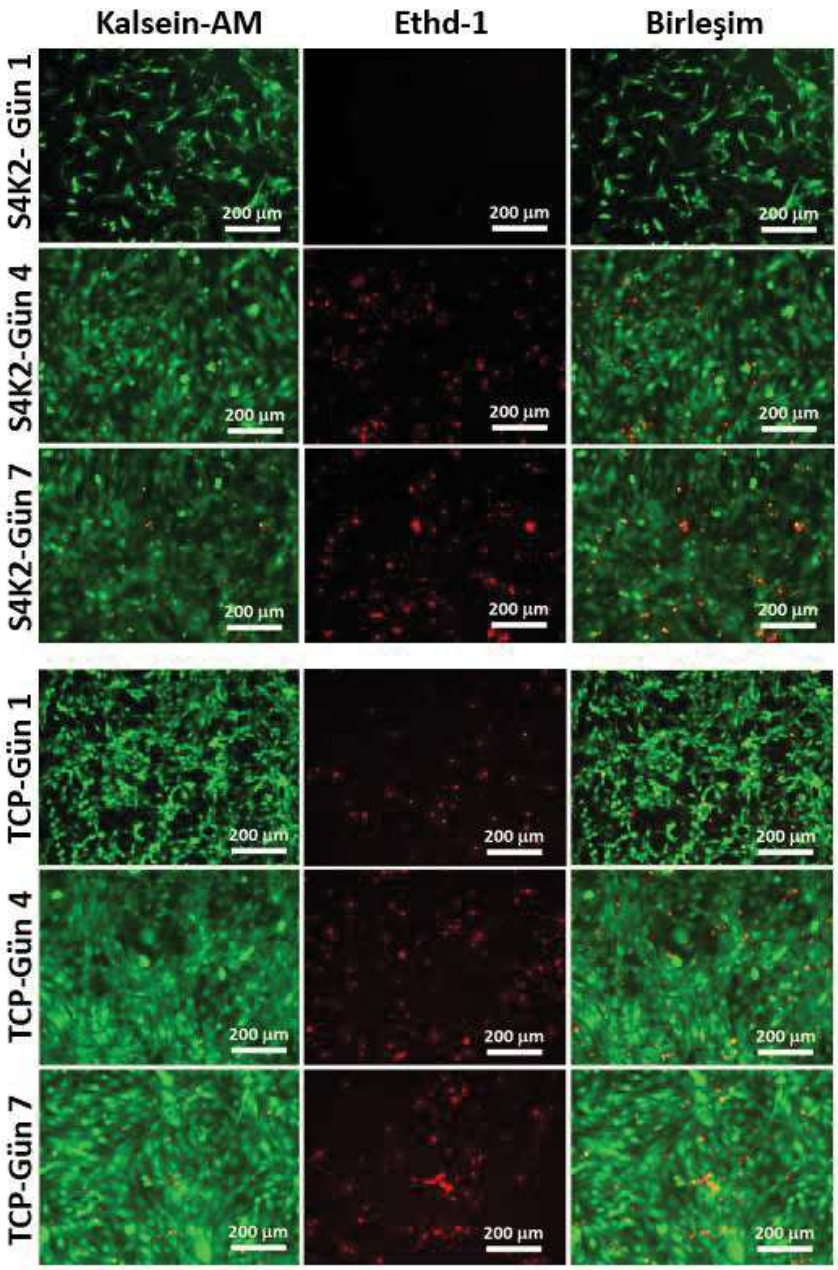


Şekil 26. *İn Ovo* CAM analizinin histolojik kesitleri. Histolojik görüntülerde kırmızı ve yeşil oklar sırasıyla yeni oluşan kan damarlarını ve hidrojelleri gösterirken, sarı oklar hücre göçünü gösterir. Ölçek çubukları 50µm'yi (40X) temsil etmektedir.

4.11. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Histokimyasal Değerlendirmeler

S4K2 hidrojel tabanlı iskelelerin sitouyumluluğunu belirlemek için canlı/ölü deneyi yapılmıştır. C2C12 miyoblastlarının 1, 4 ve 7 günlük kültürden sonra Calcein-AM/EthD-1 çift boyama floresan görüntüleri Şekil 27'te gösterilmiştir. Hücre yapışkanlık özelliklerini değerlendirmek için TCP'nin kabul edilen standart *in vitro* kültür materyali ile bir

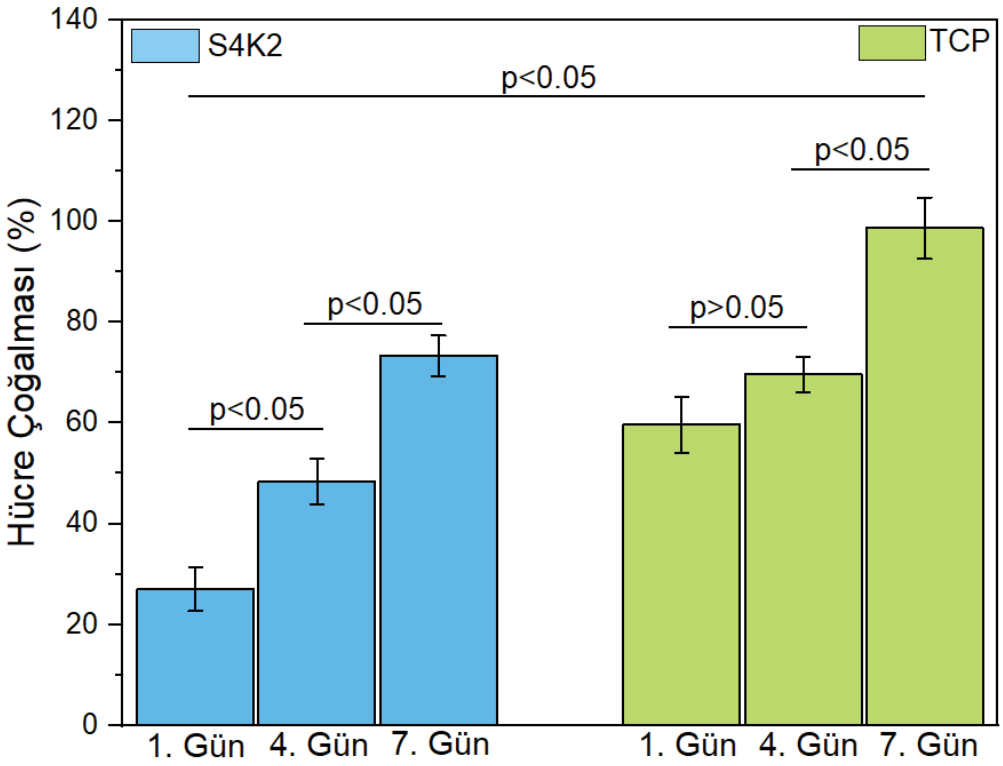
karşılaştırma yapılmıştır. Canlı/ölü testinde, kalsein ile boyamadan elde edilen yeşil floresan canlı hücreleri gösterirken, EthD-1 ile boyamadan elde edilen kırmızı floresan ölü hücreleri gösterir. Temsili mikroskopi görüntüleri, tüm zaman noktaları boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskele üzerinde canlı hücrelerin arttığını göstermiştir, bu da hücre dostu olduklarını düşündürmektedir Öte yandan, yeşil floresan emisyonları TCP'ye bağlı hücreler için daha güçlüydü. Yüzeye bağlı hücrelerin görüntülenmesi bir floresan mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildiğinden, gözenekli S4K2 hidrojel bazlı iskeleye sızan tohumlama sonrası hücreler görüntülenememiştir; bu nedenle yeşil floresan emisyonları TCP'den daha düşük kalmıştır.



Şekil 27. S4K2 hidrojel bazlı iskele için sito uyumluluk testi. Floresan mikroskobik görüntülerde yeşil boyama canlı hücreleri, kırmızı boyama ise ölü hücreleri temsil eder. Beyaz ölçek çubuğu 200 µm'dir (A).

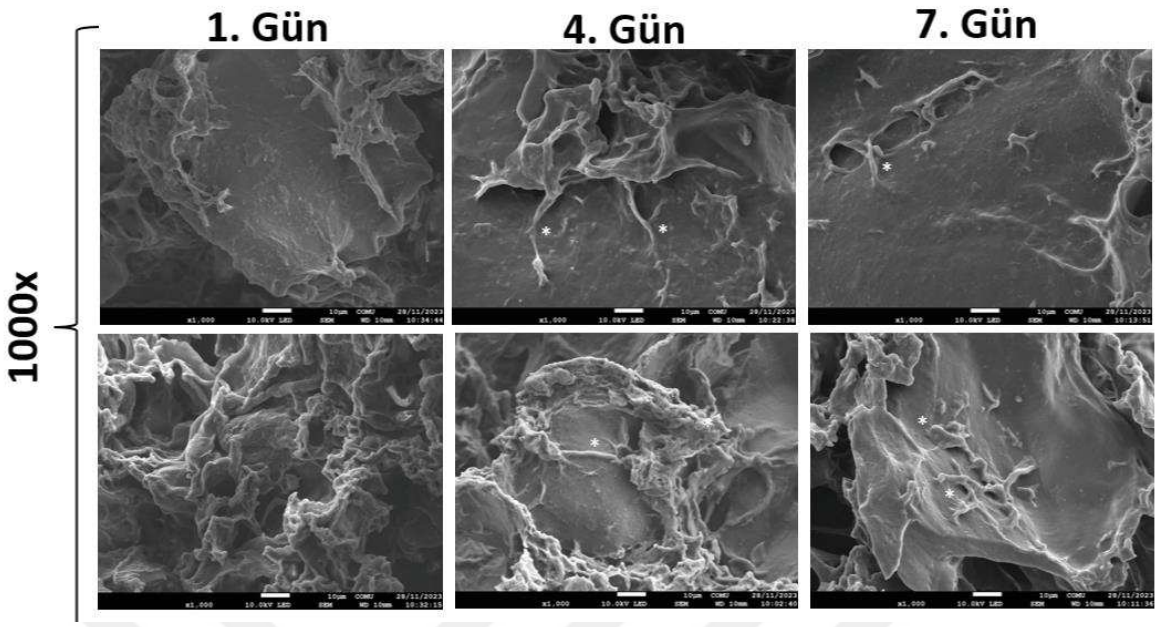
S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin hücre uyumluluğunu daha iyi değerlendirmek için MTS testi de gerçekleştirilmiştir. Şekil 28'te gösterildiği gibi sonuçlar canlı/ölü testiyle tutarlıydı ve gözenekli yapıya sahip S4K2 hidrojel tabanlı iskelelerin C2C12 hücreleri için bağlanma bölgeleri sağladığını gösterdi. Ayrıca, hidrojel bazlı iskele üzerinde 7 günlük bir

çoğalma süresi boyunca artan hücre canlılığı TCP'den daha düşüktü, bu da çoğalmadan ziyade miyoblastların potansiyel bir farklılaşmasına işaret ediyordu ve bu da kantitatif RT-PCR analizi ile doğrulandı (Kozan vd., 2023).



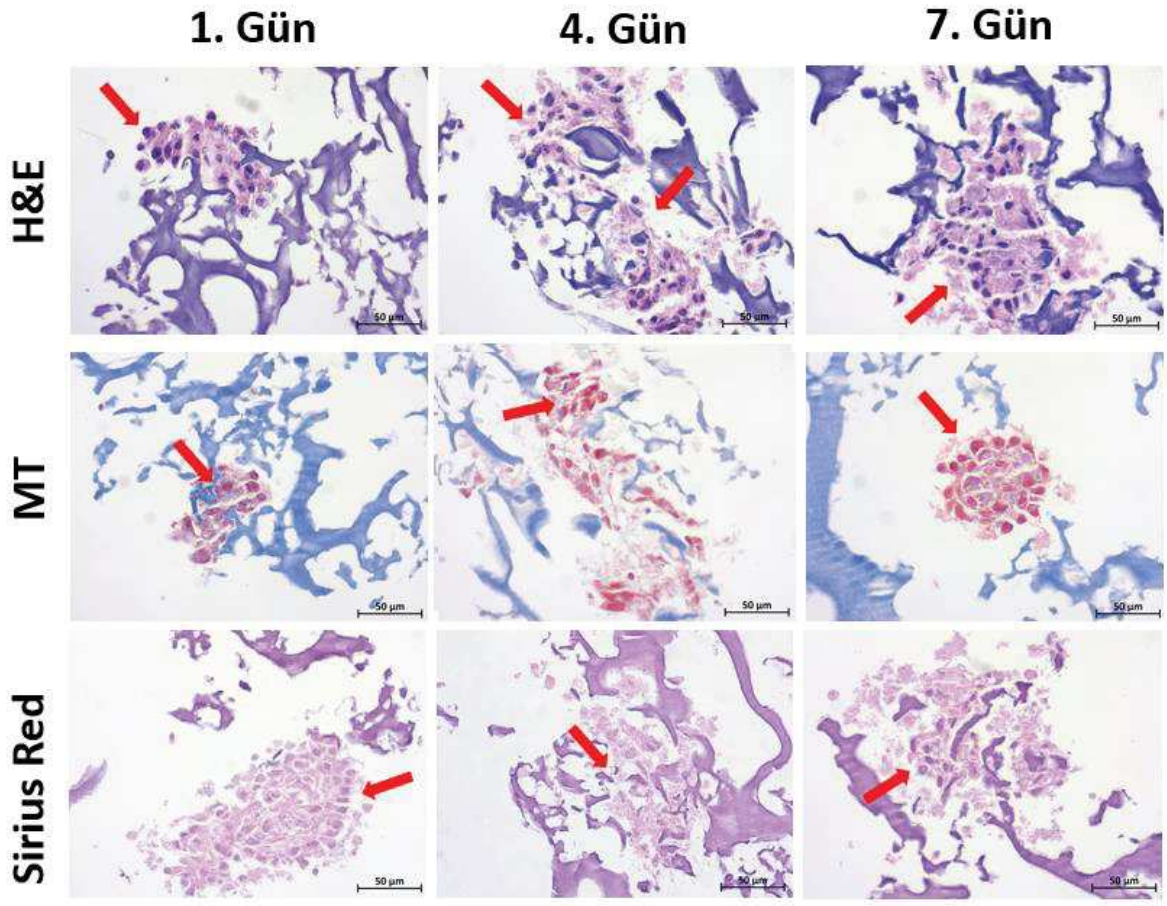
Şekil 28. 1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı yapı iskelelerinde C2C12 hücre çoğalmasına ilişkin MTS tahlili sonuçları.

Şekil 29, hücre yüklü iskele kesitlerinin 1, 4 ve 7. günlerdeki SEM mikrograflarını göstermektedir. Kültürün her bir zaman noktasında, miyoblastların S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin yüzeyine yayıldığı görülmüştür, bu da hücre büyümesi ve çoğalması için uygun ev sahibi olduklarını göstermektedir.



Şekil 29. 1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskelelere ekilen C2C12 hücrelerinin 1000x büyütmelerindeki SEM fotoğrafları.

Histokimyasal analizde, S4K2 hidrojel bazlı iskele kriyoseksiyonları, 1,4 ve 7. günlerde hücre yüklü yapılar üzerindeki hücresel yapıları ve kolajen oluşumunu incelemek için H&E, MT ve Sirius kırmızısı ile boyanmıştır (Şekil 30). H&E boyaması, S4K2 hidrojel bazlı iskelenin uygun hücre infiltrasyonu, büyümesi ve gelişimini sağladığını ortaya koymuştur. Ayrıca, MT ve Sirius kırmızısı boyaması S4K2 hidrojel bazlı iskelelerde kolajen birikimi olduğunu göstermiştir. Ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak, elde edilen İS, hücre canlılığını ve kolajen salgılanmasını etkileyebilecek farklı amino asit bileşimlerine sahip olabilir. Sıcak suyla ekstrakte edilen İS'deki metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitler, farklı memeli hücre hatlarının çoğalmasını ve bağlanmasını ve kolajen üretimini teşvik etmekle oldukça ilişkilidir (Aramwit vd., 2010; Seo vd., 2023; Silva vd., 2022). Bu bağlamda, yüksek sistein kalıntısı içeriğine sahip yün keratininin de benzer bir etki gösterebileceği düşünülebilir. *İn vitro* kültürün 1. ve 7. günleri arasındaki histolojik kesitlerdeki kolajen üretimine dayanarak, S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin esas olarak kolajenden oluşan iskelet kasının rejenerasyonuna fayda sağlayabileceği sonucuna vardık.

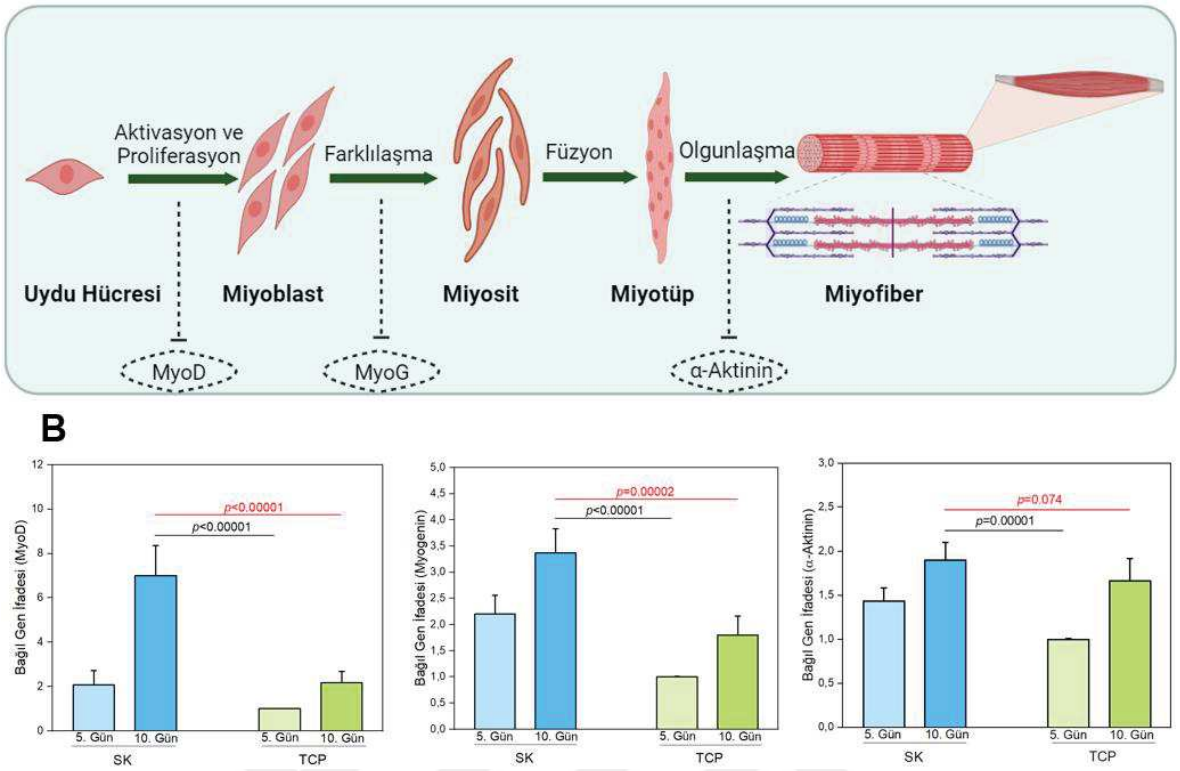


Şekil 30. 1, 4 ve 7 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskelelerde kültürlenen C2C12 hücrelerinin in vitro miyojenik farklılaşması için H&E, MT ve Sirius kırmızısı boyamanın histolojik görüntüleri. Siyah ölçek çubuğu 50 mikrondur. Kırmızı oklar matristeki hücreleri göstermektedir.

4.12. Miyojenik Farklılaşma ile İlgili Gen İfadeleri

Miyojenik farklılaşma, miyoblast adı verilen kas öncüllerinin MyoD ve MyoG gibi çeşitli miyojenik düzenleyici faktörler aracılığıyla olgun iskelet kası oluşturmak üzere farklılaştığı oldukça organize bir sıralı süreçtir (Şekil 31A) (Jang vd., 2013). MyoD, farklılaşmanın erken evresinde miyoblastlardan mononükleer miyositlerin oluşumu sırasında yüksek oranda ifade edilirken, MyoG farklılaşmanın son evresinde ve miyotüplerin çok çekirdekli miyotüplere füzyonu sırasında aktif bir rol oynamaktadır (Thilagam vd., 2022). Sonunda, miyotüpler kasa özgü protein α-aktinin'i ifade ederek miyofiberlere dönüşür (Kim vd., 2013). Bu olguya dayanarak, Tablo 5'te verilen miyojenik farklılaşma genlerinin

ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. Şekil 31B, MyoD, MyoG ve α-aktinin dahil olmak üzere miyojenik genlerin planlanan zaman aralıklarında (5. ve 10. günler) göreceli ifade düzeylerini göstermektedir. Deney günleri ilerledikçe, S4K2 hidrojel bazlı iskelelerde MyoD ve Myogenin genlerinin TCP'ye kıyasla kayda değer şekilde yukarı doğru düzenlendiği görülmüştür. Bu sonuçlar, artan yüzey alanı ve daha küçük gözenek yapısına sahip S4K2 hidrojelimizin hücre-hücre sinyalleşmesini ve ardından miyojenik farklılaşmayı desteklediğini gösterebilir (Basurto vd., 2022). Buna karşılık, kültürün 10. gününde, S4K2 ve TCP'de miyotüp dönüşümü ile ilişkili α-aktinin gen ifadelerinin seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.074$). Bu durum, S4K2 hidrojelinin miyoblastlar ve miyotüpler arasında farklılaşma için gerekli olan yeterli hizalama ve süperorganizasyon yapısına sahip olmamasına bağlanabilir (Velasco-Mallorquí vd., 2020). Bazı *in vivo* çalışmalar, iskelet kası rejenerasyonu için YK (Namjoo vd., 2023) ve İS (Song vd., 2022) gibi doğal polimer bazlı hidrojellerin kullanımını araştırmış ve bu malzemelerin miyoblastların yapışmasını, çoğalmasını ve konakçı kasa entegrasyonunu artırdığını bulmuştur ki bu da yeni miyofiberlerin oluşumu için çok önemlidir. Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, gözenekli S4K2 hidrojel bazlı iskelemiz, İS ve YK'nın miyoblast proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde sinerjik bir etki sunması nedeniyle kas dokusu mühendisliği uygulamalarında iyi bir aday olabilir.



Şekil 31. Miyojenik farklılaşma adımlarının şematik gösterimi. MyoD, MyoG ve a-aktinin dahil olmak üzere miyojenik genlerin 5 ve 10 gün boyunca S4K2 hidrojel bazlı iskelelerdeki C2C12 hücreleriyle ilgili kantitatif ekspresyon seviyeleri. p≤0,05, gruplar için de ve gruplar arasında anlamlı bir farkı temsil eder (B).

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

Birçok önemli özelliğe sahip olan doğal ürünler değeri bilinmeden atık olarak atılabilmektedir. Bunlardan ikisi de serisin ve keratin proteinleridir. İS, ipek tekstil endüstrisinde fibroin proteinini elde etme aşamasında su kaynaklarımıza karışmakta ve çevremize ciddi zararlar verebilmektedir. Keratin ise koyun çiftliklerinde atık olarak atılan koyun yünlerinin içerisinde bulunmaktadır. Çevremizi hem kirlilikten kurtarmak hem de proteinlerin ayrıcalıklarından faydalanmak için bu iki protein ektrakte edilebilir ve hatta doku mühendisliği alanında kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında, yerinde kabarcık oluşturan bir hidrojel hapsetme işlemi kullanarak YK ve İS içeren yeni gözenekli hidrojel bazlı iskeleler üretmeye çalıştık. Bu süreçte kullanılan NHS/EDC birleştirme reaksiyonu, hızlı jelleşme sırasında oluşan hapsolmuş CO_2 kabarcıklarını gidererek gözenekli bir yapı oluşturmak ve güçlü çapraz bağlı bir polimer ağı üretmek gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. İskelet kası rejenerasyonu için kullanılabilecek malzeme tasarımı için en uygun yapısal ve mekanik özellikleri sergileyen hidrojeli belirlemek amacıyla değişen miktarlarda İS ve YK içeren hidrojeller üretilmiştir. Kapsamlı değerlendirmelerin ardından, S4K2 hidrojel bazlı iskelelerin gözeneklilik, gözenek boyutu, yeterli esnek yapı ve dayanıklılık açısından en uygun malzemeler olduğu belirlendi. Reaksiyon aşamasında ipek kozası proteini olan ve sadece USS ile kaynatmadan elde edilebilen serisin kullanılmıştır. Keratin kaynağı olarak ise koyun yünü keratini kullanılmış ve koyun yünleri sülfitolizis reaksiyonu ile işlenmiştir. Proteinlerin biyokimyasal testleri olarak spektrofotometrik analizler, -SH grup tayini ve SDS-PAGE analizleri kullanılmıştır. Biyokimyasal yöntemler ile serisin ve keratinin total protein içeriği, yalnızca keratinin ise sülfidril gruplarının miktarı belinmiştir. Ek olarak, proteinlerimizin moleküler ağılıkları SDS-PAGE analizinin yardımı ile bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız serisinin, genel olarak kullanılan Na_2CO_3 yöntemi kaynatma işlemine göre daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğu ve daha sağlam bir yapıda olduğu kanıtlanmıştır. Keratini ekstrakte etme yöntemimiz olann sülfitolizis reaksiyonunda ise keratini küçük parçalarına kadar ayrıştırabildiğimiz görülmüştür.

Serisin ve keratini çapraz bağlamak için EDC ve NHS kullanılmıştır. Tercih edilen bu reaksiyon ile önemli oranda CO_2 çıkışı gözlenilmiştir. Bu CO_2 çıkışı, malzememizin

yüksek miktarda ve büyük boyutta gözeneklere sahip olmasını sağlamıştır. En önemlisi de; serisin miktarı arttıkça gözenek boyutu da artmıştır. Bunun nedeni serisinin sahip olduğu karboksil gruplarıdır. Doğru olan hidrojel oranını bulabilmek için altı farklı hidrojel kombinasyonu denenmiştir, fakat S1K2 hidrojelinden elle tutulabilen sonuç alınmamıştır. Bu sebeple; analizlerde kullanılmamıştır. S1K2 hidrojelinin olmamasının nedeni serisin oranının yeterli gelmemesi ve keratinin küçük fraksiyonlara sahip olması olarak düşünülmüştür. Ayrıca yalnıca serisin ve yalnızca keratin ile hidroejl yapmaya çalıştığımızda başarılı olunamamıştır. Serisinin çok fazla CO_2 çıkışından dolayı bir ağ oluşturamaması, keratinin ise küçük fraksiyonlara sahip olmasının stabil bir jel edilememesi muhtemel sebep olarak düşünülmüştür. İlk sonuç S2K1 hidrojeli ile alınmıştır ama protein miktarlarını orantılı olarak arttığımızda mekanik olarak daha dayanıklı hidrojeller elde ettiğimiz görülmüştür. Hidrojellerimizin stabilitesi ve mekanik mukavemetinin belirlenmesi için reoloji ve tek eksenli mekanik test analizi uygulanılmıştır. Reoloji analizi sayesinde protein miktarımızın toplamı %6'ya ulaştıktan sonra S6K3 ve S3K6 hidrojellerini yapmamıza gerek olmadığı düşünülmüştür. En stabil ve dayanıklı hidrojel olarak S4K2 kabul edilmiştir. Proteinlerimizin ekstraksiyonu sonucu sahip oldukları ve hidrojel bazlı iskelelerimizin kimyasal reaksiyon sonucu oluşturdukları fonksiyonel grupları ATR-FTIR analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucu literatüre uygun proteinler ekstrakte ettiğimiz ve reaksiyonlarını da başarı ile tamamladığımız sonuçlanmıştır. Kristal yapı özellikleri XRD ile, termal stabilite özellikleri ise TGA ile incelenmiştir. TGA ile vücut sıcaklığına ve hatta çok yüksek sıcaklarda bile stabil olan malzemeler ürettiğimiz doğrulanmıştır. Ayrıca; hidrojel bazlı iskelelere şişme ve enzimatik bozunma davranış testi yapılmıştır. Reaksiyon sonucu serisin fazla olan malzemelerin daha çok gözeneğe sahip olduğu bu testler ile de doğrulanmıştır. Gözenek oranı fazla olan iskele daha fazla PBS ile şişebilmiş ve şişme testinde daha yüksek oran göstermiştir.Aynı zamanda biyobozunurluk testinde malzememiz fazla boşluğa sahip olduğu için enzimatik çözeltiyi içine çekerek daha hızlı bozunmuştur. BET, gözenek boyutu ve temas açısı testleri malzememizin yeterli besin ve oksijeni sağlayabilecek, hücrelerin büyüme ve çoğalma oranını arttırabilecek bir malzeme olabileceğini kanıtlamıştır. Üretilen S4K2 ve S2K4 hidrojel bazlı isklelerinin hücre kültürü aşamasına geçmeden önce CAM analizi ile biyouyumlulukları ve damar oluşturabilme özellikleri test edilmiştir. Döllenilmiş yumurtaların 10. günlerinde malzemelerimiz iplante edilmiş ve 4 gün boyunca yumurta üzerindeki etkisi incelenmiştir. 4 günün sonunda damar oluşturma indeksi S4K2'nin daha fazla olduğu sonuçlanmıştır. Ayrıca SEM ve histoloji

analizleri ile de çekilen stereomikrokop görüntüleri onaylanmıştır. S4K2, serisinin hücre yapışmasına olan etkisi ve malzememizin gözenek boyutundan dolayı daha yüksek sonuçlara sahiptir. *İn vitro* hücre kültürüne devam ederken CAM analizi sonuçları doğrultusunda yalnızca S4K2 ile devam etme kararı alınmıştır. Malzemenin üzerine C2C12'lerin ekimi 250.000 hücre/iskele olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İskelenin kas hücreleri ile biyouyumluluğunu değerlendirmek için hücre canlılığı ve çoğalması, 1.,4. Ve 7. günlerinde live/dead testi ile sonuç alınmıştır. Yapılan bu testler sonucunda, neovaskülarizasyon, miyoblast proliferasyonu, bağlanma ve farklılaşmada umut verici sonuçlar göstermişlerdir. Bu durum, hidrojeli oluşturan YK ve İS'nin iyi bilinen biyouyumlu ve hücre yapışma özelliklerinin yanı sıra besin ve oksijen alışverişini kolaylaştıran uygun gözenek yapısına sahip olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır. Öte yandan, bundan sonraki çalışmalar HSK tedavisi için doğal iskelet kasının yerini alabilecek yüksek hizalı morfolojiye sahip hidrojeller elde etmeye odaklanmalıdır. Bu değişiklik homojen gözenek görüntüsüne sahip hidrojeller elde etmek ile mümkün olabilir. Bu çalışmada CO2 çıkışı kontrol altına alınamadığı için gözene boyutları çok değişkenlidir ve bunun negatif etkileri olabilir. Malzeme üzerindeki C2C12'lerin davranışını ve miyojenik etkilerini öğrenebilmek için qRT-PCR testi de yapılmıştır. MyoD, MyoG ve α-aktin genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, HSK hasarı için geliştirilen İS-YK iskelelerinin miyojenik farklılaşmayı ve hücrelerin olgunlaşmasını desteklediği kanıtlanılmıştır. Sonuç olarak, malzeme tasarımı ve miyoblast davranışı üzerine yaptığımız çalışma, iskelet kası rejenerasyonu için implante edilebilir iskeleler üzerine gelecekteki çalışmalara da yardımcı olabilir. İlk defa İS ve YK'nın birlikte kullanılarak hidrojel üretimi ve hatta in situ çapraz bağlanması bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. İlk defa sentezi yapılan bu ürün ile malzeme karakterizasyonu ve kas doku mühendisliği alanında literatüre katkı sağlamaktayız.

KAYNAKÇA

Acevedo, C. A., Sánchez, E., Orellana, N., Morales, P., Olguín, Y., Brown, D. I., Enrione, J. (2019). "Re-epithelialization appraisal of skin wound in a porcine model using a salmon-gelatin based biomaterial as wound dressing". *Pharmaceutics*, *11*(5). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050196

Al-Mayah, A. (2018). "Mechanical Characteristics of Soft Tissues". *Biomechanics of Soft Tissues, 25*. https://doi.org/10.1201/9781351135825-1

Alarcin, E., Bal-öztürk, A., Avci, H., Ghorbanpoor, H., Guzel, F. D., Akpek, A., Yesiltas, G., Canak-ipek, T., Avci-adali, M. (2021). "Current strategies for the regeneration of skeletal muscle tissue". *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 1–28. https://doi.org/10.3390/ijms22115929

Aramwit, P., Kanokpanont, S., Nakpheng, T., Srichana, T. (2010). "The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production". *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(5), 2200–2211. https://doi.org/10.3390/ijms11052200

Aramwit, P., Keongamaroon, O., Siritientong, T., Bang, N., Supasyndh, O. (2012). "Sericin cream reduces pruritus in hemodialysis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study". *BMC nephrology*, *13*. https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-119

Arango, M. C., Montoya, Y., Peresin, M. S., Bustamante, J., Álvarez-López, C. (2021). "Silk sericin as a biomaterial for tissue engineering: a review". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *70*(16), 1115–1129. https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1785454

Arnold, N., Scott, J., Bush, T. R. (2023). "A review of the characterizations of soft tissues used in human body modeling: Scope, limitations, and the path forward". *Journal of Tissue Viability*, *32*(2), 286–304. https://doi.org/10.1016/j.jtv.2023.02.003

Arslan, Y. E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., Emregul, E., Emregul, K. C. (2017). "Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to

regenerative medicine products". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *154*, 160–170. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.034

Baker, H. B., Passipieri, J. A., Siriwardane, M., Ellenburg, M. D., Vadhavkar, M., Bergman, C. R., Saul, J. M., Tomblyn, S., Burnett, L., Christ, G. J. (2017). "Cell and Growth Factor-Loaded Keratin Hydrogels for Treatment of Volumetric Muscle Loss in a Mouse Model". *Tissue Engineering - Part A*, *23*(11–12), 572–581. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0457

Balakrishnan, B., Joshi, N., Jayakrishnan, A., Banerjee, R. (2014). "Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration". *Acta Biomaterialia* (C. 10, Sayı 8). Acta Materialia Inc. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.031

Baptista-Silva, S., Bernardes, B. G., Borges, S., Rodrigues, I., Fernandes, R., Gomes-Guerreiro, S., Pinto, M. T., Pintado, M., Soares, R., Costa, R., Oliveira, A. L. (2022). "Exploring Silk Sericin for Diabetic Wounds: An In Situ-Forming Hydrogel to Protect against Oxidative Stress and Improve Tissue Healing and Regeneration". *Biomolecules*, *12*(6), 801. https://doi.org/10.3390/biom12060801

Bascou, R., Hardouin, J., Ben Mlouka, M. A., Guénin, E., Nesterenko, A. (2022). "Detailed investigation on new chemical-free methods for silk sericin extraction". *Materials Today Communications*, *33*. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104491

Basurto, I. M., Muhammad, S. A., Gardner, G. M., Christ, G. J., Caliari, S. R. (2022). "Controlling scaffold conductivity and pore size to direct myogenic cell alignment and differentiation". *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *110*(10), 1681–1694. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37418

Demiray, E. B., Kurt, T., Duman, Z. Y., Özdemir, B., N., Erkovan, B., Yiğit, G. S., Arslan, Y. E. (2023). "Clinical tissue engineering approach and biotechnological advances to improve athlete healthcare". *Turkish Journal of Sports Medicine*. https://doi.org/10.47447/tjsm.0757

Bitar, K. N., Zakhem, E. (2014). "Biomedical Engineering and Computational Biology Design Strategies of Biodegradable Scaffolds for Tissue Regeneration". *Biomedical Engineering and Computationl Biology*, *6*, 13–20.

https://doi.org/10.4137/BECB.S10961.RECEIVED

Bonferoni, M. C., Caramella, C., Catenacci, L., Conti, B., Dorati, R., Ferrari, F., Genta, I., Modena, T., Perteghella, S., Rossi, S., Sandri, G., Sorrenti, M., Torre, M. L., Tripodo, G. (2021). "Biomaterials for soft tissue repair and regeneration: A focus on italian research in the field". *Pharmaceutics*, *13*(9). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091341

Borschel, G. H., Dow, D. E., Dennis, R. G., Brown, D. L. (2006). "Tissue-engineered axially vascularized contractile skeletal muscle". *Plastic and Reconstructive Surgery*, *117*(7), 2235–2242. https://doi.org/10.1097/01.prs.0000224295.54073.49

Borselli, C., Cezar, C. A., Shvartsman, D., Vandenburgh, H. H., Mooney, D. J. (2011). "The role of multifunctional delivery scaffold in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration". *Biomaterials*, *32*(34), 8905–8914. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.019

Bružauskaitė, I., Bironaitė, D., Bagdonas, E., Bernotienė, E. (2016). "Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects". *Cytotechnology*, *68*(3), 355–369. https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4

Cal, F., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., Kiran, F., Cengiz, U., Arslan, Y. E. (2021). "Synthesis of Silica-Based Boron-Incorporated Collagen/Human Hair Keratin Hybrid Cryogels with the Potential Bone Formation Capability". *ACS Applied Bio Materials*. https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00805

Çapar, G., Aygün, S. (2015). "Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters". *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *72*(3), 219–234. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.47113

Carleton, M. M., Locke, M., Sefton, M. V. (2021). "Methacrylic acid-based hydrogels enhance skeletal muscle regeneration after volumetric muscle loss in mice". *Biomaterials*, *275*(May). https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120909

Carnes, M. E., Pins, G. D. (2020). "Skeletal muscle tissue engineering: Biomaterials-based strategies for the treatment of volumetric muscle loss". *Bioengineering*, *7*(3), 1–39. https://doi.org/10.3390/bioengineering7030085

Cezar, C. A., Mooney, D. J. (2015). "Biomaterial-based delivery for skeletal muscle repair".

Advanced Drug Delivery Reviews, *84*, 188–197. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.008

Cheema, U., Yang, S. Y., Mudera, V., Goldspink, G. G., Brown, R. A. (2003). "3-D in vitro model of early skeletal muscle development". *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *54*(3), 226–236. https://doi.org/10.1002/cm.10095

Chilakamarry, C. R., Mahmood, S., Saffe, S. N. B. M., Arifin, M. A. Bin, Gupta, A., Sikkandar, M. Y., Begum, S. S., Narasaiah, B. (2021). "Extraction and application of keratin from natural resources: a review". *3 Biotech*, *11*(5), 1–12. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02734-7

McCuller, C., Jessu R., Callahan A. R. (2023). "Physiology, Skeletal Muscle". *StarPearls,* 30725824. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537139/

Costantini, M., Testa, S., Mozetic, P., Barbetta, A., Fuoco, C., Fornetti, E., Tamiro, F., Bernardini, S., Jaroszewicz, J., Święszkowski, W., Trombetta, M., Castagnoli, L., Seliktar, D., Garstecki, P., Cesareni, G., Cannata, S., Rainer, A., Gargioli, C. (2017). "Microfluidic-enhanced 3D bioprinting of aligned myoblast-laden hydrogels leads to functionally organized myofibers in vitro and in vivo". *Biomaterials*, *131*, 98–110. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.026

Danu, M., Simionescu, B., Ibanescu, C., Ibanescu, S. A. (2020). "Dynamic rheological behavior of chitosan/collagen mixtures". *Revista de Chimie*, *71*(5), 193–200. https://doi.org/10.37358/RC.20.5.8127

Derkus, B., Okesola, B. O., Barrett, D. W., D'Este, M., Chowdhury, T. T., Eglin, D., Mata, A. (2020). "Multicomponent hydrogels for the formation of vascularized bone-like constructs in vitro". *Acta Biomaterialia*, *109*, 82–94. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.025

Dinescu, S., Gălăţeanu, B., Albu, M., Lungu, A., Radu, E., Hermenean, A., Costache, M. (2013). "Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage Regeneration". *BioMed Research International*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/598056

Donato, R. K., Mija, A. (2020). "Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review". *Polymers*, *12*(1), 1–64.

https://doi.org/10.3390/polym12010032

Dong, R., Ma, P. X., Guo, B. (2020). "Conductive biomaterials for muscle tissue engineering". *Biomaterials*, *229*(March 2019). https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119584

Du, Y., Ge, J., Li, Y., Ma, P. X., Lei, B. (2018). "Biomimetic elastomeric, conductive and biodegradable polycitrate-based nanocomposites for guiding myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration". *Biomaterials*, *157*, 40–50. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.005

Feroz, S., Muhammad, N., Ranayake, J., Dias, G. (2020). "Keratin - Based materials for biomedical applications". *Bioactive Materials*, *5*(3), 496–509. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007

Fischer, K. M., Scott, T. E., Browe, D. P., McGaughey, T. A., Wood, C., Wolyniak, M. J., Freeman, J. W. (2021). "Hydrogels for Skeletal Muscle Regeneration". *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, *7*(3), 353–361. https://doi.org/10.1007/s40883-019-00146-x

Frontera, W. R., Ochala, J. (2015). "Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function". *Behavior Genetics*, *45*(2), 183–195. https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y

Ghosh, L. Das, Ravi, V., Sanpui, P., Sundaresan, N. R., Chatterjee, K. (2017). "Keratin mediated attachment of stem cells to augment cardiomyogenic lineage commitment". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *151*, 178–188. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.023

Grounds, M. D. (2018). "Obstacles and challenges for tissue engineering and regenerative medicine: Australian nuances". *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *45*(4), 390–400. https://doi.org/10.1111/1440-1681.12899

Gupta, D., Agrawal, A., Rangi, A. (2014). "Extraction and characterization of silk sericin". *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, *39*(4), 364–372.

Haas, G. J., Dunn, A. J., Marcinczyk, M., Talovic, M., Schwartz, M., Scheidt, R., Patel, A. D., Hixon, K. R., Elmashhady, H., McBride-Gagyi, S. H., Sell, S. A., Garg, K. (2019). "Biomimetic sponges for regeneration of skeletal muscle following trauma". *Journal of*

Biomedical Materials Research - Part A, *107*(1), 92–103. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36535

Hill, E., Boontheekul, T., Mooney, D. J. (2006). "Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration". *Tissue Engineering*, *12*(5), 1295–1304. https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1295

Hiltner, A., Cassidy, J. J., Baer, E. (1985). "Mechanical Properties of Biological Polymers". *Annual Review of Materials Science*, *15*(1), 455–482. https://doi.org/10.1146/annurev.ms.15.080185.002323

Ho, T. C., Chang, C. C., Chan, H. P., Chung, T. W., Shu, C. W., Chuang, K. P., Duh, T. H., Yang, M. H., Tyan, Y. C. (2022). "Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine". *Molecules*, *27*(9), 1–29. https://doi.org/10.3390/molecules27092902

Idrees, H., Zaidi, S. Z. J., Sabir, A., Khan, R. U., Zhang, X., Hassan, S. U. (2020). "A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications". *Nanomaterials*, *10*(10), 1–22. https://doi.org/10.3390/nano10101970

Isik, M., Karakaya, E., Arslan, T. S., Atila, D., Erdogan, Y. K., Arslan, Y. E., Eskizengin, H., Eylem, C. C., Nemutlu, E., Ercan, B., D'Este, M., Okesola, B. O., Derkus, B. (2023). "3D Printing of Extracellular Matrix-Based Multicomponent, All-Natural, Highly Elastic, and Functional Materials toward Vascular Tissue Engineering". *Advanced Healthcare Materials*, *12*(20), 1–15. https://doi.org/10.1002/adhm.202203044

Jana, S., Cooper, A., Zhang, M. (2013). "Chitosan scaffolds with unidirectional microtubular pores for large skeletal myotube generation". *Advanced Healthcare Materials*, *2*(4), 557–561. https://doi.org/10.1002/adhm.201200177

Jang, Y.-N., Baik, E. J. (2013). "JAK-STAT pathway and myogenic differentiation". *Jak-Stat*, *2*(2), e23282. https://doi.org/10.4161/jkst.23282

Ju, Y. M., Atala, A., Yoo, J. J., Lee, S. J. (2014). "In situ regeneration of skeletal muscle tissue through host cell recruitment". *Acta Biomaterialia*, *10*(10), 4332–4339. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.022

Kheradmandi, M., Vasheghani-Farahani, E., Ghiaseddin, A., Ganji, F. (2016). "Skeletal muscle regeneration via engineered tissue culture over electrospun nanofibrous chitosan/PVA scaffold". *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *104*(7),

1720–1727. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35702

Kim, J. A., Shon, Y. H., Lim, J. O., Yoo, J. J., Shin, H. I., Park, E. K. (2013). "MYOD mediates skeletal myogenic differentiation of human amniotic fluid stem cells and regeneration of muscle injury". *Stem Cell Research and Therapy*, *4*(6). https://doi.org/10.1186/scrt358

Kim, K., Jin, S., Shin, M. (2024)." Effect of 3D-Printable Anisotropic Fibrous Hydrogels on Fabricating Artificial Skeletal Muscle Constructs". *Advanced Therapeutics*, *7*(1), 1–8. https://doi.org/10.1002/adtp.202300170

Kim, M. S., Jun, I., Shin, Y. M., Jang, W., Kim, S. I., Shin, H. (2010). "The development of genipin-crosslinked poly(caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers for tissue engineering applications". *Macromolecular Bioscience*, *10*(1), 91–100. https://doi.org/10.1002/mabi.200900168

Korniłłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. (2011)." Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects". *Waste Management*, *31*(8), 1689–1701. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024

Kozan, N. G., Caswell, S., Patel, M., Grasman, J. M. (2023). "Aligned Collagen Sponges with Tunable Pore Size for Skeletal Muscle Tissue Regeneration". *Journal of Functional Biomaterials*, *14*(11), 533. https://doi.org/10.3390/jfb14110533

Kozan, N. G., Joshi, M., Sicherer, S. T., Grasman, J. M. (2023). "Porous biomaterial scaffolds for skeletal muscle tissue engineering". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*(October), 1–22. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1245897

Kroehne, V., Heschel, I., Schügner, F., Lasrich, D., Bartsch, J. W., Jockusch, H. (2008). "Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts". *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*(5A), 1640–1648. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00238.x

Kular, J. K., Basu, S., Sharma, R. I. (2014). "The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering". *Journal of Tissue Engineering*, *5*. https://doi.org/10.1177/2041731414557112

Kunz, R. I., Brancalhão, R. M. C., Ribeiro, L. D. F. C., Natali, M. R. M. (2016). "Silkworm

Sericin: Properties and Biomedical Applications". *BioMed Research International*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/8175701

Kwee, B. J., Mooney, D. J. (2017). "Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering". *Current Opinion in Biotechnology*, *47*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.05.003

Lalit Jajpura, A. R. (2015). "The Biopolymer Sericin: Extraction and Applications". *Journal of Textile Science & Engineering*, *05*(01). https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000188

Lechpammer, M., Bigio, Marc Del, Folkerth, R. (2021). "Skeletal Muscle and Peripheral Nerve". *Perinatal Neuropathology*, *24*, 115 - 118. Cambridge University Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1017/9781316671863.025

Lee, K. Z., Jeon, J., Jiang, B., Subramani, S. V., Li, J., Zhang, F. (2023). "Protein-Based Hydrogels and Their Biomedical Applications". *Molecules*, *28*(13), 1–16. https://doi.org/10.3390/molecules28134988

Li, W. (2016). "Damage Models for Soft Tissues: A Survey". *Journal of Medical and Biological Engineering*, *36*(3), 285–307. https://doi.org/10.1007/s40846-016-0132-1

Liu, J., Saul, D., Böker, K. O., Ernst, J., Lehman, W., Schilling, A. F. (2018). "Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration". *BioMed Research International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/1984879

Liu, J., Zhou, H., Weir, M. D., Xu, H. H. K., Chen, Q., Trotman, C. A. (2012). "Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering". *Tissue Engineering - Part A*, *18*(21–22), 2303–2314. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0658

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *The Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265–275. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6

Ma, J., Holden, K., Zhu, J., Pan, H., Li, Y. (2011). "The application of three-dimensional collagen-scaffolds seeded with myoblasts to repair skeletal muscle defects". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*. https://doi.org/10.1155/2011/812135

Mademtzoglou, D., Relaix, F. (2022). "From cyclins to CDKIs: Cell cycle regulation of

skeletal muscle stem cell quiescence and activation". *Experimental Cell Research*, *420*(1), 113275. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113275

Maji, S., Lee, H. (2022). "Engineering Hydrogels for the Development of Three-Dimensional In Vitro Models". *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5). https://doi.org/10.3390/ijms23052662

Manesa, K. C., Kebede, T. G., Dube, S., Nindi, M. M. (2022). "Fabrication and Characterization of Sericin-PVA Composite Films from Gonometa postica, Gonometa rufobrunnea, and Argema mimosae: Potentially Applicable in Biomaterials". *ACS Omega*, *7*(23), 19328–19336. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00897

Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O., Pham, H. M., Tran, S. D. (2019). "Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine". *Materials*, *12*(20). https://doi.org/10.3390/ma12203323

Marcinczyk, M., Elmashhady, H., Talovic, M., Dunn, A., Bugis, F., Garg, K. (2017). "Laminin-111 enriched fibrin hydrogels for skeletal muscle regeneration". *Biomaterials*, *141*, 233–242. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.003

Maurel, W., Wu, Y., Thalmann, N. M. (1998). "Biomechanical Models for Soft Tissue Simulation ESPRIT Basic Research Series". *The International Review of Research in Open and Distributed Learning* (C. 15, Sayı 4).

McCullen, S. D., Chow, A. G. Y., Stevens, M. M. (2011). "In vivo tissue engineering of musculoskeletal tissues". *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(5), 715–720. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.001

Meerasri, J., Chollakup, R., Sothornvit, R. (2022)." Factors affecting sericin hydrolysis and application of sericin hydrolysate in sericin films". *RSC Advances*, *12*(44), 28441–28450. https://doi.org/10.1039/d2ra05220b

Miller, C., Gasser, T. C. (2022). "A bottom-up approach to model collagen fiber damage and failure in soft biological tissues". *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, *169*(September), 105086. https://doi.org/10.1016/j.jmps.2022.105086

Muir, V. G., Burdick, J. A. (2021). "Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels". *Chemical Reviews*, *121*(18), 10908–10949. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00923

Mukund, K., Subramaniam, S. (2020). "Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *12*(1), 1–46. https://doi.org/10.1002/wsbm.1462

Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P. (2017). "Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications". *Biotechnology Advances*, *35*(5), 530–544. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006

Nakamura, T., Takagi, S., Kamon, T., Yamasaki, K. ichi, Fujisato, T. (2017). "Development and evaluation of a removable tissue-engineered muscle with artificial tendons". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *123*(2), 265–271. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.08.003

Nakayama, K. H., Shayan, M., Huang, N. F. (2019). "Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration". *Advanced Healthcare Materials*, *8*(5), 1–14. https://doi.org/10.1002/adhm.201801168

Namjoo, A. R., Abrbekoh, F. N., Saghati, S., Amini, H., Saadatlou, M. A. E., Rahbarghazi, R. (2023). "Tissue engineering modalities in skeletal muscles: focus on angiogenesis and immunomodulation properties". *Stem Cell Research and Therapy*, *14*(1), 1–24. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03310-x

Navindaran, K., Kang, J. S., Moon, K. (2023). "Techniques for characterizing mechanical properties of soft tissues". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *138*(2022), 105575. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105575

Noosak, C., Jantorn, P., Meesane, J., Voravuthikunchai, S., Saeloh, D. (2022). "Dual-functional bioactive silk sericin for osteoblast responses and osteomyelitis treatment". *PLoS ONE*, *17*(3), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264795

Page, R. L., Malcuit, C., Vilner, L., Vojtic, I., Shaw, S., Hedblom, E., Hu, J., Pins, G. D., Rolle, M. W., Dominko, T. (2011). "Restoration of skeletal muscle defects with adult human cells delivered on fibrin microthreads". *Tissue Engineering - Part A*, *17*(21–22), 2629–2640. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0024

Passipieri, J. A., Baker, H. B., Siriwardane, M., Ellenburg, M. D., Vadhavkar, M., Saul, J. M., Tomblyn, S., Burnett, L., Christ, G. J. (2017). "Keratin Hydrogel Enhances in Vivo

Skeletal Muscle Function in a Rat Model of Volumetric Muscle Loss". *Tissue Engineering - Part A*, *23*(11–12), 556–571. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0458

Pollot, B. E., Rathbone, C. R., Wenke, J. C., Guda, T. (2018). "Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *106*(2), 672–679. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33859

Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., Emerson, C. P. (2002). "Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *18*, 747–783. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105758

Qasim, S. B., Husain, S., Huang, Y., Pogorielov, M., Deineka, V., Lyndin, M., Rawlinson, A., Rehman, I. U. (2017). "In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelated porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications". *Polymer Degradation and Stability*, *136*, 31–38. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018

Qazi, T. H., Mooney, D. J., Pumberger, M., Geißler, S., Duda, G. N. (2015). "Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends". *Biomaterials*, *53*, 502–521. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.110

Rademakers, T., Horvath, J. M., van Blitterswijk, C. A., LaPointe, V. L. S. (2019). "Oxygen and nutrient delivery in tissue engineering: Approaches to graft vascularization". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *13*(10), 1815–1829. https://doi.org/10.1002/term.2932

Rausch, M. K., Karniadakis, G. E., Humphrey, J. D. (2017)." Modeling Soft Tissue Damage and Failure Using a Combined Particle/Continuum Approach". *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, *16*(1), 249–261. https://doi.org/10.1007/s10237-016-0814-1

Reid, G., Magarotto, F., Marsano, A., Pozzobon, M. (2020). "Next stage approach to tissue engineering skeletal muscle". *Bioengineering* (C. 7, Sayı 4). https://doi.org/10.3390/bioengineering7040118

Rezvani Ghomi, E., Nourbakhsh, N., Akbari Kenari, M., Zare, M., Ramakrishna, S. (2021).

"Collagen-based biomaterials for biomedical applications". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *109*(12), 1986–1999. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34881

Ribatti, D. (2017). "The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay". *Reproductive Toxicology*, *70*, 97–101. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.004

Riboldi, S. A., Sampaolesi, M., Neuenschwander, P., Cossu, G., Mantero, S. (2005). "Electrospun degradable polyesterurethane membranes: Potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering". *Biomaterials*, *26*(22), 4606–4615. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.035

Saad, M., El-Samad, L. M., Gomaa, R. A., Augustyniak, M., Hassan, M. A. (2023). "A comprehensive review of recent advances in silk sericin: Extraction approaches, structure, biochemical characterization, and biomedical applications". *International Journal of Biological Macromolecules*, *250*(February), 126067. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126067

Sachlos, E., Czernuszka, J. T., Gogolewski, S., Dalby, M. (2003). "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application ofsolid freeform fabrication technology to the production of tissue engineeringscaffolds". *European Cells and Materials*, *5*, 29–40. https://doi.org/10.22203/ecm.v005a03

Saha, J., H. Mondal, M. I., Karim Sheikh, M. R., Habib, M. A. (2019). "Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyx mori Silk Cocoon Waste". *Journal of Textile Science & Engineering*, *09*(01). https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000390

Samancioglu, A., Aydin, B., Ozudogru, E., Arslan, Y. E. (2023). "Evaluating the angiogenic and mechanical properties of hydrogels and physical constructs derived from spinal cord meninges extracellular matrix". *Materials Research Express*, *10*(8). https://doi.org/10.1088/2053-1591/acf277

Seo, S. J., Das, G., Shin, H. S., Patra, J. K. (2023). "Silk Sericin Protein Materials: Characteristics and Applications in Food-Sector Industries". *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5). https://doi.org/10.3390/ijms24054951

Shapiro, L., Cohen, S. (1997). "Novel alginate sponges for cell culture and transplantation".

Biomaterials, *18*(8), 583–590. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00181-0

Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., Bekhit, A. E. D. A. (2017). "Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application". *Biomaterials Science*, *5*(9), 1699–1735. https://doi.org/10.1039/c7bm00411g

Shi, M., Dong, R., Hu, J., Guo, B. (2023). "Conductive self-healing biodegradable hydrogel based on hyaluronic acid-grafted-polyaniline as cell recruitment niches and cell delivery carrier for myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration". *Chemical Engineering Journal*, *457*(December 2022). https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141110

Silva, A. S., Costa, E. C., Reis, S., Spencer, C., Calhelha, R. C., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Barros, L., Vaz, J. A. Coutinho, P. (2022). "Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications". *Polymers*, *14*(22), 1–22. https://doi.org/10.3390/polym14224931

Singh, G., Chanda, A. (2021). "Mechanical properties of whole-body soft human tissues: A review". *Biomedical Materials (Bristol)*, *16*(6). https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac2b7a

Singh, S. P., Rathinam, K., Kasher, R., Arnusch, C. J. (2018). "Hexavalent chromium ion and methyl orange dye uptake: Via a silk protein sericin-chitosan conjugate". *RSC Advances*, *8*(48), 27027–27036. https://doi.org/10.1039/c8ra03907k

Siritientong, T., Angspatt, A., Ratanavaraporn, J., Aramwit, P. (2014)." Clinical potential of a silk sericin-releasing bioactive wound dressing for the treatment of split-thickness skin graft donor sites". *Pharmaceutical Research*, *31*(1), 104–116. https://doi.org/10.1007/s11095-013-1136-y

Sokolenko, E. A., Berchner-Pfannschmidt, U., Ting, S. C., Schmid, K. W., Bechrakis, N. E., Seitz, B., Tsimpaki, T., Kraemer, M. M., Fiorentzis, M. (2022). "Optimisation of the chicken chorioallantoic membrane assay in uveal melanoma research". *Pharmaceutics*, *14*(1). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010013

Song, Y., Li, M., Lei, S., Hao, L., Lv, Q., Liu, M., Wang, G., Wang, Z., Fu, X., Wang, L. (2022). "Silk sericin patches delivering miRNA-29-enriched extracellular vesicles-decorated myoblasts (SPEED) enhances regeneration and functional repair after severe

skeletal muscle injury". *Biomaterials*, *287*(June), 121630. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121630

Squire, J. M. (2001). "Architecture and function in the muscle sarcomere". *Current Opinion in Structural Biology,* 7(2), 1–11. 10.1016/s0959-440x(97)80033-4

Sun, J., Tan, H. (2013). "Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications". *Materials*, *6*(4), 1285–1309. https://doi.org/10.3390/ma6041285

Tachibana, A., Kaneko, S., Tanabe, T., Yamauchi, K. (2005). "Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation". *Biomaterials*, *26*(3), 297–302. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.032

Tao, G., Wang, Y., Cai, R., Chang, H., Song, K., Zuo, H., Zhao, P., Xia, Q., He, H. (2019). "Design and performance of sericin/poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery carrier for potential wound dressing application". *Materials Science and Engineering C*, *101*(May 2018), 341–351. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.111

Thilagam, R., Mubeena, S., Punnose, A. M., Gnanamani, A. (2022). "Fibrous protein composite scaffolds (3D) for tissue regeneration: An in vitro study on skeletal muscle regeneration". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *217*(April), 112656. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112656

Trensz, F., Haroun, S., Cloutier, A., Richter, M. V., Grenier, G. (2010). "A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway". *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *299*(5), 939–947. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00253.2010

Velasco-Mallorquí, F., Fernández-Costa, J. M., Neves, L., Ramón-Azcón, J. (2020). "New volumetric CNT-doped gelatin-cellulose scaffolds for skeletal muscle tissue engineering". *Nanoscale Advances*, *2*(7), 2885–2896. https://doi.org/10.1039/d0na00268b

Vining, K. H., Mooney, D. J. (2017). "Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(12), 728–742. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108

Volpi, M., Paradiso, A., Costantini, M., Święszkowski, W. (2022). "Hydrogel-Based Fiber Biofabrication Techniques for Skeletal Muscle Tissue Engineering". *ACS Biomaterials*

Science and Engineering, *8*(2), 379–405. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c01145

Vulpe, R., Le Cerf, D., Dulong, V., Popa, M., Peptu, C., Verestiuc, L., Picton, L. (2016). "Rheological study of in-situ crosslinkable hydrogels based on hyaluronanic acid, collagen and sericin". *Materials Science and Engineering C*, *69*, 388–397. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.003

Wang, D., Yang, X. H., Tang, R. C., Yao, F. (2018). "Extraction of keratin from rabbit hair by a deep eutectic solvent and its characterization". *Polymers*, *10*(9). https://doi.org/10.3390/polym10090993

Wang, J., Gao, H., Qin, C., Zhao, Z., Yuan, H., Wei, J., Nie, Y. (2022). "Experimental and theoretical study on the extraction of keratin from human hair using protic ionic liquids". *Journal of Molecular Liquids*, *368*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120626

Wang, L., Cao, L., Shansky, J., Wang, Z., Mooney, D., Vandenburgh, H. (2014)." Minimally invasive approach to the repair of injured skeletal muscle with a shape-memory scaffold". *Molecular Therapy*, *22*(8), 1441–1449. https://doi.org/10.1038/mt.2014.78

Wang, L., Dong, S., Liu, Y., Ma, Y., Zhang, J., Yang, Z., Jiang, W., Yuan, Y. (2020). "Fabrication of injectable, porous hyaluronic acid hydrogel based on an in-situ bubble-forming hydrogel entrapment process". *Polymers*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/POLYM12051138

Wang, L., Wu, Y., Guo, B., Ma, P. X. (2015). "Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation, and Differentiation". *ACS Nano*, *9*(9), 9167–9179. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03644

Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Huang, L., Liu, J., Li, Y., Zhang, G., Kundu, S. C., Wang, L. (2014). "Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: An injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel". *Scientific Reports*, *4*(November). https://doi.org/10.1038/srep07064

Xie, H., Yang, W., Chen, J., Zhang, J., Lu, X., Zhao, X., Huang, K., Li, H., Chang, P., Wang, Z., Wang, L. (2015). "A Silk Sericin/Silicone Nerve Guidance Conduit Promotes

Regeneration of a Transected Sciatic Nerve". *Advanced Healthcare Materials*, *4*(15), 2195–2205. https://doi.org/10.1002/adhm.201500355

Yan, C., Liang, J., Fang, H., Meng, X., Chen, J., Zhong, Z., Liu, Q., Hu, H., Zhang, X. (2021). "Fabrication and evaluation of silk sericin-derived hydrogel for the release of the model drug berberine". *Gels*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.3390/GELS7010023

Yi, H., Forsythe, S., He, Y., Liu, Q., Xiong, G., Wei, S., Li, G., Atala, A., Skardal, A., Zhang, Y. (2017). "Tissue-specific extracellular matrix promotes myogenic differentiation of human muscle progenitor cells on gelatin and heparin conjugated alginate hydrogels". *Acta Biomaterialia*, *62*, 222–233. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.022

Yildiz, S. N., Sezgin Arslan, T., Arslan, Y. E. (2024). "Organic-inorganic biohybrid films from wool-keratin/jellyfish-collagen/silica/boron via sol-gel reactions for soft tissue engineering applications". *Biomedical Materials (Bristol)*, *19*(2). https://doi.org/10.1088/1748-605X/ad2557

Yilmaz, H. D., Cengiz, U., Arslan, Y. E., Kiran, F., Ceylan, A. (2021). "From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted sol–gel reaction". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *131*(4), 420–433. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.008

Zhang, Y., Liu, J., Huang, L., Wang, Z., Wang, L. (2015). "Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery". *Scientific Reports*, *5*(July), 1–13. https://doi.org/10.1038/srep12374

Zhang, Y. Q. (2002). "Applications of natural silk protein sericin in biomaterials". *Biotechnology Advances*, *20*(2), 91–100. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00003-4

Zorlutuna, P., Annabi, N., Camci-Unal, G., Nikkhah, M., Cha, J. M., Nichol, J. W., Manbachi, A., Bae, H., Chen, S., Khademhosseini, A. (2012). "Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues". *Advanced Materials*, *24*(14), 1782–1804. https://doi.org/10.1002/adma.201104631