



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**REJENERATİF TIP UYGULAMALARI İÇİN OSTEOKONDÜKTİF
BİYOPOLİMER/BOR MİNERALİ TEMELLİ BİYOKOMPOZİT
İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA CAL

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ YAVUZ EMRE ARSLAN

ÇANAKKALE – 2021



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**REJENERATİF TIP UYGULAMALARI İÇİN OSTEOKONDÜKTİF
BİYOPOLİMER/BOR MİNERALİ TEMELLİ BİYOKOMPOZİT
İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA CAL

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ YAVUZ EMRE ARSLAN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2019-2955

ÇANAKKALE – 2021

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; 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 çalışmada 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 kayıplarımı kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Fatma CAL

23/08/2021

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesi ve gerçekleştirilmesi sürecinde, değerli bilgi birikimlerini benimle paylaşan kıymetli akademik danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'a

Çalışmanın teorik ve uygulama aşamasında bilgi birikimi ve her türlü bilimsel, teknik desteğini sağlayan ve çalışmama önerileriyle değer katan Doç. Dr. Uğur CENGİZ, Doç. Dr. Burak DERKUŞ ve Doç. Dr. Fadime KIRAN'a,

Laboratuvar çalışmalarında ayrıca desteğini ve bilgi birikimini paylaşan değerli Tuğba SEZGİN ARSLAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince ve günlük hayatta görüş ve düşünceleriyle desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Hilal Deniz YILMAZ, Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU, Burak KARACA, Ekin ŞİMŞEK, Elif Beyza DEMİRAY, Tuğçe KURT ve Feyza Meltem UYSAL'a,

Histoloji analizine ait kesit görsellerinin alınması ve düzenlenmesinde yardımlarıyla destek olan İsa SEVİNÇ'e,

Çalışmanın başarılı bir şekilde yürütülmesinde ve gerçekleştirilen analizlerde bilgi birikimi ve olanaklarını paylaşan Prof. Dr. Emin YILMAZ, Öğr. Gör. Eda KESKİN USLU, Doç. Dr. Hüseyin AYVAZ ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Tez çalışmalarım boyunca beni bilimsel anlamda destekleyen, manevi değerini hissettiren ve tezin düzenlenmesinde fikirleriyle destek olan Ziraat Yüksek Mühendisi Enes Gökhan YILMAZ'a

Hayatımın her aşamasında ve eğitim sürecim boyunca her daim yanımda olan kıymetli annem Zübeyde CAL, babam Hamza CAL ve ER ailesinin kıymetli üyeleri Hatice ER ve Metin ER'e çok teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

Bu araştırma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (FYL-2019-2955).

Fatma CAL
Çanakkale, Ağustos 2021

ÖZET

REJENERATİF TIP UYGULAMALARI İÇİN OSTEOKONDÜKTİF BİYOPOLİMER/BOR MİNERALİ TEMELLİ BİYOKOMPOZİT İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Fatma CAL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

23/08/2021, 150

Bu tez çalışmasında, insan saçı keratini ve sıçan kuyruğu kollajeninin eşsiz fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri, kemik gelişiminde kritik rol oynayan bor ve silisyum gibi inorganik moleküllerin getirdiği biyoaktif özellikleriyle birleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, rejeneratif tıp ve KDM uygulamalarında kullanılmak üzere organik/inorganik biyomalzeme olarak, biyoaktif bor ve silika molekülleri sol-jel yöntemiyle kollajen ve keratin proteinlerine modifiye edilmiştir. Sentez sonucunda, osteokondüktif özellikte yeni 3B biyokompozit kriyojeller (B-Si-Col-HK) elde edilmiştir. Kriyojellerin sol-jel yöntemi ile sentezi tamamen oda koşulları altında yapılmıştır. Proteinlerin biyokimyasal karakterizasyonları, Lowry protein, -SH grup, amino asit, hidroksiprolin, SDS-PAGE ve MALDI-TOF analizleriyle yapılmıştır. Sentezlenen kriyojellerin kimyasal ve yapısal özellikleri, organik-inorganik faz arasındaki bağların varlığını doğrulayan ATR-FTIR, ¹¹B-MAS-NMR ve XRD teknikleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca, kriyojellerin termal stabilite ve mekanik mukavemetleri; TGA, DSC, basma testi ve hidrojel formu için reoloji analizleriyle belirlenmiştir. Spesifik yüzey alanları ve gözenekliliklerin belirlenebilmesi için BET, porozite, şişme ve sıvı alım testleri yapılmıştır. İlaveten, kriyojellerin *in vitro* bozunma davranışı ve yüzey ıslanabilirlik özellikleri, biyobozunurluk testi ve temas açısı ölçümü ile ortaya çıkarılmıştır. Sol-jel reaksiyonu sonucu moleküler içi-arası bor ve silika molekülleriyle bağlı kriyojel yapıların geniş yüzey alanına sahip olduğu belirlenmiştir. Bor ve silika nano-partikülleriyle kaplanmış polimerin

yüzey pürüzlülüğü artmış ve kriyojellerin sıvı emilim hızında da artış gözlemlenmiştir. *In vitro* çalışmalar, kriyojellere iAMKH'lerin ekimiyle yürütülmüş, kriyojellerin biyoyumluluğu live/dead ve MTS testiyle değerlendirilmiştir. Kriyojeller üzerindeki iAMKH'lerin osteojenik farklılaşma düzeyleri, histokimyasal/immünohistokimyasal boyamalar ve qRT-PCR analizi yapılarak belirlenmiştir. Kriyojel yapısındaki inorganik bileşenler tarafından hücrelerin indüklenmesiyle osteojenik farklılaşmanın tespiti gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, qRT-PCR analizinde ise osteogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunun da önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bor, Keratin, Kollajen, Kriyojel, Sol-Jel Reaksiyonu, Kemik Doku Mühendisliği

ABSTRACT

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF OSTEOCONDUCTIVE BIOPOLYMER/BORON MINERAL-BASED BIOCOMPOSITE SCAFFOLDS FOR REGENERATIVE MEDICINE APPLICATIONS

Fatma CAL

Canakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering

Advisor: Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

23/08/2021, 150

In this thesis study, it is aimed to combine these unique physicochemical and biological properties of human hair keratin and rat tail collagen with the bioactive properties brought by inorganic molecules such as boron and silicon, which play a critical role in bone development. For this purpose, the organic/inorganic biomaterial that can be used in regenerative medicine and BTE applications, collagen and keratin proteins have been modified with bioactive boron and silica molecules by the sol-gel method. As a result of the synthesis, novel three-dimensional (3D) biocomposite cryogels (B-Si-Col-HK) with osteoconductive properties were obtained. The synthesis of cryogels with the sol-gel method was completely performed under room conditions. Biochemical characterizations of proteins were performed by Lowry protein, -SH group, amino acid, hydroxyproline, SDS-PAGE, and MALDI-TOF analyzes. The chemical and structural features of the synthesized cryogels were evaluated by ATR-FTIR, ¹¹B-MAS-NMR, and XRD techniques, which confirmed the presence of bonds between the organic-inorganic phase. In addition, thermal stability and mechanical strength of cryogels; were determined with TGA, DSC, compression test, and the hydrogel form rheology analyses. BET, porosity, swelling, and fluid intake capacity tests were also performed to determine specific surface areas and porosity properties. Additionally, the *in vitro* degradation behavior and surface wettability properties of cryogels were evaluated by a biodegradability test and contact angle measurement. As a result of the sol-gel reaction, it was determined that the cryogel

structures have a large surface area connected with inter-intramolecular boron and silica molecules. The surface roughness of the boron and silica nanoparticles coated polymer surface has increased and also an increase in the liquid absorption rate of cryogels was observed. The *in vitro* studies were carried out by the cultivation of hADMSCs into cryogels and the biocompatibility of cryogels was evaluated by Live/Dead and MTS tests. Osteogenic differentiation levels of hADMSCs on the cryogels were determined by performing histochemical/immunohistochemical stainings and qRT-PCR analysis. Osteogenic differentiation was observed by the induction of cells from the inorganic components of the cryogels. Moreover, in the qRT-PCR analysis, it was observed that the osteogenesis-related gene expressions were also significantly increased.

Keywords: Boron, Keratin, Collagen, Cryogel, Sol-Gel Reaction, Bone Tissue Engineering

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ETİK BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

1.1. Kemik.....	7
1.1.1. Kemik Yapısı ve Özellikleri	7
1.1.2. Kompakt ve Trabeküler Kemik	9
1.1.3. Kemik Matriksi ve Hücreleri	10
1.2. Kemik Doku Mühendisliği.....	13
1.2.1. Kemik Rejenerasyonu için Klinik İhtiyaçlar	16
1.2.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyoajanlar	17
1.3. Bor Elementi	18
1.3.1. Bor Minerali.....	19
1.3.2. Bor Mineralinin Kullanım Alanları.....	22
1.3.3. Bor Mineralinin Kemik Gelişimi Üzerine Etkileri	24
1.4. Silisyum Elementi.....	26
1.5. KDM İçin Biyomalzemeler.....	29
1.5.1. Sentetik Polimerler	30
1.5.2. Doğal Polimerler	31
1.5.3. Metaller.....	42
1.5.4. Biyoseramikler	43
1.5.5. Kompozit Biyomalzemeler	45

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

46

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM

54

3.1. Materyal	54
3.2. Yöntem.....	54
3.2.1. İnsan Saçından Keratin Ekstraksiyonu.....	54
3.2.2. Sıçan Kuyruğundan Tip I Kollajen İzolasyonu	56
3.2.3. Pepsinde Sindirilmiş Tip I Kollajen (Atelo-kollajen) Eldesi.....	57
3.2.4. İnsan Saçı Keratini ve Tip I Kollajen Proteinlerinin Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini.....	58
3.2.5. Serbest Sülfidril (-SH) Gruplarının Tayini.....	59
3.2.6. Amino Asit İçerik Analizi	60
3.2.7. Hidroksiprolin Tayini	60
3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) Analizi .	61
3.2.9. MALDI-TOF Analizi	65
3.2.10. Col-HK Temelli Üç Boyutlu Biyokompozit İskelelerin Üretimi.....	65
3.2.11. Üç Boyutlu Col-HK Biyo-iskelelerin Çapraz Bağlanması.....	65
3.2.12. B-Si-Col-HK Biyokompozit Malzemelerin Sol-Jel Sentezi ve Kriyojellerin Üretimi	67
3.2.13. B-Si-Col-HK Hidrojellerinin Reolojik Ölçümleri	69
3.2.14. Col-HK Biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK Kriyojellerin Karakterizasyonları: ATR-FTIR.....	69
3.2.15. Katı Hal Bor Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹¹ B-MAS NMR) .	69
3.2.16. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi.....	70
3.2.17. Termogravimetrik (TGA) Analizi.....	70
3.2.18. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi.....	70
3.2.19. Mekanik Basma Testi	70
3.2.20. Şişme ve Sıvı Alım Testleri.....	71
3.2.21. Gözeneklilik Testi	71
3.2.22. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi	72

3.2.23. Temas Açısı Testi.....	72
3.2.24. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS) Analizi.....	72
3.2.25. Biyobozunurluk Testi.....	73
3.2.26. In Vitro Hücre Kültürü Uygulamaları.....	73
3.2.27. Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Testleri.....	76
3.2.28. Histokimyasal/İmmünohistokimyasal Analizler.....	76
3.2.29. Osteojenik Farklılaşma Üzerine Kantitatif RT-PCR Analizleri.....	78
3.2.30. İstatistiksel Analiz.....	79

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

80

4.1. İnsan Saçı Keratini Ekstraksiyonu.....	80
4.2. İnsan Saçı Keratini ve Tip I Kollajen Proteinlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonları.....	82
4.3. Biyokompozit B-Si-Col-HK Kriyojellerin Optimizasyon Aşamaları.....	88
4.4. B-Si-Col-HK Hidrojellerinin Reolojik Davranışları.....	90
4.5. Col-HK İskelesi ve B-Si-Col-HK Kriyojellerin Kimyasal ve Yapısal Karakterizasyonları: ATR-FTIR, ¹¹ B-MAS-NMR, XRD.....	92
4.6. İskele ve Kriyojellerin Termal Karakterizasyonları: TGA ve DSC Analizleri.....	96
4.7. İskele ve Kriyojellerin Mekanik Özellikleri.....	99
4.8. Şişme ve Sıvı Alım Kapasite Testlerinin Değerlendirilmesi.....	100
4.9. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Gözeneklilik Özellikleri.....	102
4.10. Biyo-iskele ve Kriyojellerin BET Yüzey Alanları.....	103
4.11. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Temas Açısı Testi ile Islanabilirlik Özellikleri.....	104
4.12. Biyo-iskele ve Kriyojellerin SEM-EDS İncelemesi.....	105
4.13. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Biyobozunurluk Özellikleri.....	106
4.14. In Vitro Hücre Kültürü Uygulamaları: İskele ve Kriyojellerin Hücre Uyumluluğu.....	108

4.15. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi 111

4.16. Osteojenik Farklılaşma ile İlgili Gen İfadeleri: qRT-PCR Analizleri 115

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

117

KAYNAKÇA 122

EK 1 Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İzin Belgesi I



SİMGELER VE KISALTMALAR

Col	Kollajen
HK	İnsan saçı keratini
Col-HK	Kollajen-keratin biyo-iskelesi
B-Si-Col-HK	Bor ve silika modifiye edilmiş kollajen-keratin kriyojeli
HDM	Hücre dışı matriksi
KDM	Kemik doku mühendisliği
DM	Doku mühendisliği
3B	Üç boyutlu
ATR-FTIR	Zayıflatılmış toplam yansıtmalı-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
XRD	X-ışını difraktometresi
²⁹ Si-MAS-NMR	Silisyum nükleer manyetik rezonans spektrometresi
¹¹ B-MAS-NMR	Bor nükleer manyetik
TGA	Termogravimetrik analiz
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetrisi
-SH	Serbest sülfidril grubu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
MALDI-TOF	Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi
BET	Brunauer-Emmett-Teller
MKH	Mezenkimal kök hücreler
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler
sMKH	Sıçan mezenkimal kök hücreler
iKMKH	İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreler
iKISH	İnsan kemik iliği stromal hücreleri
sAKH	Sıçan adipoz kaynaklı kök hücreler
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
HA	Hidroksiapatit

BA	Borik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEOS	Tetraetil ortosilikat
rTEOS	Reaktif TEOS
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
Fe	Demir
Ti	Titanyum
Ta	Tantalyum
CaP	Kalsiyum fosfat
TCP	Trikalsiyum fosfat
h-BN	Hekzagonal bor nitrür
BN	Bor nitrür
BC	Biyoaktif cam
ALP	Alkalin fosfataz
Ch	Kitosan
PLA	Poli-laktik asit
PGA	Poli-glikolik asit
PLGA	Poli-laktik-ko-glikolid asit
PCL	Poli-kaprolakton
PHA	Poli-hidroksialkanoatlar
CPO	Kalsiyum peroksit
RGD	Arg-Gly-Asp
LDV	Leu-Asp-Val
BMP-2	Kemik morfogenetik protein-2
BSA	Sığır serum albümin
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
DAS	Dialdehit nişastası
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfat
PO ₄ ⁻³	Fosfat
Si(OH) ₄	Silanol grupları
B(OH) ₃	Borik asit

B(OH) ₄ ⁻	Borat anyonları
NHS	N-hidroksisüksinimit
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethylkarbodiimit hidroklorür
MES	2-morfolino etansülfonik asit
İS	İnsan saçı
MW	Moleküler ağırlık
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
Pa	Paskal
kPa	Kilopaskal
mA	Miliamper
Hz	Hertz
t.e.	Tespit edilemedi
Ct	Eşik döngü sayısı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
APS	Amonyum per sülfat
FBS	Fötal sığır serum
DMSO	Dimetilsülfoksit
pureZOL™	Fenol ve guanidinyum tiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi
H&E	Hematoksilen-Eozin
MT	Masson trikrom
OC	Osteokalsin
ON	Osteonektin
RUNX2	Runx transkripsiyon faktörü 2
COL1A1	Kollajen tip1 α1
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri

°C	Derece Santigrat
°K	Derece Kelvin
M	Molar
mM	Milimolar
UV	Ultraviyole
w/v	Kütle/Hacim
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
mg	Miligram



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Ticari öneme sahip bazı bor mineralleri ve bileşikleri	19
Tablo 2	Biyomalzemelerin üretiminde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları	29
Tablo 3	Kemik doku rejenerasyonu için uygun sentetik polimerler ve temel özellikleri .	31
Tablo 4	KDM uygulamalarında kullanılan doğal polimerler ve özellikleri	33
Tablo 5	SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve prosedürü	62
Tablo 6	Coomassie Brilliant Blue G-250 Boyama Çözeltisi Prosedürü	64
Tablo 7	Kantitatif RT-PCR için kullanılan gen spesifik primerler ve ileri-geri dizileri ...	79
Tablo 8	Amino asit içeriği analiz sonuçları	84
Tablo 9	Biyo-iskele ve kriyojellerin BET-BJH analiz sonuçları	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1.	Uzun kemiklerin anatomisi.....	8
Şekil 2.	Kemik dokusunun genel yapısı.....	9
Şekil 3.	Kompakt ve trabeküler kemik yapısı	10
Şekil 4.	Kemiğin hiyerarşik yapı organizasyonu.....	11
Şekil 5.	Kemik matriksi hücreleri.....	12
Şekil 6.	Kemik homeostazı	13
Şekil 7.	Doku mühendisliği yaklaşımları.....	13
Şekil 8.	Bazı önemli bor bileşikleri	19
Şekil 9.	Bor mineralinin bitkideki kaynakları	21
Şekil 10.	Bor mineralinin kullanım alanları.....	22
Şekil 11.	Bor mineralinin sağlık alanındaki etkisi.....	23
Şekil 12.	Kollajenin hiyerarşik yapısal organizasyonu.....	34
Şekil 13.	Keratinin polipeptit zinciri	37
Şekil 14.	Keratinlerin çeşitli biyokütle kaynakları	38
Şekil 15.	α -keratin liflerinin yapısı.....	39
Şekil 16.	Biyomedikal uygulamalarda insan saç keratinin kullanımı	41
Şekil 17.	Laboratuvara getirilen işlem görmemiş saç örnekleri.....	55
Şekil 18.	Keratin ekstraksiyonu genel şeması	56
Şekil 19.	Sıçan kuyruğu ve tip I memeli kollajeni	56
Şekil 20.	Sıçan kuyruğundan tip I kollajen tendon izolasyonu	57
Şekil 21.	SDS-PAGE Analizi.....	63
Şekil 22.	Çapraz bağırsız ve çapraz bağlı Col-HK biyo-iskeleleri	66
Şekil 23.	Asit katalizli ortamda hidroliz ile rTEOS'un eldesi	67
Şekil 24.	Üç boyutlu biyokompozit B-Si-Col-HK hidrojel ve kriyojellerin görüntüsü	68
Şekil 25.	B-Si-Col-HK hidrojellerinin reolojik ölçüm görüntüleri	69
Şekil 26.	Hücre kültürü deney setinin gösterimi	75
Şekil 27.	Na_2SO_3 'ün sülfitolizis reaksiyonu	81
Şekil 28.	Lowry metodu sonucu çizdirilen BSA kalibrasyon grafiği.....	81
Şekil 29.	L-sistein kalibrasyon grafiği.....	83
Şekil 30.	Keratin ekstraktı ve atelo-kollajene ait SDS-PAGE jel görseli.....	86

Şekil 31. İnsan saçı keratinine ait MALDI-TOF MS spektrumu	87
Şekil 32. %3 ve %5 B konsantrasyonlarına ait hidrojel ve kriyojellerin görüntüsü.....	88
Şekil 33. Üç boyutlu B-Si-Col-HK hidrojel ve kriyojel yapıların görüntüsü	89
Şekil 34. Üç boyutlu B-Si-Col-HK kriyojellerin ve Col-HK biyo-iskelelerin stereo mikroskop görüntüleri.....	90
Şekil 35. B-Si-Col-HK hidrojellerinin frekans tarama değerleri	91
Şekil 36. B-Si-Col-HK hidrojellerinin sıcaklık tarama değerleri.....	92
Şekil 37. ATR-FTIR analiz sonuçları	93
Şekil 38. B-Si-Col-HK kriyojellerin MAS NMR spektrumları	94
Şekil 39. B-Si-Col-HK kriyojel ağının temsili şematik gösterimi	95
Şekil 40. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelinin XRD spektrumları.....	96
Şekil 41. Biyo-iskele ve kriyojellere ait TGA termogramları.....	97
Şekil 42. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin DSC spektrumları	98
Şekil 43. Basma dayanımı testi grafiği.....	99
Şekil 44. Biyo-iskele ve kriyojellerin % şişme grafiği	101
Şekil 45. Sıvı alım testi grafiği.....	102
Şekil 46. Biyo-iskele ve kriyojellere ait % gözeneklilik grafiği	103
Şekil 47. Çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin su ile temas açısı ölçümü görüntüleri.....	104
Şekil 48. Col-HK biyo-iskele ve B-Si-Col-HK kriyojelin SEM-EDS analizleri	106
Şekil 49. İskele ve kriyojellerin 3. ve 7. gün periyotlarındaki bozunma oranları	107
Şekil 50. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin live/dead testi sonucu elde edilen spektrumu.....	108
Şekil 51. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin üzerinde çoğalan iAMKH'lerin MTS grafiği.....	109
Şekil 52. Hücre kültürü sona eren biyo-iskele ve kriyojellerin son görüntüleri	110
Şekil 53. Col-HK biyo-iskelelerindeki osteojenik farklılaşmanın histokimyasal-immünohistokimyasal boyamaları.....	113
Şekil 54. B-Si-Col-HK kriyojellerindeki osteojenik farklılaşmanın histokimyasal-immünohistokimyasal boyamaları.....	114
Şekil 55. iAMKH'ler, Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin qRT-PCR analizi sonucu elde edilen OC, ON, RUNX2, COL1A1 ve ALP genlerinin ekspresyon seviyeleri	116

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Kemik dokusu, insan vücudunda destekleyici, yük aktarımı, organları koruma, hayati elementlerin ve hücrelerin rezervuarı gibi birçok önemli işlevi yerine getirir (Grabska-Zielińska, vd., 2020). Hızla yaşlanan nüfus ve artan kazalarla birlikte, osteoporoz, kırıklar, travma veya büyük boyutlu kemik hasarı gibi çeşitli hastalıkların ve dış etkilerin neden olduğu zayıf iyileşmeyle ilişkili kusurlarla birlikte kemik rejenerasyonu ihtiyacı artmaktadır (Zhou, vd., 2015). Travmanın şiddetine bağlı olarak kemik defektlerinin rejeneratif rekonstrüksiyonunu sağlamak klinik tedavide büyük bir zorluktur (Erol-Taygun, vd., 2019). Doku mühendisliği, bu sorunları çözmek için kusurlu dokuya uygulanabilecek yeni terapötik stratejileri belirlemeye yönelik çeşitli yaklaşımlarla ön plana çıkmaktadır (Moses, vd., 2019). Son zamanlarda rekonstrüktif cerrahi için kemik dokusu materyallerine talep artmakta ve sadece otojenik ve allojenik kemik greftleri bunun için yeterli olmamaktadır (Erol-Taygun, vd., 2019). Bununla birlikte, sınırlı bulunabilirlik, kronik ağrı, immün aracılı ret, donör tedariği, enfeksiyon ve greft kalitesiyle ilişkili önemli sınırlamalar da vardır (Wang ve Yeung, 2017). Kemik dokusunun çeşitli rejeneratif gereksinimlerini karşılamak için kemik doku mühendisliği (KDM), esas olarak istenen mekanik özelliklere ve hasarlı dokuda vaskülarizasyonu etkili bir şekilde teşvik edebilecek doku rejenerasyon potansiyeline uygun biyomalzemelerin geliştirilmesine odaklanır (Lai, vd., 2018). Malzemelerin geliştirilmesinde polimerler, seramikler ve metaller biyolojik destek olarak önerilmektedir (Patrucco, vd., 2019).

Modern ortopedik cerrahide, biyo-uyumlu metaller ve seramikler (biyo-inert alümin, zirkonya, biyoaktif kalsiyum fosfat seramikler ve biyocam seramikler) çok yaygındır. Ancak bu materyaller, normal insan kompakt kemiğinden ağır, yoğun ve daha serttir. Yapay implantlar ile konakçı doku arasındaki mekanik özelliklerin tutarsızlığı, kemik implantı ekleminde korezyonu yaratabilir, bu da protezin dengesizliğini ve başarısızlığını hızlandırır. Doğal kemiğin ince yapısı ve mekanik davranışı dikkate alınarak yeni biyo-esinlenilmiş kemik ikame materyallerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Sert bir dokunun onarımında kullanılacak en uygun bileşenin, doğal doku özelliklerini içeren benzer bir malzeme olabileceği kabul edilmektedir (Bag, 2019). KDM'nin ihtiyaçlarına yanıt olarak, biyouyumluluk, biyo-rezorbe olabilirlik, biyoaktivite ve toksik olmayan

bozunma ürünlerine parçalanabilirlik gibi gerekli özelliklere sahip yeni biyomateryaller tasarlanmıştır (Grabska-Zielińska, vd., 2020).

Doğal dokuların hücre dışı matriksi (HDM), farklı biyopolimerler ve nanokristallitlerle organize edilmiş moleküler düzeyde bir hibrit polimer nanoyapıdan oluşur. Hem sert hem de yumuşak doğal dokular, hibrit ve iyi organize edilmiş yapıları nedeniyle, viskoelastisite ve mukavemet dahil olmak üzere mükemmel fizikokimyasal özellikler sergilerler. Ayrıca hücrel biyouyumluluk ve doku indüklemeye yeteneği ile de mükemmel biyolojik aktivite gösterirler. Fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteyi taklit ederek yeni biyobozunabilir biyomalzemelerin geliştirilmesi bu nedenle son yıllarda artan bir ilgi görmüştür. Biyomimetik polimer esaslı hibrit biyomalzemeler, farklı polimerler ve inorganik fazları çoklu seviyelerde birleştirerek yüksek derecede özel fizikokimyasal özellikler ve biyoaktivite ile sentezlenebildikleri için önemli bir rol oynarlar. Geçtiğimiz yıllarda, biyobozunabilen doğal bazlı polimerler (kollajen, keratin, ipek, aljinat, kitosan, hyaluronik asit) ve sentetik polimerler (poli (laktik asit): PLA, poli (glikolik asit): PGA, poli (laktik-ko-glikolid): PLGA, Poli (e-kaprolakton): PCL, Polihidroksialkanoatlar: PHA) geniş çapta incelenmiş ve biyomedikal uygulamalarda umut verici özellikleri gösterilmiştir. Bu polimerler, üç boyutlu iskeleler, hidrojeller, mikro küreler ve bunların kompozitleri dahil olmak üzere birçok biçimde hibridize edilmiştir (Lei, vd., 2019). Bu konseptte, geniş çapta araştırılan biyomateryal olarak iskeleler, üç boyutlu yapısı ile gözenekli bir mimari ve *in vitro* koşullarda hücrelere bir mikro ortam sağlamalı, hücrelerin göçünü, bağlanmasını, çoğalmasını ve entegrasyonunu desteklemek için mekanik ve biyolojik etkiler sunmalıdır. Bu tür yapı iskeleleri, kimyasal ve biyolojik özelliklerin bir kombinasyonu ile karakterize edilmelidir (Bhattacharai, vd., 2018; Chocholata, vd., 2019). İskeleler, kemik defektine uygun ideal bir biyomateryal oluşturmak için sürekli olarak biçimlendirilir ve optimize edilir. Çeşitli iskelelerin tasarımında, doğru malzemenin seçimi, rejenerasyonun artırılması açısından özellikle önemlidir (Bhattacharai, vd., 2018; Saravanan, vd., 2019)

Doğal polimerlere dayalı biyomalzemeler, biyopolimer yapısındaki çeşitli kimyasal kısımlar nedeniyle dokuyu yeniden oluştururken yavaş yavaş bozunabilir. Biyomalzemeler, biyobozunabildiğinde ve bozunma ürünleri toksik olmadığına yoğun bir immün yanıt ortaya çıkarmamakta ve malzemenin doku rejenerasyonundan sonra vücuttan çıkarılmasına gerek duyulmamaktadır. Biyomalzemelerin üretiminde bir dizi protein

polimeri (ipek fibroin, kollajen, jelatin, keratin) ve polisakkaritler (kitosan, selüloz, aljinat, hyaluronik asit) kullanılmaktadır (Grabska-Zielińska, vd., 2020). Günümüzde, polimer bazlı malzemeler yaygın olarak kollajen ile üretilmektedir. Kollajen, memelilerde en bol bulunan proteinlerden biridir (toplam proteinlerin üçte biri) ve bağ dokusunun ana proteindir. Özellikle tip I kollajen, tendonlar ve kemik gibi dokularda HDM’de bulunan en yaygın tiptir. Tüm doku türlerinin hücre dışı matriksindeki ana yapısal bileşen olan kollajen, bolluğu, biyouyumluluğu, yüksek gözenekliliği, diğer malzemelerle kombinasyon kolaylığı, kolay işlenebilirliği, hidrofiliği, düşük antijenliği, vücutta emilebilirliği vb. nedeniyle kemik doku mühendisliği için bir biyomateryal olma potansiyeline sahiptir (Arslan, vd., 2017; Ferreira, vd., 2012) Kollajen malzemelerin şişerek oluşturdukları sulu ortamdaki zayıf stabiliteyi de dahil olmak üzere çeşitli dezavantajları vardır. Bu nedenle, farklı doğal, sentetik polimerlerin, inorganik bileşenlerin eklenmesi veya bir çapraz bağlama işlemiyle kollajen bazlı malzemelerin modifiye edilmesi gereklidir (Grabska-Zielińska, vd., 2020). Sonuç olarak, kimyasal modifikasyon yoluyla kollajen esaslı malzeme özelliklerinin iyileştirilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan birkaçı, Cunniffe ve diğerleri (2010)’nin geliştirdikleri kollajen-HA biyokompozit iskelesi, Sionkowska ve Kaczmarek, (2017)’in kollajen/kitosan/hyalüronik asit/HA içeren üç boyutlu gözenekli iskeleleri, Röbber ve diğerleri (2020)’nin çok fazlı silika/kollajen kserojelleri kemik rejenerasyonu için tasarlanmış biyomalzemelerdir.

Polimer bazlı malzemelerde kullanılan bir diğer önemli protein kaynağı ise keratindir. Keratin, doğada bol miktarda bulunan lifli bir protein ailesidir. Çeşitli kaynaklardan ve sınırsız insan saçından tedarik edilebilen keratinler, doku rejenerasyonu için kullanılabilir, özellikle de insan kaynaklı olması biyomedikal uygulamalarda çekici bir protein haline dönüşebilmektedir. Dahası, insan saçı keratininin kullanımı, tamamen hastalara özel olarak kişiselleştirilebilir. Keratin proteinlerinin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonundaki gelişmeler, keratin bazlı bir biyomalzeme platformunun geliştirilmesine yol açmıştır (Vasconcelos and Cavaco-paulo, 2013). Keratin, fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinlerinde de bulunan hücre adezyon sekansları RGD (Arg-Gly-Asp) ve LVD (Leu-Asp-Val) içerir. Ayrıca hücresel bağlanma sitelerini taklit eden doğal HDM gibi hücresel bağlanma motiflerine sahiptir (Kakkar, vd., 2014). Benzer şekilde, insan kaynaklı bir protein olarak mükemmel biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik sergiler, transplantasyon sonrası bağışıklık reaksiyon göstermez, benzersiz kimyasal yapısı ve iyi hücresel etkileşim aktivitesi vardır (Feroz, vd., 2020; Lee,

vd., 2014). Tüm bu özellikler hücresel bağlanmayı, üç boyutlu bir matriks yapısında çoğalmayı destekler. Bu tür özelliklerin varlığı nedeniyle de keratin, farklı doku mühendisliği yapılarının geliştirilmesi için kullanılabilir. Keratin bazlı malzemelerin en büyük dezavantajı kırılabilirlikleridir. Bu nedenle, doku mühendisliği yapılarının tüm gereksinimlerini karşılayacak şekilde tek başına kullanımları uygulamalarını sınırlandırılabilir (Feroz, vd., 2020; Kakkar, vd., 2014). Literatüre bakıldığında, inorganik bileşen olarak silikanın keratin ile işlevselleştirilmiş birkaç çalışması mevcuttur. Tan ve ark. film benzeri substratlar üretmek için insan saç keratini, silika molekülleri ile kaplanmış ve elde edilen kompozitin biyokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesinde sinerjistik bir etki sağladığı varsayılmıştır (Tan, vd., 2017). Biyomedikal uygulamalar için Kakkar ve Madhan, (2016) tetraetil ortosilikat (TEOS) kullanarak bir keratin-silika hidrojelini üretmiş ve hidrojelini gözenekliliği ve hücreler tarafından biyoyumumluluğunu gösteren bir biyomalzeme olarak optimizasyonunu mümkün kılmıştır (Kakkar and Madhan, 2016).

Bor, 100 yılı aşkın süredir bitkiler için temel bir element olarak bilinmektedir. Biriken raporlar, aynı zamanda borun insan beslenmesinde ve metabolizmasındaki önemini de ortaya koymaktadır, ancak kesin etki mekanizması tam olarak hala aydınlatılamamıştır. Bor, beyin gelişimi ve işlevi, hormon metabolizması, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi ve kemik ve diş büyümesinde önemli roller oynar (Doğan, vd., 2014; Gümüşderelioğlu, vd., 2015). Borun özellikle kemik gelişimi üzerindeki biyokimyasal ve metabolik etkileri birçok araştırmaya konu olmuştur. Diyetlerden karşılanan bor eksikliği, sıçan ve domuz kemiklerinin büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (Hunt, 2012). Birbirinden bağımsız üç çalışmada bor, Hakki ve diğerleri (2010) osteoblastlarda, Ying ve diğerleri (2011) kemik iliği stromal hücrelerinde ve Taşlı ve diğerleri (2013) dental kök hücrelerde mineralizasyon ve kemikle ilişkili protein ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Bu çalışmalar, borun kemik mineralizasyonu ve büyümesi üzerindeki olası moleküler mekanizmalarını göstermiştir (Balasubramanian, vd., 2018). Bor bileşiklerinin, KDM uygulamalarında kalsiyum mineralizasyonunu sağlaması için uygun ve toksik olmayan dozlarda uygulanarak yeni olası çalışmaların yürütülmesi ve klinik uygulamalar için çok önemlidir. Özellikle de mineralizasyon sürecini ve iyileştirme potansiyelini arttırmak için son zamanlarda uygun miktarlarda bor içeren veya bor bileşikleriyle sentezlenen çeşitli malzeme sistemleri geliştirilmiştir. Bu malzemelere, Belaid ve diğerleri (2020)'nin polilaktik asitten (PLA) yapılmış ve bor nitrit ile güçlendirilmiş biyobozunur

nanokompozit iskeleleri, Arslan, ve diğeri (2018)'nin poli (butilen adipat-ko-tereftalat) (BPAT) liflerine bor-katkılı hidroksiapatit (B-HA) kapsüllenmiş (B-HA-PBAT) üç boyutlu nanolifli iskeleleri, Nagarajan ve diğeri (2017)'nin bor nitrür/jelatin elektro-eğirilmiş nanolifleri gibi osteojenik özellikleri destekleyen niteliklere sahip malzemeler örnek olarak verilebilir. Dahası, Öner ve diğeri (2018) iki farklı boyut ve şekle sahip bor nitrür (BN) partikülleri ile doldurulmuş poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksvalerat, PHBV) kompozitleri, Xue ve Hu (2020) hegzagonal bor nitrür-ipek fibroin kompozit nanolifler, Ulu ve diğeri (2018) poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA)/borik asit kompozit hidrojel, Wang ve diğeri (2014) borik asit ile modifiye edilmiş poli (aril eter sülfon) (PES-B) membranları, Gadhve ve diğeri (2018) tarafından borik asit ile çapraz bağlanmış nişasta-PVA kompozitleri gibi geliştirilmiş birçok malzemeler, KDM uygulamaları haricinde borun mükemmel özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Burada değinilen malzemeler, borun sadece birkaç önemli özelliğini baz almaktadır.

Sol-jel sentezi, yeni hibrit biyouyumlu hidrojel,lerin sentezlenmesinde iyi bilinen ve uygulanan geniş bir uygulama alanına sahip kimyasal bir tekniktir. Bu sentez işlemi, hafif reaksiyon koşulları altında yeni hibritlerin oluşturulması için iki veya daha fazla farklı fazın karıştırılmasıyla gerçekleştirilmekte ve böylece hem inorganik hem de organik özellikler birleştirilmektedir. Polimerizasyonu, inorganik bileşenlerin organik matrikse moleküler düzeyde dağıtılmasıyla inorganik-organik polimer ağlarının oluşumunu içerir. Ek olarak, bu yöntem, düşük sıcaklıkta homojen hibrit malzemeler elde etme olasılığı sunar ve bu da çeşitli bileşiklerin dahil edilmesi ile kapsamını genişletir (Hernández-González, vd., 2020; Kakkar ve Madhan, 2016; Kumar, vd., 2017).

Kollajen ve keratinler, konakçı hücre proliferasyonunu destekleme kabiliyeti nedeniyle genellikle organik-inorganik kompozit malzemelerde organik bileşen olarak kullanılır. Silikanın yapı iskelelerin fizyokimyasal özelliklerini geliştirdiği ve bu nedenle biyomoleküller veya canlı hücreler ile inorganik faz olarak kullanılmak için çekici bir seçenek olduğu iyi bilinmektedir (Perumal, vd., 2015). Biyouyumlu silika bazlı malzemeler, çeşitli biyomedikal alanlardaki uygulamalar için mükemmel adaylar olarak kabul edilmektedir. Silisyumun hem kollajen sentezinde hem de matriks biyomineralizasyonunda rol oynayarak kemik oluşumunda önemli bir rol aldığı bulunmuştur (Yang, vd., 2017). Ek olarak, silika bazlı partiküllerin osteoblast adezyonunun desteklenmesi, proliferasyon ve in vivo osteojenik farklılaşmanın uyarılması dahil olmak

üzere güçlü biyolojik aktiviteler sergilediği tespit edilmiştir (Li, vd., 2015). Grubumuz, mikrodalga destekli sol-jel reaksiyonu kullanarak bitkisel kaynaklı bir biyomalzeme adı altında üç boyutlu gözenekli silisyum modifiye edilmiş ayva çekirdeği müsilağı kriyojelleri üretmiş ve bu kriyojellerin çeşitli karakterizasyonları yapılarak hücre kültürü çalışmalarında iAMKH'lerin kullanılmasıyla kriyojellerin osteojenik özellikleri desteklediği ve KDM'de yeni bir biyomalzeme olarak kullanılabilceğini belirtmiştir (Yılmaz, vd., 2021).

KDM uygulamalarında en sık karşılaşılan sorunların başında, kemik doku rejenerasyonu ve rekonstrüksiyonunda kullanılacak uygun osteokondüktif ve osteoindüktif gibi özellikleri içeren gerekli yapısal taşıyıcıların arayışı olmuştur. Yapılan literatür araştırmaları değerlendirildiğinde, yürütülen tez çalışması ile geliştirilecek malzemenin temelini oluşturan organik/inorganik bileşenlerin (bor-silisyum-kollajen-keratin) KDM'de osteokondüktif ve osteoindüktif bir ajan olarak kullanılabilceği öngörülmüştür. KDM kapsamında, bor ve silisyumun iskele materyali olarak kullanıldığı ve kemik metabolizması üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışması mevcuttur.

Bu tez çalışmasında rejeneratif tıp ve KDM uygulamaları için biyokompozit organik/inorganik biyomalzeme olarak bor ve silika moleküllerinin kollajen ve keratin proteinlerine modifiye edilmesi ile birlikte birbirinden farklı eşsiz özelliklerin birleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bor ve silisyum sol-jel reaksiyonu kullanılarak kollajen ve keratin proteinlerine modifiye edilmiş ve yeni üç boyutlu osteokondüktif özellikte biyokompozit kriyojellerin (B-Si-Col-HK) sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen üç boyutlu biyokompozit kriyojeller, bir dizi karakterizasyon ve *in vitro* uygulamalardan geçirilerek kriyojelin osteokondüktif ve osteobiyolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, kriyojellerin sentezinde düşük sıcaklıklarda hibrit malzemeler elde etme olasılığı sunan sol-jel yöntemi kullanılmış ve literatüre, bor moleküllerinin çeşitli bileşenlerle düşük sıcaklıklardaki modifiyesini içeren ve uygulama esnasında kolaylık sağlayan yöntemlerin kullanımını kazandırmıştır. Öncelikle, sol-jel yöntemi kullanılarak sentezlenen osteokondüktif kriyojellerin, reaksiyon sonucu üretilen hidrojenlerin dondurarak kurutma tekniği olarak liyofilizasyon işleminden geçirilmesiyle üç boyutlu gözenekli yapısal formları elde edilmiştir. Kriyojellerin osteokondüktif özellikleri ve KDM'de başarılı uygulanabilirliğinin araştırılması için B-Si-Col-HK kriyojelleri,

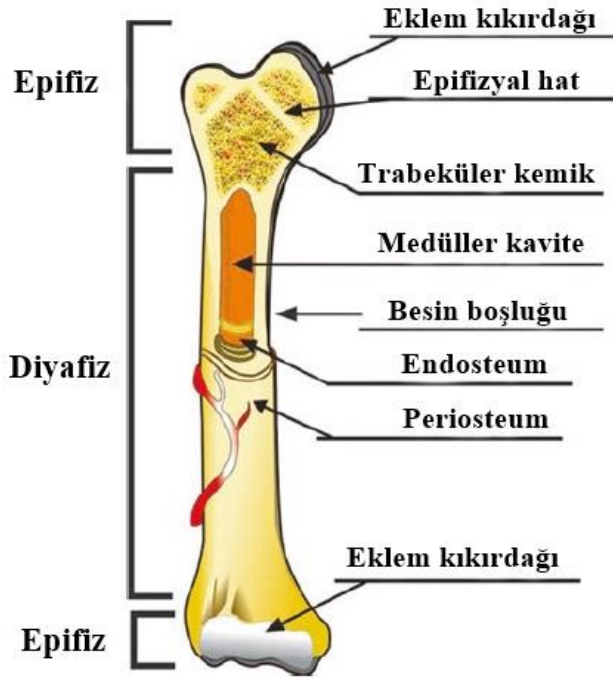
kontrol grubu olarak hazırlanan çapraz bağlı Col-HK iskeleleri ile birlikte çeşitli fizikokimyasal ve yapısal karakterizasyon tekniklerinden geçirilerek karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon teknikleri ayrıntılarıyla birlikte ilgili başlık altında değinilmiştir. *In vitro* koşullarda biyokompozit kriyojellerin osteojenik potansiyeli, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (iAMKH) kullanılarak incelenmiştir. Hücre kültürü ortamında, kriyojel ve yapı iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin 7, 14 ve 21 günlük kültürü izlenmiş, kriyojellerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için hücre canlılığı ve çoğalması, Live/Dead (canlı/ölü) testi ile kalitatif ve MTS testi ile de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, iAMKH'lerin davranış ve takibi için histokimyasal/immünohistokimyasal testler de yapılmış, ayrıntılı olarak RT-PCR tekniği ile de moleküler düzeyde inceleme yürütülmüştür. iAMKH'leri içeren İskele ve kriyojel yapılarının kemik doku oluşturma etkinliği adı geçen çeşitli analizler ile belirlenmiştir.

1.1. Kemik

1.1.1. Kemik Yapısı ve Özellikleri

Kemikler, vücuttaki bağ dokusunun en büyük bölümünü oluşturur. İnsan fizyolojisinde yapısal destek, hareket, koruma, mineral depolama, büyüme faktörleri ve hematopoez gibi görevleri ile kritik bir rol oynayan organdır (Lindahl, vd., 2015). Esas fonksiyonlarının yanı sıra; çeşitli uyaranlara karşı mekanik, biyolojik ve kimyasal yapıları ile oldukça dinamik ve karmaşık bir dokudur (Costa-Pinto, vd., 2011). Her kemik dokusu, değişen biyomekanik kuvvetlere uyum sağlamak için yaşam boyunca sürekli olarak yenilenme ve eski mikro hasarlı kemiği yeniden yapılandırma yeteneğine sahiptir (Clarke, 2008). Yetişkin bir insan iskelet sistemi, çeşitli geometrik ve yapısal açıdan farklı özelliklerde 206'dan fazla kemik türünden oluşmaktadır (Tzelepi, vd., 2009). Bu kemik türleri; iskelet sistemi üzerindeki bölgeye ve fizyolojik fonksiyonlarına göre değişiklik gösterir (Akter and Ibanez, 2016).

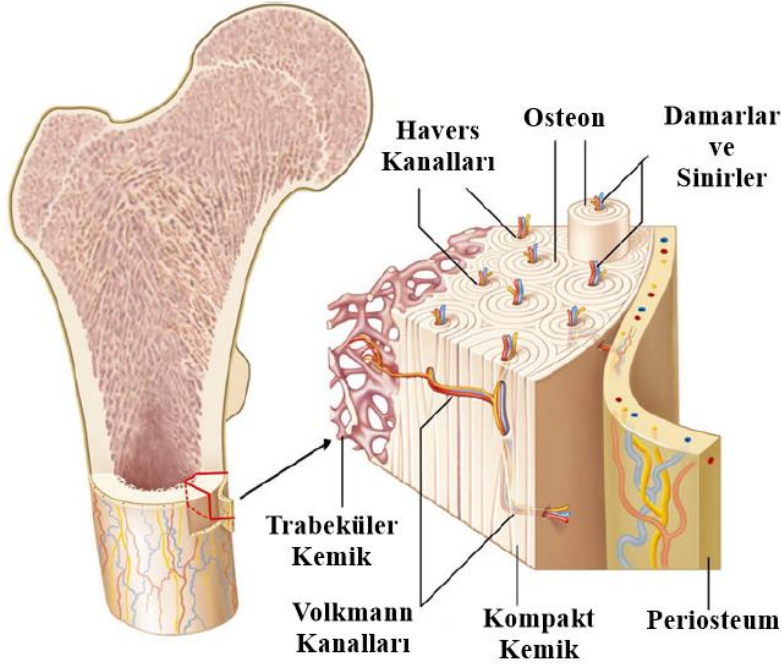
Uzun bir kemik yapısı, kemiğin tüm parçalarının genel olarak net bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Uzun kemikler, diyafiz, metafiz ve epifiz olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Uzun kemiklerin anatomisi
(Iyer, 2019)

Diyafiz, yoğun kompakt kemikten oluşur. Proksimal ve distal epifiz kısımları arasında kemik iliği ile doldurulmuş, kalın ve boru şeklindeki kısımdır. Metafizler, koni şeklinde epifizyal plakların alt kısmında bulunur. Nispeten ince kompakt kemik ile çevrili, yoğun trabeküler kemikten oluşur. Epifizler ise, kemiğin her iki uç kısmında bulunan yarı yuvarlak ve geniş yapıda, ince kompakt kemik ile çevrili, içi trabeküler kemik ile dolu bölümdür. Epifizyal plaklar, epifiz ve metafizi birbirinden ayırır ve kemiğin uzunlaşmasına büyümesinden sorumludur (Clarke, 2008; Iyer, 2019; Tzelepi, vd., 2009).

Sert yapıdaki diyafizinin içi boş bölgesinde, sarı kemik iliği ile dolu olan kısmı medüller kavite olarak adlandırılır. Periosteum, besleyici kan damarlarını ve sinirleri içerisinde barındıran, eklem kıkırdağı ile kaplanan kısımlar hariç, kemiğin en dış kompakt yüzeyini çevreleyen lifli bir bağ dokusu kılıfıdır. Kemiklere tendonların ve bağların tutunmasını sağlamak ve osteojenik aktivitesi bulunmaktadır. Periosteumdan farklı olarak endosteum, kompakt kemiği, trabeküler kemiği ve kemikte bulunan kan damarı kanallarının iç yüzeyini kaplar ve kemik büyümesinde rol oynar. Ayrıca, belirsiz bir bağ dokusu tabakası ve birkaç hücre tabakasından oluşan, 10-40 μm kalınlığında çok ince bir membrandır (Clarke, 2008; Le, vd., 2018). Kemik dokusunun genel yapısı şekil 2’de sunulmuştur.



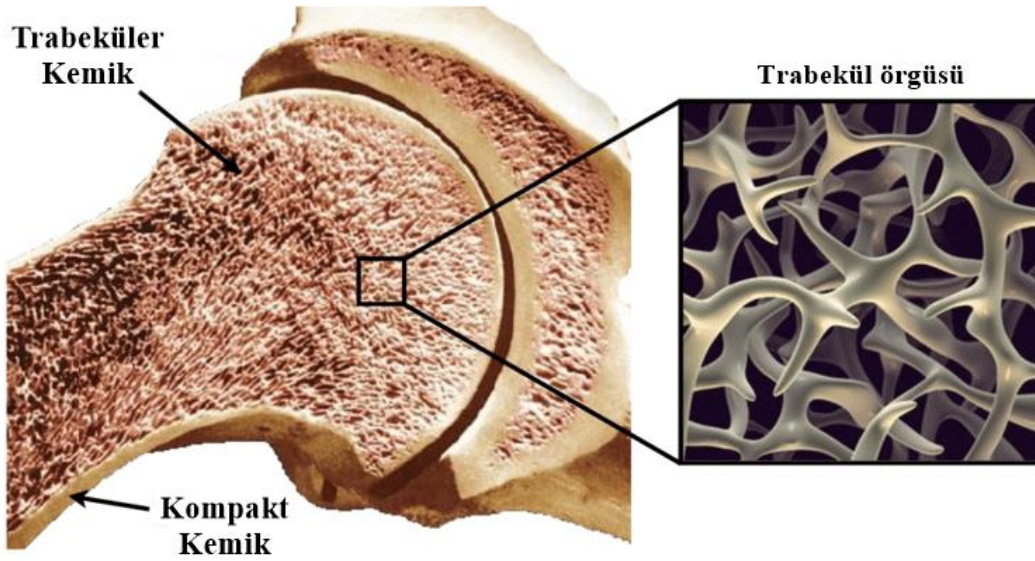
Şekil 2. Kemik dokusunun genel yapısı
(Bartl and Bartl, 2017)

1.1.2. Kompakt ve Trabeküler Kemik

İskelet sistemi üzerindeki kemik, yapısal olarak kompakt (kortikal) kemik ve trabeküler (süngerimsi) kemik olmak üzere iki ana tipe ayrılır (Şekil 3). Kompakt kemik, iskeletin %80'ini içeren sert ve yoğun yapıdan oluşur. Makroskobik olarak, homojen bir görünüme sahiptir ve uzun kemiklerin diyafiz kısmında daha çok belirgindir. Bu kısımda, kemik iliği bölgesini birkaç mm kalınlığında silindirik olarak çevreler. Yapısal olarak, %10'luk genel gözenekliliğe sahip, çok sayıda osteonlar (havers sistemleri) adı verilen mikroskobik yapı birimleri ve bir dizi volkmann kanallarından oluşur. Osteonlar, kan damarları ve sinirleri içeren merkezi bir kanal çevresinde düzenlenmiş osteositlere sahip olgun kompakt kemiğin temel birimidir. Ayrıca volkmann kanalları, osteonları radyal olarak sıkıştırma veya gerilim kuvvetlerine karşı birbirine bağlayarak daha dirençli duruma getirir (Şekil 2) (Iyer, 2019; Lynnerup and Klaus, 2019).

Trabeküler kemik ise; iskeletin %20'sini oluşturur ve kompakt kemik dokusuna göre daha fazla yüzey alanına sahiptir. Makro yapı düzeyinde, %50-90 arasında gözenekliliği içerir ve bu gözenekli yapı, endosteumu çevreler. Yapısal olarak osteona sahip değildir ve matriks, aralarında nispeten geniş boşlukları olan küçük, birbirine bağlı, kan damarı olmayan açık ve düzensiz bir trabekül örgüsünü içerir. Bu trabekül örgüsü içerisinde, homotopozde rol oynayan kırmızı kemik iliği bulunur. Trabeküler kemik, en

çok düz ve düzensiz kemiklerde görülür ve düz kemiklerin iç ve dış yüzeyleri arasındaki boşluğu kaplar (Şekil 3) (Iyer, 2019; Le, vd., 2018).



Şekil 3. Kompakt ve trabeküler kemik yapısı (Cardiff, 2012)

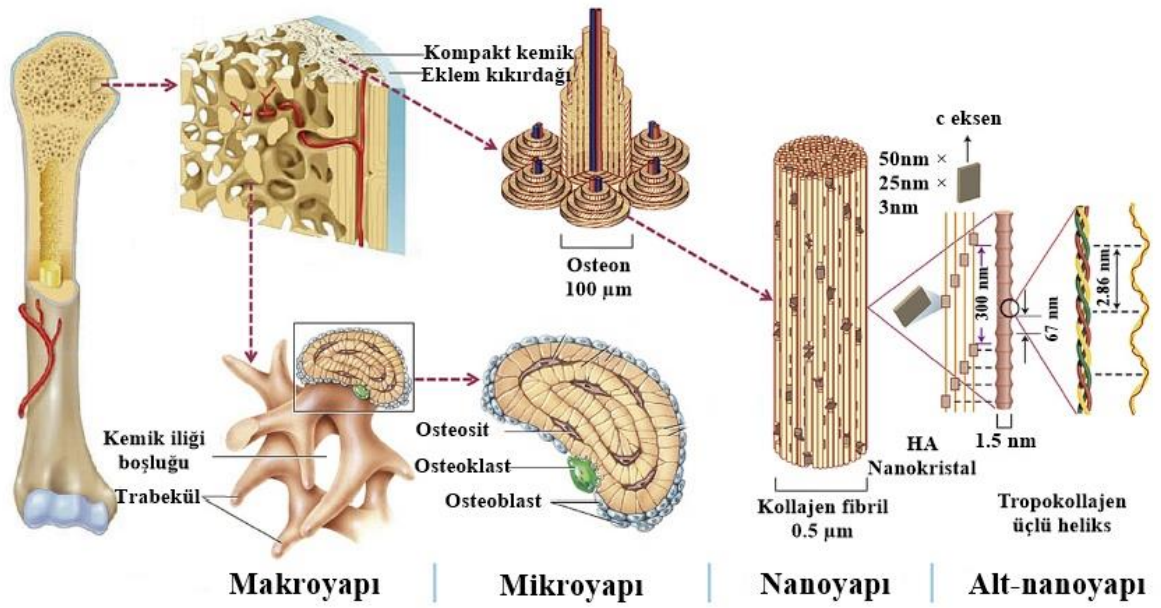
1.1.3. Kemik Matrisi ve Hücreleri

Kemik, hücre dışı matris ve hücrelerden oluşan mineralize bir bağ dokusudur (Fattore, vd., 2012). Karmaşık ve hiyerarşik yapısı nedeniyle kemik matrisi, yaklaşık olarak %30 organik ve %70 inorganik bileşenlerden oluşan bir kompozit malzeme olarak tanımlanabilir. Bu organik bileşenlerin neredeyse %90'ı kollajendir (çoğunluğu tip-I kollajen, çok az kısmı ise tip-III, IV). Kalan %10'u ise kollajenöz olmayan proteinler; proteoglikan molekülleri, osteopontin, osteokalsin, fibronektin ve diğer kemik matris proteinleridir. Ayrıca kollajen içeriğindeki üçlü heliks yapısının kendiliğinden bir araya gelmesiyle kollajen fibrilleri oluşur. Kemik matrisinde çoğunluk olarak kollajen proteinlerinin olması, yapıya hem esnek, hemde hafif optimum özellikler katar. Ayrıca bu matris proteinleri, mekanik mukavemette kritik bir rol oynar (Ansari, 2019; Chocholata, vd., 2019; Lynnerup ve Klaus, 2019).

Kemik matrisinin inorganik mineral içeriği, kalsiyum fosfatın (CaP) özel bir kristali olan hidroksiapatittir (HA). Kristalin kimyasal formülü ise $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 'dir. Bu kristaller çok geniş bir yüzey alanına sahiptir (1 g HA başına yaklaşık 100 m^2). Buna ek olarak HA kristalleri, kollajen fibrilleri üzerine uzun eksenini boyunca paralel olarak bağlanır. Burada yüzey bağlama ve elektrostatik etkileşimler HA'nın kimyasal yapısındaki

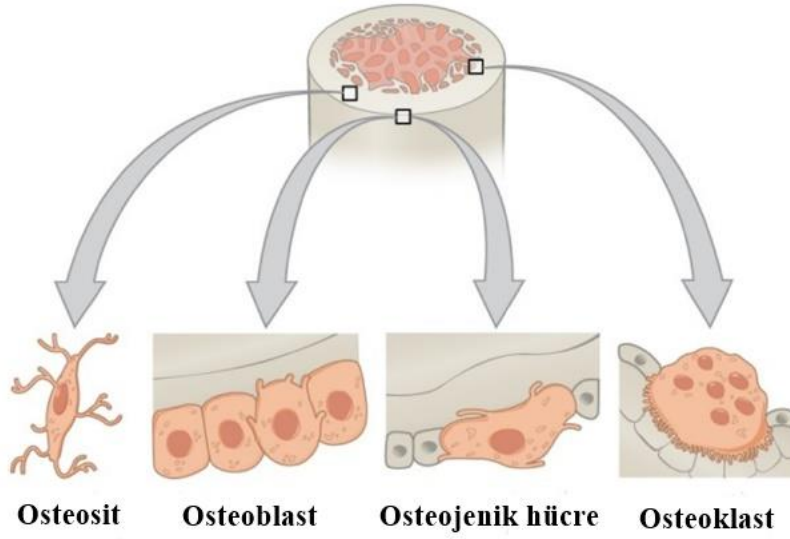
Ca^{2+} ve $(\text{PO}_4)^{3-}$ 'ın varlığı ile ilişkilidir. Kompozit olarak matriks yapısında bulunan HA, kemik dokusuna sertlik özelliği kazandırır (Ansari, 2019; Lynnerup and Klaus, 2019).

Bütün bu özellikler, esas olarak Şekil 4'te gösterildiği gibi kemik dokusu, esnek kollajen proteini ve sert hidroksiapatit mineralinden oluşan hiyerarşik bir organizasyona sahiptir. Her seviye çeşitli mekanik, biyolojik ve kimyasal fonksiyonları yerine getirir. Kemik hiyerarşik organizasyonu arasında makro ölçeği, mikro ölçeği, nano ölçeği ve alt-nano ölçeği bulunur. Makro ölçek seviyesi kemiğin genel şeklini temsil eder (Wang, vd., 2016).



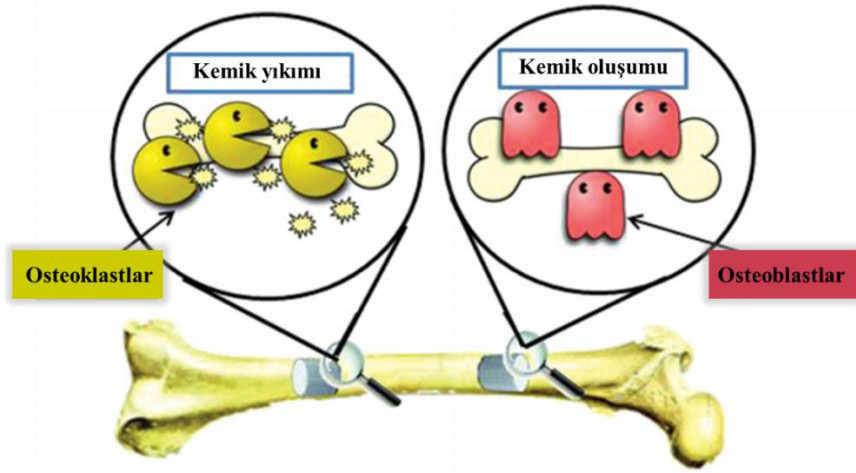
Şekil 4. Kemik hiyerarşik yapı organizasyonu (Wang, vd., 2016)

Kemik dokusunda genel olarak 4 tip hücre bulunur. Bunlar; osteositler, osteoblastlar, osteojenik hücreler ve osteoklastlardır (Şekil 5). Kemik dokusunun büyümesi, düzenlenmesi, onarımı ve diğer fonksiyonları bu 4 tip hücrenin davranışı tarafından yönlendirilir (Ansari, 2019).



Şekil 5. Kemik matriksi hücreleri
(Ansari, 2019)

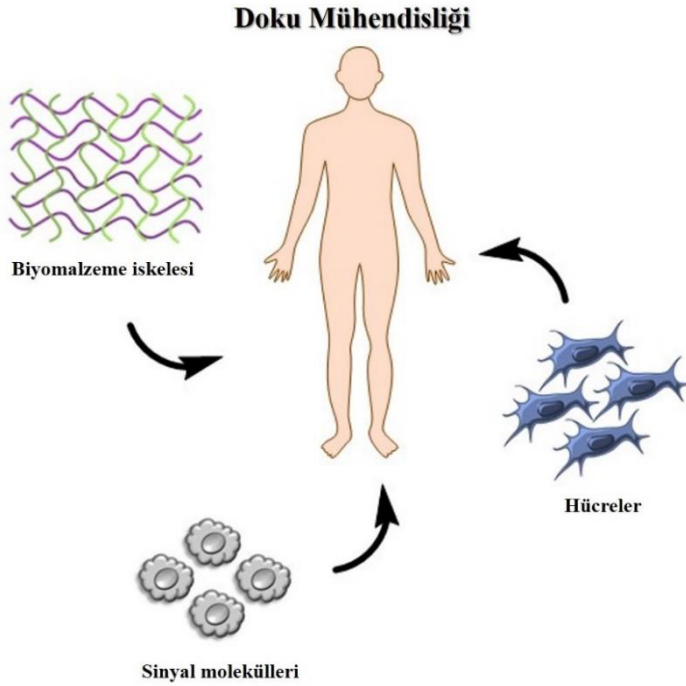
Osteositler, kemik dokusunda en fazla bulunan hücre tipidir. Osteoblastik farklılaşmaya maruz kalan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) tarafından türetilir (Ansari, 2019). Kemik matriksini koruyan olgun kemik hücreleridir. Ayrıca osteositler, oluşturdukları kemikte sıkışmış olan inaktif osteoblastlardır. Kemik dokusu içerisinde iletişim için hayati önem taşırlar (Iyer, 2019). Osteoblastlar, kemiğin oluşumu, büyümesi veya şeklinin değiştirilmesinden sorumludur. Bu hücreler, tip I kollajen, osteopontin, osteokalsin ve alkalın fosfataz gibi hücre dışı matriks proteinleri salgılar, birden fazla kemik birimi oluşturmak için birbiriyle etkileşime girer (Ansari, 2019; Salhotra, vd., 2020). Osteoprogenitör hücreler, osteoblast üretmek için bölünen mezenkimal kök hücrelerdir ve esas olarak kırık onarımına yardımcı olan periosteumun iç hücresel tabakasında bulunurlar (Iyer, 2019). Son olarak osteoklastlar, kemik matriksini çözen, depolanan mineralleri (osteroliz) salgılayan asitleri ve protein sindirici enzimleri salgılayan büyük, çok çekirdekli hücrelerdir. Makrofaj üreten kök hücrelerden türetilirler. Ayrıca, kemikte yıkımı veya kemik rezorpsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir (Iyer, 2019). Şekil 6, osteoblastlar ve osteoklastların kemik homeostazı üzerindeki etkilerini göstermektedir.



Şekil 6. Kemik homeostazi
(Dhivya, vd., 2015)

1.2. Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği (DM), “doku işlevini eski haline getiren, sürdüren veya iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulayan multidisipliner bir alan” olarak tanımlanmaktadır. Klasik doku mühendisliği paradigması, biyolojik ikameler üretmek için iskeleleri, hücreleri ve sinyal moleküllerini kullanır (Şekil 7).



Şekil 7. Doku mühendisliği yaklaşımları

Bu DM bileşenleri, doku mühendisliğinin üçlüsü olarak bilinir ve her birinin belirli bir işlevi vardır: (1) iskeleler; hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması için bir üç boyutlu yapı sağlar, (2) hücreler; yeni doku oluşumunu kolaylaştırır ve (3) sinyal molekülleri (büyüme faktörleri); hücrelerin replikasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (Altuntaş, vd., 2017; Huang, vd., 2020)

Kemik doku mühendisliği, son yıllarda hızla büyüyerek kemik greftleri haricinde kritik kemik defektlerinin tedavisinde büyük umutlar vadetmektedir. Yaşlanan bir popülasyon için yaşam kalitesini iyileştirmek, ideal, sağlam, tekrar üretilebilir ve kolayca temin edilebilir geliştirilmiş kemik ikamelerini oluşturmak ana hedeflerindedir (Black, vd., 2015). Genel olarak kemik doku mühendisliği, DM üçlüsü olarak bilinen hücrelerin, büyüme faktörleri/sinyal moleküllerinin ve yapı iskelelerinin sinerjisiyle yeni doku onarımını ve rejenerasyonunu teşvik etmeyi amaçlamaktadır. Biyomalzemelerden oluşan bir yapı iskelesi, hücrelerin ve sinyal moleküllerinin taşıyıcısı olup hücrelerin tutunması, göçü, çoğalması ve farklılaşmasına rehberlik edecek bir üç boyutlu yapı sağlamaktadır (Huang, vd., 2020; Qu, vd., 2019).

Kemik dokusunun biyomekanik sistemi karmaşıktır, bu durumda kemik matriksinin çok boyutlu organizasyon ve hiyerarşisini taklit edecek biyomalzemenin ideal özellikte olması ve birçok çeşitli gereksinimleri karşılaması gerekmektedir. Bu bağlamda, ideal bir iskelenin tasarımı için aşağıdaki nitelikler dikkate alınmalıdır (Koons, vd., 2020; Venkatesan, vd., 2015).

Biyo-uyumluluk, canlı dokuda toksik, zararlı veya immünolojik bir yanıt üretmeyerek biyolojik olarak uyumlu olma özelliği olarak tanımlanır. Biyolojik olarak bozunabilen malzemelerle ilgili olarak, bozunma sonucu elde edilen yan ürünler, insan vücudunda biyoyumlu olmalı ve filtrasyon veya metabolizma yoluyla elimine edilebilmelidirler. Kemik defekt bölgelerinde zayıf vaskülarizasyon veya azalan metabolizma gibi nedenlerle bozunma sonucu salınan yan ürünlerin büyük miktarda salınımı veya tamamen ortadan kaldırılması doku için büyük bir tehlike arz etmekte ve bu durum istenmeyen doku tepkileri ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle özellikle, polimer bazlı yapı iskeleleriyle ilgili potansiyel immünolojik problemler özel dikkat gerektirir. Kemik doku iskelelerinin biyoyumluluğuna erişilirken, pH, vaskülarizasyon ve metabolik aktivite gibi hasarların lokal fizyolojik koşulları dikkate alınmalıdır (Huang, vd., 2020; Suvaneeth ve Nair, 2018).

Gözeneklilik, boşluk hacminin toplam hacme oranını ifade eder. Gözenekli bir iskele, hücrelerin büyümesine izin verir, vaskülarizasyonu ve yeni kemik oluşumunu destekler ve hücre canlılığı için yeterli oksijenin ve besinlerin difüzyonuna ortam sunar. Gözeneklilik miktarı mekanik özelliklerle ters orantılıdır. Bununla birlikte, yeni kemik doku iskeleleri geliştirilirken yüksek gözenekliliğin bazı dezavantajları dikkate alınmalıdır. İlk olarak, yüksek gözeneklilik, iskelelerin yapısal bütünlüğünü tehlikeye atar. Gözeneklilik çok yüksekse, iskelelerin mekanik dayanımı yetersiz olabilir. Ayrıca, yapı iskelelerinin gözenekliliği, bozunma oranlarını da önemli ölçüde etkiler. Yüksek gözeneklilik, iskeleler ve çevredeki dokular arasındaki etkileşimi artırır ve böylece bozunma sürecini hızlandırır. Sonuç olarak, iskelenin yapısı, yenileme işlemi sırasında gerekli fiziksel desteği sağlamak için hem makro gözenekleri (gözenek boyutu $>50 \mu\text{m}$) hem de mikro gözenekleri (gözenek boyutu $<10 \mu\text{m}$) içermelidir (Altuntaş, vd., 2017; Zhang, vd., 2018).

Biyobozunurluk, yeni dokuların oluşumu ve büyümesi için boş alan oluşturmak amacıyla *in vitro* veya *in vivo* ortamlarda zamanla, kontrollü bir emilim hızında parçalanma yeteneğidir. Malzemenin bozunma hızı, dokunun iyileşme veya yenilenme süreci ile büyüme hızına uyması beklenir. Ayrıca biyobozunurluk özelliği, biyouyumluluk ile ilişkilidir, çünkü bozunma ürünleri toksik olmamalı ve vücuttan metabolize edilerek atılabilmelidir (Velasco, vd., 2015).

Bir iskelenin mekanik özellikleri, hedef dokunun biyomekanik talebini olabildiğince yakından karşılamalıdır. Yapı iskeleleri, defekt bölgesinde ihtiyaç duyulan yapısal bütünlüğü ve mekanik kuvveti sağlamakla yükümlüdür. Bozunma sürecine bağlı mekanik özelliklerdeki farklılıklar, kemik dokusunun rejenerasyon süreci ile uyumlu olmalıdır, bu süre zarfında hasarlı kemik dokusu, kararlı bir biyomekanik duruma ulaşmak için yeniden şekillenir. Ek olarak, iskeleler hasarlı dokunun lokal koşullarına uyacak şekilde ayarlanabilir olmalıdır (Velasco, vd., 2015).

Osteokondüktivite, bir iskelenin osteojenik öncü hücrelerin içe doğru göçünü destekleme yeteneği ve yüzeyde yeni kemik oluşumunu kolaylaştırmak için damar sisteminin infiltrasyonu olarak tanımlanır. Osteojenik progenitör hücrelerin yapışmasına, göç etmesine, çoğalmasına, farklılaşmasına ve sonunda yeni mineralize matriks oluşturmasına izin veren kemik iskelelerinin bir performansıdır (Albrektsson ve Johansson, 2001; Chocholata, vd., 2019).

Osteoindüktivite, bir iskelelin osteoprogenitör hücreleri kusurlu bir bölgeye yönlendirmesi ve ardından hücreleri, yeni kemik dokusu oluşturmak için osteojenik farklılaşmaya girmeye teşvik etme kabiliyetini ifade eder. Kemik doku iskelelerinin osteoindüktivitesini iyileştirmek için yüzey modifikasyonu, geometrisi, osteojenik peptidlerle dekorasyonu, nanomalzemelerin dahil edilmesi ve elektriksel uyarı gibi çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Albrektsson and Johansson, 2001; Kazimierczak and Przekora, 2020).

Kemik iskelelerinin bir başka çok önemli özelliği de, transplante edilmiş biyomalzemelerin yüzeylerinde kemik benzeri apatit kristalleri oluşturma kabiliyeti olarak tanımlanan biyoaktiviteleridir (Kazimierczak and Przekora, 2020). Kemik doku mühendisliği uygulamaları için iskelelin tasarımında yukarıdaki temel gereksinimler dikkate alınarak, defektli doku bölgesinde osteointegrasyonun sağlanması için, özellikle osteokondüktif matriks, osteoindüktif sinyaller, canlı osteojenik hücreler, uygun mekanik özellikler ve hızlı vaskülarizasyon gibi biyolojik özelliklerine özel dikkat edilmelidir (Kazimierczak and Przekora, 2020)

1.2.1. Kemik Rejenerasyonu için Klinik İhtiyaçlar

Son on yıllarda, osteoporoz, enfeksiyon, neoplazma ve diğer kemik hastalıkları, tüm dünyada önemli ölçüde artmıştır. Bu nedenle kemik, kemik deformitelerinin tedavisi için kemik greftleri ve kemik ikame malzemeleri kullanılarak yılda yaklaşık 4 milyondan fazla operasyonla dünyanın ikinci en sık nakil işlemi gerçekleştirilen dokusudur (Christy, vd., 2020; Ribas, vd., 2019). Kemik dokusu, çatlaklar ve bazı kırık türleri gibi küçük hasar alanlarının iyileşmesi için yeterli olan doğal bir rejeneratif kapasiteye sahiptir. Büyük boyutlu kemik hasarı ve kırıklar gibi kritik boyut eşiğini (>2 mm) aşan kemik kusurları için ise klinik müdahale gereklidir (Koons, vd., 2020). Kritik boyutta kemik kusuru yaşayan çok sayıda hasta, olası tedaviler için kemik greftlerini tercih etmektedir. Kemik greftleri kullanılan malzemelerine göre, otogreftler, allogreftler ve ksenogreftler olarak kategorilere ayrılır. Burada, otogreftler; “hastanın kendi vücudunun herhangi bir yerinden alınarak kusurlu bölgeye aktarımı yapılan doku parçaları”, allogreftler; bir bireyden alınıp hasta bireye nakledilen kemik dokuları, ksenogreftler; insan dışındaki başka bir türden temin edilen kemik parçalarını ifade etmektedir (Oryan, vd., 2014). Müdahale gerektiren kritik boyutlu kemik kusurları vakalarının çoğunda, otogreftler ve allogreftler kullanılmaktadır.

Otogreftler, kemiğin iyileşmesi ve rejenerasyonu ile ilgili güçlü osteojenik özelliklere sahiptir. Genellikle otogreft kemik parçaları, hastanın iliak krestinden trabeküler kemik şeklinde alınır. Nispeten iyi başarı derecesi sunması ve altın standart olarak kullanılmasına rağmen, elde edilebilen sınırlı otogreft miktarı, kronik ağrı ve donör saha morbidite riskleri nedeniyle kullanılabilmesi vakaların aralığı sınırlıdır (Oryan, vd., 2014; Pereira, vd., 2020). Allogreftler, otogreft ile karşılaştırıldığında kemiğe greft olarak katılma oranı daha düşüktür. Benzer şekilde, greft reddi, enfeksiyon, maliyet, greft ile birlikte hastalık geçişi ve bağışıklık reddine neden olabilir. Allogreftlerin dezavantajlarına ek olarak ksenogreftler, zoonotik hastalıkların bulaşma risklerini de taşır ve greftin reddi daha olasıdır (Pereira, vd., 2020; Ribas, vd., 2019; Wang, vd., 2014). Kemik greftlerinin dezavantajları terapötik yaklaşımı kısıtlar ve kemik deformitelerinin tedavisi için artan talebin yalnızca otojen veya allojenik kemik greftleri ile karşılanamayacağı kabul edilmektedir.

1.2.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyoajanlar

Kemik dokusunun sağlığı belirli mineraller (kalsiyum, bor, silisyum, magnezyum) ve vitaminlerden (D ve K vitamini) olumlu etkilenmektedir. Bu besin minerallerinin eksikliği, çocukluk/ergenlik döneminde kemik kütlelerinin artışı yavaşlatır ve menopoz sonrası/yaşlılıkta kemik kaybı veya çeşitli kemik rahatsızlıkları sürecini hızlandırır (Price, vd., 2012; Zofková, vd., 2013). Kemik rahatsızlıkları ile ilgili çalışmalarda, genellikle D vitamini ve kalsiyum mineralleri araştırmalara konu olmuş ve diğer besin elementlerinin kemik kalitesi ve osteoporozdaki rollerinin gölgede kaldığı vurgulanmıştır. Kemik dokusu üzerindeki etkileri bilinen bir diğer besin elementleri ise bor, silisyum, magnezyum ve K vitamini olmuştur (Price, vd., 2012). Özellikle son yıllarda, bor ve silisyum mineralleri kemik gelişimi üzerine olumlu etkileri ile kemik doku mühendisliği uygulamalarında biyoajan olarak kullanılmalarına öncülük etmiştir.

Bor ve silisyum elementlerinin etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte, kimyasal ve biyokimyasal olarak birçok benzer özellik gösterdiği bilinmektedir (Jugdaohsingh, vd., 2015). Kimyasal olarak, her ikisi de zayıf, sulu çözelti içinde ayrılmamış asitlerdir ve silisyum, bor elementi gibi polihidroksi bileşikleriyle kolayca kompleks oluşturabilmektedir (Rogalla and Römhald, 2002). Kemik dokusu üzerinde biyokimyasal özellikleri dikkate alındığında, silisyum ve bor kemik lokalizasyonunda belirgin farklılıklar

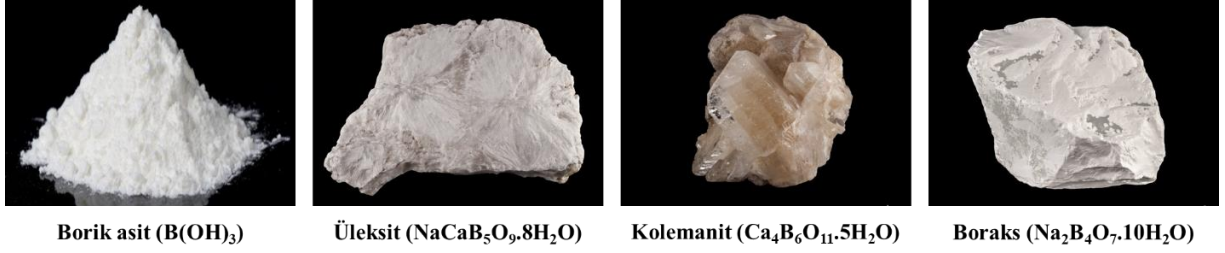
göstermiştir. Bu bağlamda, silisyum elementi kemiğin kollajen bağ dokusunda, bor ise mineral fraksiyonlarında lokalize olmuştur. Bu durumda, silisyum ve borun farklı biyolojik etkilere sahip olduğu ve birbirlerinin yerini doldurmalarının mümkün olmadığı bildirilmektedir (Jugdaohsingh, vd., 2015).

Burada, kemik kalitesinin bozulması sonucu karşılaşılan rahatsızlıkların ve özellikle de parçalı kırıkların tedavisi için bor ve silisyum minerallerinin kemik metabolizması üzerine etkileri araştırılmış ve osteoporoz gibi hastalıklarda kemik kaybının güçlü bir baskılayıcısı olabileceği varsayılmıştır. Bu nedenle, kemik dokusunun rekonstrüksiyonunda organik/inorganik biyokompozit malzemelerin geliştirilmesine bir alt yapı oluşturacağı gerekçesiyle bor ve silisyum üzerinde yoğunlaşmıştır.

1.3. Bor Elementi

Bor, 1808 yılında Sir Humphry Davy, J.L. Gay-Lussac ve L.J. Thenard tarafından bir element olarak keşfedilirken, yüksek saflıktaki (>%99,9) borun ise ilk olarak 1909'da Amerikalı kimyager Ezekiel Weintraub tarafından sentezi gerçekleştirilmiştir (Bolaños, vd., 2004). Periyodik cetvelde 3A grubunun başında bulunan ve “B” sembolünü taşıyan bor, metal ve ametal arasında özellikleri olan yarı iletken bir elementtir. Atom numarası 5, atomal ağırlığı 10,81, yoğunluğu 2,84 g/cm³, ergime noktası 2200 °C ve kaynama noktası 2250 °C'dir. Ayrıca, kütle numaraları 10 ve 11 olan iki kararlı izotopu bulunan bor elementi, moleküler kovalent bağlı ağlar oluşturma kabiliyeti açısından da karbona benzer (Kabu and Akosman, 2013) (Anonim2020a).

Doğada bor, serbest halde elementel olarak bulunmamaktadır. Oksijenle bağ yapmaya eğilimli oldukları gerekçesiyle de çok sayıda bor-oksijen bileşimi bulunmaktadır. Bu bor-oksit bileşimlerine genel olarak “borat” adı verilmektedir (Demirtaş, 2010). Bu bileşikler içerisinde en basit yapılı olanları da bor oksit (B₂O₃) ve borik asittir (B(OH)₃). Ek olarak, bor, Ca, Na, Mg gibi metallerle bileşikler halinde bulunmaktadır. Borat olarak da adlandırılan bu bileşiklerin bor oksit içerenleri daha değerli kabul edilmektedir. Burada bor oksit içeren bileşikler; üleksit (NaCaB₅O₉.8H₂O), kolemanit (Ca₄B₆O₁₁.5H₂O) ve boraks (tinkal) (Na₂B₄O₇.10H₂O)'tır (Şekil 8) (Demirtaş, 2010; Yakıncı and Kök, 2016). Ayrıca bor, çeşitli bileşimlerinde metal dışı bileşikler gibi davranır, ancak saf haldeki bor ise farklı olarak karbon gibi elektrik iletkenidir (Anonim2020a).



Şekil 8. Bazı önemli bor bileşikleri
(Anonim2020b)

1.3.1. Bor Minerali

Dünyadaki toplam bor rezervlerinin %74'lük bir oranı Türkiye'de bulunmaktadır. Bu mevcut rezervi ile Türkiye, dünyanın en zengin bor kaynağına sahip ülke konumundadır. Dünyadaki rezerv oranı bakımından Türkiye'yi sırasıyla, Rusya ve ABD takip etmektedir (Anonim2020a ; Yiğitbaşıoğlu, 2004).

Tabiatta belirlenen yaklaşık 230 çeşit bor minerali olduğu bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri ve ticari öneme sahip olan bor ürünleri; boraks, kolemanit, Üleksit, kernit, probertit, pandermite ve hidroborasittir (Tablo 1) (Białek, vd., 2019; Yiğitbaşıoğlu, 2004).

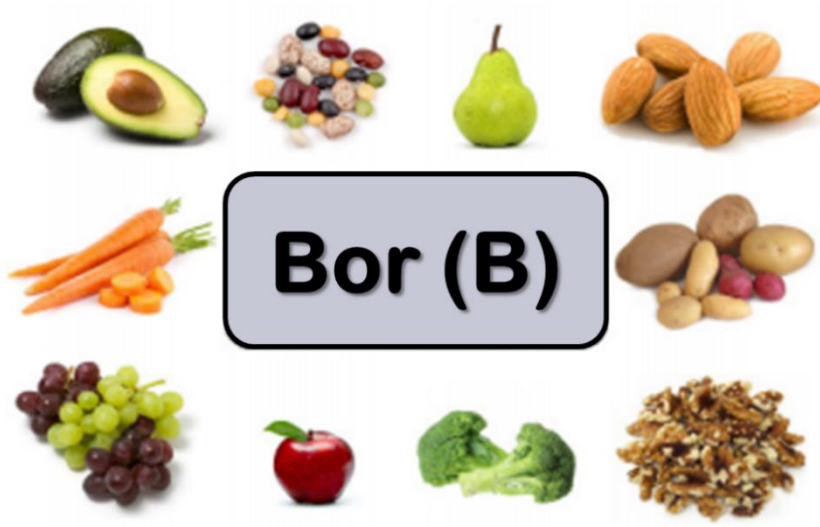
Tablo 1
Ticari öneme sahip bazı bor mineralleri ve bileşikleri

Mineraller/Bileşikler	Kimyasal Formülü	B ₂ O ₃ İçeriği (%)
Mineraller		
Boraks dekahidrat (Tinkal)	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	36,60
Kolemanit	Ca ₄ B ₆ O ₁₁ .5H ₂ O	50,80
Üleksit	NaCaB ₅ O ₉ .8H ₂ O	43,00
Kernit (Razorit)	Na ₂ B ₄ O ₇ .4H ₂ O	51,00
Probertit	(NaCaB ₅ O ₉ .5H ₂ O)	49,60
Pandermite (Priseit)	(Ca ₄ B ₁₀ O ₁₉ .7H ₂ O)	49,80
Hidroborasit	(CaMgB ₆ O ₁₁ .6H ₂ O)	50,50
Bileşikler		
Boraks pentahidrat	Na ₂ B ₄ O ₇ .5H ₂ O	48,80
Susuz boraks	Na ₂ B ₄ O ₇	69,12
Borik asit (Sassolit)	H ₃ BO ₃	56,40
Sodyum Perborat Monohidrat	NaBO ₃ .H ₂ O	34,88
Sodyum Perborat Tetrahidrat	NaBO ₃ .4H ₂ O	23,45
Bor oksit	B ₂ O ₃	100,00

(Garrett, 1998; Yiğitbaşıoğlu, 2004)

Bor bileşikleri çevrede bozunmaz veya dönüştürülemez. Ancak bor türlerinin dönüşümleri, doğal ortamdaki (nem seviyesi ve toprağın pH'ı gibi) değişikliklerden etkilenir (Białek, vd., 2019). Bor mineralinin kaynağı genellikle denizler, yeraltı-üstü suları ve topraklardır. Özellikle sularda bor minerali, borik asit formunda bulunmaktadır. Burada pH, 8,7'den küçük ise borik asit halinde, eğer pH değeri 8,7'den büyük ise borat formunda bulunabilmektedir (Spivack, vd., 1987). Topraktaki bor içeriği ise, pH, toprakta bulunan organik/inorganik maddeler ve toprağın türü gibi çeşitli faktörlerden dolayı farklılık göstermektedir (Aydın, vd., 2018). Bu bağlamda denizlerden buharlaşan borik asit, yağmur ve kar aracılığıyla toprağa inerek yeraltı-üstü kaynaklarına ulaşır geniş alanlara yayılmaktadır. Sebze-meyve ürünleri de dahil bitkiler, bor mineralini topraktan ve sudan almakta ve böylece, her türlü kaynaktan bor mineralinin bitkilere, hayvanlara ve insanlara dolaylı yollarla geçişi sağlanmaktadır (Demirtaş, 2010; Yakıncı and Kök, 2016).

Bor mineralinin canlılar tarafından; yeraltı-üstü sularının içilmesi, bor miktarı yüksek bitkisel ürünlerin tüketilmesi, hava ve sudaki bor mineralleri ile teması, bor içeren temizlik ürünlerinin kullanımı, bor minerali ve bor ürünleri çıkartılan yerlerde çalışarak ağız, solunum ve deri yoluyla alımı yapılmaktadır. Borun bitkiler için gerekli temel bir element olduğu bilinmekte olup, son yıllarda insanlar için de gerekli olduğu kanıtlanmıştır. İnsan sağlığı açısından bor mineralinin esas kaynağını bitkisel ürünler oluşturur. Bu ürünler, içerisinde bulundurduğu bor minerali miktarıyla da çeşitlilik gösterir (Şekil 9). Çeşitli besin grupları olarak, meyveler, yeşil sebzeler, baklagiller, mantarlar ve kabuklu yemişler ve bunların yan ürünleri bor bakımından zengindirler. Mikro besin elementi olarak nitelendirilen bor mineralinin besin zinciri yoluyla insan vücuduna alımında biyolojik birikimi söz konusu değildir (Sağlam, vd., 2013; Yakıncı ve Kök, 2016).



Şekil 9. Bor mineralinin bitkideki kaynakları
(Aşkar, vd., 2018)

Bitkisel ürünler sağlıklı beslenmede ağırlıklı olarak tüketildikleri için bor alımına önemli bir düzeyde katkı sağlamaktadırlar (Yakıncı and Kök, 2016). Bor mineralinin eksik veya fazla tüketilmesi, insan vücudunda birçok anormallikleri meydana getirmektedir (Aydın, vd., 2018). Bor bileşiğinin oluşturduğu bor-oksijen bağına parçalamak için çok yüksek düzeyde enerji harcamak gereklidir. Bu durumda da bor bileşiğinin vücuttan metabolize edilmeden atıldığı ileri sürülmektedir (Kuru and Yarat, 2017). İnsanlarda diyetle veya gıda takviyesi şeklinde alınan borun yaklaşık %90-95'i direkt olarak vücutta birikimi olmadan üre yoluyla dış ortama atılmaktadır. Vücutta tutulmayan borun sadece küçük bir kısmı kemik dokusu ve kalp, karaciğer, akciğer, böbrek gibi organlarda ppm düzeyinde birikimi gerçekleşmektedir (Aydın, vd., 2018; Kabu ve Akosman, 2013). Bor, vücut dokuları ve sıvılarında borik asit formunda bulunur ve ppm düzeyindeki bor seviyelerinin %98,4'ü borik asit iken %1,6'sı borat anyonu şeklinde bulunmaktadır (Kabu and Akosman, 2013). Yapılan hayvan ve insan çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda, günde 1,0 mg'dan daha az alınan bor mineralinin sağlık açısından herhangi bir yararlı etkisinin ortaya konmadığı bildirilmiştir (Aydın, vd., 2018). Bu durum dikkate alınarak, günde 1-7 mg arası bor alınabilir. Sağlıklı insanlarda bor seviyeleri 15 ile 80 µg/kg arasında değişmektedir (Kabu ve Akosman, 2013; Uluisik, vd., 2018).

1.3.2. Bor Mineralinin Kullanım Alanları

Eski çağlardan bu yana varlığı bilinen bor mineralinin, günümüzde de bor rezervlerinin ülkemizdeki stratejik konumundan ötürü kullanım alanları gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Bor minerallerinin kullanım alanları içerisinde; gıda, tarım, sağlık, kozmetik, temizlik ürünleri, tekstil, inşaat malzemeleri, seramik, cam endüstrisi, enerji sektörü, metalürji, nükleer, bilgisayar ve uçak sanayi alanları dahil edilmektedir (Şekil 10) (Kuru and Yarat, 2017; Yakıncı and Kök, 2016).



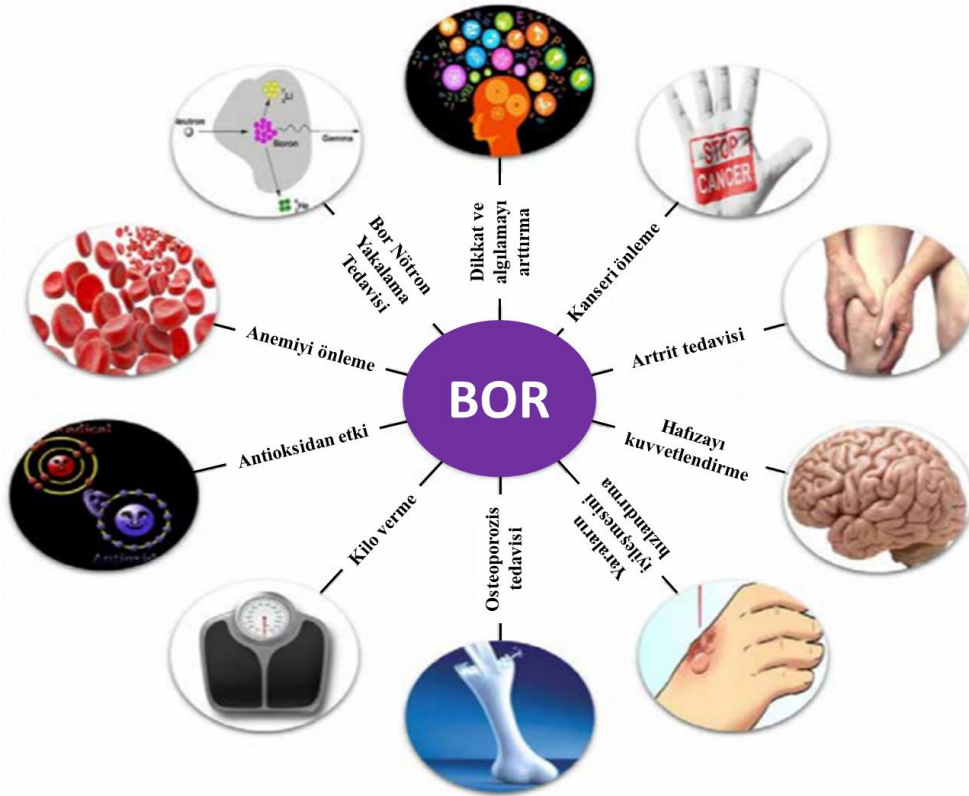
Şekil 10. Bor mineralinin kullanım alanları
(Kuru and Yarat, 2017)

Çeşitli kullanım alanları içerisinde bor mineralinin, tarımda önemi büyüktür. Birçok bitki için mikro besleyici özellikte olup bor takviyesi ile bitkilerin gelişimi ve optimum ürün kalitesi için önemlidir. Benzer şekilde bitkide bor eksikliğinin giderilmesi amacıyla bor içeren biyolojik gelişim ve kontrol kimyasalları ve özel gübrelerin yanı sıra, yabancı ot ve böceklerin mücadelesi için de kullanılmaktadır (Yakıncı and Kök, 2016). Sağlık alanına odaklanıldığında ise, bor mineralinin birbirinden farklı eşsiz özellikleriyle karşılaşılmaktadır. Bor mineralinin sağlıkta kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır (Şekil 11).

- Kemiğin gelişimi ve korunmasında
- Yara iyileşmelerinde
- Hormonların regülasyonunda

- Beyin fonksiyonlarında
- Bor Nötron Yakama Terapisi (BNTC) ile kanser (özellikle beyin kanserleri) tedavisinde
- Yanık tedavilerinde
- Yara iyileşmelerinde
- Göz iltihaplanmalarında sterilizasyon ürünü olarak
- Bazı merhemlerin içeriğinde
- Antiseptik lens solüsyonlarında kullanılmaktadır (Demirtaş, 2010; Kuru and Yarat, 2017; Pizzorno, 2015).

Bu tez çalışmasında bor mineralinin sağlık alanlarına etkisi üzerinde kısaca durulmuş ve özellikle kemik gelişimi ve onarımı konusuna odaklanılmıştır. Bor minerali, osteokondüktif biyokompozit malzememizin temelini oluşturduğu için kemik rekonstrüksiyonlarında kullanımına ağırlık verilmiştir.



Şekil 11. Bor mineralinin sağlık alanındaki etkisi
(Kuru and Yarat, 2017)

1.3.3. Bor Mineralinin Kemik Gelişimi Üzerine Etkileri

Özellikle son yıllarda, canlıların beslenmesinde kritik bir rol oynayan bor elementi gerek biyokimyasal gerekse metabolik etkileri ile de birçok bilimsel çalışmalara konu olmuştur. Bor, giderek artan bir şekilde, özellikle kemik sağlığı üzerinde birçok faydası olan bir element olarak tanımlansa da borun kemik sağlığı üzerindeki kesin etki mekanizması hala aydınlatılamamıştır (Gümüşderelioğlu, vd., 2015). Kemik dokusunun sağlığı için bor, kemik metabolizması, rejenerasyonu, gelişimi ve bakımı, çoğalması ve mineralizasyonunda önemli rol oynar (Khaliq, vd., 2018). Ayrıca borun, yara iyileşmesi, bağışıklık fonksiyonları, hormonal metabolizması, anti-inflamatuar etki ve anti-kanser etkileri ile birçok yaşamsal olayda etkin rolü olduğu bilinmektedir (Pizzorno, 2015). Borun diğer biyolojik işlevleri arasında, *in vivo* yara iyileşmesinin uyarılması, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınması, RNA sentezinde artış ve hücre dışı matriks döngüsünün artması da sayılabilir (Balasubramanian, vd., 2018).

Borun kemiklerdeki çeşitli metabolik aktiviteleri etkilediği de iyi bilinmektedir. Kemik metabolizmasında önemli rol oynayan magnezyum (Mg), D vitamini ve kalsiyum (Ca) ile etkileşime girer. Ca ve Mg homeostazı ile bu sinerjik ilişki, kemik gücündeki rolüne yardımcı olur. Yaşın artması gözenekli kemik dokusunda kemik zayıflığına neden olabilir ve bor, kalsiyum ve magnezyum seviyesinin etkili bir şekilde çalıştığını doğrulayarak bu bozulmanın üstesinden gelmeye yardımcı olur (Khaliq, vd., 2018). Çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, borun hayvanlar ve insanlar için biyoaktif özellikleri ile yararlı ve temel bir element olduğunu göstermiştir. Borun bildirilen biyoaktif etkileri, kemik gelişimi ve bakımı üzerindeki yararlı etkileri içermektedir (Hakki, vd., 2013). Birbirinden bağımsız çeşitli çalışmalar, borun kemik mineralizasyonu ve büyümesi üzerindeki olası moleküler mekanizmalarını göstermiştir. Bu çalışmalara örnek olarak, borun, kalsiyum akışı yoluyla osteoblastik hücre aktivitesini hızlandırdığı görülmektedir (Capati, vd., 2016). Ayrıca, osteoblast hücrelerinin (MC3T3-E1) proliferasyonu, hücrelerin canlılığı, mRNA ekspresyonu ve mineralizasyon açısından kemik metabolizmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Hakki, vd., 2010). Borun *in vitro* çalışmalarda, insan diş germ kök hücrelerinde alkalın fosfataz aktivitesini ve ayrıca osteokalsin, kollajen tip I ve kemik morfogenetik protein-7'nin ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (Taşlı, vd., 2013). Ying ve arkadaşları 2011'de insan kemik iliği stromal hücrelerinin (iKİSH), proliferasyon ve farklılaşma aşamasında borun osteojenik

farklılaşmayla ilişkili markör gen sentezini uyararak osteojenik etkiyi arttırabileceğini ve hücrelerin osteojenik kapasitesini arttırmak için kemik doku mühendisliği uygulamalarında umut verici bir yaklaşım olabileceğini ilk kez bildirmişlerdir (Ying, vd., 2011). Başka bir çalışmada bor nitrür nanotüplerinden bor salınımının, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını arttırdığını doğrulamış ve ortopedik uygulamalardaki borun potansiyelini kanıtlamıştır (Li, vd., 2016). Gizer ve ark. 2020 çalışmasında geliştirdikleri bor içeren nano-hidroksiapatit kompozitlerin, alkalın fosfataz aktivitesini artırarak mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını attırdığı tespit edilmiştir (Gizer, vd., 2020). Demirer ve arkadaşlarının (2012), sıçanlarda deneysel periodontitislerde sistemik olarak uygulanan borik asidin alveolar kemik kaybını ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığını ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir (Demirer, vd., 2012). Hülya Toker ve ark. (2016) ait çalışmada ise borik asidin periodontitis ve osteoporozlu bir sıçan modelinde alveolar kemik kaybını azaltabileceği sonucuna varılmıştır (Toker, vd., 2016). Kemikteki bor konsantrasyonu, kemik metabolizması, mineralizasyon ve rejenerasyon için uygun olabilecek tüketilen element miktarına bağlıdır. Bor eksikliği, büyüme sürecinde bozulmaya ve anormal kemik gelişimine yol açar (Khaliq, vd., 2018). Bordan yoksun bırakılan sıçanlar, trabeküler boşlukların artışı ve kemik hacminin azaldığını göstermiştir. Dahası, bor eksikliği uyluk kemiğinin (femur) gücünün azalmasına neden olmuştur (Nielsen and Stoecker, 2009). Bor eksikliği mineral değişiklikleri ile ilişkilidir, bu da borun osteoblast aktivitesinde kemik büyümesi ve korunmasında rol oynadığını düşündürmektedir. Grustovich ve ark. (2008) farelerde uygulanan diyetlerde bor eksikliğinin kemik oluşumunu inhibe ederek periodontal alveolar kemiğin iyileşmesi ve yeniden şekillenmeyi değiştirdiğini kanıtlamışlardır (Gorustovich, vd., 2008). Bazı araştırmacılar, hayvanlarda ve insanlarda uygun kemik gelişimi için sadece optimal bir bor dozu önermektedir (Capati, vd., 2016; Kabu ve Akosman, 2013; Uluisik, vd., 2018). Daha önceki çalışmalar, uygun dozların kemik gücü ve gelişimi üzerinde istenen etkilere sahip olabileceğini göstermiştir. Düşük bor kaynağının osteoblastların farklılaşmasını ve proliferasyonunu etkilediği bildirilir (Capati, vd., 2016). Nielsen ve Stoecker, diyet uygulamalarındaki borik asit eksikliğinin, sıçanlarda 3 mg/kg bor diyetine kıyasla kemik hacmi fraksiyonunda önemli bir azalma gösterdiğini kanıtlamıştır (Nielsen and Stoecker, 2009).

Yukarıda değinilmiş birbirinden bağımsız çalışmalarda borun kemik oluşumu ve korunmasındaki önemli etkileri vurgulanmıştır. Bir sonraki kısımda ise bor mineralinin

borik asit kullanılarak proteinlerle sol-jel reaksiyonu ile modifiye edilmesine odaklanılmıştır. Borun insan ve hayvan dokularındaki etkisini daha da açıklığa kavuşturmak ve özellikle insanlar için kemik doku mühendisliği sınırları içerisinde klinik uygulamalarda kullanımını genişleterek sol-jel reaksiyonu ile proteinlere modifiyesini içeren araştırmalar bu tez çalışmasında düşünülmektedir.

1.4. Silisyum Elementi

Silisyum (Si), atom numarası 14 ve atom ağırlığı 28,08 olan yarı iletken bir elementtir. Yeryüzünde (%28) en çok bulunan ikinci elementtir. Ancak, oksijene olan büyük afinitesinden dolayı nadiren saf elemental formunda bulunur ve çoğunlukla (%92) oksitlenmiş formunda çeşitli silika/silikat mineralleri oluştururlar. Silisyumun biyolojik rollerine ilişkin ayrıntılı bilgiler hala eksiktir, ancak Si neredeyse tüm organ ve dokularda bulunabilir. Silisyumun farklı organların metabolizması üzerinde veya enflamatuar süreçler sırasında dolaylı olarak diğer eser elementlerin emilimini ve kullanımını değiştirerek etki gösterebileceği de tartışılmıştır. Si'nin insanlar için, özellikle stres koşulları altında sağlığa faydaları iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, temel bir mineral olarak olası rolü hala tartışılmaktadır (Götz, vd., 2019; Jugdaohsingh, 2007). İnsan vücudunda silisyum, yaklaşık 1-2 g kadarlık bir dağılıma sahiptir ve günlük ortalama beslenme ile 20–50 mg arasında alınımı gerçekleşmektedir (Arora ve Arora, 2017; Price, vd., 2012).

Silisyum elementinin insan vücudundaki en yüksek konsantrasyonları ise kemik dahil bağ ve sert dokulardadır. Özellikle kemik dokusu içerisinde kollajen ve proteoglikanlara ek olarak, HDM'nin önemli bir bileşeni olan glikozaminoglikanlara yoğun bir şekilde bağlı görünmektedir. Bu, silisyumun kemik yapısında ve oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Arora and Arora, 2017). Biyomedikal uygulamalarda silisyum, hücreler için uygun bir matriks hazırlanması ve kemik gelişimi üzerindeki etkin rolleri son yıllarda çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır (Götz, vd., 2019). Özellikle de silisyumun, hidrojel, toz, üç boyutlu yapı iskeleleri ve implantlar olarak çeşitli formlarda kullanımları mevcuttur. Genel olarak KDM uygulamaları baz alındığında, kemik rejenerasyonuna özgü geliştirilmiş fazla sayıdaki silika nanopartiküllerinin, silika-inorganik kompozitlerin, biyocam yapıların, silika içeren nano ve mikro ilaç taşıma sistemlerinin ve silika-polimer hibritlerinin (keratin, kollajen, jelatin vb. gibi doğal

polimerler) üretilerek kullanıldığı görülmektedir (Eivazzadeh-Keihan, vd., 2020; Shadjou and Hasanzadeh, 2015).

Kemik dokuya destek sağlamanın yanı sıra, iyileşme sürecini de hızlandırmak amacıyla biyoaktif molekülleri içeren eş zamanlı iskeleler kullanılmaktadır. Bu iskeleler osteoindüktif/osteokondüktif etkiler gösterirler. Bugüne kadar, ortopedik uygulamalar için yapı iskelesi olarak kullanılan malzemeler arasında; polimerler, metaller, seramikler, organik ve inorganik bileşenlerine karşılık gelen kompozitleri bulunmaktadır. Kompozit malzemeler söz konusu olduğunda, organik-inorganik yapıların oluşumundaki önemini belirtmek için mineralizasyon süreçleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Burada, Karunya ve Lechner yeni biyo-planlı silika kompozitlerinin hazırlanmasını rapor etmişlerdir. Hücre-iskele etkileşimlerinin ilk adımı, hücre-malzeme yüzeyleri ve arayüzleri üzerindeki yoğun etkileşimlerle ilgili yapışma süreçleridir. Bu etkileşimler, yüzey polaritesine (hidrofilik ve hidrofobik yüzeyler), yüzey pürüzlülüğüne ve topografyaya büyük ölçüde bağlıdır. İnorganik yapı iskelelerin gelişimi, hücre iç büyümesinin sağlanmasında iyi tanımlanmış gözenekli yapılar elde etmek için son teknoloji polimerizasyon tekniklerini kullanan polimer senteziyle başlar. Hem polimer kütlesi hem de yüzey, doğal ortamın ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde uyarlanmalıdır. Hücre yapışmasını, çoğalmasını ve büyümesini desteklemek için iskele yüzey polaritesi ve topografya hücre şekline adapte edilmelidir (Götz, vd., 2019)

Silikonun kemik üzerindeki etkisinin mekanizmalarını belirlemek için çok sayıda doku ve hücre kültürü çalışması da yapılmıştır. 1980'lerde Carlisle ve ark. *in vivo* çalışmaları ile, silikanın civciv tibialarında kemik matriksi yoğunluğunu artırdığını ve Si'nin, kollajen sentezinde rol oynayan enzim olan proli hidroksilaz aktivitesinde doza bağlı bir artışa sahip olduğunu bulmuştur (Carlisle, 1986). Bu, silikonun enzimlerin regülasyonu yoluyla kemik matriks sentezine dahil olduğunu göstermektedir. Bir diğer *in vitro* çalışmalar, silika moleküllerinin tip I kollajen sentezini ve osteoblastların farklılaşmasını uyardığını göstermiştir (Reffitt, vd., 2003). Sıçanlarda yapılan çalışmalar ise fizyolojik seviyelerde silisyumun, silisyum eksikliği olan sıçanlara kıyasla kemiğe kalsiyum katılımını iyileştirdiğini göstermiştir (Seaborn and Nielsen, 2002). Bu nedenle silisyum, kemik oluşumu için gerekli bir unsur haline gelmiştir. Feng ve ark. (2007) ve Zou ve ark. (2009) ayrıca silika içeren nanosferlerin osteoblast hücre hatlarının *in vivo* ve *in vitro* proliferasyonu üzerinde doza bağlı bir şekilde önemli bir etkiye sahip olduğunu

bulmuşlardır (Feng, vd., 2007; Zou, vd., 2009). Daha sonralarda, Martinez ve ark. (2015) ve Ghanaati ve ark. (2010), silikanın bir jel iskelesine dönüştürüldüğünde, osteoblast farklılaşmasını ve vaskülojenezi teşvik ettiğini ve ayrıca ilaç dağıtımına yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir (Ghanaati, vd., 2010; Martínez-Vázquez, vd., 2015). Bu nedenle silikanın hem *in vivo* hem de *in vitro* kemik oluşumunu, kemik rejenerasyonunu ve vaskülarizasyonu teşvik etmede önemli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Silika bazlı inorganik materyallerin Ca-P bazlı biyoseramiklere göre temel avantajı, silisyumun (Si) kemik rejenerasyon sürecinde mineralizasyon ve gen aktivasyonunda önemli bir rol oynamasına bağlıdır. 1960'ların sonlarında Hench ve ark. bazı silika bazlı biyocamların, fizyolojik ortamda konak doku ile implantlar arasında mekanik olarak güçlü bir arayüzey bağ oluşturan kemiğin ana minerali olan HA oluşumunu indükleyebileceğini keşfetmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak, implantlar açısından inert biyomalzemeler yerine yeni bir “biyoaktif” biyomateryal kavramı geliştirilmiştir (Hench ve Paschall, 1973; Zhou, vd., 2015).

Silika, ayrıca biyoaktif camın (BC) iyi bilinen bir bileşenidir ve apatit oluşumunu uyarır. Silika nanopartiküllerin fizyolojik sıcaklık altında yerinde jelleşmeye girme kabiliyeti, onları biyoaktif enjekte edilebilir sistemlerin sentezi için umut verici bir aday haline getirir (Lewandowska-Łańcucka, vd., 2015). Üretilen BC nanopartiküller, damıtılmış suda, kemik hücrelerinin bağlanmasını ve çoğalmasını kolaylaştıran bir potansiyeli sergiler. BC'lerin iyonik çözünme ürünlerinin, gen aktivasyon materyalleri olarak hareket ederek kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını indüklediği bulunmuştur (Luz and Mano, 2012; Tavakolizadeh, vd., 2017). BC nanopartiküllerinden kontrolsüz ve aşırı iyonik salınım, hücreler için ölümcül olan yerel ortamın pH'ında değişikliğe neden olur. Ek olarak, nano boyutlu parçacıklardan kaynaklanan biyolojik tepki, aynı kimyasal bileşime sahip daha büyük parçacıklardan elde edilenden farklıdır. Mikro temas baskısının, yüzeydeki nanopartikül yoğunluğunun hassas kontrolünü sağladığı, böylece iyonik salınımı veya verimsiz partikül konsantrasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Luz and Mano, 2012). BC nanopartiküllerinin karbon nanofiberler ve PES nanofiberlere dahil edilmesi kemik rejeneratif süreci üzerinde önemli etkilere sahiptir (Ardeshirylajimi, vd., 2015; Cheng, vd., 2017). SiO₂-CaO-P₂O₅, diş uygulamalarında kemik dolgu malzemesi olarak, biyoaktif kaplama olarak veya 3D iskele olarak kullanılmıştır (Tavakolizadeh, vd., 2017). BC nanopartiküller, SiO₂-CaO sol-jel bazlı nanopartikülleri içeren biyomimetik

süperhidrofobik yüzeyler üzerinde küresel agregalar oluşturmak için de kullanılmıştır (Luz and Mano, 2012). Elektrospon PLLA iskelesine BC nanopartiküllerinin dahil edilmesinin osteokondüktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Mahdavi, vd., 2017).

1.5. KDM İçin Biyomalzemeler

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak uygun malzemelerin geliştirilmesi son derece zordur. Bugüne kadar, metaller, biyoaktif seramikler ve camlar, doğal ve sentetik polimerler ve bunların kompozitleri dahil olmak üzere kemik rejenerasyonu için iskeleler olarak çeşitli malzemeler değerlendirilmiş ve kullanılmıştır (Shi, vd., 2016). Bununla birlikte, geliştirilen malzeme için biyobozunurluk özelliği en önemli endişelerden biri olduğundan, malzemenin seçimi biyobozunur biyoseramikler ve biyopolimerler ile sınırlıdır. Kemik dokusunun rejenerasyonu için uygun bir fiziksel mikro ortam, yeniden yapılandırılacak dokuya bağlı olarak polimerik materyallerin kullanımıyla sağlanır (Ranganathan, vd., 2019). Polimerler ve kompozitleri, çoğu metal ve seramiğe göre avantajlı biyoyumlulukları ve biyobozunur özellikleri için en umut verici adaylar olarak kabul edilmektedir. Daha da önemlisi, polimerler oldukça esnek tasarım kapasitesine sahiptir ve çeşitli özellikleri, kimyasal bileşimleri ve yapıları manipüle edilerek özel gereksinimleri karşılayacak şekilde kolayca uyarlanabilir (Shi, vd., 2016). Kemik doku mühendisliği için birçok polimerik malzeme türü kullanılmış ve bunlar doğal ve sentetik polimerler olarak iki ana grupta kategorize edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2

Biyomalzemelerin üretiminde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları

	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Sentetik Polimerler	Tanımlanmış saflık ve tekrarlanabilir kimyasal/mekanik özellikler Uygun mekanik özellikler Düşük bağışıklık tepkisi Düşük üretim maliyetleri Büyük miktarlarda bulunabilirlik ve üretim Üretim sırasında malzeme özelliklerini özelleştirme fırsatı	Zayıf biyoyumluluk, Düşük esneklik, Zor üç boyutlu baskısı Biyobozunma sonucu yan etkileri (nanotoksosite, inflamasyon vb.) Şüpheli hücre-matriks interaksyonu Bozunma sonucu mekanik dayanım kaybı (biyobozunur polimerler) Vücutta uzun süreli kalıcılığın etkileri (bozunmayan polimerler)
Doğal Polimerler	Doğal kökenli, Doğal HDM ile benzerlik Biyoyumluluk, Biyobozunurluk Biyoaktivite, Biyoemilebilirlik Hücre tanıma ve yapışma bölgelerinin varlığı İşlenmesi için sert kimyasallar gerektirmez	Zor işlem, Düşük stabilite Yetersiz mekanik özellikler Pahalı üretim yöntemleri Çapraz kontaminasyona duyarlılık

(Filippi, vd., 2020)

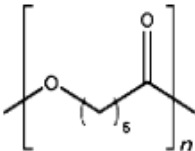
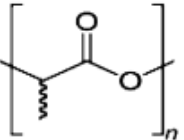
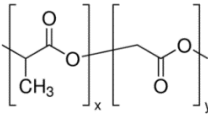
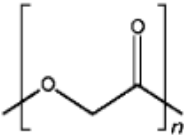
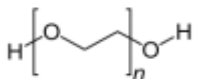
1.5.1. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, özellikle üretim sırasında özelliklerini tam olarak uyarlama olasılığı nedeniyle, çeşitli biyomedikal uygulamalar için araştırılmıştır (Filippi, vd., 2020). Poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli (kaprolakton) (PCL), poli (etilen glikol) (PEG) polimerleri ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri gibi polyesterlere dayanmaktadır. Aynı zamanda, KDM uygulamalarında üç boyutlu iskeleler için en yaygın kullanılan sentetik polimerler arasında sayılmaktadır (Chocholata, vd., 2019; Turnbull, vd., 2018). Sentetik polimerler, polimerlerin fonksiyonel gruplarını uygun şekilde tasarlayarak özel yapı ve özellikler sunar. Bu avantajlar, belirli uygulamalara göre değiştirilebilen tahmin edilebilir, tekrarlanabilir ve ayarlanabilir özellikleri garanti eder. Örneğin, kimyasal bileşime, kristalliğe ve moleküler ağırlığa göre bozunma hızları değiştirilebilir, ihtiyaca özel gözenek boyutu, gözeneklilik ve mekanik mukavemet oluşturulabilir (Donnaloja, vd., 2020). Bununla birlikte, genellikle hidrofobiktirler ve hücre tanıma alanlarından yoksundurlar, biyoaktiviteyi iyileştirmek için ikincil modifikasyon olmaksızın uygulamayı sınırlandırır (Turnbull, vd., 2018). Bazı polimerlerin biyolojik ortamda bozunma kinetiklerinin yavaş olması ve bozunma sonucunda toksik yan ürünler ortaya çıkarması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Öte yandan, doğal polimerler ile karşılaştırıldığında, azaltılmış biyoaktivite sunarlar. Bu bağlamda, biyoseramik partiküller gibi birkaç kaplamaları, kemik doku rejenerasyonunda yüzey performanslarını iyileştirmek amacıyla test edilmiştir (Donnaloja, vd., 2020).

Bazı sentetik polimerler yüksek basınç dayanımı ve kontrollü bir bozunma süresi göstermesine rağmen, *in vivo* ortamlarda hızlı bozunma nedeniyle güçlerini kaybederler ve olumsuz doku tepkileri verebilen lokal asidik ortam oluştururlar (Ghassemi, vd., 2018). Bu durumda, DM uygulamaları için polimer kompozitleri olan kopolimerlerin hazırlanmasıyla bu dezavantajlı özellikleri ortadan kaldırmak mümkün olabilir (Chocholata, vd., 2019). KDM uygulamalarında kullanılan bazı sentetik polimerler Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3

Kemik doku rejenerasyonu için uygun sentetik polimerler ve temel özellikleri

Polimerler	Karakteristikleri	Kimyasal Yapısı	Referanslar
Sentetik			
PCL	FDA onaylı, biyobozunur, yavaş bozunma oranı, sitouyumlu, hidrofobik ve düşük biyoaktivite sergiler		(Donnaloja, vd., 2020) (Ghassemi, vd., 2018) (Sabir, vd., 2009)
PLA	FDA onaylı, biyoyumlu, biyobozunur, sitouyumlu, termal stabilite, hücre adezyonunu destekler, toksik ve inflamatuvar değildir		(Ghassemi, vd., 2018) (Donnaloja, vd., 2020) (Sabir, vd., 2009)
PLGA	FDA onaylı, biyobozunur, ayarlanabilir özellikler, optimal olmayan mekanik özellikler ve zayıf osteokondüktivite sergiler		(Donnaloja, vd., 2020) (Ghassemi, vd., 2018)
PGA	FDA onaylı, biyoyumlu, biyobozunur, hücre adezyonunu destekler, toksik ve inflamatuvar değildir		(Ghassemi, vd., 2018) (Sabir, vd., 2009)
PEG	FDA onaylı, biyoyumlu, toksik değildir, vücutta ozmotik etkilidir		(Ghassemi, vd., 2018)

1.5.2. Doğal Polimerler

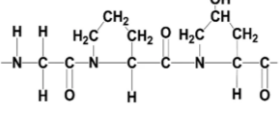
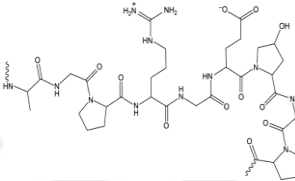
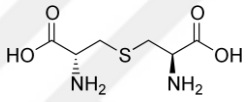
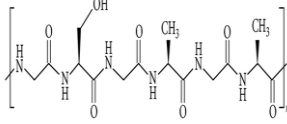
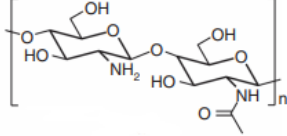
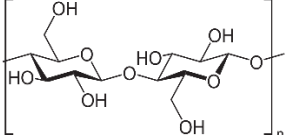
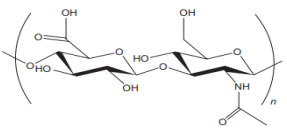
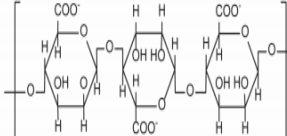
Doğal polimerler, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan, hücre adezyonunu ve fonksiyonlarını desteklemek için HDM ile benzerlik gösteren, doğal olarak türetilmiş, biyoyumlu ve biyobozunabilir polimerlerdir (Shi, vd., 2016). Esas olarak proteinleri (kollajen, keratin, elastin, jelatin ve ipek fibroini) ve polisakkaritleri (selüloz, kitin/kitosan, aljinat, ve hyalüronik asit) içerirler. Genellikle biyoaktivite, biyomimetik yüzey ve doğal olarak yeniden şekillenmeyi garanti eden biyo-fonksiyonel moleküller içerirler (Donnaloja, vd., 2020). Bununla birlikte, spesifik kaynak ve ekstraksiyon süreci, doğal polimerlerin özelliklerini ve sonucunda ortaya çıkan biyolojik aktiviteyi derinden etkileyebilir. Değişkenlikleri nedeniyle üretim prosedürlerinin standardizasyonu, doğal polimerlerin DM'de başarılı bir şekilde kullanılması için kritik öneme sahiptir (Filippi, vd., 2020). Doğal olarak oluşan polimerlerin kullanımı, immünojenik yanıt, mikrobiyal kontaminasyon (endotoksin), azaltılmış ayarlanabilirlik, kontrol edilemeyen bozunma hızı

ve zayıf mekanik güç gibi ana dezavantajları doğurabilir ve kemik dokusu rejenerasyonundaki uygulamalarını sınırlar (Donnalaja, vd., 2020). Tablo 4'te KDM uygulamalarında yaygın olarak kullanılan protein ve polisakkarit yapıları doğal polimerler özetlenmiştir.

Polisakkaritlerden farklı olarak protein yapıları doğal polimerler, integrin bağlama alanları aracılığıyla hücrelerin tutunması ile ilişkili amino asit dizilerini sunar. Bu nedenle polisakkarit bazlı malzemelerde hücre adezyonu ve osteokodüktivitenin kimyasal yüzey modifikasyonları, yapıya integrin bağlama dizilerinin veya hücre adezyon proteinlerinin dahil edilmesiyle artırılabilir (Filippi, vd., 2020). Protein bazlı malzemeler doğal HDM'yi, yapısı, içeriği ve uyarıcı etkileri ile taklit ederek hücrelerin adezyonunu, büyümesini ve organizasyonunu teşvik etme potansiyeline sahiptir. Kollajenler, elastinler, keratinler ve ipek fibroinleri gibi lifli proteinler, bu proteinlere benzersiz mekanik ve mimari özellikler veren oldukça tekrarlayan amino asit dizileri ile karakterize edilir. Bu tekrarlayan amino asit dizileri, yapısal olarak ilginç hiyerarşik malzemeler halinde kendi kendine birleşen protein monomerlerinin, kendiliğinden polimerizasyonunu teşvik eden nispeten homojen ikincil yapıların (örneğin, β -kırıklı tabakalar, sarmal bobinler veya üçlü sarmallar) oluşumuyla sonuçlanır. Dahası, lifli proteinler biyoaktif yapı iskelelerinin tasarlanması için çekici malzemelerdir. (Costa, vd., 2018).

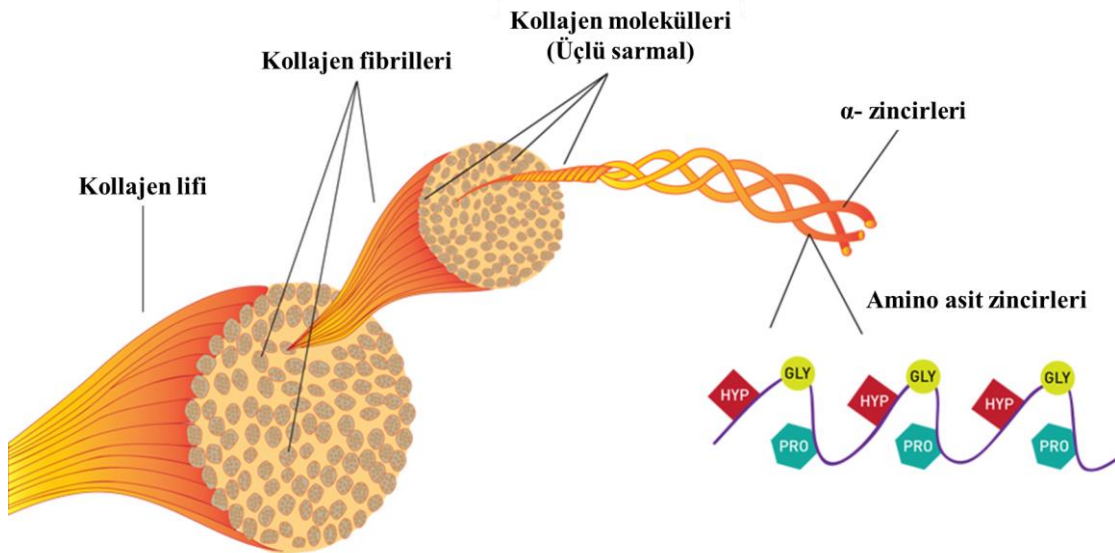
Tablo 4

KDM uygulamalarında kullanılan doğal polimerler ve özellikleri

Polimerler	Karakteristikleri	Kimyasal Yapısı	Referanslar
Doğal Proteinler			
Kollajen	FDA onaylı, biyoyumlu, biyobozunur, biyoyenilenebilir, biyofonksiyonel, HDM'ye benzer, çapraz bağlama özelliği, toksik ve antijenik değildir, zayıf mekanik özellik, düşük stabilite, zor kullanım		(Filippi, vd., 2020) (Donnalaja, vd., 2020) (Gulick, vd., 2019)
Jelatin	Biyoyumlu, biyobozunur, iyi hücre tanıma özellikli, sitoyumlu, toksik değil, kırılabilir, düşük stabilite, düşük antijenite, düşük mekanik özellik		(Filippi, vd., 2020) (Donnalaja, vd., 2020) (Kariduraganava r, vd., 2014)
Keratin	Biyoyumlu, biyobozunur, hücreler etkileşim bölgelerine sahip, biyofonksiyonel, zayıf mekanik özellik		(Filippi, vd., 2020) (Anonim2021a)
İpek fibroin	Biyoyumlu, biyobozunur, yavaş bozunma, esnek, yüksek termal stabilite, yüksek mekanik mukavemet, düşük üretim, yüksek kırılabilirlik,		(Filippi, vd., 2020) (Donnalaja, vd., 2020) (Shen, vd., 2015)
Polisakkaritler			
Kitosan	Biyoyumlu, biyobozunur, biyoyenilenebilir, toksik ve antijenik değildir, ucuz, hızlı bozunma, zayıf mekanik güç ve stabilite, elektrospilme ile zor işleme		(Filippi, vd., 2020) (Neffe, vd., 2014)
Selüloz	Biyoyumlu, ucuz, kolay elde edilebilir, sitoyumlu, kolay manipülasyon, ayarlanabilir özellik, uzun yenileme süresi <i>in vivo</i> 'da yavaş bozunma		(Filippi, vd., 2020) (Donnalaja, vd., 2020) (George and Sabapathi, 2015)
Hyalüronik asit	Biyoyumlu, biyobozunabilir, viskoelastik, sitoyumlu, kolay manipülasyon, hızlı bozunma, düşük mekanik mukavemet		(Donnalaja, vd., 2020) (Kariduraganava r, vd., 2014)
Aljinat	Biyoyumlu, biyobozunabilir, kolay işlevselleştirme, ayarlanabilir özellik, kontrolsüz bozunma kinetiği, düşük mekanik özellikler, zor sterilizasyon ve kullanım		(Filippi, vd., 2020) (Shen, vd., 2015)

Kollajen

Kollajen, memelilerde çeşitli dokuların temel yapısal ve mekanik desteğini sağlayan en bol proteindir. Sığır, sıçan kuyruğu, tavşan kemiği ve domuzda bulunan doğal bir polimerdir ve memeli organizmasındaki proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturan ana yapısal proteini temsil eder (Christy, vd., 2020; Radhakrishnan, vd., 2020). Şimdiye kadar 29 tip kollajen tanımlanmış ve kategorize edilmiştir. Bu başlıca kollajen türleri şunlardır; tip I (tendon ve kemik), tip II (kıkırdak) ve tip III (deri ve damar sistemi). Bu kollajen türleri, doku mimarisi ve bütünlüğünün önemli bir parçasını oluşturan fibriler yapıların bir parçası olarak bulunabilir. En yaygın olanı kollajen tip I'dir ve vücudun kollajeninin %90'ından fazlasını oluşturur. Genellikle tendon ve kemik gibi çoğu bağ dokusunun hücre dışı matriksinde bulunur (Bazrafshan ve Stylios, 2019; Sionkowska ve Kaczmarek, 2016). Şekil 12'de görüldüğü üzere kollajenin moleküler yapısını üç α -zinciri oluşturmakta ve her bir zincir 1000 amino asit içermektedir. Amino asitler, -Gly-X-Y gibi bir dizi oluşturan benzersiz bir üçlü sarmal halinde düzenlenir. En küçük yan grubuyla glisin, sekans üzerindeki her üçüncü pozisyonda tekrar eder ve zincirlerin bir sarmal halinde sıkı paketlenmesine olanak sağlar. Diğer X ve Y pozisyonları ise genel olarak sırasıyla prolin (X) ve hidroksiprolin (Y) amino asitleriyle tanımlanır (Liu, vd., 2019; Radhakrishnan, vd., 2020).



Şekil 12. Kollajenin hiyerarşik yapısal organizasyonu (Qasim, vd., 2019)

Kollajenin doğal dokuya mekanik stabilite, güç ve elastikiyet sağladığı ve biyolojideki ana yapısal materyal olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Bazrafshan and

Stylios, 2019). Hem çok yönlülük hem de insan dokuları ile uyumluluk gösteren biyomalzemeler arayışında, tendon, deri, vasküler greft, kalp kapakçıkları, sinir rejenerasyonu, ilaç dağıtımı, diş ve kemik gibi vücut dokularının onarımı ve değiştirilmesi için kollajen bazlı biyomalzemelere büyük ilgi gösterilmiştir. Bir biyomalzeme olarak kollajenin genel özelliklerinden bazıları, biyoyumluluk, biyobozunabilirlik, liflerinin yüksek mekanik mukavemeti, hücre büyümesi için bir substrat olarak uygunluğu ve kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmayla ayarlanabilir stabilitesidir. Diğer biyomalzemelere kıyasla daha az immünolojik özellik taşır. Ayrıca, hücreye bağlanan RGD sekansına sahiptir, diğer biyomalzemelerde hemen hemen bulunmayan hücrelerin adezyonu, büyümesi ve çoğalmasından sorumludur ve mineralize matriksin birikmesini desteklediği bilinmektedir (Donnalaja, vd., 2020; Radhakrishnan, vd., 2020; Zaokari, vd., 2020). Tüm bu özellikleri dikkate alındığında kollajenler, kolaylıkla filmler/membranlar, hidrojeller, iskeleler ve 3 boyutlu matriksler gibi farklı malzeme formlarına dönüştürülebilir (Christy, vd., 2020). İstenilen biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için geniş malzeme yelpazesi ile rahatlıkla fonksiyonel hale getirilebilir (Radhakrishnan, vd., 2020).

Kollajenin yapısal, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri çeşitli araştırmalarla kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Radhakrishnan, vd., 2020). Kollajenin, iyi bir şişme, jelleşme yeteneği ve enzimatik dehidrasyona karşı mükemmel duyarlılığı vardır. Yapı iskeleleri olarak kullanıldıklarında, hücre göçünü ve doku yenilenmesini artırır. Bu da onu kemik dokusu rejenerasyonu için uygun hale getirir. Doku rejenerasyonunda belirli işlevleri yerine getirmek için kollajen yapı iskelelerinin çapraz bağlanması gerekir. Çapraz bağlama işlemi fiziksel işlemlerle veya kimyasal maddeler kullanılarak yapılabilir (Ferreira, vd., 2012). 1997'de Mizuno ve arkadaşları, iKISH'lerden başlayarak osteogenezde kollajen I yeteneğini rapor etmişlerdir (Mizuno, vd., 1997). Daha sonra, diğer *in vitro* çalışmalar osteoblast proliferasyonunu ve radyal olarak yönlendirilmiş kollajen yapı iskelelerinde osteojenik farklılaşmayı doğrulamıştır (Chen, vd., 2015). Kollajenin bir başka avantajı, diğer birçok biyoaktif bileşik ile birleştirilebilmesi ve bir iletim aracı olarak hizmet vermesidir. Kollajen kendi başına tipik olarak biyoaktif özelliklere sahip değildir, ancak diğer malzemelerle birleştirildiğinde etkili bir yapı iskelesi olarak kullanılabilir (Zaokari, vd., 2020). Örneğin, *in vitro* kültürleri test eden bir çalışmada, insan fetal osteoblastları ekilen nanofibröz hidroksiapatit/kollajen/kitosan iskelesinde kontrol grubuna kıyasla ilgili osteoblast proliferasyonu, mineral birikimi ve

alkalin fosfataz ekspresyonu elde etmişlerdir (Zhang, vd., 2010). Kollajendeki hidroksiapatit biyopolimerin yüzey alanını artırır ve dolayısıyla hücre yapışmasını yönetir (Glowacki and Mizuno, 2008). Osteoindüktivite açısından ilgili kollajen sonuçları dikkate alınarak, hidroksiapatit haricinde farklı inorganik bileşenlerin takviyesi ile ilgili birkaç çalışma daha denenmiştir. Buna örnek olarak, Calabrese ve arkadaşlarının araştırması, hidroksiapatit katkılı kollajen/Mg iskelesi üzerine iAMKH'lerinin ekilmesiyle kollajenin osteojenik aktivitesini göstermiş, *in vivo* fare modeli deneyleriyle de kemik ogmentasyonunu ve artmış osteojenezi doğrulamışlardır (Calabrese, vd., 2016).

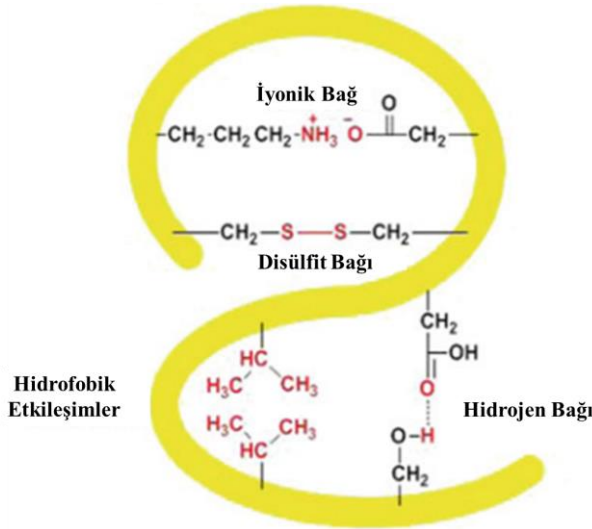
Keratin

Keratin, memeliler, sürüngenler ve kuşlara ait kıllar, yünler, tüyler, tırnaklar ve boynuzlar gibi doğal kaynakların epidermal uzantıları için koruyucu bir tabaka görevi gören başlıca yapısal fibröz bir protein sınıfıdır (Vasconcelos and Cavaco-paulo, 2013). Ayrıca keratin, sistein açısından zengin filament proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşan organik bir materyaldir (Aggarwal, vd., 2020). Yüksek sistein kalıntısı içeriği ile de diğer proteinlerden ayrılır. Sisteinler, keratinin stabilitesine ve üstün mekanik mukavemetine katkıda bulunan moleküller arası disülfür köprülerinden (-S-S-) sorumlu olan sülfür içeren amino asitlerdir (Rouse and Van Dyke, 2010). Amino asit analizi sonuçlarına göre de, toplam amino asit rezidülerinin %7-26'si kadar yüksek konsantrasyonda sistein içerir (Kumawat, vd., 2018). Bir keratin proteini, amino asit zincirlerine dayalı bir birincil yapı ile tanımlanır. Bu zincirler amino asitlerin sayısı, dizisi, polaritesi, yükü ve boyutu açısından farklılık gösterir (Donato and Mija, 2020).

Keratin, omurgalıların epitel hücrelerinin en karmaşık proteini ve bu protein, selüloz ve kitinden sonra sert, lifli ve çevrede en bol bulunan üçüncü polimerdir. Yapısındaki sülfür içeriği ve moleküler ağırlıkları bakımından, keratin proteinleri esas olarak α -keratin (sert keratin) ve β -keratin (yumuşak keratin) olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır (Kumawat, vd., 2018). Kompakt ve sert bir yapı sunan α -keratinler, sistein açısından zengin bir protein matriksine gömülü sıralı filamentler oluşturur ve daha az sayıda hidroksiprolin ve prolin amino asit içerir; bunlar büyük ölçüde yün ve saç gibi dokularda bulunur. β -keratinler ise gevşek bir şekilde paketlenmiş filament demetleri oluşturan uzama ve gerilim salınımı sağlama işlevine sahip “yumuşak” keratinlerdir. Alanin ve glisin bakımından zengindir, ancak sistein, hidroksiprolin ve prolin bakımından fakirdir; bu

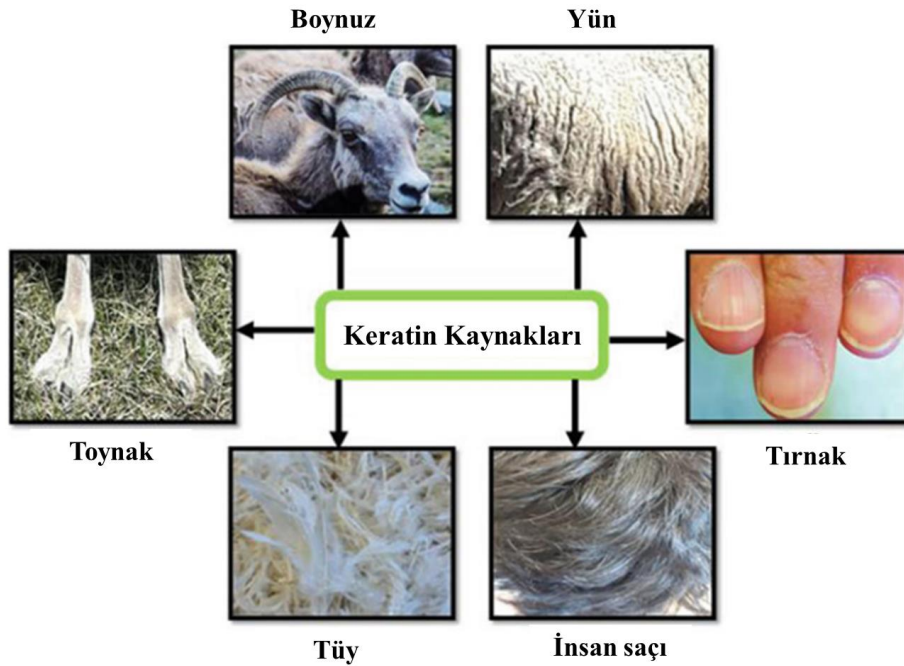
proteinler çoğunlukla kuş tüyleri, balık pulları ve diğer dokularda bulunur (Donato and Mija, 2020; Vineis, vd., 2019). Keratinlerin X-ışını kırınımı ile moleküler yapısı incelenerek karakteristik α ve β kırınım modeli (X ışını kırınım modeli) ortaya çıkarılmıştır. Bu protein, skleroprotein grubuna aittir. Keratinlerin dayanıklılığı, son derece yüksek moleküler ağırlığa sahip karmaşık yapılarının doğrudan bir sonucudur (Kumawat, vd., 2018). Keratinler, organik çözücülerin çoğunda kimyasal olarak oldukça kararlı ve çözünmez bileşiklerdir (Vineis, vd., 2019). Yapısındaki disülfid bağları, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler nedeniyle pepsin, tripsin ve papain gibi proteoliz yoluyla kısmen asimile edilebilir (Aggarwal, vd., 2020; Kumawat, vd., 2018).

Keratinler genellikle katlanmış bir konfigürasyona sahiptir. Polipeptit omurgası, keratin liflerinin ardışık katlanmasına izin veren bir dizi yan zincir içerir. Gerilim altındaki bu yapılar düzleşir, ancak serbest bırakıldıklarında orijinal biçimlerine kavuşurlar. Keratin lifinin elastik doğası, proteinin α ve β -sarmalları konfigürasyonu arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Zincir içi ve zincirler arası bağlar olarak bulunan sistein molekülleri arasındaki disülfür bağı, iyi stabilitesinden ve daha az çözünürlükten sorumludur. Enzimatik reaksiyonlara karşı iyi miktarda direnç sağlayabilen kararlı bir üç boyutlu yapının oluşmasına yardımcı olur. İyonik bağlar, amonyum katyonları ile karboksilik anyonlar arasındaki keratin yapısında da mevcuttur. İyonik bağlar pH'a bağlıdır, çünkü bunlar şiddetli asidik veya bazik koşullarda en düşüktür (Şekil 13) (Saha, vd., 2019).



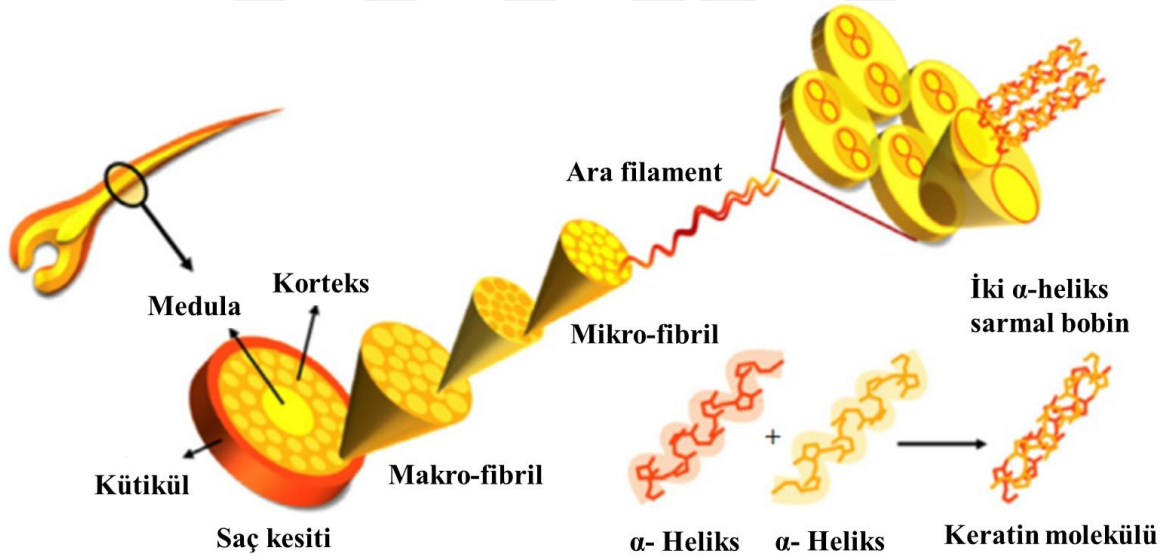
Şekil 13. Keratinin polipeptit zinciri (Saha, vd., 2019)

Doğa, dünyaya bir dizi faydalı organizma sağlamıştır. Bunların arasında çok az sayıda mikroorganizma, keratin proteinini parçalayabilir ve bunları bir besin kaynağı olarak kullanabilir. Keratofilik mikroflora (mantarlar ve bakteriler) doğanın armağanıdır ve keratin atığını bozma kabiliyetine sahip organizmaların en büyük grubudur. Keratin atığının biyolojik olarak parçalanması, fiziksel ve kimyasal bozunmadan daha etkili olmakta ve ancak, doğa için çok miktarlardaki atık ürünlerin bozunması bir o kadar da zordur. Keratin atığının ana üreticisi, milyonlarca ton keratin içeren protein üreten ABD, Çin, Hindistan ve Brezilya'dır. Doğadaki keratin atıkları, ticari kümes hayvanı işleme tesislerinden, deri endüstrisinden, yün endüstrisinden, tekstil endüstrisinden ve mezbahalardan büyük miktarlarda üretilmektedir. Ek olarak, berber ve kuaför dükkanları da en önemli keratin kirlilik kaynaklarıdır ve genellikle şehir bölgesinde, büyük miktarlarda katı atık olarak birikmektedir (Şekil 14). Keratin biyokütlelerinin imhası, yakıt için yanmaları verimsiz ve kirleticiliği (yüksek kükürt içeriği) nedeniyle sık karşılaşılan bir problemdir. Olumsuz çevresel etkiye sahip kirletici endüstriler olarak kabul edilirler ve bu atıklar insan sağlığı veya çevre (toprak, hava, su) için potansiyel bir tehlike oluşturabilir (Kumawat, vd., 2018; Vineis, vd., 2019). Dahası, dünya çapında yılda yaklaşık 300.000 ton saçın atıldığı ve kuaförlerin, hastanelerin vb. atıklarından keratin açısından zengin kaynaklar sağlandığı bildirilmiştir. Bu gibi kaynaklardan elde edilen keratinler, özellikle kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee, vd., 2014).



Şekil 14. Keratinlerin çeşitli biyokütle kaynakları
(Saha, vd., 2019)

İnsan saçı keratinleri, nem içeriğine bağlı olarak %65-96 protein, %1-9 lipid, %3 melanin ve minör komponentlerden oluşan sert keratin olarak sınıflandırılır (Lee, vd., 2014). Sert keratinler, bir sistinerik protein matriksine gömülü ara filamentlerin sıralı dizilerini oluşturur ve epidermal uzantıların sağlam yapısına katkıda bulunur (Rouse and Van Dyke, 2010). Genel olarak her bir keratin lifi, kütikül, korteks ve medulla olarak üç ana bölümden oluşmuştur (Şekil 15). Lifin ince dış yüzeyini oluşturan kütikül, iç katmanları koruyan ve nemi tutan 5-12 katmanlı, pullu ve boru şeklinde bir tabakadır. Kütikül tabakası toplam ağırlığın %10'unu oluşturur ve esas olarak saç lifini, fiziksel ve kimyasal hasarlardan koruma işlevi gören β -keratinleri içerir. Korteks, keratin ara filamentlerin bulunduğu yer olup keratinöz olmayan proteinler ve lipidlerden oluşur. Medulla ise, saç lifinin merkezinde bulunan yumuşak ve gevşek bir şekilde paketlenmiş keratinize hücrelerden oluşan bölgedir (Costa, vd., 2018; Lee, vd., 2014; Rouse ve Van Dyke, 2010). Saç lifinin özellikle korteks katmanında bulunan alfa-keratinler, benzersiz yapısı ve biyolojik işlevi nedeniyle biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi görmüştür (Lee, vd., 2014).



Şekil 15. α -keratin liflerinin yapısı
(Lee, vd., 2014)

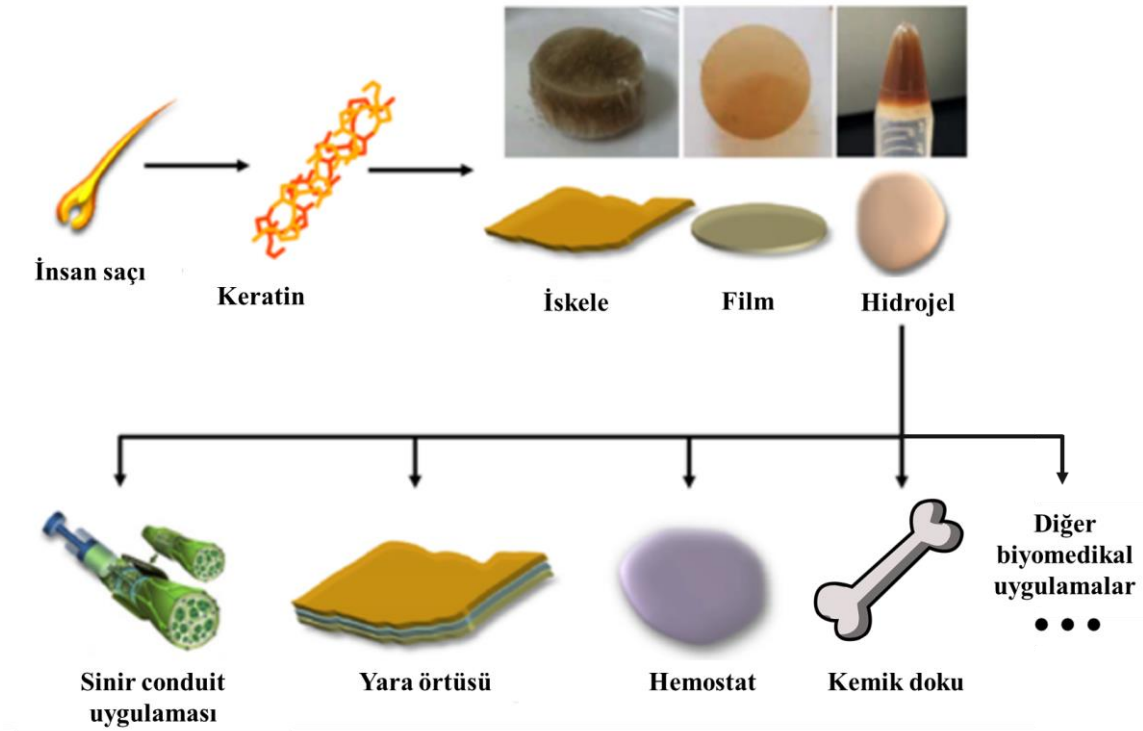
İnsan saçı liflerinde yüksek oranda korunmuş bir merkezi alanda bulunan α -keratinler, moleküler ağırlık ve bileşimine göre tip I (asidik) keratin ve tip II (nötr-bazik) keratin olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Saç keratinlerinin yapısal alt birimleri olan bu tip I ve tip II keratinler, bir keratin ara filamentinin normal montajı sırasında birbirleriyle etkileşime girerek heterodimer oluşturur. Heterodimerler daha sonra paralel bir şekilde

etkileşerek tetramerleri oluştururlar. Bu hiyerarşik süreçler, 10 nm uzunluğunda sarmal bobin ara filamentlerin nihai polimerizasyonuna kadar devam eder. Sarmal bobin ara filamentlerin oluşumu sırasında dönme yönleri, dimer, tetramer, oktamer ve benzerlerini oluşturmanın her aşamasında değiştirilir. Son olarak, alfa-keratinlerin üst yapısı olan makrofibril oluşumu, binlerce mikrofibril demeti ile tamamlanır (Lee, vd., 2014; Singh, vd., 2017).

Keratin proteini fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların etkisine büyük ölçüde dirençlidir (Kumawat, vd., 2018). Ancak kozmetik veya biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için uygun ortam ve koşullarda ekstraksiyonu gerçekleştirilmelidir. İnsan saçından keratinin verimli bir şekilde ekstraksiyonu için, çeşitli reaktiflerin kombinasyonları kullanılarak ısı, mekanik kuvvet ve hidroliz tamponunun kullanımı dahil olmak üzere çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Özellikle bu işlem, delipidizasyon, ekstraksiyon, diyaliz ve dondurarak kurutma dahil olmak üzere dört adımdan oluşur. Bu süreçler, keratinleri çapraz bağlı olmayan formlarına dönüştüren sisteinler arasındaki disülfid bağlarını koparmak için oksidatif veya indirgeyici kimyasal reaksiyonlara dayanır (Costa, vd., 2018).

Keratin araştırmalarının temeli, biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere birçok keratin bazlı biyomalzemenin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu temel, bu biyomalzemelerin genel fiziksel, kimyasal ve biyolojik davranışına katkıda bulunan keratinlerin birkaç temel özelliğine dayanmaktadır. İlk olarak, ekstrakte edilmiş keratin proteinleri, kendi kendine bir araya gelme ve polimerize olma özelliğine sahiptir. Keratin solüsyonlarının kendiliğinden düzenlenme eğilimi hem mikro ölçek hem de makro ölçek seviyelerinde kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu kendiliğinden düzenlenme, doğru gerçekleştiğinde, keratin bazlı malzemelerin yeniden üretilebilir yapısından, boyutluluğundan ve gözenekliliğinden sorumludur (Rouse and Van Dyke, 2010). Ek olarak, yün ve insan saçından türetilen keratin biyomalzemelerinin hücre bağlanması ve büyümesini destekleyebilen RGD (arginin-glisin-aspartik asit) ve LDV (lösin-aspartik asit-valin) gibi hücre bağlanma motiflerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu motifler, çeşitli hücre dışı matriks (HDM) proteinlerinde bulunan iyi yapılandırılmış aynı hücre bağlanma dizileridir (Vasconcelos and Cavaco-paulo, 2013). Keratinin bu özellikleri ile birlikte, hücresel infiltrasyon, tutunma ve çoğalmaya olanak sağlayan uygun bir üç boyutlu matriks oluşturur (Rouse and Van Dyke, 2010).

Keratinler, gelişmiş özelliklerinin yanı sıra yenilenebilir, sürdürülebilir, biyoyumlu ve biyobozunabilir bir doğal kaynaktır. Bu eşsiz özellikleri keratini çeşitli uygulamalar için umut verici bir aday haline getirmiş, özellikle de yün ve insan saçı kaynaklarından yararlanma isteği, son otuz yılda keratin biyomalzemesi araştırmalarını arttırmıştır (Saha, vd., 2019). Biyomedikal amaçlar için ekstraksiyonu gerçekleştirilen keratinler, filmler, hidrojeller, yapı iskeleleri, kaplamalar dahil olmak üzere çok çeşitli formlarda biyomalzemelerin tasarımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Şekil 16) (Donato and Mija, 2020). Bu keratin temelli malzemelerin biyoaktivitesini ve biyoyumluluğunu göstermek için birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Geçmişten günümüze kadar çeşitli biyomalzeme türleri ile keratin, yara iyileşmesi, ilaç dağıtımı, kemik rejenerasyonu, nöral onarım, hemostaz gibi klinik uygulamarda sınırsız bir kaynak olarak kullanılmaktadır (Vasconcelos and Cavaco-paulo, 2013).



Şekil 16. Biyomedikal uygulamalarda insan saçı keratinin kullanımı (Donato and Mija, 2020)

Özellikle kemik rejenerasyonu için, de Guzman ve diğerleri (2013) elde ettikleri keratoz malzemesini kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) faktörünü kullanarak yeni bir taşıyıcı-iskele olarak değerlendirmiş ve sıçan modelinde keratoz iskelelerinin osteojenezi indüklediği bildirilmiştir. Zhao ve diğerleri (2015), üretilen keratin-PCL-CaP kompozit malzemesinin hücre çoğalmasını arttırdığını tespit etmiş, Tachibana ve diğerleri (2005)

keratin-CaP hibrit malzemesi ile de preosteoblastların farklılaşmaya yöneldiğini göstermiştir. Arslan ve diğerleri (2017) ise keratin-kollajen-HA temelli yapı iskelelerinin osteojenik etkisini incelemiş ve geliştirdikleri biyokompozit malzemenin KDM uygulamalarında kullanılma potansiyeli olduğunu vurgulamışlardır.

1.5.3. Metaller

Metaller, KDM’de esas olarak yüksek mekanik performansları nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Koons, vd., 2020). Metal biyomalzemeler, genel olarak hafif, dayanıklı, biyoyumlu ve osteokondüktiftir. Ancak kemik oluşum belirteçlerini inhibe edebilir, kemik kaybını veya rezorpsiyonunu uyarabilir, sertlik farkından dolayı çevredeki kemikle zayıf osseointegrasyon gösterebilir ve inflamatuvar yanıtlara neden olabilecek korozyonla toksik iyonlar salabilirler (Ghassemi, vd., 2018). Titanyum (Ti), magnezyum (Mg), tantalyum (Ta), demir (Fe), zirkonyum (Zr) ve paslanmaz çelik gibi metal alaşımları diş ve ortopedik cerrahide implantasyon malzemesi olarak kullanılan çeşitli metalik malzemelerdir. KDM uygulamaları için, eklem replasmanında ve kırık fiksasyon implantlarında kemiğin iyileşmesine destek sağlamak amacıyla kullanılırlar (Turnbull, vd., 2018). Bununla birlikte, metalik biyomalzemelerin ana dezavantajı, biyolojik ortamlarda bozunmamalarıdır. Günümüzde titanyum, tantalyum, magnezyum ve alaşımları, dental ve ortopedik implantlar için en sık kullanılan metalik biyomalzemelerdir (Chocholata, vd., 2019).

Titanyum (Ti), düşük yoğunluklu, yüksek mukavemetli, dayanıklı, biyoyumlu ve korozyona karşı aşırı dirence sahip oldukça parlak bir geçiş metalidir. Düzgün yüzeyli Ti implantlar biyoaktif değildir ve iyi osteointegrasyon özellikleri göstermezler (Dhivya, vd., 2015). Titanyum yüzeyler, kimyasal olarak modifiye edilebilir veya yüzey topografileri, osteointegrasyonu destekleyen kalsiyum fosfatların nükleasyonunu ve aynı zamanda uygun bir konakçı immün tepkisini sağlayarak onları biyoaktif hale getirmek için değiştirilebilir. Yine de, titanyum tek başına biyolojik ortamlarda bozunmadığından, KDM uygulamaları için ideal bir biyomalzeme türü olarak kabul edilmez (Koons, vd., 2020). Özellikle iskelet olgunluğuna ulaşmamış pediatrik hastalarda kullanıldıklarında, metal implantlarının çıkarılması için sıklıkla ek cerrahi gereklidir (Turnbull, vd., 2018). Öte yandan, titanyum alaşımları üstün güce sahip olmasına rağmen, toksik veya alerjenik olabilen bileşenler içermektedir (Chocholata, vd., 2019).

Magnezyum (Mg) ve alaşımlarının, biyoyumluluğu, biyoemilebilirliği, uygun mekanik özellikleri, inflamatuvar veya sistemik yanıt indüklemedikleri, osteokondüktiviteyi, kemik büyümesini teşvik ettikleri ve hücrelerin tutunmasında rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, biyobozunabilir özellikleri nedeniyle, malzemenin çıkarılması için ikinci ameliyattan kaçınılabılır. Tüm bu gerçekler, Mg'nin yük taşıyıcı bir biyomalzeme olarak KDM'de önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Alvarez and Nakajima, 2009). Bir dizi çalışma, Mg-Ca alaşımlarının ortopedik uygulamalar için biyobozunabilir biyomalzeme olarak *in vitro* ve *in vivo* ortamlarında değerlendirmiştir (Li, vd., 2008). Bununla birlikte, çözünmüş Mg'nin toksisitesi ile ilgili endişeler artmıştır, ancak bir başka çalışmada fazla magnezyumun vücuttan idrarda verimli bir şekilde atıldığı gösterilmiştir (Saris, vd., 2000). Ek olarak, Mg'nin fizyolojik koşullarda bozunma hızı hızlı olduğundan, saf Mg'nin kullanımına ilişkin endişeler devam etmektedir (Alvarez and Nakajima, 2009).

1.5.4. Biyoseramikler

Biyoseramikler, mekanik olarak güçlü biyomalzemelerdir, örneğin seramik kompozitler, amorf camlar ve kristalin seramikleri içerir. Biyoaktif camlar ve cam seramikler, sadece kemik doku mühendisliğinde değil aynı zamanda ortopedi ve diş hekimliğinde de kullanılan biyomalzemelerdir. Kemik doku mühendisliğinde en sık kullanılan biyoseramikler hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve bunların kompozitleridir. Kemik rejenerasyonu için uygulanan HA ve TCP seramik iskeleler, yüksek mekanik sertlik, çok düşük elastikiyet ve kırılabilirlik ile karakterizedir. Doğal kemiğe kimyasal benzerliklerinden dolayı mükemmel biyoyumluluk gösterirler ve osteoblastların iyi farklılaşmasını ve proliferasyonunu kolaylaştırırlar. Öte yandan, kırılabilirlikleri mekanik yükleme ve bozunma hızı kontrolü ile ilgili sorunlara neden olabilir (Chocholata, vd., 2019).

Biyoaktif camlar (BC) KDM alanında kapsamlı bir şekilde araştırılmış olan bir seramik malzeme alt grubunu temsil eder. BC'ler, amorf yapılara sahip yüzey reaktif cam-seramik biyomateryaller olarak düşünülebilir ve inorganik, sentetik ve biyoyumlu bir malzemedir. Biyoaktivitesi, fizyolojik sıvı ile reaksiyona girdiğinde karbonatlı HA oluşumu yoluna kemik dokusuna bağlanma kabiliyetinden gelir. Bu malzeme grubunun öncülüğünü ilk olarak 1960'ların sonlarında Florida Üniversitesi'nde Profesör Larry Hench,

Vietnam Savaşı gazilerini tedavi etmek için kemik ikame malzemeleri bulmaya çalışırken yapmıştır. BC alanı, en biyoaktif olan 45S5 Bioglass® olarak bilinen Na₂O (sodyum oksit)-CaO (kalsiyum oksit)-SiO₂ (silika)-P₂O₅ (fosfor pentoksit) camlarının geliştirilmesi ile başlamıştır. Biyoaktif bir cam, konakçı dokuya nakledildikten sonra yavaş yavaş çözünür ve çözünme nedeniyle iyonlar salınır. Biyoaktif camın çözünmesi ile, camın yüzeyinde biyoaktif bir HA tabakasının oluşumuna neden olur ve bu da, güçlü bir bağ oluşturmak için konakçı kemiğin kollajen fibrilleri ile etkileşime girer Kalsiyum ve silika iyonları gibi çözünme ürünlerinin de konakçı hücreleri kemik matriksi üretmesi için uyardığı düşünülmektedir (Khurshid, vd., 2018; Turnbull, vd., 2018). Ayrıca, gen transdüksiyon yollarını aktive etmek için gerekli olan silika iyonlarını sağladıkları için farklılaşmayı ve osteojenezi iyileştirebilirler (Jell and Stevens, 2006). Kemik dokusu içerisinde biyoaktif camların, osteoindüktif özellikleri için kanıtlar daha sınırlı olmasına rağmen, osteokondüktif malzemeler olarak nitelendirilebilirler. BC'lerin birbirine bağlı gözenekli yapısı, trabeküler kemiğe benzer ve hücrelerin yenilenmesi için geçici bir şablon sağlar. Dezavantajları olarak, yük taşıyıcı uygulamalarda inorganik malzemelerin kullanılmasını sınırlandıran özellikleri ise düşük mukavemet ve kırılabilirlikleridir. En yaygın kullanım alanları kemik dolgu malzemeleri, küçük kemik implantları, ortopedik implantların kaplanması ve diş ile ilgili uygulamalarıdır (Chocholata, vd., 2019; Turnbull, vd., 2018). Biyoaktif camların üretimi için kullanılan iki ana üretim süreci eriyik söndürme ve sol-jel yöntemidir. Eriyik söndürme, suda veya bir grafit kalıpta oksitleri söndürmeden önce yüksek sıcaklıkta eritmeyi içerir; 45S5 BC ve diğer ticari biyoaktif camlar bu yöntemle yapılır. Sol-jel yöntemi ise, çözeltilerin daha düşük sıcaklıklarda jelleştirilmesi ile biyoaktif cam nanopartiküllerinin sentezini içerir. Elde edilen cam, geniş bir yüzey alanına sahip olup nano gözeneklere sahiptir. Aynı bileşime sahip eriyik söndürme yöntemi ile hazırlanan iskeleye kıyasla bu camların bozunması, daha hızlı HA dönüşümü ve özellikle kontrollü olarak nano ölçekte nihai formlar (tozlar, monolitler, nanopartiküller ve jeller) elde edilir (Chocholata, vd., 2019; Erol-Taygun, vd., 2019; Khurshid, vd., 2018; Turnbull, vd., 2018).

Hidroksiapatit (HA) (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), kemiğin önemli bir doğal inorganik bileşeni olarak mükemmel biyoaktivite, biyoyumluluk, kontrollü degradasyon, toksik olmayan ve anti-inflamatuar gibi KDM için kritik özelliklere sahiptir (Chocholata, vd., 2019). Kemik dokusu ile güçlü bir bileşimsel benzerlik gösterir ve kanıtlanmış osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri, HA yapılarını çevreleyen kemik ile güçlü bir

bağ oluşturmaya izin verir (Turnbull, vd., 2018). Osteokondüksiyon, osteointegrasyon ve osteoindüksiyonu (belirli koşullarda) içeren olumlu biyolojik özelliklerinden ötürü de yaygın olarak yapay kemik ikameleri olarak kullanılır. HA yalnızca Ca ve P iyonları içerir ve bu nedenle hiçbir çalışmada olumsuz lokal veya sistemik toksisite bildirilmemiştir (Kattimani, vd., 2016). HA ayrıca, kemik morfogenetik proteini gibi osteojenik büyüme faktörlerinin endojen ekspresyonunu uyarabilir ve mezenkimal kök hücrelerde (MKH'ler) alkalik fosfataz (ALP) aktivitesini arttırabilir. ALP aktivitesi, kemik oluşumu ile ilişkili erken mineralizasyon sürecinde çok kritik rol oynadığından bu durum özellikle önemlidir. Bununla birlikte, diğer seramiklerde olduğu gibi HA'nın sert ve kırılabilir olma özellikleri vardır. Bu da HA'nın yük taşıma ve manipülasyonunu bireysel kemik kusurlarına özgü şekillere dönüştürülmesini sınırlar. Diğer yandan HA, *in vivo* ortamlarda yavaş bir bozunma oranına sahiptir ve bu durum implant bölgelerinde mekanik problemler doğurabilir. Bu mekanik sınırlamaların üstesinden gelebilmek için HA, kompozit yapı iskeleleri oluşturmak üzere çeşitli doğal veya sentetik polimerler ile birleştirilmelidir (Turnbull, vd., 2018).

Trikalsiyum fosfat (TCP), günümüzde mevcut olan ticari ürünlerle KDM'ne uyarlanmış bir başka popüler biyoseramiktir. MKH'lerin *in vivo* osteojenik farklılaşmasını destekler ve genellikle iskelelerin üretimi için kullanılır. Aljinat jel ile kombinasyon halinde enjekte edilebilir üç boyutlu beta-TCP (β -TCP) iskeleleri de mevcuttur (Matsuno, vd., 2008). β -TCP allotropu ayrıca, bir spinal füzyon modelinde otogreftlere eşdeğer klinik performansa sahip gözenekli yapı iskeleleri üretmek için tip I kollajen ile birleştirilmiştir (Kurien, vd., 2013). Nanokompozit TCP/kollajen iskele performansı da *in vivo* olarak HA yapı iskeleleriyle olumlu bir şekilde karşılaştırılmıştır. Bir tavşan segmental femur kemik defektine implante edilmiş TCP/kollajen iskeleleri, kollajen/HA iskelelerine göre daha iyi kemik oluşumu gösterdiği tespit edilmiştir (Mohseni, vd., 2018).

1.5.5. Kompozit Biyomalzemeler

Kompozitler, tekli bileşenlerinden daha iyi performans gösterebilmeleri nedeniyle önemi giderek daha da artan önemli bir biyomalzeme sınıfıdır (Koons, vd., 2020). Kompozit biyomalzemeler, değişik yapı ve özellikteki iki veya daha fazla malzemeyi belirli fazlar oluşturacak şekilde birleştirmek için tasarlanmıştır. Kompozit malzemelerin kullanılmasının amacı, temel olarak sahip oldukları özelliklerin tek bir yapı altında

birleştirilmesiyle malzemelerin işlenebilirliğini, yük performansını, mekanik özelliklerini ve biyoaktivitesini iyileştirmektedir (Qu, vd., 2019). Birçok araştırmacı polimerler, metaller ve biyoseramik veya biyo-camları birleştirirerek farklı özellikler içeren kompozit biyomalzemeler üzerinde çalışmalar yapmıştır. Genel kompozit biyomalzemeleri, metal matriks kompozitleri, polimer matriks kompozitleri, seramik matriks kompozitleri olarak matriks fazlarına göre ayrılmaktadır (Qu, vd., 2019). Metal matriks kompozit malzemelerinin matriks fazı Mg, Fe ve Al gibi metalik iyonları içerir (Glenske, vd., 2018). Özellikle, metaller KDM malzemesi olarak yüksek mukavemet, süneklik ve korozyon direnci için tercih edilir. Ancak düşük biyouyumluluk, doğal dokuya kıyasla çok yüksek sertlik, yüksek yoğunluklar ve olası alerjik doku reaksiyonları ile metal iyonlarının salınması açısından sorunlar sunabilir (De Santis, vd., 2019).

Son yıllarda, biyomedikal alanlarda polimer matriks kompozitler ve seramik matriks kompozitlerin uygulanması, KDM malzemelerinde büyük ilerleme kaydetmiştir. Polimer kompozitler, biyobozunabilirlik, esneklik, işlenebilirlik gibi çeşitli mükemmel özelliklere sahiptir (Qu, vd., 2019). Biyoseramik malzemeler, yüksek mekanik sertlik, düşük elastikiyet ve kırılma dayanıklılık özellikleri ile karakterizedir. Özellikle en sık kullanılan olan HA, doğal kemiğin ana inorganik bileşenleridir. Bu sert partiküllerin polimer matriksi boyunca dağılması ile kompozitleri mekanik olarak güçlendirir ve biyoaktiviteleri ile kemik dokusuna artan rejeneratif özelliği kazandırabilir (Koons, vd., 2020; Qu, vd., 2019). Çoğunlukla, biyoseramikler veya biyo-camlar, mekanik özelliklere ek olarak biyoaktiviteyi iyileştirmek için polimer matriksine bir kaplama veya dolgu maddesi olarak eklenir (Turnbull, vd., 2018). Biyoseramik malzemelerde takviye faz olarak KDM'de lokal etkiler sağlayan, inorganik faz olarak da nitelendirilen biyoajanlar (Si, B vb.) kullanılmıştır (Mülazim, vd., 2011). İnorganik biyoajanların seramik malzemelere çeşitli tekniklerle modifiye edilmesi veya birlikte kullanılması ile kemik rejenerasyonunda artış gözlemlenmektedir. Bu biyoaktif iyonların osteoblast aktivitesi üzerinde etkilerinin olduğu gösterilmiş olup KDM'de terapötik ajanlar olarak da kullanılabilmesi desteklenmiştir. Özellikle B'nin etkileri, kemik metabolizmasında iyileşme göstererek geniş çapta bildirilmiştir (Balasubramanian, vd., 2018).

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zhao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, elektroğirme yöntemiyle üretilmiş keratin-polikaprolakton (PCL) kompozit malzemeleri üzerine homojen bir şekilde, kemik dokunun yapısında bulunan kalsiyum fosfat (CaP) kaplaması elde etmek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. PCL içerisindeki keratin, CaP ile kaplanmadan önce çözünürlüğü azaltmak için çapraz bağlanmıştır. Elde edilen keratin-PCL-CaP kompozit malzeme üzerine insan mezenkimal kök hücreleri (iMKH) ekilerek, hücrelerin canlılığı ve çoğalması incelenmiştir. Deney sonucunda elde edilen kompozit malzemenin hücre çoğalmasını arttırdığı tespit edilmiş ve mekanik kuvvetinde, diğer geleneksel kaplama yöntemleriyle karşılaştırıldığında bir gelişme göstermiştir. Sonuç olarak, biyouyumlu bir kemik doku mühendisliği iskelesi geliştirme yaklaşımı, gelecekte daha fazla in vitro osteojenik farklılaşma çalışmaları için de kullanılacaktır (Zhao, vd., 2015).

Kakkar ve ark. (2014) dondurarak kurutma yöntemi ile keratin, kitosan ve jelatin içeren yeni bir biyomimetik yapı iskelesi hazırlamış ve hazırlanan keratin kompozit yapı iskelesinin iyi bir yapısal bütünlüğe sahip olduğunu belirtmiştir. FTIR spektroskopisi, iskelede kullanılan biyopolimerlerin (keratin, kitosan ve jelatin) doğal yapısının korunduğunu göstermiştir. TGA ve DSC sonuçları, iskelenin yüksek termal denatürasyon sıcaklığını (200–250 °C) ortaya çıkarmıştır. SEM analizi kullanılarak gözlemlenen keratin kompozit yapı iskelesinin morfolojisi, iyi gözeneklilik ve gözeneklerin birbirine bağlanabilirliğini sergilemiştir. NIH 3T3 fibroblast hücrelerinin kullanıldığı MTT testi ile de keratin kompozit iskelenin hücre canlılığının iyi olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemler, keratin-kitosan-jelatin kompozit yapı iskelesinin doku mühendisliği uygulamaları için umut verici bir alternatif biyomalzeme olduğunu göstermiştir (Kakkar, vd., 2014).

Mori ve Hara (2018), yün keratini hidrojelinin mekanik olarak sıkıştırılmasıyla şeffaf bir keratin filmi hazırlamışlardır. Hazırlanan keratin filmi ve hidrojeli, mekanik çekme testi, in vitro biyobozunma ve biyouyumluluk testi ile karakterize edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ile, keratin filminin iltihaplanma veya kapsüllenmeye neden olmadan biyouyumlu olduğu, mekanik olarak keratin hidrojelinin daha yüksek mekanik mukavemet sergilediği ve bozunmaya karşı keratin hidrojele göre daha dirençli olduğu sonuçlarına varılmıştır (Mori and Hara, 2018).

de Guzman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri keratoz biyomateryalini yeni bir taşıyıcı/iskele olarak değerlendirmiş ve osteoindüktif faktör olarak

bilinen kemik morfogenetik protein 2'nin salınımını bu iskele üzerinde kontrol etmişlerdir. BMP-2 faktörü ile muamele edilen bu keratoz iskeleler sıçanda kritik boyutta oluşturulmuş femoral defektli bölgeye transplante edilmiştir. Keratoz iskelelerinin sadece osteojenezi indüklememekle beraber adipoz doku oluşumunu da baskılayabildiği belirtilmiş ve kemik rejenerasyonunu arttıran biyomateryal arasında yerini almıştır (de Guzman, vd., 2013).

Aran ve ark. (2020) bu çalışmada, saç folikülü kök hücrelerinin doğal kollajen iskeleler üzerine ekilmesi ile kemik hücrelerine farklılaşma kapasiteleri araştırılmıştır. Kök hücreler, erkek Wistar bıyığında izole edilerek kültürlenmiş ve osteojenik ortamda indüklenmiştir. Kültür sonunda; morfolojik değişiklikler, kalsifikasyon seviyeleri ve kemiğe özgü genlerin ekspresyonu dahil olmak üzere farklılaşma parametreleri tespit edilmiştir. Hidrojel preparasyonu ve yapı iskelesi, ekstrakte edilmiş kollajen kullanılarak üretilmiş ve SEM ile görüntülenmiştir. Kök hücrelerin büyümesi, iskele ve iskele dışı koşullarındaki değişiklikler karşılaştırılmış, her iki durumda da kübik bir morfoloji sergileyerek osteositlerin farklılaşma işaretlerini ortaya çıkardığını göstermiştir. Histolojik boyama ile kalsiyum kütlesinin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Osteopontin ve ALP genlerinin ekspresyonu, farklılaşmayı güçlendirmiştir. SEM görüntüleri, kaydedilen gözenekliliğin hücrelerin bağlanması ve bağlanması için uygunluğunu kanıtlamıştır. Veriler, kök hücrelerin osteoblastik farklılaşma için önemli bir kapasiteye sahip olduğunu ve kollajen iskelelerinin uygun bir matris olduğunu göstermiştir (Aran, vd., 2020).

Grabska-Zielińska ve ark. (2020) yaptıkları bu çalışmada, kollajen, ipek fibroin ve kitosandan yapılan üç boyutlu biyopolimerik iskeleler dondurarak kurutma yöntemi ile başarıyla hazırlanmıştır. Malzemeler için çapraz bağlama maddesi olarak dialdehit nişastası (DAS) kullanılmıştır. Malzemelerin yoğunluk ve gözeneklilik ölçümleri, SEM görüntüleme, şişme ve nem içeriği ölçümleri kullanılarak incelenmiştir. Ek olarak, MG-63 osteoblast benzeri hücreler ile temas halindeki materyallerin sito-uyumluluğu, Live/Dead (canlı/ölü) testi ile 1., 3. ve 7. günlerde test edilmiştir. Üç boyutlu biyokompozit yapıların yüksek şişme kabiliyetine sahip hidrofilik olduğu bulunmuş ve DAS ile çapraz bağlanma sonucu % şişme oranı artmış, ancak gözeneklilik, yoğunluk ve nem içeriğini düşürmüştür. Yapıda DAS'ın varlığı, SEM tarafından gösterildiği gibi çapraz bağlı olmayan örneklerle kıyasla iskelelerin mikro yapısını etkilememiştir. Sonuç olarak, test edilen tüm numunelerin sito-uyumlu olduğu, Live/Dead ve metabolik aktivite testi ile gösterildiği gibi MG-63 hücrelerinin yapışmasını ve büyümesini desteklediği bulunmuştur (Grabska-Zielińska, vd., 2020).

Lv ve ark. yaptıkları bu çalışmada, insan saç keratini, ipek, jelatin ve kalsiyum peroksitten (CPO) oluşan yeni bir oksijen üreten iskele türü bildirmişlerdir. Optimum oranlarda kullanılan malzemelerin mükemmel mekanik özellikler, sito-uyumluluk ve oksijen üretme yeteneği gösterdiği bildirilmiştir. İskelenin ayrıntılı yapısı, konfokal lazer ve elektronik tarama mikroskobu ile ortaya çıkarılmıştır. CPO partiküllerin iç kısma yerleştirilerek jelatinin CPO etrafında sarıldığı, jelatin-ipek fibroini ve keratinin bir ağ yapısı oluşturarak malzemenin kabuk-çekirdek yapısı oluşturulmuştur. Ayrıca oksijen salımı testi, iskelenin *in vitro* ortamda iki hafta boyunca sürekli olarak yüksek düzeyde oksijen salabildiğini göstermiştir. CPO içeren malzemenin, CPO içermeyen malzemeyle kıyasla uygulanan köpekte geliştirilmiş organize kas demetleri ve epitel tabakası gözlenmiştir. Bu çalışma, bu biyomateryalin doku mühendisliği alanında kullanıma uygun olabileceğini düşündürmektedir (Lv, vd., 2016).

González ve ark. (2020) tarafından yapılan bu çalışmada, silika-aljinat hibrit hidrojelilerin bir sol-jel yöntemi ile hazırlanması önerilmiştir. Deneysel parametreler, belirli özelliklere sahip hibrit malzemelerin su ve katalizör oranlarının etkisi, inorganik silika oranının etkisi ve aljinat çözeltisinin konsantrasyonunun etkisi olarak üç aşamada kullanılarak analiz edilmiştir. Hidrojel yapıdaki yüksek aljinat miktarları, sentezlenen hibritlerin depolama modülünü arttırmış ve yüksek katalizör oranları, stabilitelelerini azaltmıştır. Sonuç olarak, %5 (w/v) aljinat ve %8 (w/v) silika öncülü içeren bileşimlerin DM uygulamaları için değerlendirmeye uygun olduğu bulunmuştur (Hernández-González, vd., 2020).

Biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere Kakkar ve madhan (2016), keratin biyopolimerini TEOS ile sol-jel reaksiyonunda kullanarak bir keratin-silika hidrojelini üretmiş ve üretilen hidrojelilerin fiziksel özelliklerini aydınlatarak yeni hidrojelilerin optimizasyonunu mümkün kılmıştır. Optimize edilmiş keratin-silika hidrojelinin, esneklik kolaylığı ile optimum sertlik sergilediği, oldukça gözenekli bir mikro mimari ve mükemmel bir şişme gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca fibroblast hücreleri ile *in vitro* ortamda MTT testi ile biyo-uyumluluğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak, biyomedikal alanlarda kullanılacak bir biyomalzeme geliştirilmiş, ancak bu malzemenin herhangi bir doku üzerindeki etkisi veya rejeneratif kapasitesine yönelik çalışması ortaya konulmamış ve çalışmanın devamı sürdürülmemiştir (Kakkar and Madhan, 2016).

Shi ve ark. (2019) hücre-protein-mineral üçlü arayüzündeki etkileşimleri göz önünde bulundurarak silika (nano) çubukları ve tip I kollajen hidrojenlerin yapısal ve reolojik özellikleri belirlenmiş ve bu malzemenin insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yüksek kollajen konsantrasyonları malzemenin mekanik özellikleri için önemli iken silika çubuklarının mekanik özellikleri sınırlandırabileceği fikri ortaya atılmıştır. Elektron mikroskobu, bu malzemelerin gerçek kompozit doğasını vurgulayarak güçlü biyo-mineral etkileşimlerini kanıtlamıştır. Bunun aksine, hücrelerin yapışma ve proliferasyon çalışmaları, bu etkileşimlere rağmen fibroblastların protein ve inorganik fazlar arasında ayırım yapabildiğini ve silika ile doğrudan teması sınırlandırmak için kollajen ağına nüfuz edebildiğini göstermiştir. Fizikokimyasal özellikler ve biyolojik tepkiler arasındaki bu tür bir farklılığın, nanokompozit biyomalzemelerin *in vivo* uygulamalardaki davranışının öngörülmesinde büyük etkileri vardır (Shi, vd., 2019).

Guo ve ark. 2017'de mineralizasyon alanlarına sahip seçici peptitlerle birleştirilebilen ipek proteini bazlı kompozitleri geliştirmiş ve bu kompozitleri osteokondral arayüzlerde yumuşaktan sert alanlara geçişi taklit etmek için kullanmışlardır. Bu özelliklere sahip gradyan kompozitler, ayarlanabilir mineralizasyonu ve mekanik özellikleri desteklemiştir. Ayrıca, yapı ve mekanik özelliklerin yanı sıra kompozit yapılar, sito-uyumluluk ve biyobozunabilirlik açısından sürekli geçişler sergilemiştir. *In vitro* ortamda bir osteoindüktif özellik sergileyerek iAMKH'lerin osteojenik farklılaşmasını teşvik etmiş ve düzenlemiştir. Bu yeni biyomimetik gradyan biyomateryal tasarımı, rejeneratif tıpta çok çeşitli ihtiyaçları karşılamak için yararlı bir yaklaşım sunar (Guo, vd., 2017).

Movahedi Najafabadi ve Abnosi tarafından yapılan çalışmada, borik asitin (BA), farklılaşmış sıçan mezenkimal kök hücrelerinin (sMKH) hücrel ve moleküler yapısı üzerindeki etkisi karakterize edilmiştir. Hücre kültür ortamına 6 ng/ml ve 6 µg/ml borik asit eklenerek belirli gün aralıklarında bekletilmiş, hücrelerin canlılık ve mineralleşme seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca hücrelerin morfolojisi, nükleer çapı ve sitoplazmik alanı incelenmiştir. Deney sonucunda 6 µg/ml borik asitin toksik olduğu bulunmasına rağmen, 6 ng/ml'lik bir konsantrasyon, tedavi boyunca hücrenin osteojenik yeteneğini önemli ölçüde arttırmıştır. Sonuç olarak ise osteoporoz riski yüksek olan gruplarda kemik kırığı durumunda borik asit takviyesi önerilmiştir (Najafabadi and Abnosi, 2016).

Giasuddin ve Brit'in bu çalışması, hidrolize edilmiş hidrofobik proteinin organo-veya floro- silan solüsyonunda çözündürmek için mikrodalga enerjisi kullanarak silika-protein nanokompozit materyallerin sentezlenmesi basit ve çevre dostu bir yöntem sunmaktadır. Burada, organo- veya floro- silanlar, silika öncüsü olarak kullanılmıştır. Sentetik örümcek ipeği proteini ve organo- veya floro- silan öncülleri mikrodalga destekli sol-jel reaksiyonuna tabi tutulmuş ve elde edilen silica-protein nanokompozit materyalinin yapısı karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, ipek proteinine ait β -tabaka içeriği, ipek proteini-organo-silika nanokompozitleri ile %14 artarken, ipek proteini-floro-silika nanokompozitlerinin ise %20 azalttığı bulunmuştur. Protein-silan hibrit partiküllerinde tanımlanmış ikincil yapıları indüklemeye yeteneği, biyoaktif partiküllerin, yüzeylerin ve monolitlerin tasarımına izin verebilmektedir. Son olarak, epitaksiyel büyüme ve biyomineralizasyon özelliklerinin çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere ayarlanabilir olduğu bildirilmiştir (Giasuddin and Britt, 2019).

Bor nitrür nanotüpler ile MKH arasındaki etkileşim ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiş olup nanotüplerin, MKH'lerin bağlanmasını ve büyümesini desteklediği, MSC'lerle iyi biyouyumluluk sergilediği ve özellikle de alkalın fosfataz (ALP) aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Li, vd., 2016).

Arslan ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışma ile %90'ın üzerinde gözenekliliğe sahip üç boyutlu poli (butilen adipat-ko-tereftalat) (BPAT) liflerine bor-katkılı hidroksiapatit (B-HA) kapsüllenmiş (B-HA-PBAT) üç boyutlu nanolifli iskeleler üretmiş ve üretilen iskelelerin osteojenik potansiyeli insan kemik iliği mezenkimal kök hücreler (iKMKH'ler) kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, B-HAp-PBAT iskelelerinde alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi ile kollajen ve kalsiyum miktarlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, B-HAp-PBAT yapı iskelelerindeki hücrelerin, PBAT iskelelerine göre hem erken hem de geç kültürü sonunda gözlemlenen osteojenik genlerin, örn. ALP, kollajen I (COL-I), osteokalsin (OC) ve osteopontin (OPN) için önemli ölçüde daha yüksek ekspresyon seviyeleri gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri ile bor içeren üç boyutlu nanofibröz PBAT iskelelerinin KDM için alternatif yapılar olarak kullanılabilirliğini göstermektedir (Arslan, vd., 2018).

Doğan ve arkadaşları tarafından bor minerali içeren PLGA yapı iskeleleri geliştirilmiş ve bu iskeleler üzerine sıçan adipoz kaynaklı kök hücreler (sAKH) uygulanarak hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarında kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri

incelenmiştir. Sonuçlar, bor içeren yapı iskelelerinde sAKH'lerin *in vitro* ortamda proliferasyonunu, tutunmasını ve kalsiyum mineralizasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur. Ek olarak, bor içeren iskeleler sıçanın femur defekt modelinde osteokalsin ve kollajen tip I protein seviyelerini arttırarak kemik rejenerasyonunda artışa neden olmuştur. Bu çalışma, borun fonksiyonel kemik doku mühendisliği uygulamaları için iskele sistemleri üretiminde umut verici ve yenilikçi bir yaklaşım olarak kabul görülmüştür (Doğan, vd., 2014).

Tuncay ve grup arkadaşları, osteoindüktif özelliği olan bor (B) katkılı hidroksiapatit (B-HA) üreterek B-HA kaplı kitosan (B-HA/Ch) iskelelerin *in vitro* osteojenez potansiyelini araştırmıştır. Dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilmiş kitosan iskelelerinin biyoaktivitelerini ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için B-HA ile kaplama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak da, aynı koşullarda üretilen hidroksiapatit kaplı kitosan iskeleler (HA/Ch) kullanılmıştır. Hücre kültürü sonuçları, B-HA/Ch iskelelerden salınan B'nin, MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonunu ve osteoblastik farklılaşmasını arttırdığını göstermiştir. Son olarak bu çalışma, *in vitro* kemik doku mühendisliği uygulamalarını geliştirmek için iskelelerde B'nin kullanılmasının önemini vurgulamıştır (Tunçay, vd., 2017).

Bir başka çalışmada Shalehin ve ark. (2020) borik asidin periodontiteyi baskıladığı düşüncesinden yola çıkarak, borik asit uygulamasında hücresel aktivitenin analiz edilmesi için borik asitle muamele edilmiş ipek bağları kullanılarak borik asit uygulanan sıçanların periodontitinde alveolar kemiği histolojik olarak değerlendirmiştir. Sonuçlar, borik asit muamele edilmiş bağın periodontitisin iltihaplanmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca bu ajan, osteoklastogenezi inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu azaltabilir ve ayrıca osteoblastogenezi hızlandırabilir (Shalehin, vd., 2020).

Bir diğer çalışmada Gomes ve ark. sol-jel yöntemiyle geliştirdikleri hibrit silika-jelatin kaplamaları ile osteojenik biyomateryal olarak biyolojik potansiyelleri test edilmiştir. Her yüzeye adsorbe edilen proteinleri ve bunların *in vitro* ve *in vivo* etkileri incelenmiştir. *In vitro* sonuçlar, jelatin içeren numunelerde hücre çoğalmasında ve mineralizasyonunda bir gelişme olduğunu göstermiştir. *In vivo* testler ise, özellikle jelatin içeren numunelerde, esasen daha fazla tamamlayıcı aktivasyon proteinlerinin adsorbe

edildiği bu kaplamalarda daha gevşek bir bağ dokusu tabakasının varlığını göstermiştir (Araújo-Gomes, vd., 2018).

Deveci ve ark. 2020 çalışmasında, HA, hegzagonal bor nitrür (h-BN), kitosan (Ch) ve tip I kollajenden (CtI) oluşturarak geliştirilen yeni bir biyokompozitin sıçanlarda biyoyoumluluk ve kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Biyokompozit yapılar, hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve bulguları karşılaştırılmıştır. Genel olarak bulguların tutarlı ve benzer olduğu ortaya atılmıştır. Histopatolojik incelemeler ile biyokompozit içeriğinin biyo-uyumlu olduğu belirtilmiştir. Ancak, kaplama yüzeyinin fiziksel mukavemetinin sterilizasyon ve cerrahi işlemlere karşı artırılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, tüm karakterizasyon bulguları yorumlandığında HA/h-BN/Cs/CtI biyokompozit materyallerinin biyoyoumluluğu ortaya çıkarılmıştır (Deveci, vd., 2020).

Belaid ve ark. (2020) tarafından PLA temelli biyomimetik biyobozunur iskeleler üretilmek için üç boyutlu yazdırma yaklaşımı kullanılarak basılmış iskeleler elde edilmiştir. Bu iskeleler, bor nitrürün (BN) ilavesiyle güçlendirilmiştir. Geliştirilen yapıdaki BN'nin varlığı, Raman spektroskopisi ve XRD kullanarak fizikokimyasal analiz ile gösterilmiştir. DSC ve TGA termogramları ile BN birleşiminin geçiş sıcaklığını etkilemediğini, ancak polimer kristallliğini azalttığı bulunmuştur. Morfolojik değerlendirme için SEM, 500 µm'lik bir ortalama iskele gözenek boyutu göstermiş, BN'nin ilavesi iskelenin mekanik özelliklerini (çekme testi) etkilememiş, ancak yüzey pürüzlülüğünü değiştirmiştir. Ayrıca, temas açısı ölçümü, PLA/BN yapı iskeleleri yüzeyinin hidrofilik ve PLA iskeleleri yüzeyinin hidrofobik olduğunu göstermiştir. Son olarak, MG-63 ve MC3T3 hücreleri kullanılan sitotoksisite testinde, hücre bağlanması ve proliferasyon deneylerinin sonuçları, BN eklenmiş PLA yapı iskelelerinin toksik olmadığını ve osteoblastik hücrelerle uyumlu olduğunu ve ayrıca MG-63 hücreleri tarafından iskele mineralizasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. Sonuçlar, bu üç boyutlu baskılı nanokompozit iskelenin doku mühendisliği için uygun olduğunu göstermektedir (Belaid, vd., 2020).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tezde, insan saçının deneysel çalışmalarda kullanılması için gerekli olan etik kurul izni Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (Karar No:2019-14, Karar Tarihi: 24.07.2019). İlgili izin belgesine Ek 1'de yer verilmiştir. Isıl-kimyasal işlem görmemiş ve boyasız insan saçı, Çanakkale iline ait kuaför/berber gibi saç bakım salonlarından tedarik edilmiştir.

Tip I memeli kollajeni, Wistar Albino türü sıçanların kuyruklarından izole edilen tendonların çözündürülmesiyle elde edilmiştir. Bu sıçan kuyrukları, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yürütülen deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen hayvansal atıklardan temin edilmiştir. Sıçan kuyruklarından izole edilen tendonlar, deneysel çalışmalarda kullanılan kollajen için -26 °C'deki buzdolabında (Siemens KG57NPW24N, Almanya) muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal ve reaktifler, aksi bildirilmedikçe Merck (Merck-Millipore) firmasından satın alınmıştır. Ayrıca, cihazlara ait marka ve modeller adı geçen kısımda açıklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İnsan Saçından Keratin Ekstraksiyonu

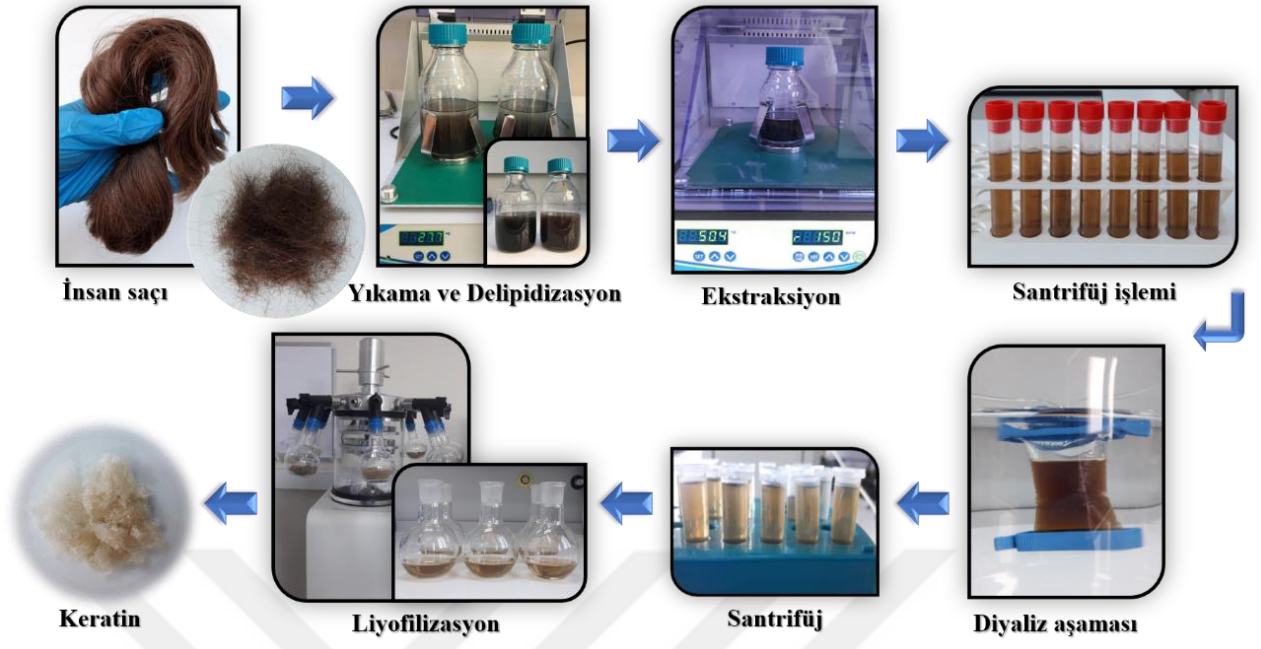
İlk olarak, saç bakım merkezlerinden laboratuvara getirilen saç örnekleri (Şekil 17), deterjan (%1 (w/v) SDS) ve sıcak su ile 30 dakika boyunca muamele edilmiş ve iyice yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra kurutulmuş saç örnekleri dezenfeksiyon için, etanol (%99,9) içerisinde 30 dakika daha muamele edilmiş ve oda koşullarında kurutularak küçük parçalar halinde kesilmiştir. Delipidizasyon işlemi için, önceden küçük parçalara kesilmiş saçların yapısındaki harici lipitler, bir kloroform/metanol (2:1) (v/v) karışımı içerisinde 16 saat süreyle inkübe edilerek uzaklaştırılmıştır. Delipidize edilen saçlar, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve kuruduktan sonra yeniden küçük parçalara kesilerek ekstraksiyon işlemi için hazırlanmıştır. Ön hazırlık aşamasından geçirilen saç örneklerinin keratin

ekstraksiyonu işlemi, daha önceden yayınlamış çalışmalardaki yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Sezgin Arslan, 2017; Wrzeźniewska-Tosik and Adamiec, 2007).



Şekil 17. Laboratuvara getirilen işlem görmemiş saç örnekleri

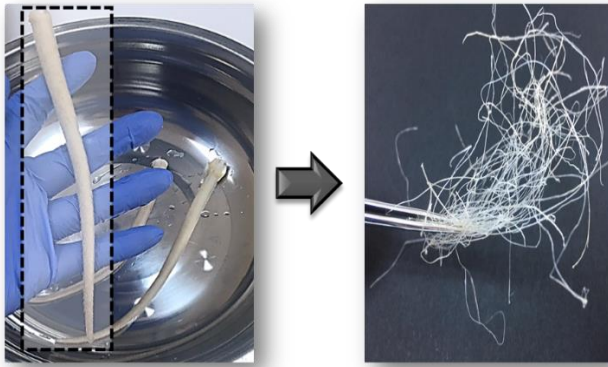
Ekstraksiyon işlemi için sülfitolizis yöntemi kullanılmıştır. Bu yöneme göre, %5 (w/v) NaOH ve %5 (w/v) Na₂SO₃ çözeltisi içerisine 5 g olarak tartılan saçlar ilave edilmiş ve daha önceden sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmış dinamik çalkalayıcı (Incu-Shaker, Mini Benchmark, ABD) içerisinde yaklaşık 90 dakika olacak şekilde 180 rpm dönme hızında bekletilmiştir. Elde edilen keratin ekstraktlar akan su altında oda sıcaklığına getirilmiştir. Ekstraktlar, çözünmeyen saç partiküllerinden arındırılmak suretiyle tülbent yardımıyla süzölmüş ve süzöntü santrifüj tüplerine aktarılarak 6000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj (Hettich EBA20, 145 Germany) edilmiştir. Ekstraktın içeriğindeki alkali ortamın saflaştırılması ve pH'ın 7,2 – 7,4'e ayarlanması amacıyla oda sıcaklığında yaklaşık 2 gün süreyle saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz, her iki ucundan klips (Spectra/Por Closures Standard & Weighted Pairs, 55 mm) ile tutturulmuş membran (MWCO:1kDa, Spectra/Por 6 Dialysis membrane Pre-wetted RC Tubing) kullanılarak manyetik karıştırıcıda balık yardımıyla düşük rpm dönme hızında gerçekleştirilmiştir. Diyaliz suyu günde üç kez olacak şekilde değiştirilmiştir. Diyaliz işleminden sonra diyalizat, içerisinde var olan protein agregatlarının ayrılması için 14000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj (Hettich Micro120, Germany) edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar cam balonlara aktararak -26 °C'de dondurulmuş ve toz formda keratinin eldesi için gece boyunca liyofilize (Telstar, LyoQuest, İspanya) edilmiştir. Toz formdaki keratin +4'de saklanmıştır. İnsan saçından keratin ekstraksiyonu Şekil 18'de verilen şemada özetlenmiştir.



Şekil 18. Keratin ekstraksiyonu genel şeması

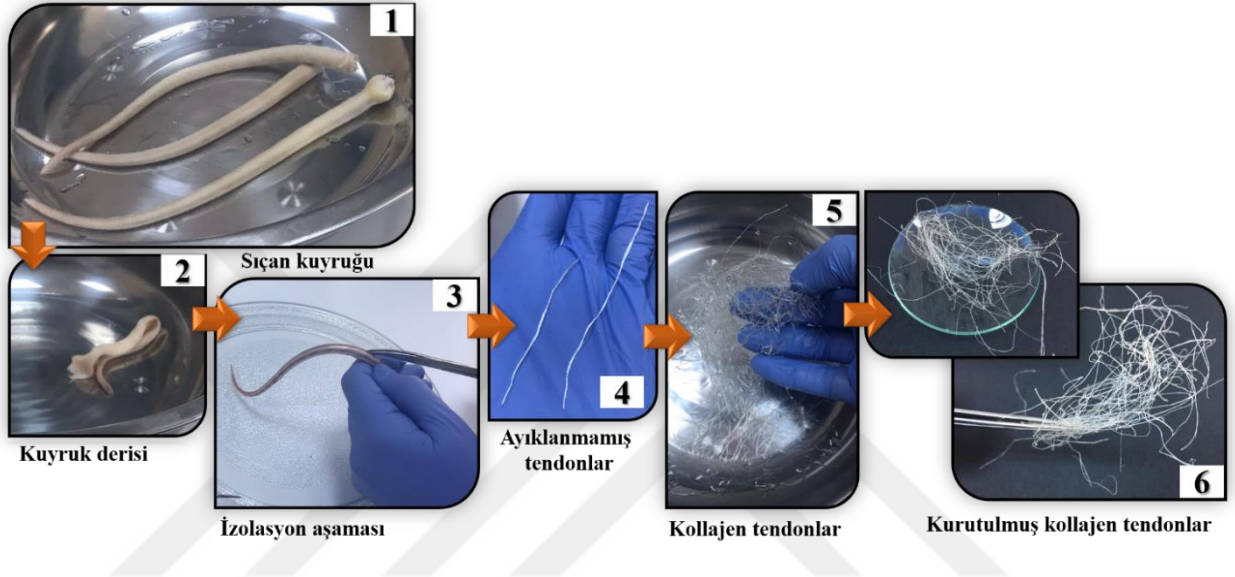
3.2.2. Sıçan Kuyruğundan Tip I Kollajen İzolasyonu

Sıçan kuyruğundan tip I memeli kollajen izolasyonu Rajan ve diğerleri (2007) ve Gil ve Del Río, (2012)'nin çalışması baz alınarak Sezgin Arslan (2017)'a göre yapılmıştır. Temin edilen ve soğuk zincir vasıtasıyla laboratuvara getirilen sıçan kuyrukları (Şekil 19) ilk olarak, su ile temizlenerek iyice yıkanmıştır. Yıkanan kuyruklar %80'lik etanol içerisinde bekletilerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyonu gerçekleştirilen kuyruklar, ultra saf suya (Milli Direct-Q 3UV, Merck-Millipore, Almanya) daldırılıp fazla suyu atıldıktan sonra gece boyunca $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra, donmuş sıçan kuyruklarının buzları çözdürülmüş ve tekrar %80'lik etanolde bir süre daha bekletilmiştir. Etanol ile muamele edildikten sonra kuyruklar oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 19. Sıçan kuyruğu ve tip I memeli kollajeni

İzolasyon aşaması için öncelikle bistüri, pens, makas vb. cerrahi aletler ile kuyruğun dış derisi sıyrılıp atılmıştır. Sonrasında beyaz kollajen tendonlar tutularak çekilmiş ve ince ince olacak şekilde birbirinden ayrılmıştır. Ayrılan kollajen tendonlar etanol içerisine batırılmış ve birkaç tur daha etanol ile durulandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan kollajen tendonlar ve kullanılmayan kısımlar $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Sıçan kuyruğundan tip I kollajen tendon izolasyonu

3.2.3. Pepsinde Sindirilmiş Tip I Kollajen (Atelo-kollajen) Eldesi

Elde edilen kollajen tendonlar, %1 (10 mg/ml) (w/v) konsantrasyonda olacak şekilde tartılmış ve küçük parçalara kesilerek toz haline getirilmiştir. Kesilen kollajen tendonlar, oda koşullarında 0,02 M asetik asit ve 1 mg/ml (w/v) pepsin (Sigma Aldrich, 600-1200 U/mg) içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmaya başlanmıştır. Karıştırma işlemine çözelti içindeki kollajen tendonlar tamamen çözünene kadar devam edilmiştir. Kollajenin tamamen çözünmesi ve pepsinde sindirilmiş tip I kollajen (atelo-kollajen) eldesi için çözelti, 24 saat boyunca yüksek rpm'de karıştırılarak bekletilmiştir. Reaksiyon sırasında kollajenden kaynaklı çözelti viskozitesi artacağından birkaç dakika $37-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sıcak su banyosunda bekletilerek sıvılaştırılmıştır. Daha sonra iyice sıvılaştıran atelo-kollajen çözeltisi, enjektör yardımıyla çözünmeyen partikülleri uzaklaştırmak için süzme işleminden geçirilmiştir. Enzim inaktivasyonu için, süzme işleminden geçirilen süzöntü beher içerisine alınmış ve manyetik karıştırıcıda balık yardımıyla karıştırılarak

süzüntünün pH'ı 6,5'e ayarlanmıştır. Nötralizasyon aşamasının ardından atelo-kollajen çözeltisi cam balona aktarılarak -26 °C'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen sıçan kuyruğu atelo-kollajeni stok olarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. İnsan Saçı Keratini ve Tip I Kollajen Proteinlerinin Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini

Ekstrakte edilmiş keratin proteinlerinin total konsantrasyon içeriğini belirlemek için Lowry metodu kullanılmıştır. Bu test için BSA (Sığır serum albümin, Merck-Millipore), kontrol grubunda standart protein olarak tercih edilmiştir. Lowry protein tayini metodu, bazik ortamlarda Folin-Ciocalteu reaktifi içeren çözeltinin proteinlerdeki fenolik amino asitlerle (Tyr, Trp, Cys) oluşturduğu tepkime temeline dayanmaktadır. Protein tayini için Lowry ve diğerleri (1951) tarafından öne sürülen yöntem kullanılmıştır. Bu metot kapsamında, öncelikle tepkimelerde kullanılacak olan A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A: (100 ml ultra saf suda-0,571 g NaOH ve 2,86 g Na₂SO₃ içeren çözelti)
2. Çözelti B: (100 ml ultra saf suda-1,4232 g CuSO₄.5(H₂O))
3. Çözelti C: (100 ml ultra saf suda-1,34 g NaK(COO)₂ (CHOH)₂.4H₂O içeren çözelti)
4. Lowry çözeltisi (Çözelti A, B ve C sırasıyla 100:1:1 oranıyla hazırlanmıştır.)
5. Folin-Ciocalteu reaktifi (6 ml ultra saf suda-5 ml 2N Folin Ciocalteu's Fenol Reaktifi)

Tepkime için, lowry çözeltisi ve Folin-Ciocalteu reaktifi çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır.

Standart protein çözeltisi (BSA) ise 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde %0,9 (w/v) NaCl ile hazırlanarak stok çözeltisi oluşturulmuştur. 1 mg/ml konsantrasyonlu stok çözeltisinden 0,01-0,1 mg/ml dilüsyonlar elde edilmiştir. Daha sonra, 0,5 ml protein çözeltisi üzerine 0,7 ml Lowry çözeltisi eklenerek iyice vortekslenmiş ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda, çözeltiliye 0,1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (sarı renkte) hızla eklendikten sonra, tekrar karanlık ortamda 30 dakika daha beklemeye bırakılmıştır. Ek olarak, başka bir tüpe protein haricindeki diğer standart çözeltiler eklenerek kör oluşturulmuş ve protein çözeltileri gibi karanlık ortamda bekleme işlemlerine tabi tutulmuştur. Tepkime süreci tamamlandığında, proteinlerin yoğunluğuna bağlı olarak mavi renkli kompleks çözeltiler elde edilmiştir. Son

olarak, çözeltilerin absorbanları köre karşı spektrofotometre cihazı (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) kullanılarak 650 nm’de ölçülmüştür.

Lowry sonuçları için keratin diyalizatlarındaki konsantrasyonlar dikkate alındığında, standart protein eğrisi kullanılarak % verim hesabı yapılmış ve hesaplama için denklem (3.1) kullanılmıştır.

Lowry sonuçları için % verim: $[(OD_{650} / \text{eğim}) \times (\text{seyreltme faktörü}) \times \text{toplam diyalizat hacmi (ml)}] / [(\text{ham malzeme miktarı (mg)}) \times 100]$ (3.1)

Liyofilizasyon aşamasından sonra kuru kütleleri elde edilen keratin proteinlerinin % verim hesapları denklem (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır.

Kuru kütleye göre % verim: $[(\text{proteinlerin kuru ağırlığı (mg)}) / \text{ham malzeme miktarı (mg)}] \times 100$ (3.2)

3.2.5. Serbest Sülfidril (-SH) Gruplarının Tayini

Ekstrakte edilen indirgenmiş (hidrolize) keratindeki serbest sülfidril (-SH) gruplarının miktarı, Ellman's reaktifi (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) (Merck-Millipore) kullanılarak spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Analiz, Silva ve ark. (2014) 'nın yöntemine göre modifiye edilerek uygulanmıştır. İlk olarak, ultra saf suda çözüldürülmüş 0,1 M NaH₂PO₄ (sodyum fosfat mono bazik) ve 1 mM etilendiamintetra asetik asit (EDTA) reaksiyon tamponu (pH 8,0) hazırlanmıştır. Ellman's reaktif çözeltisi, 4 mg/ml olacak şekilde reaksiyon tamponu içerisinde çözüldürülmüştür. 1 mM konsantrasyonda reaksiyon tamponunda L-sistein standart stok çözeltisi de hazırlanmış ve bu stok çözeltiden 0,1-0,8 mM dilüsyonlar elde edilmiştir. Katı/toz formundaki keratin, reaksiyon tamponu içerisinde 10 mg/ml olacak şekilde çözdürülerek protein çözeltileri hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin ardından, Ellman's reaktifi çözeltisi (50 µl), reaksiyon tamponu (2,5 ml) ve protein çözeltisi (250 µl) karışımı iyice vortekslenmiştir. Daha sonra homojen karışımı sağlanan çözelti, karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, reaksiyon sonucu olarak sarı renkli kompleks bir çözelti oluştuğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sarı renkli çözeltilerin absorbanı, 412 nm’de UV-VIS spektrofotometre cihazında ölçümü yapılmıştır. Serbest -SH gruplarının içeriği aşağıdaki eşitliğe göre (3.3) hesaplanmıştır.

$$\text{mM serbest SH grupları / g keratin} = [(\text{OD}_{412} / \text{eğim}) \times (\text{seyreltme faktörü} \times \text{toplam hacim})] / \text{keratin ağırlığı (g)} \quad (3.3)$$

3.2.6. Amino Asit İçerik Analizi

Ham insan saçı ve keratin örneklerinin amino asit içerik analizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı (Shimadzu Prominence Series HPLC (LC-26A) with RF-26AXS Fluorescence Detector, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz, Derkus ve diğerleri (2016) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Kısaca, tüm örneklerden 5'er mg olacak şekilde tartılmış ve polipropilen tüpler (Nunc, ABD) içerisine alınmıştır. Her bir tüp içerisine 200 µl 6 N HCl eklenmiş ve tüpler azot gazından geçirilerek kapakları kapatılmıştır. Daha sonra, hidroliz edilmek üzere 110 °C'deki etüv içerisine alınarak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler, kömürleşen partiküllerden arındırmak için 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından hidrolize örnekler, 9-florenilmetil kloroformat (FMOC), orto-fitalaldehit (OPA) ve 3-merkaptopropiyonik (3-MPA) asit ile türevlendirilmiş ve HPLC cihazına yerleştirilerek analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda, kromatograflar alınmış ve HPLC sonuçları, g/100g olarak elde edilmiştir. Aşağıda verilen eşitlik esas alınarak farklı amino asit sayıları rezidü/1000 rezidü şeklinde hesaplanmıştır (AA=amino asit).

$$AA_1^{\text{HPLC sonucu (g/100g veya nmol/ml)}} / MW_{AA_1} = AA_1 \quad AA_1 + AA_2 + \dots + AA_n = y$$

$$(AA_1 / y) * 1000 = \text{rezidü} / 1000 \text{ rezidü} \quad (3.4)$$

3.2.7. Hidroksiprolin Tayini

İzole edilmiş sıçan kuyruğu atelokollajeni yapısında bulunan toplam hidroksiprolin miktarı, ticari olarak satın alınmış hidroksiprolin test kiti (Merck-Millipore, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle, atelokollajen numuneleri 5'er mg olacak şekilde tartılmış ve üzerlerine 100 µl 12 M HCl-100 µl ultra saf su eklenmiştir. Asit içeren bu çözelti, hidroliz edilmek üzere 120 °C'ye ayarlanmış etüv (Memmert UN-55 Etüv, Almanya) içerisinde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kömürleşen partiküllerin uzaklaştırılması için 14000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işleminin ardından, süpernatant kısımdan 2'şer µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plastiği içerisine aktarılan numuneler, 60 °C'deki etüvde kuruyana kadar bekletilmiştir. Hidroksiprolin içeriğinin belirlenebilmesi için kit

içeriğindeki hidroksiprolin standardı ile spike yapılmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa kloramin T/oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino) benzaldehit eklendikten sonra karanlık ortamda ve oda koşullarında 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Son olarak çözeltilerin absorbanı, 560 nm’de spektrofotometre cihazında ölçülerek alınmıştır. Hidroksiprolin miktarı aşağıda bildirilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Hidroksiprolin miktarı} = [A_{560} (\text{numune}) / (A_{560} (\text{spike kontrol}) - A_{560} (\text{numune}))] \times 0,4 \mu\text{g} \quad (3.5)$$

3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Analizi

Ekstrakte edilmiş proteinlerin moleküler büyüklüğü, saflığı ve proteinlere ait spesifik bantları, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) analizi yapılarak belirtilmiştir. Proteinler için bu analiz, geniş çapta kullanılan Laemmli, (1970) metoduna göre modifiye edilerek yapılmıştır. Bu metot doğrultusunda, keratin, atelokollajen ve BSA proteinleri için %12,5’luk yürütme jeli ve %4’lük yükleme jeli Tablo 5’te belirtilen verilere göre hazırlanmıştır.

Jel Hazırlık Aşaması: Öncelikle, jel düzeneği kurulmuş ve jel tankı düz bir şekilde ayarlanarak dikey elektrofrez sistemi hazırlanmıştır. İlk olarak yürütme jeli hazırlanmak üzere, APS ve TEMED hariç diğer çözeltiler, prosedürde belirtilen miktarlarda behere aktararak karıştırılmıştır. Homojen karışım sağlandıktan sonra çözeltilere, polimerizasyonu başlatıcı ve katalizör olarak sırasıyla APS ve TEMED eklenmiş ve elde edilen jel çözeltisi hızlı bir şekilde mikropipet yardımıyla jel düzeneğine aktarılmıştır. Aktarım esnasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir. Jelin hava ile temasının engellenmesi ve düzgün polimerleşme için jel üzerine 2-propanol (%99,9) eklenerek 1 saat boyunca bekletilmiştir. 1 saatin sonunda, jel üzerindeki alkol uzaklaştırılmış ve jel, ultra saf su ile 2 kez yıkama işleminden geçirilerek filtre kâğıdı ile kurulanmıştır. Daha sonra, yükleme jeli çözeltileri hazırlanarak yürütme jeli üzerine, düzenek içerisinde boşluk kalmayacak şekilde aktarılmıştır. Ardından jel üzerinde kuyucuk oluşturmak için tarak aparatı, yürütme jeli ile tarak ucu arasında yaklaşık 1 cm mesafe olacak şekilde yerleştirilmiştir. Yükleme jelinin polimerizasyonu için ise yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Süre sonunda jel, elektrofrez tankına düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Tank sistemi içerisine 1X yürütme tamponu

eklenmiş ve jelin her bir tarafına etkili olması için bir süre bekletilmiştir. Tarağın, tampon ile ıslanan jelden dikkatli bir şekilde çekilmesiyle kuyucukların oluşumu tamamlanmıştır.

Tablo 5

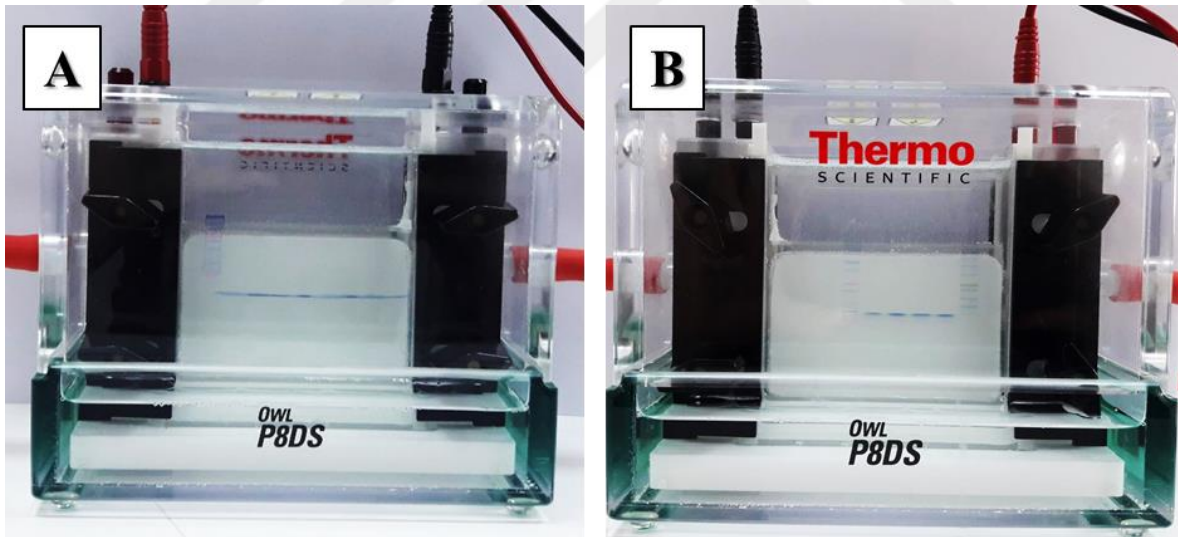
SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve prosedürü (jel kalınlığı: 0,75 mm)

Çözelti İçeriği	Çözelti	%12,5'lük yürütme jeli (10 ml)	%4'lük yükleme jeli (5 ml)
%30 (w/v) Akrilamid ve %0,8 (w/v) Bisakrilamid sulu çözeltisi	Akrilamid/Bisakrilamid	4,16 ml	0,66 ml
4X yürütme jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi) (pH 8,8)	Yürütme jeli tamponu	2,5 ml	-
4X yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi) (pH 6,8)	Yükleme jeli tamponu	-	1,26 ml
%10 (w/v) SDS'in ultra saf sudaki çözeltisi	%10 SDS	100 µl	50 µl
Ultra saf su	Ultra saf su	3,185 ml	3 ml
%10 (w/v) APS'nin ultra saf sudaki çözeltisi. (Taze hazırlanmalıdır)	Amonyum per sülfat (APS)	50 µl	25 µl
TEMED (Merck-Millipore) (Ticari olarak satın alınmıştır)	TEMED	5 µl	5 µl
Diğer Çözeltiler			
1X Yürütme Tamponu	0,025 M Tris, 0,192 M glisin ve %0,1 (w/v) SDS'in sudaki çözeltisi (pH 8.3). Hazırlanan çözelti, oda sıcaklığında saklanabilir ve kullanılan tampon en az 3 kere süzülerek tekrar kullanılabilir.		
2X Numune Hazırlama Tamponu	0,125 M Tris-HCl, %2 SDS, %25 (v/v) gliserol ve %0,01 (w/v) bromofenol blue'nun sudaki çözeltisi (pH 6.8). Hazırlanan tampon ışıktan korunmalıdır. Porsiyonlanarak -26 °C'de saklanmalıdır.		
Merkaptoetanollü Numune Tamponu	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.		

Numune Hazırlık Aşaması: Jel hazırlık aşamasında beklenen süre içerisinde, yüklemede kullanılacak proteinler hazırlanmıştır. Öncelikle, farklı saç örneklerinden elde edilen keratinler (10 mg/ml) ve BSA (0,2 mg/ml) tartılarak ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Diğer bir protein numunesi olan sıçan kuyruğu tip I atelokollajeni (10 mg/ml) ise 0,1 M asetik asitte çözündürülerek hazırlanmıştır. Protein numuneleri (25 µl), taze hazırlanan merkaptoetanollü numune tamponu (25 µl) ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Vorteksenerek iyice karışımı sağlanan tampon, 100 °C'ye ayarlanmış blok ısıtıcıda 5

dakika boyunca denatüre edilmiştir. Denatürasyon süresi dolduktan sonra, protein içeren tüpler buz aküsü kullanılarak soğutulmuş ve proteinler yüklenmeye hazırlanmıştır.

Proteinleri Yükleme ve Yürütme Aşaması: Denatürasyon işleminden sonra protein içerikli tüpler soğutulmuş ve vorteksenerek yükleme aşamasına hazır hale getirilmiştir. Ayrıca yükleme aşamasında protein molekül ağırlığı belirteci (markör) de kullanılmıştır. Protein belirteci olarak, daha önceden satın alınmış Biolabs (Biolabs, P7712S, Color Prestained Protein Standard, 11–245 kDa) ve Biorad (Biorad, Precision Plus Protetein Dual Xtra Standarts; Katalog numarası: 161-0377) markalı markörlerin her ikisi de kullanılmıştır. Yükleme aşamasında her bir kuyucuğa, Bio-Labs 5 µl ve Biorad 10 µl protein markör, keratin ve BSA çözeltilerinden 5'er µl, atelokollajen çözeltilisinden ise 3 µl olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Böylelikle, BSA 0,5 µg, keratin proteinleri 25 µg ve atelokollajen ise 15 µg olarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağı bağlantıları yapılmıştır. Son olarak yürütme işlemi, 10 °C'de ve 15 mA'e ayarlanmış güç kaynağına bağlı olarak 100-120 dakika arasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. SDS-PAGE Analizi (A) Farklı saç örneklerine ait keratin numunelerinin jel görseli (B) Atelokollajenlere ait jel görseli

Jelin Boyanma Aşaması: Yürütme işlemi sonrasında jel için bir sonraki adım boyama işlemidir. Jelin boyanmasında, kolloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmış ve protein bantları belirginleştirilmek istenmiştir. Tablo 6'da verilen prosedür uyarınca da boyama çözeltisi manyetik koşullar altında hazırlanmıştır. Öncelikle, alüminyum sülfat-(14-18)-hidrat ultra saf su içerisinde çözdürülmüş ve çözeltiliye etanol

eklenerek karıştırılmıştır. Ardından homojen çözeltiye, tartılmış toz formdaki Coomassie Brilliant Blue G250 eklendikten sonra tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen çözeltinin rengi çivit-mavi olarak gözlemlenmiştir. Daha sonra, çözelti içerisine ortofosforik asitin yavaşça ilavesiyle birlikte çözeltinin rengi petrol yeşilimsi-mavi rengine dönüşmüş ve kolloidal partiküller oluşmuştur. Son olarak ise, ultra saf su ile son hacim tamamlanarak boya hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan boya, oda sıcaklığında ve amber şişe içerisinde saklanmıştır. Yürütme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel düzeneği, elektroforez tankından alınarak çeşme suyu altında açılmıştır. Çıkarılan jel, SDS'den arındırılmak üzere saf su dolu küvet içerisinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 tur yıkama işleminden geçirilmiştir. Daha sonra, yıkanan jel boya içerisine bırakılmış ve oda sıcaklığı koşullarında çalkayıcıda (Incu-Shaker Mini Benchmark, ABD) gece boyunca boyanmıştır. Boyama sonrası jel, tekrar 2 kez 10'ar dakika daha ultra saf su içerisinde yıkanmıştır. Boyanan jelin arka planın rengini iyice açmak ve bantları belirgin hale getirmek için, boya uzaklaştırma çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, Tablo 6'daki prosedürde bildirilen oranlarda hazırlanmış ve jel, çözelti içerisinde 1 saat boyunca bekletilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından 2 kez 10'ar dakikalık yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Jelin görüntüsü, Biorad (Gel Doc XR+, ABD) görüntüleme cihazı kullanılarak elde edilmiş ve bantlar gözlemlenmiştir.

Tablo 6
Coomassie Brilliant Blue G-250 Boyama Çözeltisi Prosedürü

Coomassie Brilliant Blue (GBB) G-250 Çözeltisi	100 ml total hacim için;
%0,02 (w/v) CBB G-250	20 mg
%5 Alüminyum sülfat-(14-18)-hidrat	5 g
%10 (v/v) Etanol (%96)	10 ml
%2 (v/v) Ortofosforik asit (%85)	2,35 ml
Ultra saf su	87,65 ml
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	100 ml total hacim için;
%10 (v/v) Etanol (%96)	10 ml
%2 (v/v) Ortofosforik asit (%85)	2,35 ml
Ultra saf su	87,65 ml

3.2.9. MALDI-TOF Analizi

Keratin ekstraktlarındaki peptitlerin moleküler ağırlığı da Cardamone 2010 tarafından bildirilen yönteme göre matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Microflex™ LT, ABD) analizi kullanılarak belirlenmiştir. Yönteme göre kütle spektrometrisinden hemen önce, toz keratin numuneleri %0,1 trifloroasetik asit (TFA) ile yıkanmış ve metanol/su (40:60) (v/v) karışımı içerisinde çözündürülmüştür. Numune üzerine 10 µL α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA, 5 mg/mL) matrisi eklendikten sonra, bu karışımdan 1 µL'lik numunenin MALDI plakasına uygulanması ile azaltılmış basınç altında (20 kV) spektral ölçümler alınmıştır.

3.2.10. Col-HK Temelli Üç Boyutlu Biyokompozit İskelelerin Üretimi

Yürütülen bu tez çalışmasında, KDM ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilen osteokondüktif bor ve silisyum modifiye edilmiş kollajen-keratin biyokompozit kriyojellerin (B-Si-Col-HK) kemik doku hasarları rejenerasyonunda etkisinin karşılaştırılması amacıyla kontrol grubu olarak modifiye edilmemiş üç boyutlu çapraz bağlı kollajen-keratin (Col-HK) biyo-iskeleleri kullanılmıştır.

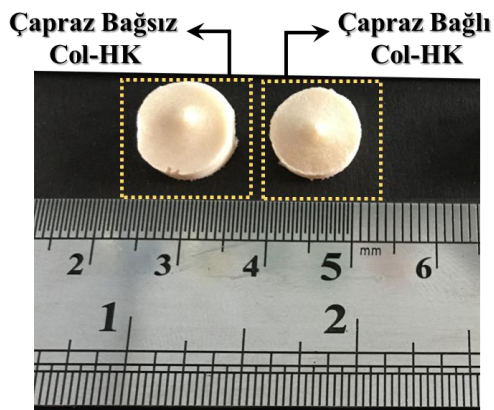
Col-HK biyo-iskelelerinin üretimi için, liyofilize formdaki pepsinde sindirilmiş tip I kollajen 10 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 0,01 M HCl içerisinde çözündürülmüştür. Ardından, 10 mg/ml konsantrasyonda liyofilize toz keratin tartılarak kollajen çözeltisi üzerine eklenmiş ve pipetaj işlemi ile homojen bir şekilde karışımı sağlanmıştır. Elde edilen homojen çözelti, 48 kuyucuklu teflon kalıplar içerisindeki her bir kuyucuğa, 300'er µL olacak şekilde aktarılarak kalıplama işlemi yapılmıştır. Kalıplama işlemi sonunda teflon kalıp, gece boyunca -26 °C'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon aşamasından sonra üç boyutlu gözenekli iskele formları elde edilmiştir.

3.2.11. Üç Boyutlu Col-HK Biyo-iskelelerin Çapraz Bağlanması

Üç boyutlu biyo-iskelelerin yapısal bütünlüğünün korunmasında, mekanik mukavemetinin artırılması ve mikro yapısının yeniden düzenlenmesi amacıyla N-hidroksisüksinimit (NHS) ve N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) ajanları kullanılarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama

işlemi, Sezgin Arslan, (2017)'nin yapmış olduğu tez çalışmasında optimize ettiği prosedür baz alınarak yapılmıştır.

Çapraz bağlama öncesi biyo-iskeleler 30 dakika boyunca %99,9'luk etanol (Millipore-Sigma, Almanya) içerisinde bekletilmiştir. Çapraz bağlama işlemi için gerekli tüm çözeltiler bekleme süresi boyunca hazırlanmıştır. Bunun için, 0,05 M MES (2-morfolinoetansülfonik asit, Millipore-Sigma, Almanya) tamponu ultra saf suda çözündürülerek çözeltinin pH'ı 5,5'e ayarlanmıştır. Sonrasında sulu MES tampon çözeltisi ve %99,9'luk etanol sırasıyla 1:9 oranında olacak şekilde karıştırılmıştır. Çapraz bağlamada kullanılacak her bir iskele (Col-HK) için total protein kütleleri temel alınmış olup, iskele başına 1 ml etanollü MES tampon çözeltisi kullanılmıştır. Bir Col-HK iskelesinin kütlesi 6 mg olarak bulunmuştur. Her bir 6 mg iskele için 6,72 mg NHS ve 27,6 mg EDC tartılmış olup 1 ml etanollü MES tampon çözeltisi içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Beklenen süre sonunda, 24 kuyucuklu well-plate içerisinde iskeleler üzerindeki etanol uzaklaştırılmış ve her bir iskele üzerine hazırlanan çapraz bağlayıcı çözeltilisinden 1'er ml olarak eklenmiştir. İşlemi tamamlanan iskeleler, oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Incu-Shaker Mini Benchmark, ABD) 100 rpm dönme hızında çalkalanarak 5 saat boyunca çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi sonunda, çapraz bağlayıcı ajanların iskele yapılarından arındırılması amacıyla iskeleler, oda sıcaklığı koşullarında manyetik karıştırıcıda (Magnetic Stirrer MS-12BB, Jeio Tech, Daejeon, Güney Kore) saf su ile 2 saat boyunca yıkanmıştır. Yıkanan çapraz bağlanmış iskeleler, temiz ve kuru 24 kuyucuklu well-plate içerisine yerleştirilmiş ve gece boyu -26 °C'de dondurularak liyofilize edilmiştir. Tüm bu işlemlerin sonunda üç boyutlu gözenekli çapraz bağlı iskele yapıları elde edilmiş olup karakterizasyon aşamaları ve hücre kültürü uygulamaları için kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Çapraz bağırsız ve çapraz bağı Col-HK biyo-iskeleleri

3.2.12. B-Si-Col-HK Biyokompozit Malzemelerin Sol-Jel Sentezi ve Kriyojellerin Üretimi

Bor ve silisyum modifiye edilmiş kollajen/keratin temelli biyokompozit hidrojel üretimi sol-jel reaksiyonu baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Silika prekürsörü olarak tetraetil ortosilikat (TEOS, %98, Merck-Millipore) kullanılmıştır. Sol-jel reaksiyonu için ilk olarak, TEOS solüsyonunun asit katalizli ortamda hidroliz edilmesi (reaktif TEOS, rTEOS) ile polikondenzasyon tepkimelerinde kullanılacak rTEOS çözeltisi hazır hale getirilmiştir (Şekil 23). Reaktif TEOS (rTEOS), Yılmaz ve diğerleri (2021) tarafından bildirilen prosedür baz alınarak hazırlanmıştır. Kısaca, TEOS (3 mL), HCl (0,1 M, 0,18 mL) ve ultra saf su (0,6 mL) (Milli Direct-Q 3 UV, 18 MΩ cm⁻¹, Merck-Millipore, Almanya) sırasıyla bir cam tüp içerisine aktarılmış ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika süreyle maksimum hızda vortekslenmiştir (IKA Genius 4). Daha sonra karışım, homojen ve şeffaf bir çözelti elde edilene kadar 45 °C'de 10 dakika boyunca sonikasyona (Elma, S 30H, Almanya) tabi tutulmuştur. Reaktivasyonu gerçekleştirilen stok TEOS çözeltisi taze günlük olarak hazırlanmış ve içeriğindeki silanol grupları (Si(OH)₄) ile sol-jel reaksiyonunda kullanılmak üzere diğer jelasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

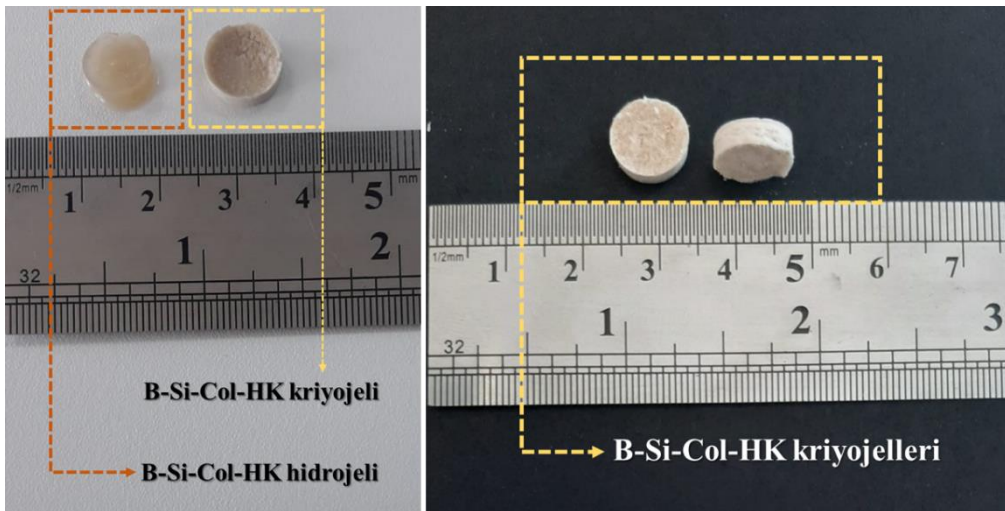


Şekil 23. Asit katalizli ortamda hidroliz ile rTEOS'un eldesi

Sol-jel reaksiyonu ile B-Si-Col-HK biyokompozit malzemesinin temelini oluşturan bor minerali için ise borik asit (H₃BO₃, ≥%99,5, Merck-Millipore,) kullanılmıştır. Öncelikle borik asit, %3 (w/v) konsantrasyonunda ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Literatür çalışmaları kapsamında, jelasyon reaksiyonu esnasında borik asidin veya diollerinin kompleksleşmesi için genellikle çözelti pH'nın ~9 veya üzerinde olması gerektiği bildirilmiştir (Chen, vd., 2017). Bu durumdan yola çıkılarak, tetrahedral

tetrahidroborat anyonu oluşturmak üzere borik asit çözeltisi üzerine damla damla NaOH (1 M) eklenerek $\text{pH} \geq 9,24$ (borik asidin pKa 'sına eşit veya daha yüksek) olarak ayarlanmış ve sol-jel reaksiyonunda kullanılmak üzere hazır duruma getirilmiştir.

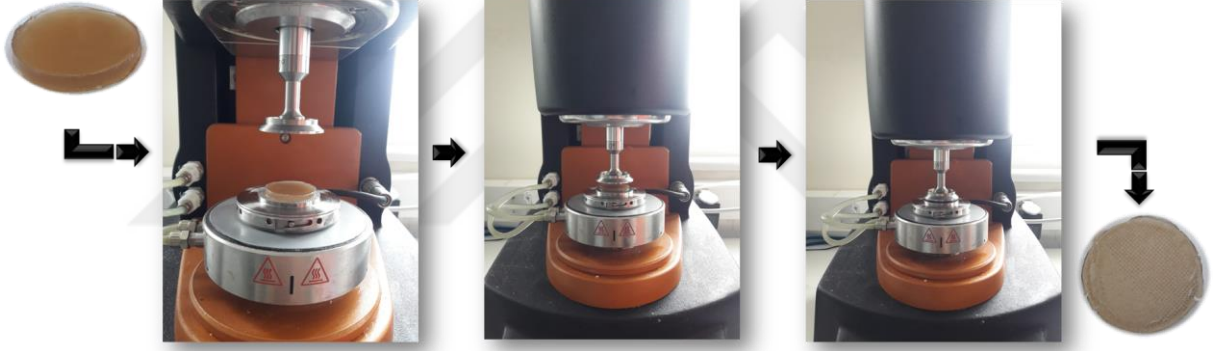
Polimer zincirlerinin silika öncü fazı ile kovalent çapraz bağlanması için şablon görevi gören proteinli polimerik malzeme hazırlanmıştır. Bu amaçla, liyofilize formdaki atelo-kollajen (Col) %1 (w/v) konsantrasyonda olacak şekilde borik asit çözeltisi (B) ($\text{pH} \geq 9,24$) içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra süspansiyona aynı oranda (%1, w/v) toz keratin (HK) eklenerek köpürmeden hafifçe karıştırılmıştır. B-Si-Col-HK hidrojel ve kriyojellerin elde edilmesi için 48 kuyucuklu teflon (politetrafloroetilen, PTFE) kalıplar kullanılmıştır. Optimizasyonu gerçekleştirilen sırasıyla 10-10/1 (mg/ml) Col-HK ve B ($\text{pH} \geq 9,24$) sol ürünlerine karşılık 50 μL rTEOS oranları, 48 kuyucuklu teflon kalıplardan elde edilebilecek hidrojel/kriyojel yapıları için uyarlanarak sentez aşamasına geçiş yapılmıştır. Öncelikle, teflon kalıp içerisindeki her bir kuyucuğa; 300 μl sol ürünler aktarılmış ve üzerine 15 μL rTEOS eklenerek oda sıcaklığında homojen bir karışım sağlanıncaya kadar dikkatli bir şekilde pipetajlanmıştır. Sol-jel dönüşümü 5-10 dakika içinde gerçekleşmiş ve elde edilen hidrojel, jelin olgunlaşması ve reaksiyonun tamamen sona ermesi için oda koşullarında ~60 dakika dinlenmeye bırakılmıştır. Tüm bu süreç sonunda protein polimerleri, bor ve silisyum molekülleri, sol-jel reaksiyonunun polikondenzasyon aşamalarını tamamlamasıyla katı bir jel formu elde edilmiştir. Son olarak, olgunlaşan hidrojel teflon kalıpla birlikte $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca dondurulmuş ve daha sonra suyu ve EtOH'ı uzaklaştırmak için liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işleminden sonra dondurularak kurutulmuş B-Si-Col-HK kriyojelleri Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Üç boyutlu biyokompozit B-Si-Col-HK hidrojel ve kriyojellerin görüntüsü

3.2.13. B-Si-Col-HK Hidrojellerinin Reolojik Ölçümleri

B-Si-Col-HK hidrojellerinin reolojik özelliklerini incelemek için, DHR-2 Reometre cihazı (TA Instruments, ABD) kullanılmıştır. Reolojik ölçümler, çelik-çizgili geometriye sahip ($\Phi=40$ mm) paralel plaka sistemi kullanılarak alınmıştır. B-Si-Col-HK hidrojelleri, 34,8 mm çapındaki (6 kuyucuklu) teflon kalıp içerisinde 3 ml'lik bir çözelti hacminden oluşturulmuştur. Hidrojel örneği doğrudan iki plaka arasına yerleştirilmiş ve üst plaka ile hidrojel arasındaki mesafe $0,9 \pm 0,1$ mm olarak ayarlanmıştır. Hidrojelin lineer viskoelastik bölgesini belirlemek için salınımlı genlik taraması yapılmış ve gerinim genlik değeri %0,099 (10585,4 Pa) olarak bulunmuştur. %0,099 gerinim değeri baz alınarak 0,01–100 Hz aralığında frekans taraması uygulanmıştır. Son olarak, hidrojellerin termal tarama işlemi %0,099 sabit gerinim değeri altında, 10 Hz'lik bir frekansta ve 1 °C/dakikada artarak 4-40 °C sıcaklık aralığında ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. B-Si-Col-HK hidrojellerinin reolojik ölçüm görüntüleri

3.2.14. Col-HK Biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK Kriyojellerin Karakterizasyonları: ATR-FTIR

Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin kimyasal yapıları, zayıflatılmış toplam yansıtımlı (ATR) modunda Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre (FTIR) (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) analizi ile elde edilmiştir. FTIR spektrumları $500-4000$ cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve oda sıcaklığında kaydedilmiştir.

3.2.15. Katı Hal Bor Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{11}B -MAS NMR)

Col-HK ve B-Si-Col-HK biyokompozit malzemelere ait yapıların aydınlatılması ve spesifik grupların belirlenebilmesi için katı hal ^{11}B MAS NMR spektroskopik analizi

yapılmıştır. Katı hal NMR spektrumları, oda sıcaklığında $B_0=11,7$ Tesla'da JEOL ECZ 500R spektrometresi (Japonya) ile toplanmıştır. 1H ve ^{11}B rezonans frekansları sırasıyla 500,11 ve 160,45 olarak ayarlanmıştır. TMS (tetrametilsilan) ve BF_3 (bor triflorür) sırasıyla 1H ve ^{11}B deneyleri için harici standart malzemeler olarak kullanılmıştır. Spektrumlar, 3.2 mm ZrO_2 (zirkonyum oksit) rotorları ile 6 kHz spin frekansında taranarak kaydedilmiştir.

3.2.16. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Biyokompozit numunelerin kristal yapı özellikleri X-ışını kırınımı (XRD) (PANalytical Empyrean, Hollanda) sistemi kullanılarak incelenmiştir. Analiz için $Cu-K\alpha$ ışınları kullanılmıştır. Kırınım verileri, X-ışını tüpü ($Cu K\alpha$ radyasyonu, $\lambda=1.54056$ Å, 45 kV ve 40 mA) kullanılarak $5^\circ-70^\circ$ (2θ) aralığı ve 0.02° dakikalık adım genişliği ile kaydedilmiştir.

3.2.17. Termogravimetrik (TGA) Analizi

Biyokompozit iskele ve kriyojellerin, değişen sıcaklık değerlerine karşı kütledeki değişimleri belirlemek için termogravimetrik analiz yapılmıştır. TGA analizi için, TGA 8000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, 20 ml dk-1 kuru azot atmosferi altında $30-800$ °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika sabit ısıtma hızında alınmıştır.

3.2.18. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

Hazırlanan iskele ve kriyojellerin termal stabilitesi, DSC Perkin Elmer 4000 cihazında (Perkin Elmer, Groningen, Hollanda) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi ile incelenmiştir. DSC analiz işleminde yaklaşık 6 mg numune kullanılmıştır. Numuneler, 20 ml/dakika inert nitrojen atmosferi altında, $25^\circ C$ ve $400^\circ C$ sıcaklık aralığında ve $10^\circ C/dakika$ ısıtma hızında olacak şekilde analiz edilmiştir.

3.2.19. Mekanik Basma Testi

Mikromekanik düzeyde Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin basma testi, dinamik mekanik analiz cihazı (Instron-5569, Massachusetts, ABD) ile oda sıcaklığında yapılmıştır. Numunelerin basma testi, 100 N yük hücresi altında ve $0,1$ N/dakika basma hızı esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Her bir numune, analizde üç tekrar olacak şekilde

kullanılmıştır. Numunelerin mekanik dayanıklılığını değerlendirmek için cihaz ile yapılan bağımsız ölçümlerden, lineer basma modülü ve gerilme-gerinim diyagramları elde edilmiştir.

3.2.20. Şişme ve Sıvı Alım Testleri

Col-HK iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin şişme kapasiteleri, 24 saat boyunca bir fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) solüsyonunda (pH:7,4) 37 °C etüvde (Memmert UN55 Etüv, Almanya) inkübasyon yoluyla fizyolojik koşullar altında belirlenmiştir. İlk olarak, numunelerin kuru ağırlığı (m_{kuru}) tartılmış ve ardından numuneler 10 ml PBS içerisine yerleştirilmiştir. 24 saat sonunda numuneler, PBS tampon çözeltisinden çıkarılmış ve tekrar tartılarak ıslanan numunelerin kütlesi ($m_{ıslak}$) not edilmiştir. Her bir numunenin şişme oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Kaczmarek, vd., 2018):

$$\text{Şişme oranı (\%)} \text{ (mg/mg)} = \left[\frac{(m_{ıslak} - m_{kuru})}{m_{kuru}} \times 100 \right] \quad (3.6)$$

Sıvı alım testinde, numunelerin PBS içerisine daldırılmadan önceki ilk PBS kütlesi (m_{ilk}) ve daldırılmadan sonraki son PBS kütlesi (m_{son}) kaydedilmiştir. Son olarak, sıvı alım kapasitesi (%) aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Sıvı Alım Yüzdesi (\%)} \text{ (mg/mg)} = \left[\frac{(m_{ilk} - m_{son})}{m_{son}} \times 100 \right] \quad (3.7)$$

Deneysel veriler, $n = 3$ için ortalama \pm standart sapma (SD) olarak belirtilmiştir.

3.2.21. Gözeneklilik Testi

Col-HK biyoiskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin gözenekliliği, sıvı değiştirme yöntemi ile Bhardwaj ve Kundu, (2011)' çalışmasına göre gerçekleştirilmiştir. Yer değiştirme sıvısı olarak da hekzan ($\geq \%99$, Millipore-Sigma, MA, ABD) kullanılmıştır. İlk olarak, dereceli cam mezur içerisine hekzan eklenmiş ve bilinen çözeltinin hacmi V_1 olarak kaydedilmiştir. Numune, mezurdaki hekzan çözeltisi içerisine daldırıldıktan sonra ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş ve 1 dakika boyunca degas işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde, iskele ve kriyojel yapısı içerisindeki hava kabarcıkları çıkarılmıştır. 1 dakikanın sonunda, hekzan ve numunenin toplam hacmi V_2 olarak not edilmiştir. Son olarak, numune dikkatlice hekzan içerisinden çıkarılmış ve kalan hekzan hacmi V_3 olarak kaydedilmiştir.

Deney seti üç kez gerçekleştirilmiş ve yüzde gözeneklilik aşağıdaki formül baz alınarak hesaplanmıştır.

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = [(V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)] \times 100 \quad (3.8)$$

3.2.22. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

Kompozit iskele ve kriyojellerin özgül yüzey alanı ve toplam gözenek hacimleri, azot (N₂) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı Quadrasorb SI BET cihazı (Quantachrome Instruments, ABD) kullanılarak Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) yöntemleri ile araştırılmıştır. Numuneler ilk önce 300°C'de 3 saat boyunca degas işlemine tabi tutulmuş ve analiz, 77 °K (Kelvin) sıvı azot gaz atmosferi ortamında gerçekleştirilmiştir. Numunelerin yüzey alanı ölçümleri BET yöntemiyle, gözenek hacmi ise BJH yöntemiyle elde edilmiştir.

3.2.23. Temas Açısı Testi

Çapraz bağlı Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelinin yüzey ıslanabilirlik özelliklerini belirlemek için Attension Theta Optik Tensiyometre cihazı (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) kullanılmıştır. Temas açısı ölçümü, motorize şırıngayla ±1° hassasiyette gerçekleştirilmiştir. Motorize şırınga ile numune üzerine 5 µl ultra saf su damlatılmıştır. Numune yüzeyine bir damla su, damlatıldığında emilime başlanmış ve cihaza takılan kamera ile damlacıklar tamamen emilene kadar anlık fotoğraflar çekilmiştir. Su damlacığına ait saniyedeki emilim hız değerleri her iki numune için de anlık görüntülerinden hesaplanmıştır.

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

Biyoskele ve kriyojellerin mikro yapısı ve yüzey morfolojisi, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FEG-SEM XL 30S, PHILIPS, Hollanda) ile gözlemlenmiştir. Cihazın EDAX EDS birimi kullanılarak kriyojellerin yüzey dağılımında kantitatif elementel bileşimi de belirlenmiştir. Tüm numuneler 90 saniye boyunca Au ile kaplanmış ve yüksek vakum altında farklı büyütme seviyelerinde 10 kV gerilimde kaliteli görüntüler alınmıştır. Cihaz yazılımı kullanılarak malzemelerin SEM görüntülerinde rastgele seçilen yaklaşık 100 gözenekten gözenek çapları hesaplanmıştır.

3.2.25. Biyobozunurluk Testi

Çapraz bağlanmış üç boyutlu iskeleler ve kriyojellerin biyobozunurluğunun test edilmesi için enzim yardımıyla biyobozunurluk testi yapılmıştır. Bu test, protein temelli iskele ve kriyojeller için, proteinaz K (Merck-Millipore) enzimi ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 0,02 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) hazırlanmış ve içerisine mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için %0,01 sodyum azid ($\geq 99,5\%$, NaN_3) eklenmiştir. Ardından %0,01 proteinaz K enzimi solüsyonda çözündürülmüştür. Test için, numunelerin ilk kuru ağırlığı (m_{ilk}) tartılmıştır. Tartımları yapılan numuneler, steril 24 kuyucuklu well-plate içerisine alınmıştır ve her bir numunenin üzerine hazırlanan enzimatik çözeltiden 1'er ml eklenerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi, 3 ve 7 günlük periyotta, her iki günde bir enzim solüsyonları yenilenerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra saf suyla (Milli Direct-Q 3UV, Merck-Millipore, Almanya) yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen numunelerin kalan kütleleri tartılarak (m_{son}) kaydedilmiştir. Biyobozunurluk oranı ortalama \pm SD ($n = 3$) olarak kaydedilmiştir. Numunelerin kütle kaybı yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Tamburaci, vd., 2019; Yamauchi, vd., 2008).

$$\text{Toplam Kütle kaybı (\%)} = [(m_{ilk}) - (m_{son}) / (m_{ilk})] \times 100 \quad (3.9)$$

3.2.26. *In Vitro* Hücre Kültürü Uygulamaları

Üretimi yapılan çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelleri üzerinde hücrelerin davranışı ve osteojenik etkilerinin incelenmesi için hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bu hücre kültürü uygulamaları, Class II A-2 laminar akışlı kabin içerisinde yürütülmüş ve satın alınmış -80 °C'de dondurularak muhafaza edilen insan adipoz mezenkimal kök hücreleri (iAMKH) (Merck-Millipore, Kat.no. SCC038, Lot QVP1303200, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasaj sayısı olarak P6'da kriyovial tüplerde bulunarak -80 °C'den çıkartılan hücreler, 37 °C su banyosunda küçük bir buz kristali yüzeye çıkana kadar (1/3'ü) çözündürülerek pipetajlanmıştır. Ardından hücreler, önceden 37 °C'ye getirilerek ısıtılan ve içerisinde, %5 fetal sıgır serumu (FBS) (ScienCell, kat. no. 0025, ABD), %1 penisilin/streptomisin (P/S) (ScienCell, kat. no. 0503, ABD), %1 büyüme faktörü solüsyonu (ScienCell, kat. no. 0503, ABD), %93 mezenkimal kök hücre bazal vasatı (ScienCell, kat. no. 7501, ABD) bulunduran kök hücre çoğaltma vasatına eklenmiştir. Oda sıcaklığında, 200 x g'de 5 dk santrifüj (NÜVE, Türkiye) işlemi

uygulanmış ve +4 °C'den sonraki sıcaklıklarda sitotoksik etki gösteren dimetilsülfoksit (DMSO) ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve dip kısımda toplanan pelletler, mezenkimal kök hücre tam besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Besiyeri içerisinde hücrelerin homojen dağılması için ise pipetaj işlemi uygulanmıştır. Sıvı faza geçirilerek homojenitesi sağlanan hücreler, pipet ile steril T75 flaskları içerisine aktarılmış, 1 hafta boyunca bekletilmek üzere %5 CO₂, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem koşullarındaki inkübatöre (Panasonic, Japonya) yerleştirilmiştir. Her 2-3 günde bir besiyeri, tazesıyla değiştirilmiş ve hücreler T75 flaskın %80-90'ını doldurana kadar inkübasyon işlemine devam edilmiştir. Maksimum doluluğa ulaşan T75 flaskların içerisindeki hücreler, invert faz-kontrast (Zeiss, PrimoVert, Almanya) mikroskobu kullanılarak hücre proliferasyonu incelenmiştir.

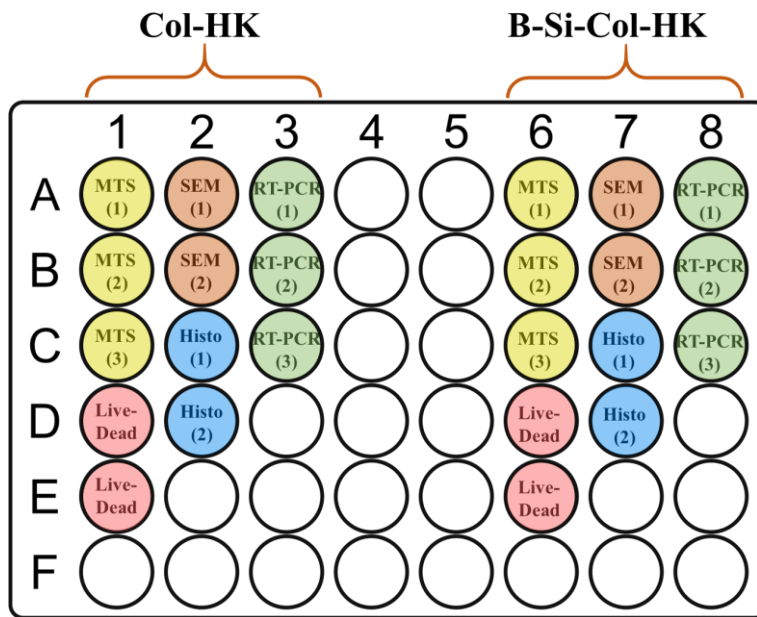
Bir sonraki adım ise hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması işlemidir. T75 içerisindeki besiyeri pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Devamında serumun, tripsin enzimini inhibasyonunu engellemek ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için, flask yüzeyi 5'er ml PBS (7,4) ile yıkanmıştır. T75 flaskı yüzeyine tutunmuş hücrelerin üzerine, steril PBS içerisinde %0,25 Tripsin-0,53 mM EDTA (etilendiamintetraasetik asit) bulunan solüsyondan 2'şer ml eklenmiş ve hücreler 37 °C'de 3 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler flask yüzeyinden kaldırılarak tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu işlem ile hücreler pasajlanmıştır (p7).

İnkübasyon sonunda, hücreler üzerine 8'er ml olacak şekilde tam besiyeri eklenerek pipetaj işlemi yapılmış ve flask içerisinden alınan hücreli solüsyon, 15 ml'lik falcon tüplere aktararak 200 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası dipte toplanan hücreler üzerine taze besiyeri eklenerek pipetajlanmış ve ekim işlemine hazırlanmıştır.

Biyomalzemelere İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin Ekimi: İlk olarak çapraz bağlı Col-HK biyoiskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelleri, laminar akışlı kabin içerisine alınarak 1 saat boyunca UV ışık (254 nm) altında sterilize edilmiştir. Akabinde sterilize edilen biyomalzemeler, steril 48 kuyucuklu hücre kültürü plastiği (well-plate) içerisine yerleştirilmiştir. B-Si-Col-HK kriyojeli reaksiyonu sonucunda oluşan asidik yapıyı uzaklaştırmak için, kriyojel besiyeri ile nötralize edilmiştir. Nötralizasyon işlemi, kriyojel başına DMEM high glucose besiyeri ile 3 tur olacak şekilde nazikçe yıkanmıştır. Aksi takdirde nötralizasyon işlemi gerçekleşmezse kriyojelin asidik çevresinden dolayı etkilenen hücreler ölecektir. Pasaj sayısı 7 olan iAMKH'ler, her bir biyomalzeme başına 100,000 hücre yoğunluğunda (150 µL) olacak şekilde biyomalzemelere ekimi

gerçekleştirilmiştir. Col-HK biyoiskelelerine ekim, 150 µL hücrelerin emdirme işlemiyle yapılmış ve üzerine 1 ml taze tam besi yeri eklenerek ekim tamamlanmıştır. Nötralizasyon işlemi takiben, B-Si-Col-HK kriyojeline ekim işleminde ise ilk olarak, kriyojel üzerine MSCs taze besiyeri (1 ml) eklenmiş ve akabinde kuyucuk içerisine 150 µL hücreler ekilmiştir. Hücrelerin ekimi sonrasında, hücre kültürü plastiği 37 °C, %5 CO₂, ve %95 bağıl nem sağlayan inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücrelerin, biyoiskele ve şişen kriyojellere tutunması için inkübatörde 24 saat bekletilmiştir.

24 saatin sonunda, ortama şartlandırma görevi gören mezenkimal kök hücre besi yeri çekilerek atılmıştır. Devamında hücreler, mezenkimal kök hücre osteojenik farklılaşma besi yeri (ScienCell, MODM, Kat.no. 7531) ve ek solüsyonları (ScienCell, FBS, P/S mezenkimal kök hücre osteojenik besi besiyeri ek maddeleri A (MODS-A) ve B (MODS-B)) içeren besi yeri içerisinde kültüre başlanmıştır. Besiyerleri, her 2-3 günde bir 1 ml olacak şekilde taze besi yeri ile yenilenmiş ve kültür 7, 14 ve 21 günlük periyotlarla devam etmiştir. Hücre kültürü periyotları sona erene kadar osteojenik besi yeri solüsyonu kullanımı sürdürülmüştür. Hücrelerin kültür işlemi sona erdikten sonra, hücre canlılık testleri yapılmış ve biyomalzemeler FE-SEM analizleri için %2,5 glutaraldehit, histokimyasal analizler için ise %10 formalin çözeltileri ile fiksasyondan geçirilerek +4 °C’de saklanmıştır. Şekil 26’da biyomalzemelerin deney setindeki hücre canlılık testi (MTT, Live-Dead), histokimyasal testler ve RT-PCR analizleri için 48 kuyucuklu hücre kültürü plastiği içerisindeki dizilimleri gösterilmektedir.



Şekil 26. Hücre kültürü deney setinin gösterimi

3.2.27. Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Testleri

Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin hücre canlılığını ve çoğalmasını teşvik etme kapasitesini test etmek için Live/Dead testi (Molecular Probes, Thermo Fisher, İngiltere) ve MTS testi, Derkus ve diğerleri (2020) tarafından bildirilen prosedür dikkate alınarak yapılmıştır. Live/Dead testi için, Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojeller içerisindeki iAMKH'lerin osteojenik indüksiyonunu takiben, malzemeler fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından, her iskele ve kriyojel üzerine calcein-AM (4 µM, canlı hücreleri yeşil boyar) ve ethidium homodimer-1 (ethd-1, 2 µM, ölü hücreleri kırmızıya boyar) solüsyonları eklenerek 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren karanlık ortamda 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, 488 ve 527 nm'lik eksitasyon dalga boyları kullanılarak floresan mikroskopu (Leica DMIL, Almanya) altında gözlenmiştir. Her iskele ve kriyojelin üç kopyası da incelenmiştir.

Hücrelerin proliferasyonu da yapı iskelesi ve kriyojel bileşenlerinin potansiyel toksisitesini değerlendirmek için MTS testi ile niceliksel olarak ölçülmüştür. Her zaman noktadan sonra, malzeme üzerindeki ortam atılmış ve her bir malzeme PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Akabinde, her bir malzeme üzerine 100'er µl MTS reaktifi eklenerek 37 ° C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri, 490 nm'de bir spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan Sky Microplate Spektrofotometre) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her parametre üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.28. Histokimyasal/İmmünohistokimyasal Analizler

Çapraz bağlı üç boyutlu Col-HK yapı iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojeller üzerindeki iAMKH'lerin, davranış ve takibi için histokimyasal/immünohistokimyasal testler yapılmıştır. Öncelikle, hücre kültürü sonlanan tüm biyomatriksler PBS ile yıkama işleminden geçirilmiş ve %10'luk nötr tamponlu formaldehit solüsyonunda fikse edilmiştir. Formaldehit solüsyonundan yıkanarak arındırılan biyomatriksler, etanol serilerinden (%50, %70, %80, %85, %90 ve %100'lük) geçirilerek dehidre edilmiş ve etanolün yapıdan uzaklaştırılması için örnekler, oda şartlarında yaklaşık 24 saat boyunca beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra, kuruyan örnekler parafine gömülmüş ve mikrotom cihazında 3-5 µm kalınlığında olacak şekilde kesitlere ayrılmıştır. Kesitler, poli-L-lizin mikroskop lamaları (Thermo Scientific, Braunschweig, Almanya) üzerine yerleştirilmiş ve kullanımına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır. Devamında, örneklerin yeniden hidrate olması için de-

parafinizasyon işlemi yapılmış ve kesitler su ile muamele edilerek (rehidrasyon) histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalarına hazırlanmıştır.

Histokimyasal analizde mineralize matriks oluşumunu ve genel histomorfolojiyi değerlendirmek için kesitler, Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson Trikrom (MT) ile boyanmıştır. H&E ve MT boyamaları için standart boyama prosedürleri uygulanmıştır. Hematoksilen ve eozin boyaları, çeşitli doku tiplerini tanımlamada kullanılmaktadır. Hematoksilen, koyu mavi-mor bir renge sahiptir ve nükleik asitleri karmaşık, tam olarak anlaşılmayan bir reaksiyonla boyar. Eozin ise pembedir ve proteinleri boyar. Tipik bir dokuda, çekirdekler maviye boyanırken, sitoplazma ve hücre dışı matriks, değişen derecelerde pembe renge boyanmaktadır (Fische, vd., 2008). Masson Trikrom boyaları, biyomatriks yapısındaki kollajen liflerin tespiti için HDM'yi ortaya çıkarır, böylece liflerin miktarını ve dağılımını uygun bir şekilde vurgulamaktadır (Bedossa, vd., 2018)

İmmünohistokimyasal analizinde, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla örnekler, 30 dakika süreyle %0,3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Örneklerde formaldehit fiksasyonunun kullanılmasıyla oluşan kimyasal modifikasyonların hücre içeren örneklerdeki antijenik yapılara (epitoplara) zarar vermemesi için ısı kaynaklı antijen geri kazanım tekniği (HIER) kullanılmıştır. Bu teknikte kesit örnekleri, sitrat tamponu (0,1 M, pH:6,0) (Sigma Aldrich, Inc, ABD) içerisinde 800 W gücündeki bir mikrodalga fırınında ısıtılmak suretiyle 20 dakika boyunca ön işleme tabi tutulmuştur. Herhangi bir non-spesifik bağlanmayı önlemek için örnekler, %10'luk normal keçi serumu içerisinde bekletilmesiyle 30 dakika süreyle bloke edilmiştir. Proteinleri bloke etme adımının ardından, kesitler üzerine anti-ON (osteonektin) (1:750, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-OP (osteopontin) (1:500, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-OC (osteokalsin) (1:400, Biorbyt, Cambridge, İngiltere) ve anti-ALP (alkalin fosfataz), (1:200, Boster, CA, ABD) primer antikörleri konularak bir gece boyu inkübe edilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamaların ileri işlemleri, HRP-konjuge ikincil antikör kiti (Ultra Vision Quanto Detection System, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemlerin sonunda görüntüler, bir dijital ışık mikroskobu (Zeiss Primostar, AxioCam, Jena, Almanya) altında alınmıştır.

3.2.29. Osteojenik Farklılaşma Üzerine Kantitatif RT-PCR Analizleri

Hücreli Col-HK iskelesi, B-Si-Col-HK kriyojelleri ve dondurulmuş iAMKH'lerin, osteojenik farklılaşma yeteneklerinin belirlenebilmesi için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi yapılarak osteojenik genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Kontrol grubu olarak, -80 °C'de dondurularak saklanmış iAMKH'ler (pasaj 5-6) kullanılmış ve iAMKH'ler 0. gün deney seti adı altında değerlendirilmiştir. Deneysel prosedür sırasında, 0. (kontrol olarak), 7., 14. ve 21. günlerinde kültürü sona eren iskele ve kriyojel yapıların her biri için 1 ml RNA izolasyon çözeltisi (pureZOL™, fenol ve guanidinyum tiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi, Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) kullanılarak, numunelerin korunup saklama ve taşınma sorunu çözülmüş 24 saat boyunca -26 °C'de dondurulmuştur. iAMKH'ler ve hücreli iskele ve kriyojel yapılardan mRNA izolasyonu, Bio-Rad firmasına ait RNA izolasyon protokolü (#732-6890 katalog numaralı) ile gerçekleştirilmiştir.

iAMKH'ler, iskeleler ve kriyojel yapılardan izole edilen RNA'lar, saflığın ve miktarının tayin edilebilmesi için RNAaz içermeyen ultra saf su ile resüspanse edilmiş ve ThermoFisher NanoDrop™ LITE Spektrometresi (ThermoFisher Scientific, MA, ABD) aracılığıyla okutulmuştur. Spektrometrede her bir numuneden 2 tekrar olarak okuma alınmıştır. Kör çözeltisi olarak ise, RNAaz içermeyen ultra saf su kullanılmıştır.

İzole edilen RNA moleküllerinden Revers (ters) transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA'nın sentezinde Bio-Rad firmasına ait iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Prosedür uyarınca PCR reaksiyonu ön döngü ve ana döngü olacak şekilde iki aşamada kurulmuştur. Ön döngü, 95 °C'de 15 dakika ve 50 °C'de 2 dakika olarak programlanmıştır. Asıl döngüde ise 94 °C'de 15 saniye, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde 39 döngü ile reaksiyon tamamlanmıştır.

PCR reaksiyonu sonucu cDNA'lar, hazırlanan SYBR Green PCR master karışımı (Bio-Rad) ile tablo 7'de değinilen gen spesifik ileri ve geri primerler kullanılarak qRT-PCR işlemine tabi tutulmuştur. Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olarak kullanılan osteokalsin (OC), osteonektin (ON), kollajen tip1 α 1 (COL1A1), runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) ve alkalın fosfataz (ALP) genlerinin osteojenik farklılaşmada gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Housekeeping geni (kontrol gen

grubu) olarak glikolizi katalizleyen gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzim geni kullanılmıştır. Ayrıca qRT-PCR reaksiyonunda CFX-96 Termal Döngü (Bio-Rad, ABD) cihazı aracılığıyla amplifikasyon işlemi uygulanmıştır. Amplifikasyon sonuçları ise eşik döngü sayısı (Ct) şeklinde ifade edilmiştir. Gen transkriptleri, orta düzeyde eksprese edilen bir referans geni olan GAPDH geninin ekspresyon değeri, diğer genlere ait ekspresyon seviyelerine göre normalize edilmiştir. Hedeflenen her genin ekspresyonlarındaki değişimi (FC), housekeeping geni ile kıyaslanması sonucu belirlenmiş ve normalizasyonu $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Kantitatif RT-PCR deneyleri 3 kez tekrarlanmıştır.

Tablo 7
Kantitatif RT-PCR için kullanılan gen spesifik primerler ve ileri-geri dizileri

Hedef Gen	Kısaltma		Oligonükleotit Sekansı
Osteonektin	ON	İleri 5'/3'	GCTCAAGAACGTCCTGGTCA
		Geri 5'/3'	TTTCATGGATCTTCTTCAC
Osteokalsin	OC	İleri 5'/3'	GCAAAGGTGCAGCCTTTGTG
		Geri 5'/3'	GGCTCCCAGCCATTGATACAG
Runx transkripsiyon faktör 2	RUNX2	İleri 5'/3'	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC
		Geri 5'/3'	CGTTACCCGCCATGACAGTA
Kollajen tip I $\alpha 1$	COL1A1	İleri 5'/3'	CAAGACAGTGATTGAATACAAAACCA
		Geri 5'/3'	ACGTCGAAGCCGAATTCCT
Alkalın fosfataz	ALP	İleri 5'/3'	ATGTCATCATGTTTCCTGGGAGAT
		Geri 5'/3'	TGGAGCTGACCCCTTGAGGAT

(Haeri, vd., 2016; Kang, vd., 2013)

3.2.30. İstatistiksel Analiz

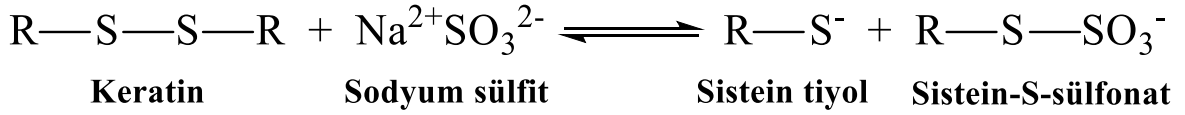
Çalışma kapsamında elde edilen deneysel veriler, en az 3 tekrar olarak alınmış ve ortalama \pm standart sapma sembolü ile belirtilerek Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programında hesaplanmıştır. Aynı deneydeki farklı grupların istatistiksel açıdan karşılaştırılmasında Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) kullanılmış ve gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi Tukey testiyle tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak, p-değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar ($*p \leq 0,05$) anlamlı olarak kabul edilirken, p-değerinin 0,05'ten büyük olduğu durumlar ($**p > 0,05$) ise anlamlı değil şeklinde kabul edilmektedir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnsan Saçı Keratini Ekstraksiyonu

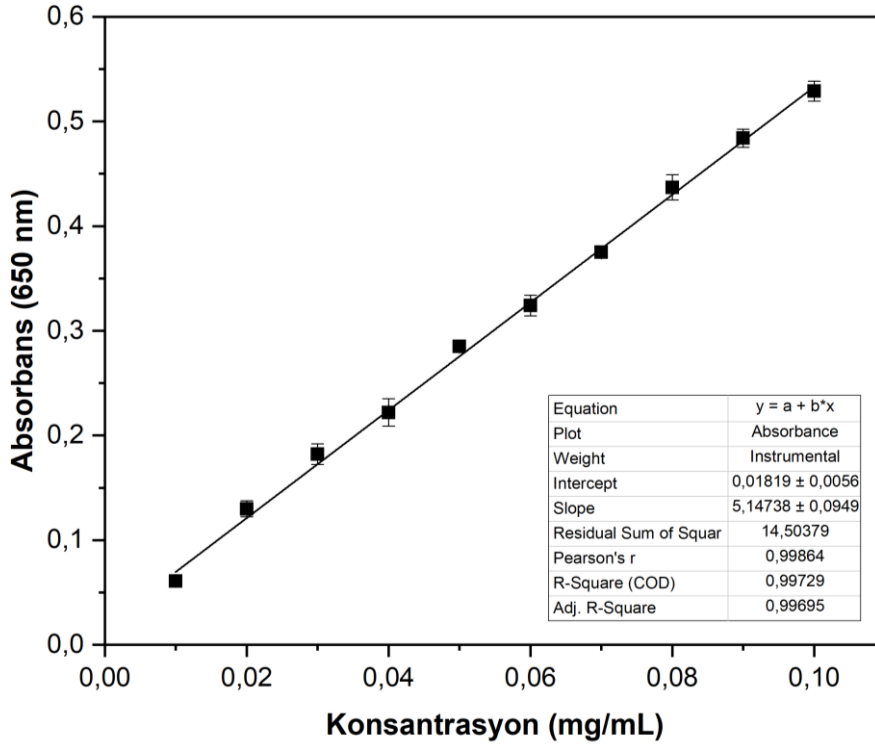
Keratin, tüy, saç, yün, boynuz ve tırnakların ana bileşeni olduğundan doğada oldukça bol bulunan lifli bir proteindir (Saha, vd., 2019). Saçtaki keratinlerin diğer keratin kaynaklarına kıyasla daha yüksek miktarda sistin içerdiği ve bu nedenle disülfid bağları yoluyla daha sert, dayanıklı ve birçok kimyasala dirençli bir yapı oluşturduğu belirtilmektedir (Rouse and Van Dyke, 2010). Ayrıca genel çözücülerle de çözünmezler ve yapılarındaki sistin nedeniyle de çevreye karşı kararlıdırlar (Chaliewsak and Charuchinda, 2013). Genel olarak keratin esaslı biyomalzemeler, doku mühendisliği, yara iyileşmesi, ilaç dağıtımı ve çeşitli biyomedikal ve kozmetik uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sharma, vd., 2019). Dünya nüfusunun artması ile saç bakım merkezlerinden çıkan insan saçı atıkları, bozunma zorluğundan dolayı çevre kirliliğine yol açmaktadır. Dolayısıyla, atık ürünlerden elde edilen keratinler, yenilenebilir, sürdürülebilir ve biyoyumlu bir biyolojik kaynaktır (Chaliewsak ve Charuchinda, 2013; Saha, vd., 2019). Disülfid bağları keratini çözünmez hale getirir. Dolayısıyla keratinin sulu çözünürlüğünü arttırmak için bu bağların kırılması ve modifikasyonu ile keratin ekstraksiyonunun farklı metodolojileri (kimyasal, mekanik ve enzimatik yöntemler) geliştirilmiştir (Agarwal, vd., 2019; Shavandi, vd., 2017a). Keratin ekstraksiyonu için kullanılan başlıca yöntemler, oksidasyon, indirgeme, iyonik sıvıların kullanımı, alkali ekstraksiyon ve sülfitolizis reaksiyonudur (Shavandi, vd., 2017a). Bu tez çalışması kapsamında, atık bir biyokütle olan insan saçı örneklerinden keratin ekstraksiyonu sülfitolizis reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem içeriğinde, Na_2SO_3 ve NaOH birlikte kullanılmıştır. Na_2SO_3 alkali ortamda keratinlerin ekstraksiyonu için kullanılan uygun, basit ve ucuz bir kimyasaldır. Reaksiyon esnasında keratin moleküllerindeki disülfid bağlarını parçalayarak keratinlerin çözünme hızını artırır. Şekil 27’de gösterilen reaksiyon sonucu Na_2SO_3 , disülfid bağını (sistin kalıntısı) kırarak sistein tiyol (R-S) ve S-sülfonatları (S-SO_3^-) oluşturmaktadır (Ji, vd., 2014; Wang, vd., 2018).



Şekil 27. Na₂SO₃'in sülfitolizis reaksiyonu

Sodyum sülfid, sülfitolizis reaksiyonunda ekstraksiyon şartlarını tek başına tamamlayamamaktadır. Bu durumda, ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanması ve verimin artırılması adına ek olarak ortama NaOH eklenmiştir. Ortama ilave edilen NaOH sonrası, ekstraksiyon süreci hızlanmıştır. Reaksiyonun sonucunda sodyum hidroksitin, peptit bağlarını hidrolize etmesiyle molekül ağırlığı küçük keratin fraksiyonları elde edilmiştir (Ji, vd., 2014; Wang, vd., 2018).

Ayrıntılı bir şekilde değinilen sülfitolizis yöntemiyle gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi Arslan 2017'nin tezinde optimize edilen 2. yönteme benzer % verim oranı göstermiştir. Ekstrakte edilmiş keratin proteinlerinin total konsantrasyon içeriğinin belirlenebilmesi için Lowry metodu ile standart kalibrasyon grafiği (Şekil 28) kullanılmış ve diyalizattaki protein konsantrasyonu 8,704±0,111 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

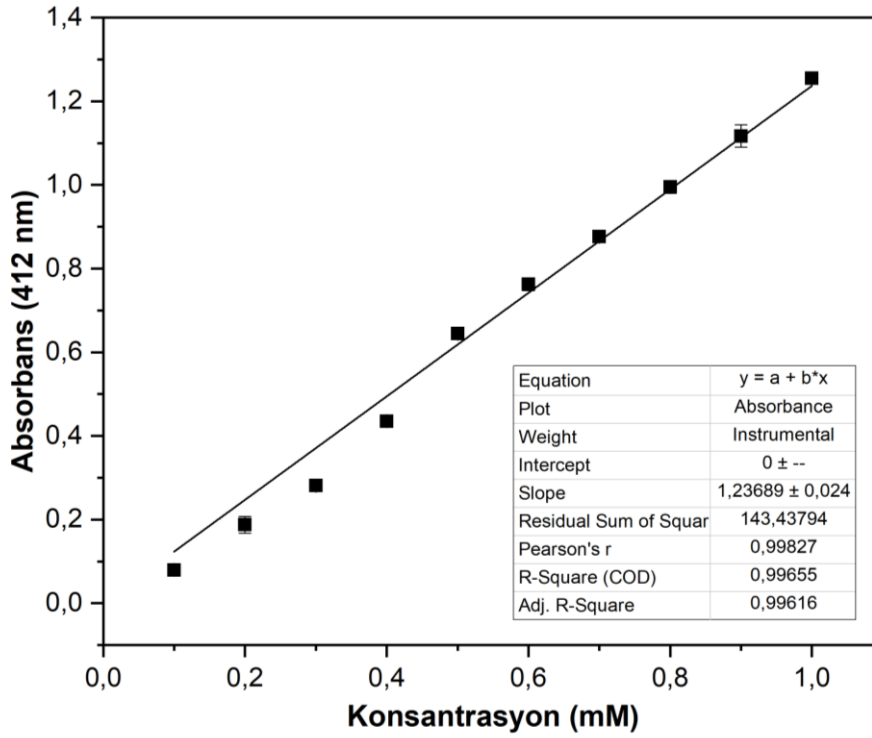


Şekil 28. Lowry metodu sonucu çizdirilen BSA kalibrasyon grafiği

Keratin proteinlerinin diyalizat konsantrasyonu verimi %34,81±0,54 iken, kuru ağırlığa göre belirlenen ekstraksiyon verimi ise %33,55±0,27 olarak bulunmuştur. Her iki protein konsantrasyonları % verimleri kıyaslandığında, bulguların birbirine benzer ve proteinlerin saf olduğu düşünülmektedir. Literatür kapsamında sülfitolizis ile alkali ortamlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon verimlerini Tonin ve diğerleri (2007) %33, Aluigi ve diğerleri (2014) %38, Shavandi ve diğerleri (2017b) %41 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Bu bağlamda, çalışmamız için elde edilen verimimizin literatür ile uyduğu bilinmektedir.

4.2. İnsan Saçı Keratini ve Tip I Kollajen Proteinlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonları

Genel olarak insan saçı keratini, diğer proteinlere nazaran içeriğindeki sistin ve yüksek sistein kalıntıları ile dikkat çekmektedir. Sistin, sistein kalıntılarının oksidasyonu ile oluşan dimerik bir amino asittir ve oluşturdukları disülfür bağları (S-S) ile keratinin stabilitesini sağlar. Keratinlerin ekstraksiyonu sülfitolizis yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup disülfür bağlarının kırılmasıyla sistein kalıntılarında ait sülfidril grupları (-SH) oluşmuştur. Bu sülfidril grupları, reaktiviteleri ile kimyasal etkileşimleri düzenler ve böylece keratinler için kimyasal reaksiyonları indükleyen eşsiz moleküllerdir (Silva, vd., 2014; Singh, vd., 2017). Bu nedenle, sülfitolizis yöntemiyle ekstrakte edilmiş keratinin serbest -SH gruplarının varlığı Ellman's reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Hidrolize keratinlerin serbest -SH grup içeriği, Şekil 29'da yer verilmiş L-sistein standart kalibrasyon grafiğinin kullanılmasıyla hesaplanmıştır. Hidrolize keratinlerden elde edilen -SH miktarı ise 0,0656±0,0011 mmol SH/mg keratin (n=3) olarak bulunmuştur. Sistein kalıntısı olarak bulunan bu gruplar, yapıdaki diğer moleküllerle hidrojen bağları oluşturmaya orta derecede ilgi gösteren reaktif gruplardır. Ek olarak, keratindeki az sayıda sistein kalıntısı, B-Si-Col-HK kriyojellerinin birbirine bağlı gözenekli ağlarını oluşturarak keratinin jelleşmesine de katkıda bulunabilir (Silva, vd., 2014).



Şekil 29. L-sistein kalibrasyon grafiği

İnsan saçı ve saç keratini numunelerinin amino asit içerikleri, rezidü/1000 rezidü olarak ifade edilmiş ve Tablo 8’de gösterilmiştir. Amino asit içerik tablosu incelendiğinde, her iki numunede de asparajin, glutamin ve metiyoninin tespit edilemediği (t.e.) görülmektedir. Bu durum, asidik koşullarda gerçekleşen hidroliz aşamasında amino asitlerin kısmi degradasyonu ile açıklanabilmektedir. Ek olarak, asparajin ve glutamin amino asit kalıntıları hidroliz esnasında sırasıyla aspartik ve glutamik asiti oluşturduğu bildirilmektedir (Aluigi, vd., 2013; Arslan, vd., 2017). Genel olarak, insan saçında glisin, prolin ve serin amino asit kalıntılarının keratine kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Bu amino asit kalıntıları çoğunlukla saç foliküllerinin yapısal mukavemeti, esnekliği ve sertliği ile ilişkilidir (Strnad, vd., 2011). İlâveten keratin, içeriğindeki sistein kalıntısı nedeniyle yüksek sülfür içeriğine sahiptir. Sistein kalıntılarının oksidasyona uğrayarak oluşturdukları disülfür (-S-S-) kovalent bağları ile keratinlere mekanik, kimyasal ve termal dayanıklılık kazandırmaktadır. Bu özellikleriyle fibröz bir yapıya sahip olan keratin proteinleri, kollajen gibi diğer proteinlerden ayırt edilmektedir. Numunelerde tanımlanan 21 adet amino asit kalıntısına (rezidü) ait elde edilen kantitatif analiz sonuçları, literatürde daha önceden bildirilen bazı çalışmalarla tutarlıdır (Arslan, vd., 2017; Hill, vd., 2010; Patrucco, vd., 2019).

Tablo 8

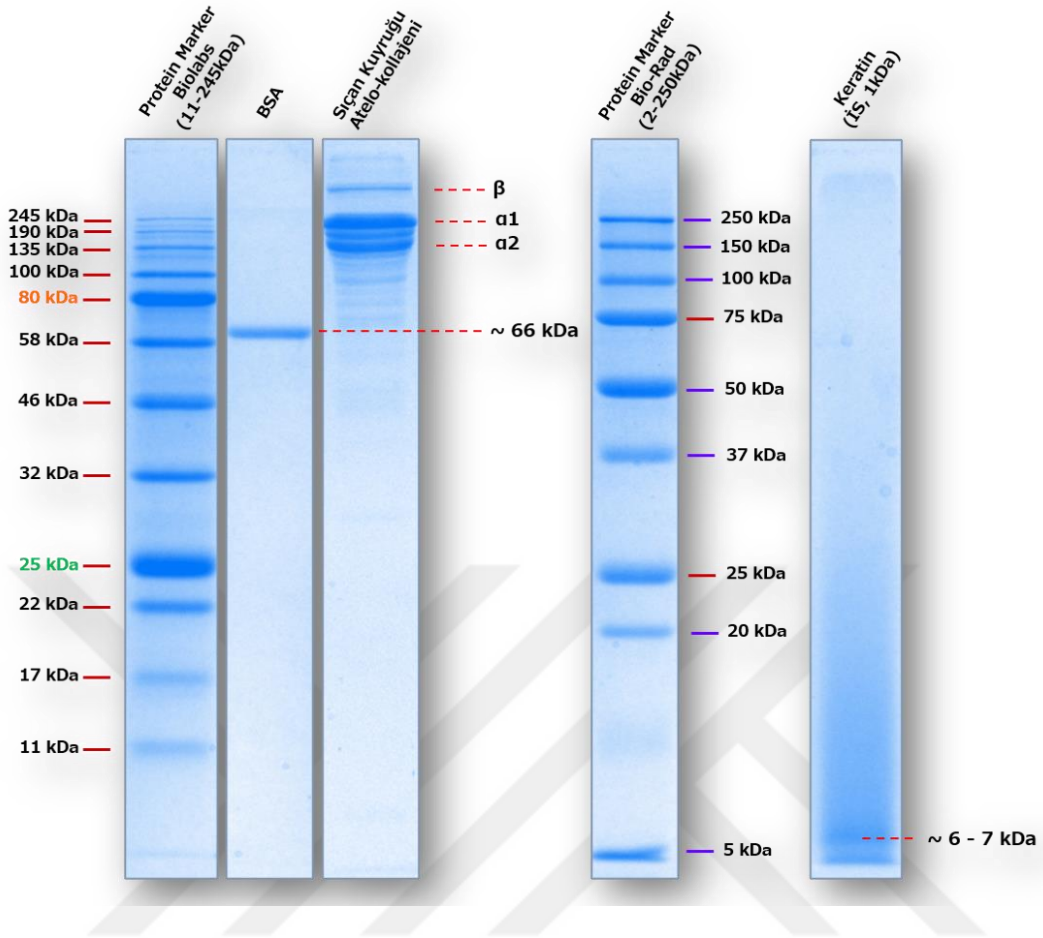
Amino asit içeriği analiz sonuçları (rezidü/1000rezidü) (t.e.= tespit edilemedi)

Amino Asitler	Kısaltmalar	İnsan Saçı	Saç Keratini
Alanin	ALA	92	70
Arjinin	ARG	39	73
Asparajin	ASN	t.e.	t.e.
Aspartik asit	ASP	47	103
Sistein	CYS	16	32
Glutamik asit	GLU	74	149
Glutamin	GLN	t.e.	t.e.
Glisin	GLY	264	104
Histidin	HIS	19	9
Hidroksiprolin	HYP	53	18
İzolösin	ILE	37	80
Lösin	LEU	18	27
Lizin	LYS	21	27
Metiyonin	MET	t.e.	t.e.
Fenialanin	PHE	14	29
Prolin	PRO	151	110
Serin	SER	100	98
Treonin	THR	36	43
Triptofan	TRP	6	8
Tirozin	TYR	9	18
Valin	VAL	7	4
Toplam		1000	1000

Kollajen molekülleri, üç farklı α zincirinden oluşan üçlü sarmal yapıları içerir. Her bir α zinciri tekrar eden -Gly-X-Y tripeptit motiflerine sahiptir ve motiflerde X prolini, Y ise hidroksprolini temsil etmektedir. Kollajene ait karakteristik bir amino asit olan hidroksprolin, kollajen dokusunun yaklaşık %10'unu oluşturur. Prolin ile birlikte kollajenin üçlü sarmal yapısı ve termal stabilitesinin belirlenmesinde etkin bir rol oynar (Rastian, vd., 2018; Wichuda, vd., 2016). Sıçan kuyruğu kollajenin kantitatif tayini hidroksprolin kiti ile gerçekleştirilmiş ve atelo-kollajenden elde edilen hidroksprolin miktarı $223,48 \pm 7,60$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık (n=3) olarak bulunmuştur. Kollajenin moleküler yapısını oluşturan hidroksprolinin miktarı α zincirinin stabilitesi ile ilişkilidir.

Ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş keratin ve atelo-kollajenler, moleküler ağırlık dağılımı açısından SDS-PAGE analizi ile karakterize edilmiştir. Atelo-kollajen için analizde, etik kurul izni gerekmeksizin temin edilen sıçan kuyruğundan izole edilmiş tip I memeli kollajenlerin pepsinde sindirilerek (atelo-kollajen) elde edilen formuna yer verilmiştir. Keratin örneği olarak ise, etik kurul izni ile saç bakım merkezlerinden laboratuvara getirilen saç örneklerinden sülfitolizis yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiş keratin proteinleri kullanılmıştır. Atelo-kollajen ve keratine ait spesifik bantlar, Şekil 30'da görüldüğü üzere hazırlanan %12,5'lük yürütme jeli ve %4'lük yükleme jeli vasıtasıyla görüntülenmiştir. Jel üzerinde protein ekstraktları pozitif kontrol, BSA ise negatif kontrol olarak yüklenmiştir.

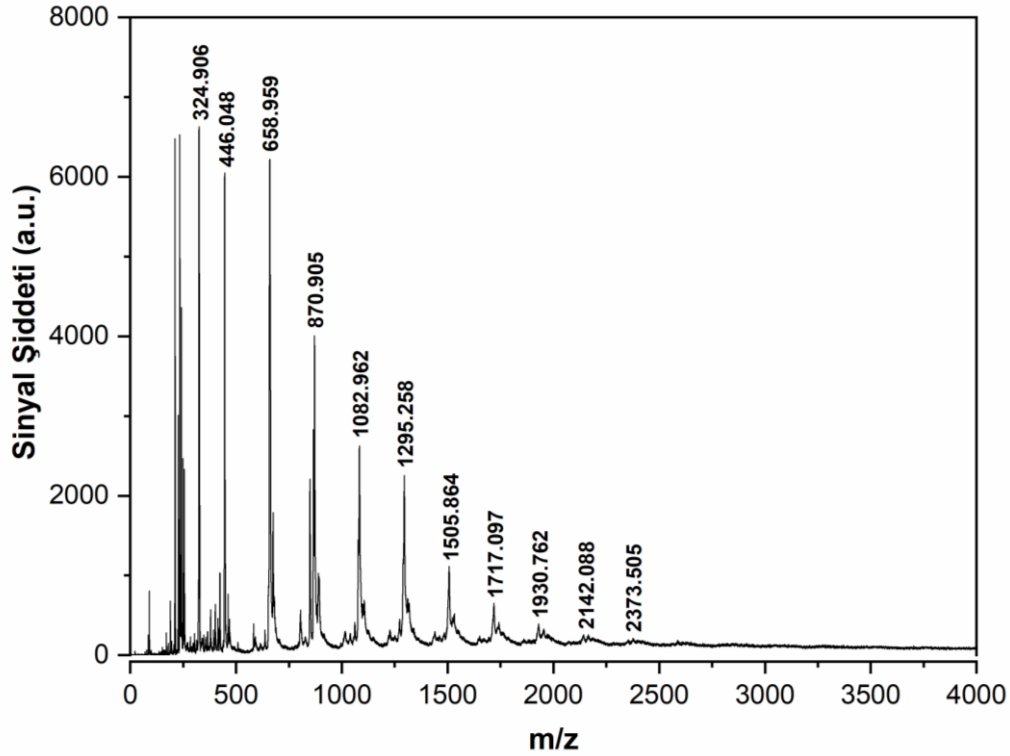
Jel görselinde kullanılan iki ayrı protein markörün moleküler ağırlığına karşılık gelen bantları görülmektedir. Sıçan kuyruğu (tip I) atelo-kollajeninde görülen yoğun bantlar, 100-190 kDa aralığında monomerik α -zincirleri ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$) ve yaklaşık 200 kDa civarında ise dimerik β bileşenleri (iki α -zincirin kovalent bağlı yapısı) içeren bantlara karşılık gelir. Kollajenin pepsin ile sindiriminin bir sonucu olarak, yaklaşık 65 kDa ve 90 kDa moleküler ağırlığında hafif bantları da görülmektedir. Öte yandan, negatif kontrol grubu olarak kullanılan BSA yaklaşık 66,46 kDa moleküler ağırlığında tipik bir bant sergilemiştir. Elde edilen bulgular literatür çalışmalarıyla örtüşür durumdadır (Chen, vd., 2019; Derkus, vd., 2016; Tronci, vd., 2013).



Şekil 30. Keratin ekstraktı ve atelo-kollajene ait SDS-PAGE jel görseli

Sülfitolizis yöntemine dayalı keratin proteinlerinin SDS-PAGE analizinde, yaklaşık 6-7 kDa civarında belirgin düşük moleküler ağırlıklı bantların görüldüğü tespit edilmiştir. Bu durumda, sülfitolizis reaksiyonu esnasında verimin artırılması ve reaksiyonun optimum sürelerde tamamlanması amacıyla reaksiyona NaOH'ın eklenmesi ve ortamın yüksek pH (12-14) seviyelerine ulaşarak oluşturdukları yüksek alkali ortamda protein yapılarının zarar görmesi sonucu moleküler ağırlığının 6-7 kDa'daki küçük fraksiyonlarına kadar ayrıştığı bilinmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı keratinler, aşırı alkali ortamda yapılan hidroliz işlemlerinden önemli ölçüde etkilenmiş ve hidrolize keratin proteinlerinin varlığı görülen belirgin bantlar ile belirtilmiştir. Literatür araştırmalarından ulaşılan sonuçlar, alkali muamele gören saç ve/veya yün proteinleri profilinin tipik yüksek fraksiyonları ile ilgili bantların kaybolduğunu ve proteinlerin çoğunun, 3,5 kDa civarında ve 6 kDa üzerinde olabileceğini göstermiştir (Shavandi, vd., 2017; Vineis, vd., 2019). Elde edilen bulgular, keratinlerin aşırı alkali ortamda kimyasal yapısının güçlü bir şekilde parçalandığını göstermektedir.

MALDI-TOF MS, küçük moleküler ağırlıklı proteinleri ölçmede etkili bir yöntemdir ve ekstrakte edilen insan saçı keratinini karakterize etmek için uygulanmıştır. Şekil 31, ekstrakte edilmiş keratin için MALDI-TOF kütle spektrumlarını göstermekle birlikte elde edilen pikler kütle-yük oranları (m/z) ile tanımlanmaktadır. Keratinlerin dağılımı incelendiğinde, hidrolize keratin peptitleri 3000 Da'nın (m/z) altında nispeten daha düşük çoklu piklere sahiptir. 324-1000 Da civarındaki piklerin ise MS spektrumunda MALDI matrisine (CHCA'ya) ait olduğu düşünülmektedir (Tasaki, 2020).



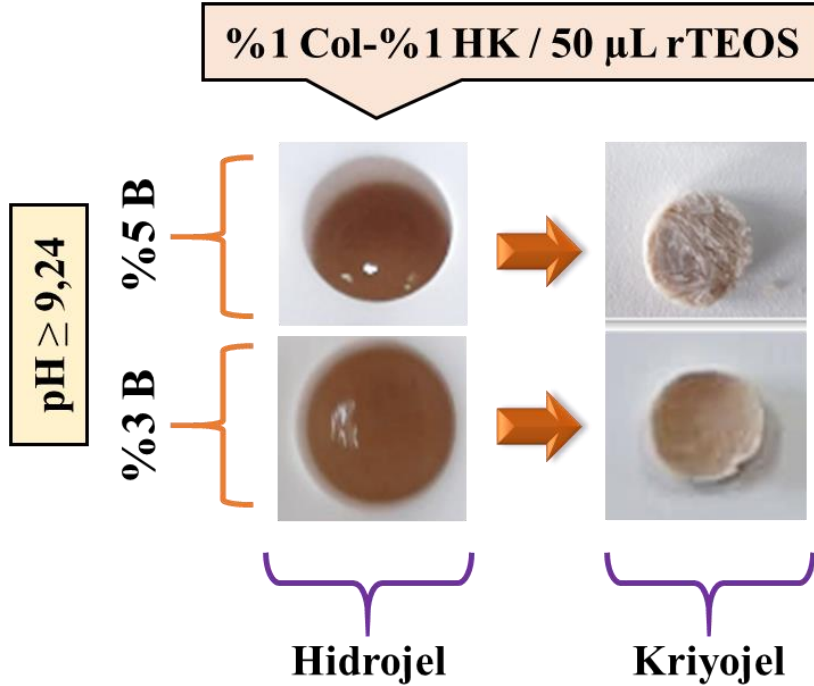
Şekil 31. İnsan saçı keratinine ait MALDI-TOF MS spektrumu

MALDI-TOF kütle spektroskopisinden elde edilen sonuçlara dayanarak, keratin proteininin yalnızca <3000 Da düşük MW ve biyomedikal uygulamalar için avantajlı olabilecek geniş bir MW fraksiyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Tasaki, 2020). Ayrıca, Matyašovský ve diğerleri (2017) koyun yünü keratin hidrolizatlarının moleküler kütle analizi ile 550-4000 Da aralığında bir moleküler kütle sunduğunu ortaya çıkarmıştır (Matyašovský, vd., 2017). Aynı numuneler üzerinde gerçekleştirilen SDS-PAGE ve MALDI-TOF kütle spektroskopisi arasındaki sonuçların tutarsızlığı, keratin hidrolizatlarının MW dağılımının daha doğru belirlenmesi için iki analizin de kullanılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

4.3. Biyokompozit B-Si-Col-HK Kriyojellerin Optimizasyon Aşamaları

Sol-jel reaksiyonu ile B-Si-Col-HK biyokompozit malzemesinin üretimi için Col, HK, borik asit ve rTEOS'un farklı konsantrasyonlardaki oranları dikkate alınarak morfolojik ve mekanik stabilitesine göre optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu süreçte, her bir deneme için kalıplama, reaksiyon işlemi ve liyofilizasyon aşamalarından geçirilerek elde edilen üç boyutlu malzeme üzerinde değerlendirilme yapılmıştır. Öncelikle üretimi gerçekleştirilecek bir malzemede iki farklı protein kaynağı kullanılacağından her bir protein için de optimum konsantrasyonun %1 (w/v) olması gerektiğine karar verilmiş ve borik asit ve rTEOS optimizasyonu bu protein konsantrasyonu üzerinden gerçekleştirilmiştir.

rTEOS optimizasyonunda, optimum konsantrasyonlardaki (%1:1) Col-HK proteinlerinin ve %1, %3 ve %5 (w/v) farklı konsantrasyonlardaki borik asit ($\text{pH} \geq 9,24$) üzerinde her 1 ml sol çözeltilisine 50 μl , 75 μl ve 100 μl rTEOS olacak şekilde kombinasyonu ile gerçekleştirilen denemeler kurulmuştur. Değerlendirme sonunda da elde edilen biyokompozit yapıda oluşabilecek yoğun kristallenme durumunu inhibe edebilmek ve özellikle bor mineralinin malzeme üzerindeki işlevine odaklanabilmek amacıyla rTEOS'a ait optimum değer 50 μl olmasına karar verilmiştir.



Şekil 32. %3 ve %5 B konsantrasyonlarına ait hidrojel ve kriyojellerin görüntüsü

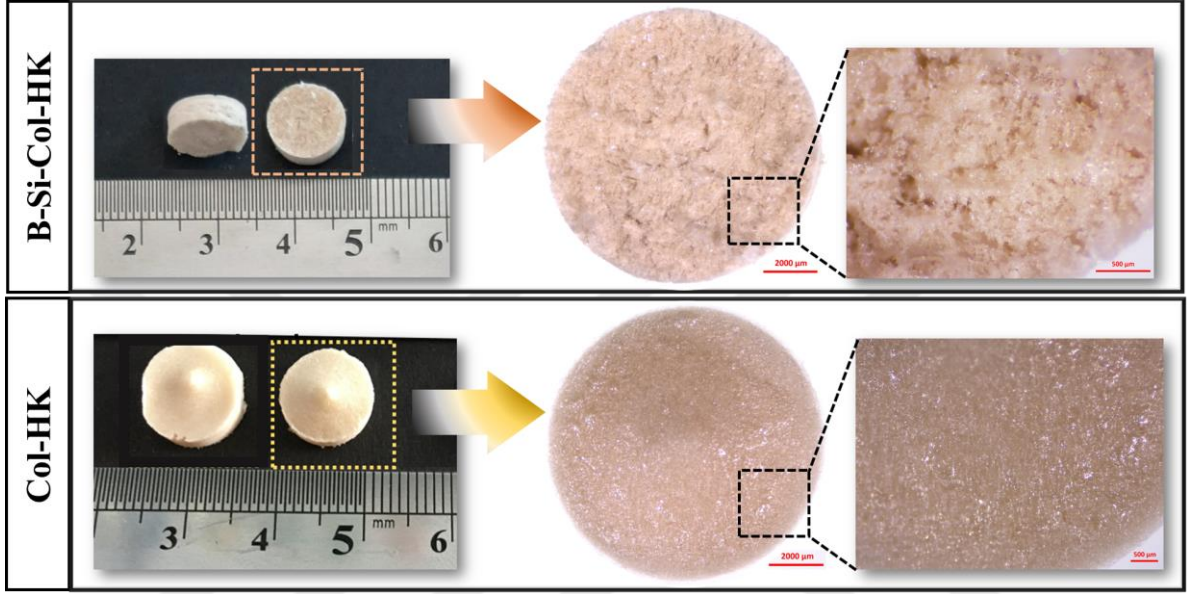
Borik asit optimizasyonunda ise, proteinlerin varlığı ile daha önceden belirlenen %1, %3 ve %5 konsantrasyonlardaki çözeltinin (B) ($\text{pH} \geq 9,24$), 50 μl rTEOS ile jelasyonu sonucunda jelin durumuna göre değerlendirilme yapılmıştır. Denemede %1 konsantrasyondaki B çözeltisinin 50 μl rTEOS ile jelleşmenin olmadığı, %3 ve %5'te ise tam jel oluşumunun gerçekleştiği belirlenmiştir. Tam jel oluşumu gerçekleşen B konsantrasyonlarının reaksiyon işlemi ve liyofilizasyon aşaması sonrası görüntüleri Şekil 32'de gösterilmiştir. Son olarak, biyokompozit yapıda rTEOS çözeltisinden gelebilecek Si varlığı ile kristallenmenin artacağı, morfolojik ve mekanik stabilite olarak da yapısal bütünlüğün yalnızca %3 konsantrasyonuna sahip çözeltide olabileceği gerekçesiyle optimum değer %3 olmasına karar kılınmıştır. Optimizasyon sonunda, üç boyutlu biyokompozit malzemenin sentezinde kullanılması gereken optimal konsantrasyonu belirlenen hidrojel ve kriyojel yapılarına Şekil 33'te yer verilmiştir. Sol-jel yöntemi kullanılarak sentezlenen kriyojel yapıları, hidrojel formundan sonra liyofilizasyon işleminden geçirilmiş ve üç boyutlu gözenekli yapıları elde edilmiştir.



Şekil 33. Üç boyutlu B-Si-Col-HK hidrojel ve kriyojel yapıların görüntüsü

Sentezlenen B-Si-Col-HK kriyojel yapısı incelendiğinde, yapıya %3 BA, %1 Col, %1 HK (w/v) ve 50 μl (1 ml sol başına) rTEOS eklendiği ve her bir kriyojel için 300 μl kullanıldığı bilinmektedir. Tüm bu verilerden yola çıkarak, sol-jel reaksiyonun %100 oranında verimi gerçekleştiği varsayılırsa, kriyojel yapısında 1,57 mg B ve 1,49 mg Si atomlarının bulunduğu tespit edilmiştir. Ağırlıkça % oranları ise B'nin 51,24, Si'nin 48,75 ve B/Si oranı 1,05 olarak kabul edilmektedir.

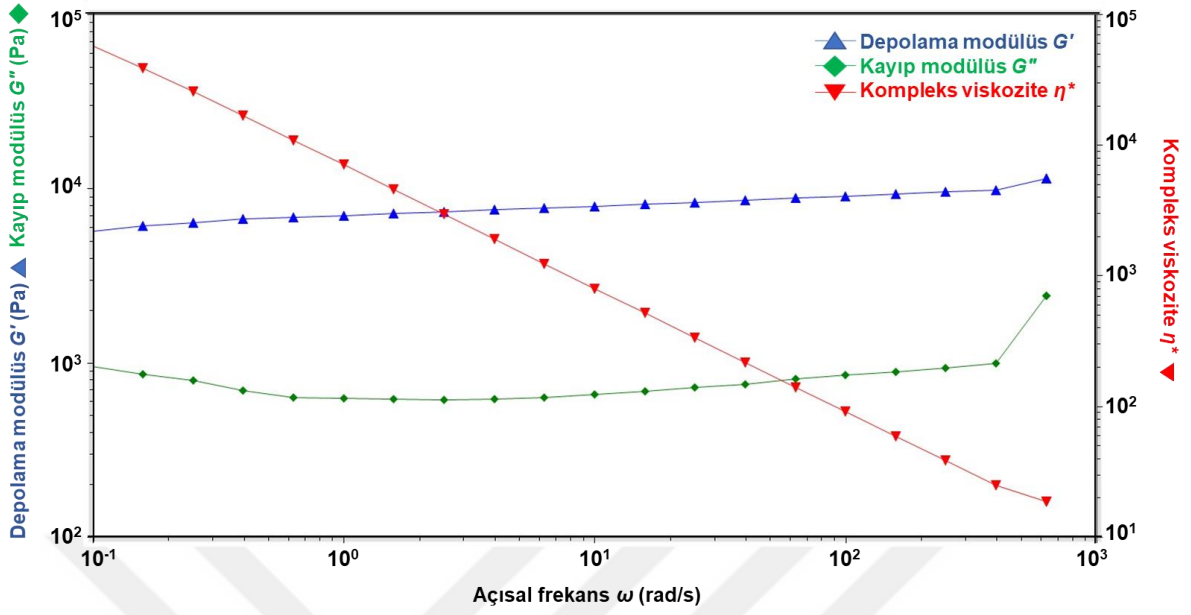
Optimizasyonu belirlenen üç boyutlu B-Si-Col-HK kriyojellerin ve karşılaştırma amaçlı kontrol grubu olarak hazırlanan çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelelerin makro görüntüleri ayrıca bir stereo mikroskop (Zeiss, Stemi 305 Axiocam, Almanya) kullanılarak kaydedilmiş ve Şekil 34’te gösterilmiştir.



Şekil 34. Üç boyutlu B-Si-Col-HK kriyojellerin ve Col-HK biyo-iskelelerin stereo mikroskop görüntüleri

4.4. B-Si-Col-HK Hidrojellerinin Reolojik Davranışları

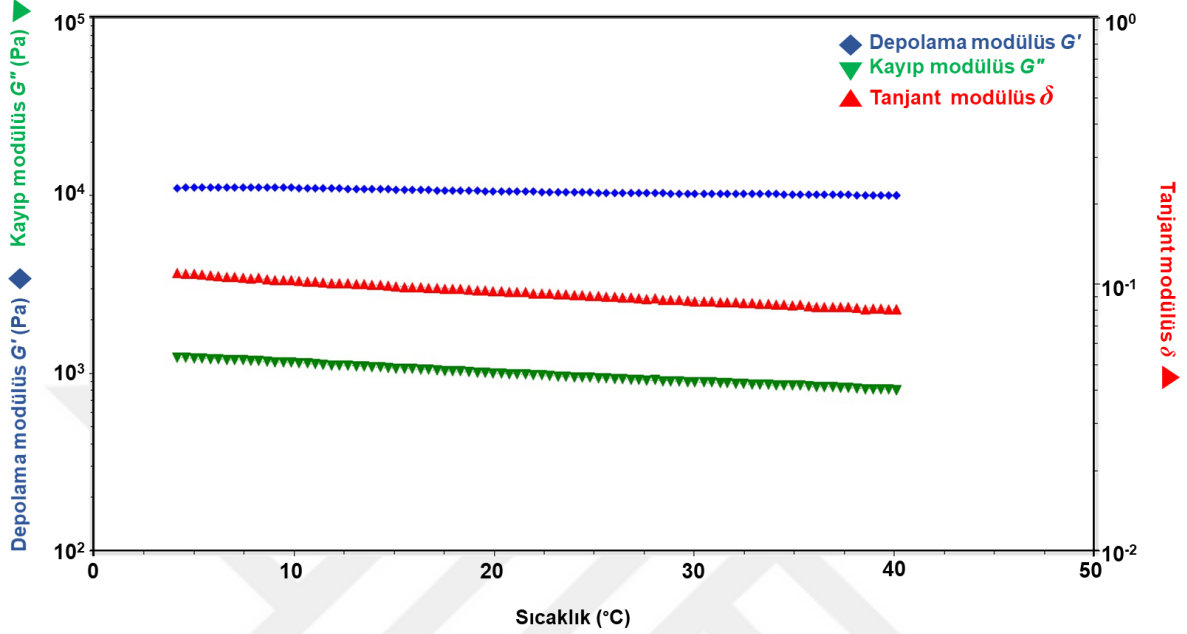
Hidrojellerin stabilitesi ve mekanik mukavemetinin belirlenebilmesi için reolojik ölçümler yapılmaktadır. Burada sol-jel yöntemiyle reaksiyonu gerçekleştirilen B-Si-Col-HK hidrojellerinin reolojik davranışları, gerinim genlik, frekans ve sıcaklık taramaları ile belirlenmiştir. İlk olarak, hidrojelin lineer viskoelastik bölgesini belirlemek için salınımlı genlik taraması yapılmış ve gerinim genlik değeri %0,099 (10585,4 Pa) olarak bulunmuştur. Bu bağlamda %0,099 gerinim değeri baz alınarak frekans tarama işlemi, 0,01–100 Hz frekans aralığında uygulanmış ve tarama sonucunda ise depolama (elastik) modülüsü (G'), kayıp (viskoz) modülüs (G''), kompleks viskozite (η^*) değerleri elde edilmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. B-Si-Col-HK hidrojenlerinin frekans tarama değerleri (Hz: hertz)

Şekil 35'te görüldüğü üzere, taranan tüm frekans aralığında depolama modülüs değerinin kayıp modülüs değerine göre daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Benzer şekilde, hidrojenin elastik bileşeni viskoz bileşenine baskındır. Bu durum, kompozit hidrojenlerin kararlı ve iyi geliştirilmiş üç boyutlu yapıları ile jel benzeri özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (Yılmaz, vd., 2021). G' 'nin G'' 'ye olan bu etkisinin, hidrojen yapısının varlığını ortaya koyduğu geniş çapta rapor edilmiştir. Literatürde, keratin ve kollajen hidrojenlerinin benzer viskoelastik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Wang, vd., 2012). Ayrıca, Roy ve arkadaşları farklı konsantrasyonlarda borik asit (%0,0-4,5 w/v) içeren hidrojenlerin viskoelastik özelliklerini incelemiş ve hidrojenlerin borik asit miktarını %1,5'ten %4,5 oranında arttırdığında, depolama modülünün kayıp modülünden daha yüksek bir değer gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu durumu ise, borik asitin hidrojele elastikiyet özellik kazandırdığını ve borik asit miktarını arttırdıkça hidrojen içerisinde oluşan daha fazla çapraz bağlı zincirleri ile elastikiyetin kademeli olarak arttığını açıklamışlardır (Roy, vd., 2009). Bu tez çalışmasında ise, hidrojenlerin sentezinde borik asit miktarı %3 (w/v) ve rTEOS miktarı %3,4 (w/v) olarak tutulmuştur. Sentezlenen hidrojen yapıda, bor ve silika moleküllerinin oluşturduğu çapraz bağların elastik özelliklere katkısı olduğu düşünülmektedir.

Frekans taramasının ardından, hidrojellerin sıcaklık taraması %0,099 sabit gerinim değeri altında, 10 Hz'lik bir frekansta ve 4-40 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Şekil 36'da da grafiği gösterilmiştir.



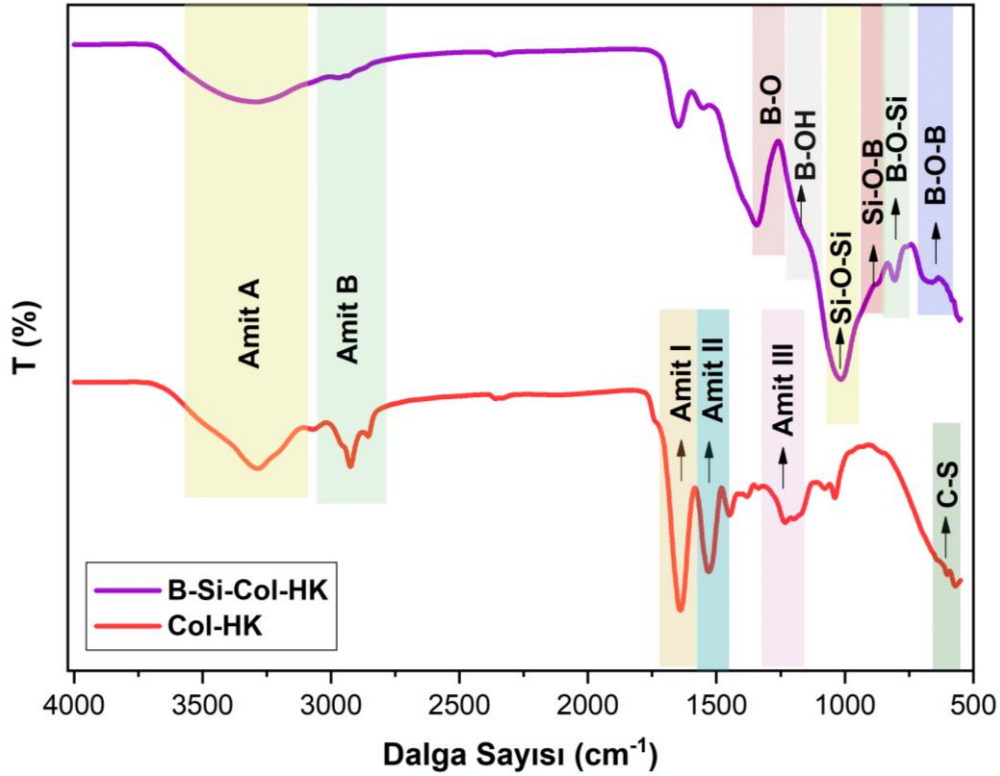
Şekil 36. B-Si-Col-HK hidrojellerinin sıcaklık tarama değerleri

Termal tarama sonucu elde edilen sonuçlara göre, B-Si-Col-HK hidrojelinin kararlı ve stabil davranış sergilediği görülmüştür. Bunun sonucunda, hidrojel formunun üç boyutlu jel benzeri yapısında herhangi bir değişiklik olmaksızın vücut sıcaklığı (*in vivo*) koşullarında başarıyla kullanılabileceğini varsayabiliriz.

4.5. Col-HK İskelesi ve B-Si-Col-HK Kriyojellerin Kimyasal ve Yapısal Karakterizasyonları: ATR-FTIR, ¹¹B-MAS-NMR, XRD

Çapraz bağlı Col-HK yapı iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojel örneklerinin kimyasal yapı karakterizasyonu için elde edilen FTIR spektrumları Şekil 37'de verilmiştir. Protein temelli iskelelerin FTIR spektrumları, tipik olarak peptit bağlarına (-CONH-) ait karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir. Peptit bağlarının titreşimleri, Amit A, B, I, II ve III olmak üzere beş ana amit bantlarına karşılık gelmektedir. Spektrumlar incelendiğinde, 3200-3400 cm⁻¹'de bulunan amit A bandı, N-H bağlarının gerilme titreşimlerine aittir. İskele yapısındaki kollajen proteinine ait Amit B bandı ise, CH₂'nin asimetrik uzaması ile ilişkili olarak 2900-3000 cm⁻¹ dalga boyundaki karşılığını göstermektedir. 1600-1700 cm⁻¹ piki (amit I) C-O bağının gerilme titreşimlerine, 1500-

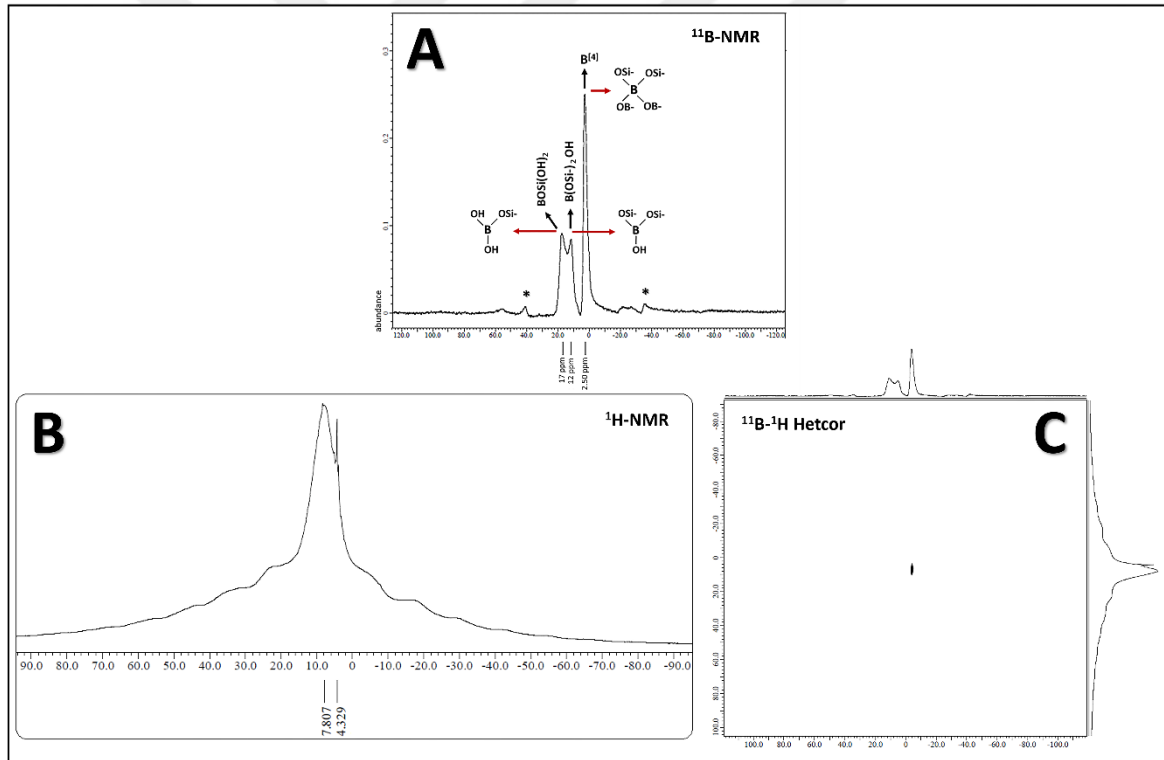
1600 cm^{-1} aralığındaki pikler ise N-H eğilme ve C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amit II bandına aittir. 1200-1300 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki Amit III absorpsiyon bandı, C-N ve N-H düzlem eğilmelerini ifade etmektedir (Lin, vd., 2019; Zhang, vd., 2019). Keratinin varlığı ise, 628 cm^{-1} 'deki zayıf pik ile kanıtlanmaktadır (Xu, vd., 2013). Böylece, Col-HK biyo-iskelelerinde karakteristik amit tepeleri görülmüş, ancak bu pikler B-Si-Col-HK kriyojellerinde net olarak görülmemiştir.



Şekil 37. ATR-FTIR analiz sonuçları

B-Si-Col-HK kriyojellerinin spektrumu incelendiğinde, Col-HK yapısına bağlı TEOS ile ilgili karakteristik Si-O-Si spesifik asimetrik titreşim piki yaklaşık 1030 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Kakkar and Madhan, 2016). 1345 cm^{-1} 'deki geniş absorpsiyon piki ise B-O bağına ve 1195 cm^{-1} 'deki küçük tepe noktası B-OH gerilme moduna karşılık gelmektedir. Ayrıca, 880 cm^{-1} 'deki Si-O-B bağları ile ilgili pik, Col-HK spektrumunda görülmeyen etkili bir piktir. Yaklaşık 800 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları, B-O-Si'nin simetrik ve asimetrik absorpsiyon bandı ile ve $630-670 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pik ise B-O-B'nin kapsamlı asimetrik gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir (Chowdhury, vd., 2018; Sembiring, 2011; Siqueira, vd., 2007). Bu absorpsiyon bantları, B atomlarının başarılı bir şekilde biyokompozit yapıya dahil edildiğini doğrulamaktadır (Chowdhury, vd., 2018).

B-Si-Col-HK kriyojellerine ait hibrit yapılar katı hal ^{11}B MAS NMR spektroskopik analizi yapılarak belirlenmiştir (Şekil 38). B-Si-Col-HK kriyojellerinin ^{11}B MAS NMR spektrumları, bor içeren silika kompozitten oluşan üç ana tepe noktasına sahiptir (Şekil 38-A) (Koller, vd., 2005; Ranoux, vd., 2013). Yaklaşık 2,5 ppm'e karşılık gelen keskin bir simetrik piki, 4 koordinatlı bir alana sahip tetrahedral B'a ($\text{B}^{[4]}$) atanır (Fild, vd., 2000). Genellikle dar $\text{B}^{[4]}$ tepe noktası, B-O-T bağ tipine (T= Si veya B) bağlı olarak 0 ppm civarında temsil edilir. Bor atomu sadece silisyum atomları ile çevrilidir ($\text{B}(\text{OSi})_4$) ve yaklaşık -2 veya -3 ppm'e karşılık gelir. Ancak, bir diğer bor atomları bir silisyum atomunun yerini aldığı anda 2-3 ppm'lik bir kimyasal kayma meydana gelmiştir. Buna göre, ^{11}B MAS NMR spektrumunda $\text{B}^{[4]}$ (1 B, 3 Si) ve $\text{B}^{[4]}$ (2 B, 2 Si) pikleri kimyasal olarak sırasıyla yaklaşık 0 ppm ve 2 ppm civarına kaydırılmıştır (Angeli, vd., 2010; Du ve Stebbins, 2003).

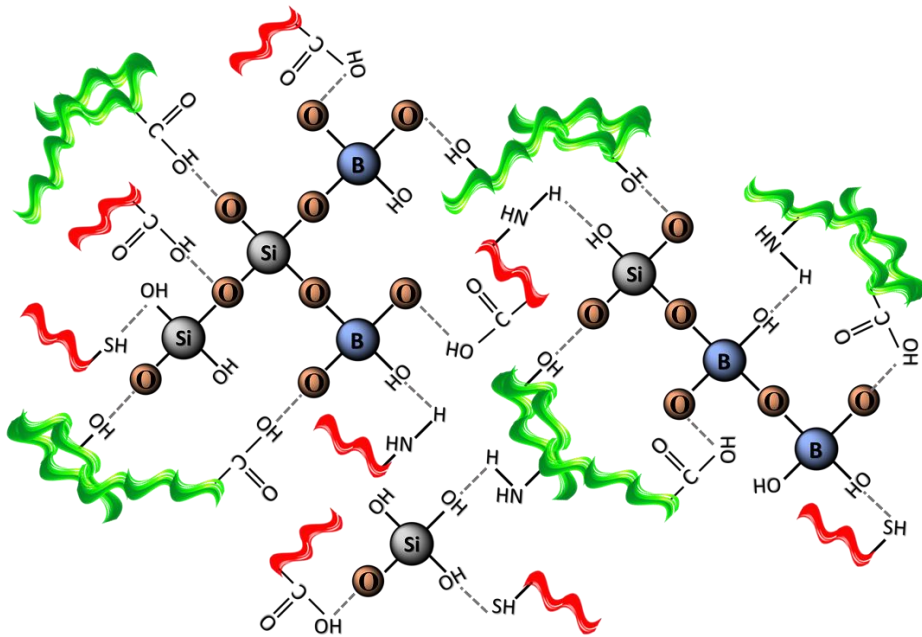


Şekil 38. B-Si-Col-HK kriyojellerin MAS NMR spektrumları (A) ^{11}B NMR, (B) ^1H NMR, (C) Heteronükleer Korelasyon (HETCOR)

Benzer şekilde, B-Si-Col-HK spektrumundaki 2,5 ppm'deki tepe noktası, 2 B ve 2 Si atomuna bağlı tetrahedral B yapısından kaynaklanmaktadır (Şekil 38-A). Buna ek olarak, farklı kimyasal kaymaların gözlemlenmesi, trigonal bor alanlarının farklı sayıda B-O-Si bağlantılarından kaynaklanır. Yaklaşık 12 ppm'lik tepe noktası, B-Si-Col-HK

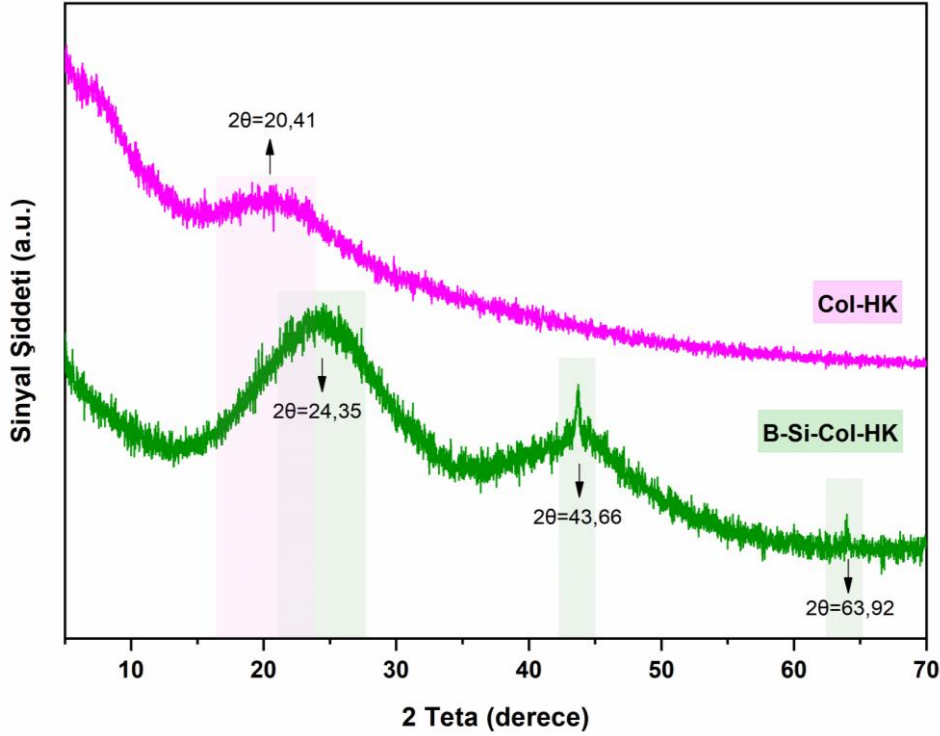
spektrumunda oksijen atomları B(OSi-)2OH aracılığıyla iki silisyum atomuna bağlanan bor ile ilgilidir (Koller, vd., 2005). Son olarak, 17 ppm'deki tepe noktası ise silika ağında gözlenen BOSi(OH)2 bağına karşılık gelmektedir (Angeli, vd., 2010; Du ve Stebbins, 2003; Koller, vd., 2005).

4.3 ppm'de keskin pikten oluşan B-Si-Col-HK kriyojelinin ¹H MAS NMR spektrumu Şekil 38-B'de sunulmuştur. ¹H MAS NMR, 3 tip T-OH (T: Si veya B) alanı hakkında bilgi vermektedir. Bunlardan biri Sınıf A olarak adlandırılır ve eksik silanol gruplarından (1,7 ppm) kaynaklanmaktadır. B Sınıfı, T-OH türlerinin ikinci türüdür ve zayıf hidrojen bağlı Si-OH (2,0 ppm) ve B-OH (2,3 ppm) gruplarını içermektedir. Öte yandan, C sınıfı ise güçlü hidrojen bağlı Si-OH (3,0 ppm), B-OH (4,3 ppm) grupları ile ilişkilidir ve bu da sudan kaynaklanmaktadır (Koller, vd., 2005). B-Si-Col-HK kriyojelinin 4,3 ppm'deki tepe noktası, muhtemelen -NH veya -SH grubu keratin veya yapısal olarak bağlı su ile B-OH türlerinin güçlü hidrojen bağı şeklinde ilişkilendirilir. Ayrıca, B^[4]'ün (¹¹B) simetrik tetrahedral ortamı ve B-OH'ın (¹H) H bağı, Şekil 38-C'de gösterilen ¹H/¹¹B heteronükleer korelasyon testi ile de doğrulanmaktadır. Şekil 38-C gözlemlendiğinde, B-OH'ın ¹H sinyalleri, 2,5 ppm'lik kimyasal kaymada ¹¹B tepe noktası ile iyi korelasyon göstermiştir. Son olarak, B-Si-Col-HK kriyojelinin hibrit yapısına ait bağların temsili gösterimi Şekil 39'da sunulmuş ve NMR spektrumlarında bahsi geçen bağlar temsili olarak aydınlatılmıştır.



Şekil 39. B-Si-Col-HK kriyojel ağının temsili şematik gösterimi (Yeşil polimer: Col, Kırmızı polimer: HK)

Biyo-iskele ve kriyojellerin kristal yapı özellikleri XRD analizi ile incelenmiş ve spektrumları Şekil 40'ta gösterilmiştir. $2\theta=20^\circ$ civarındaki geniş kırınım piki, Col-HK biyo-iskelesindeki keratinin β -tabaka kristal yapısı ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum, keratin ekstraksiyonu sonucu elde edilen keratin hidrolizatlarında α -heliks yapısının β -tabaka yapısına dönüşmesiyle açıklanabilir (Sharma, vd., 2018). Öte yandan, silikanın amorf yapısı B-Si-Col-HK kriyojelin spektrumuna hâkim olmuştur. $2\theta=20-25^\circ$ 'deki merkezi geniş bant, keratin piki de dahil olmak üzere silika yapısının karakteristik özelliği olarak ortaya çıkmıştır (Djambaski, vd., 2009; Yılmaz, vd., 2021). Buna ek olarak, yapıya eklenen borun etkisi $2\theta=43$ ve 63° noktalarındaki pikler ile açıkça gösterilmiştir (Belaid, vd., 2020; Ertuş, vd., 2016).

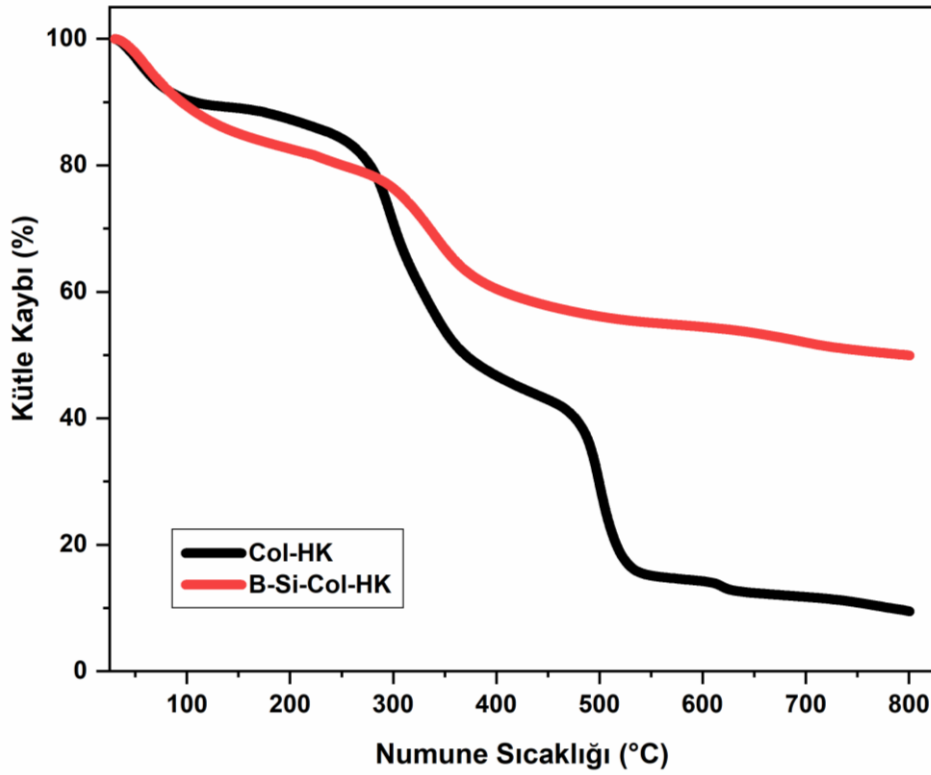


Şekil 40. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelinin XRD spektrumları

4.6. İskele ve Kriyojellerin Termal Karakterizasyonları: TGA ve DSC Analizleri

Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin termal stabilitesi, TGA kullanılarak incelenmiş ve bozunma eğrilerini gösteren termogramlarına Şekil 41'de yer verilmiştir. Termogramlardaki kütle kaybı eğrisi, malzemenin $30-800^\circ\text{C}$ sıcaklık aralığında bozunduğunu göstermektedir. Termogramlar incelendiğinde; tüm durumlar için iki aşamalı ayrıştırma süreci gözlemlenmiştir. İlk aşama olarak, $30-120^\circ\text{C}$ sıcaklık

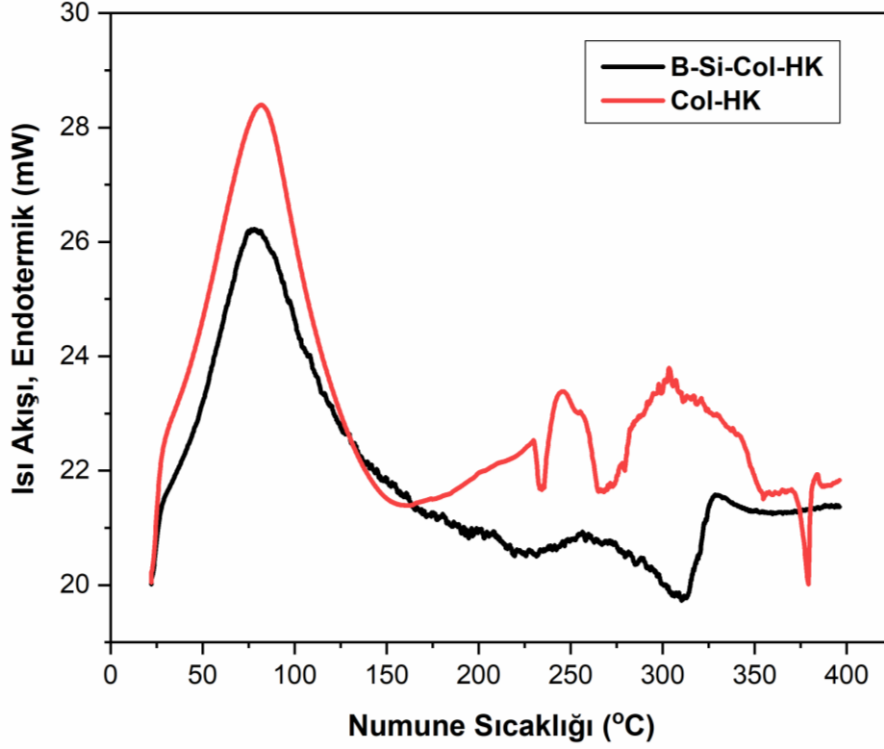
aralığında Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojel yapılarındaki suyun buharlaşarak uzaklaştığı bilinmektedir.



Şekil 41. Biyo-iskele ve kriyojellere ait TGA termogramları

Termogramlar için ikinci aşamada ikinci keskin kütle kaybı eğrisi, proteinlerin termal bozunmasını göstermektedir (Arslan, vd., 2017; Wang, vd., 2016). Her iki numunede de ikinci kütle kaybı 300 °C'den sonra başlamıştır. Col-HK proteinlerine ait termal bozunma sıcaklığı 300-450 °C'de olup, bu sıcaklık aralığında iskelede yaklaşık %35'lik bir kütle kaybı görülmektedir. B-Si-Col-HK kriyojelinin termal bozunma sıcaklığı ise yaklaşık olarak 300-380 °C'dir. Bu sıcaklık aralığında hibrit kriyojel, kütlelerinin yaklaşık %15-20'sini kaybetmektedirler. Genel olarak bakıldığında, B-Si-Col-HK kriyojellerine ait organik-inorganik hibrit B/Si-OC bağları nedeniyle %40 kütle kaybı ile termal bozunma süreci neredeyse tamamlanmışken, Col-HK biyo-iskelelerinde bu süreç %90'a kadar devam etmiştir (Li, vd., 2016; Yılmaz, vd., 2021). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, protein matriksine bor mineralinin eklenmesiyle hibrit malzemedeki ısıl kararlılığın arttığı gözlenmektedir (Öner, vd., 2018). Ayrıca literatürde var olan çalışmalar, silisyumun hibrit biyomalzemenin termal direnci etkilediği teorisini desteklemektedir (Li, vd., 2016). Bu durum, biyomalzemedeki termal stabilitenin artmasıyla sonuçlanır.

Öte yandan, biyokompozit Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin termal özelliklerindeki farklılıklar DSC analizi yapılarak da karşılaştırılmış ve incelenmiştir. DSC spektrumları Şekil 42’de gösterilmiştir.



Şekil 42. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin DSC spektrumları

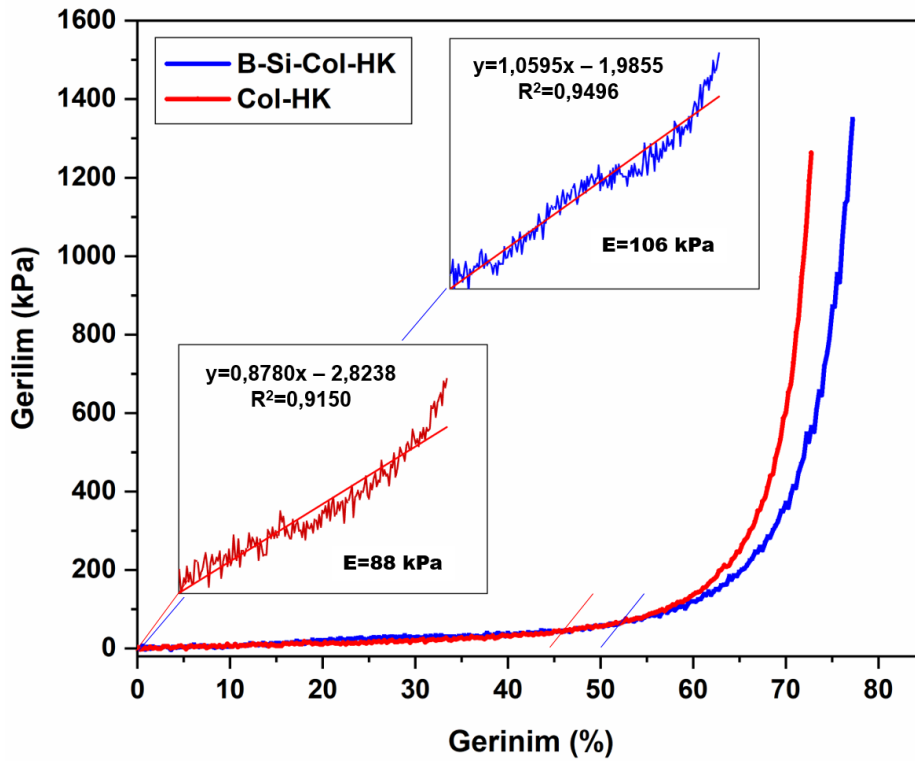
DSC taramasında her iki malzeme için de 50-125°C aralığında gözlemlenen geniş endotermik tepe, absorbe edilmiş suyun buharlaşması ile ilgilidir. Col-HK biyo-iskelesinde 230 °C’de gözlemlenen ikinci keskin tepe ise, keratinin α -heliks yapısının denatürasyonundan kaynaklanmaktadır. 250°C ile 280°C sıcaklık aralığındaki endotermik pik, kollajen proteinlerinin degradasyonuna karşılık gelmektedir (Balaji, vd., 2012; Esparza, vd., 2018; Kakkar, vd., 2014; León-Mancilla, vd., 2016).

DSC diyagramında B-Si-Col-HK kriyojel örneğine ait 80-100°C arasındaki geniş endotermik geçiş, yapıdaki nemin buharlaşmasına bağlanabilir. Şekilden 310°C’de görülen pik alanının yapıdaki proteinlerin degradasyonu olduğu düşünülebilir. Protein yapıları bor ve silisyumun modifiyesi ile termal bozunma sıcaklığının arttığı görülebilir. Bu bağlamda, bor ve silisyumun sol-jel reaksiyonu esnasında yapıda moleküler arası oluşturdukları çapraz bağ ile moleküler hareketi yavaşlattığı ve dolayısıyla bozunma sıcaklığı arttırdığı düşünülmektedir (Gadhane, vd., 2018; Miyazaki, vd., 2010). Ayrıca, Perumal ve arkadaşları da geliştirdikleri kollajen-silika hibrit iskeleleri ile yapıdaki silikanın kollajenin

termal direncini büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir (Perumal, vd., 2015). Burada sentezlenen biyokompozit B-Si-Col-HK kriyojelin bor ve silika içeriği ile gösterdiği termal direnci literatürle desteklenmiştir.

4.7. İskele ve Kriyojellerin Mekanik Özellikleri

KDM uygulamalarında kullanılacak gözenekli üç boyutlu biyomalzemeler, hücre büyümesi için gerekli olan gözenekliliği ve birbirine bağlanabilirliği sürdürmek için yeterli mekanik güce sahip olmalıdır. Bu nedenle karşılaştırmanın bu perspektifte analiz edilmesi gerekir. Analizde kontrol grubu olarak kullanılan Col-HK biyo-iskelelerinin mekanik stabilitesinin geliştirilmesi amacıyla NHS/EDC çapraz bağlama ajanları kullanılmıştır. Basma testinde, B-Si-Col-HK kriyojellerinin yapısına modifiye edilen bor ve silika moleküllerin kriyojeldeki mekanik özelliklerine etkisi incelenirken, Col-HK iskelesinde ise NHS/EDC çapraz bağlama ajanlarının etkisi incelenmek istenmiştir. Bu nedenle, geliştirilen üç boyutlu gözenekli biyomalzemelerin her ikisi için de mekanik basma testi yapılmış ve test sonuçları Şekil 43'teki gerilim/gerinim grafiği ile gösterilmiştir. Sonuçları standardize etmek için, young modülü (E) ve gerinimde (%) mukavemet karşılaştırması yapılmıştır.

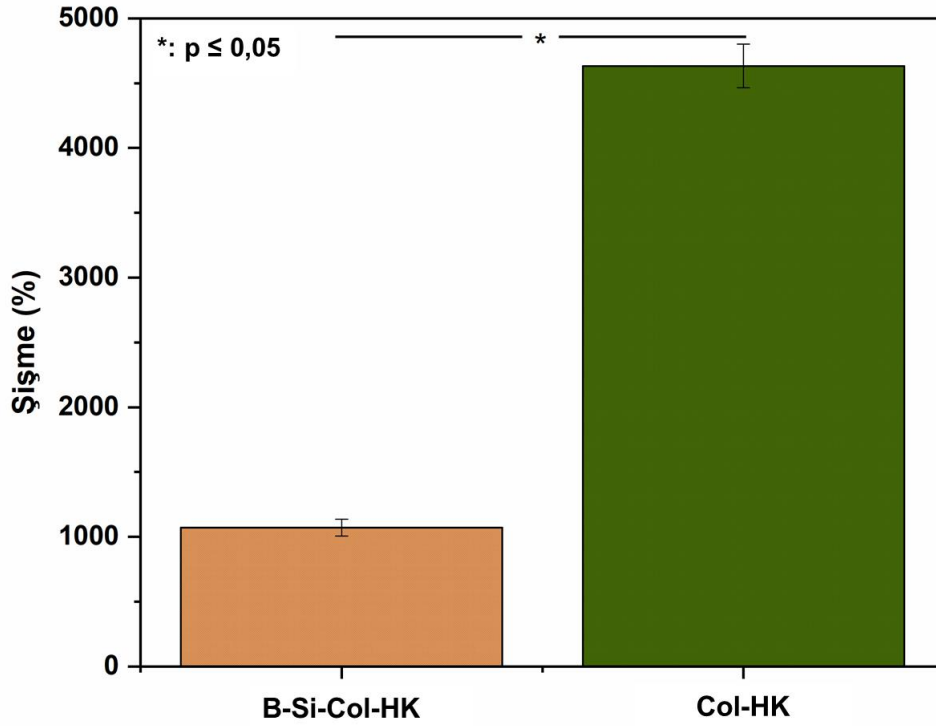


Şekil 43. Basma dayanımı testi grafiği

Test sonuçlarından elde edilen verilere göre, Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin young modülü değerleri sırasıyla 88 kPa ve 106 kPa'dır. Bu sonuç, modifiye edilen bor ve silika moleküllerinin kriyojelin mekanik mukavemetine katkı sağladığı ve bu nedenle B-Si-Col-HK kriyojellerinin mekanik dayanımını gözle görülür derecede arttırdığını ortaya çıkarmaktadır. Literatürde karşılaştırıldığında, Col-HK biyo-iskelesine ait E değeri çapraz bağlı (EDC/NHS) kollajen (~18 kPa) iskelesine karşılık gelen E değerinden daha yüksektir (Kaczmarek, vd., 2018). Buna ek olarak, yalnızca keratinden oluşan iskeleler ise ölçülemeyecek kadar kırılğan bulunduğundan rapor edilememiştir (Hartrianti, vd., 2017). Col-HK biyo-iskelesi yapısında kollajen ve keratin proteinlerinin birlikte kullanılması ve NHS/EDC ajanları ile protein yapıları arasında oluşturulan çapraz bağın biyo-iskelede mekanik dayanımı arttırdığı söylenebilir. Öte yandan, biyomalzemelerin mekanik özelliklerini iyileştirmek ve biyouyumluluklarını arttırmak için hekzagonal bor-nitrürün (h-BN) birçok çalışmada biyokompozit bileşen olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Deveci, vd., 2020). Atila ve ark. HA ve bor modifiye edilmiş HA moleküllerinin biyopolimer bazlı malzemelere, Nagarajan ve ark. ise jelatin bazlı elektro-eğirilmiş nanoliflere ait young modülün bor nitrürün konsantrasyonuyla ilişkili olarak mekanik dayanımı arttırdığını vurgulamışlardır (Atila, vd., 2019; Nagarajan, vd., 2017). Ayrıca, bir diğer çalışmada Griffin ve ark. silikanın da mekanik mukavemete katkısı olduğunu polimerik yapılarda kullanarak bulmuşlardır (Griffin, vd., 2016). Literatür araştırmaları kapsamında, B-Si-Col-HK kriyojeli yapısındaki organik/inorganik bağların mekanik dayanımı arttırdığı, ancak bor ve silikanın belli bir miktarın üzerinde eklenmesiyle kriyojel yapısındaki kırılğanlıkların da artabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar, literatür verileriyle iyi bir uyum içindedir. Genel olarak bu durum, kullanılan çapraz bağlama ajanları ve bor ve silikanın miktarına bağlı olarak değişeceği söz konusu olabilir.

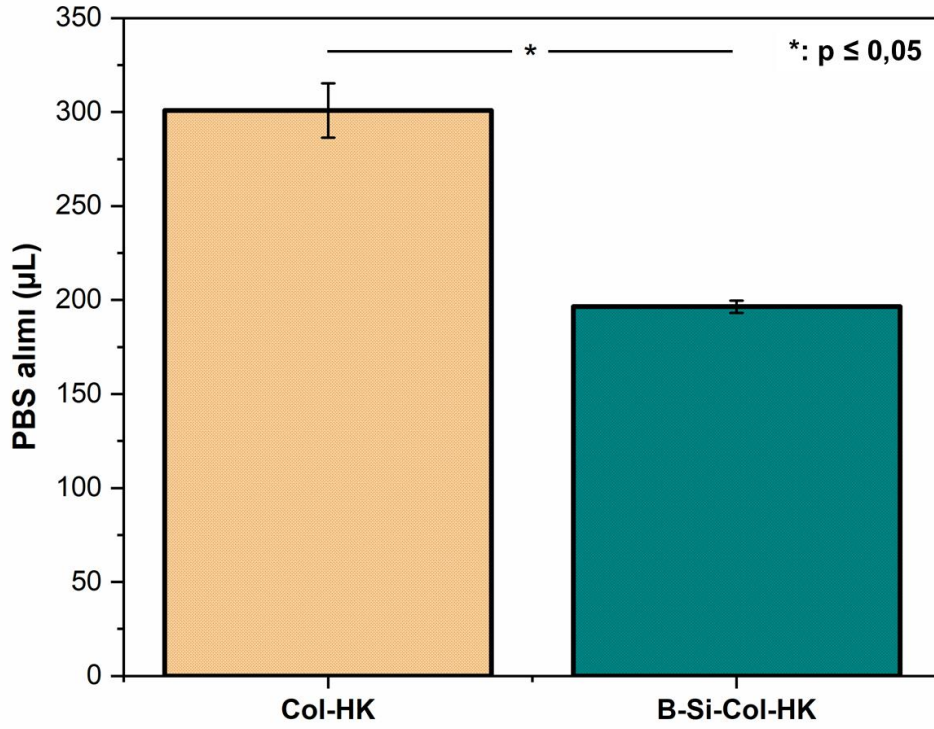
4.8. Şişme ve Sıvı Alım Kapasite Testlerinin Değerlendirilmesi

In vitro hücre kültürü çalışmalarında iskele ve kriyojellerin şişme kabiliyeti çok önemlidir. Şişme oranı, malzemelerin sıvıyı emme özelliği ile belirlenir. Ayrıca malzeme şişerek, hücreye ait besin ve metabolitlerin yapı içerisinde transferine olanak sağlar (Maji, vd., 2016). Şekil 44'te gösterildiği gibi, çalışmamızda üretimi yapılan üç boyutlu çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin şişme oranı sırasıyla %4632,75±168,57 ve %1070,95±64,51 (n=3) olarak bulunmuştur.



Şekil 44. Biyo-iskele ve kriyojellerin % şişme grafiği

Bir diğer test olan sıvı alım testi, hücre kültürü sırasında gözenekliliği temsil ederek, içerisine alabildiği besiyeri miktarını gösterir. Ek olarak, üç boyutlu yapı içerisindeki gözenek boyutunu ve toplam gözenekliliği genişleterek yapının iç yüzey alanını maksimize eder (Shahbazarab, vd., 2018). Üç boyutlu çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin sıvı alım kapasiteleri Şekil 45'te gösterilmektedir. İskele ve kriyojellere ait PBS alımının sırasıyla $300,85 \pm 14,43 \mu\text{l}$ ve $196,45 \pm 3,34 \mu\text{l}$ olarak bulunduğu, 10 ml PBS'in ise $\%3,01 \pm 0,14$ ve $\%1,96 \pm 0,03$ 'ünü ($n=3$) içerisine alarak doygunluğa ulaştığını göstermektedir. İskele ve kriyojel arasındaki farklılığın, her iki test için de istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($*p \leq 0,05$). Col-HK biyo-iskeleleri, şişme kapasitesini sınırlayan yoğun Si-O ve B-O çapraz bağlarına ek olarak keratin ve kollajenin gerilebilirliği nedeniyle B-Si-Col-HK kriyojeline kıyasla şişebilmekte ve daha fazla su tutabilmektedir (Esparza, vd., 2018; Yılmaz, vd., 2021).

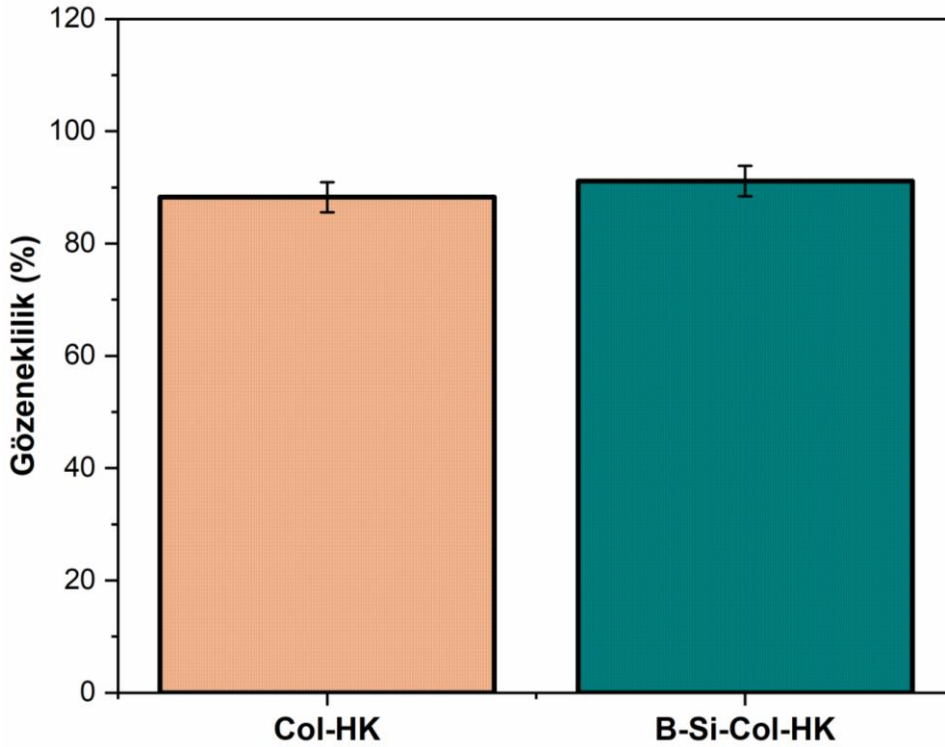


Şekil 45. Sıvı alım testi grafiği

4.9. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Gözeneklilik Özellikleri

Fonksiyonel doku rekonstrüksiyonu için doğal yolla yapısal destek sağlayan ve birbirine bağlanabilen yeterli büyüklükte gözenekliliğe sahip fiziksel ve kimyasal özellikteki üç boyutlu biyomalzemelere ihtiyaç vardır. Özellikle polimer matrisleri, polimer-hücre etkileşimlerine, hücre poliferasyonu ve farklılaşmasına, büyüme faktörleri/sinyal moleküllerine ve hücrelerarası iletişimine olanak sağlayan uygun gözeneklilikte bir ortam sunar (Altuntaş, vd., 2017; León-Mancilla, vd., 2016). Tüm bu özellikler dikkate alındığında, üretilen üç boyutlu çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin gözeneklilik ölçümü, hekzan sıvısı kullanılarak yer değiştirme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 46’da gösterildiği gibi, Col-HK iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojeli için elde edilen sonuçlar sırasıyla $88,3 \pm 2,7$ ve $91,2 \pm 2,7$ (n=3) olarak ölçülmüştür. Literatürde trabeküler kemik için gerekli porozite aralığı %50 ile %90 arasında bildirildiğinden, her iki iskelenin de porozite değerleri kemik dokusu uygulamaları için uygun bulunmuştur (Costa-Pinto, vd., 2011). Gözeneklilikler incelendiğinde, bor ve silisyum minerali içeren kompozit kriyojellerin kollajen-keratin iskelesine kıyasla daha yüksek poroziteye sahip olduğu görülmüştür. Kontrol grubu olarak kullanılan Col-HK iskelesi için literatürden elde edilen verilere göre, Grabska-Zielińska ve

diğerleri (2020) kollajen iskelesinde $88\pm0,5$ gözeneklilik tespit ederken, Cui ve diğerleri (2019) ise keratin iskelesinin 90 'nın üzerinde gözeneklilik sergilediğini bildirmiştir. Literatür, porozite testi sonucunda Col-HK iskelesi için elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir. Atila ve diğerleri, 2019'da geliştirdikleri bor katkılı hidroksiapatit/jelatin kompozit iskelelerin $68,49$ ile $80,94$ arasında değişen gözeneklilik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar neticesinde porozite değerleri açısından her iki biyomalzeme de benzer özellik sergilemektedir.



Şekil 46. Biyo-iskele ve kriyojellere ait % gözeneklilik grafiği

4.10. Biyo-iskele ve Kriyojellerin BET Yüzey Alanları

Kompozit üç boyutlu biyo-iskele ve kriyojellerin spesifik yüzey alanları, toplam gözenek hacimleri ve gözenek boyutları BET ve BJH analizleri yapılarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları ise Tablo 9'da özetlenmiştir. Tabloya göre toplam yüzey alanları (BET) ve por çapları sırasıyla, Col-HK iskelesi için $2,315 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $2,482 \text{ nm}$, B-Si-Col-HK kriyojeli için ise $5,401 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $8,777 \text{ nm}$ 'dir. Bu bağlamda, B-Si-Col-HK kriyojelinin Col-HK biyo-iskelesine kıyasla toplam yüzey alanı için yaklaşık 2,5 kat, BJH metoduna ait por çapları için ise 3,5 kat daha fazla oranlara sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda B-Si-Col-HK kriyojeli için, B ve Si nano-partikülerinin yüzey alanı boyunca

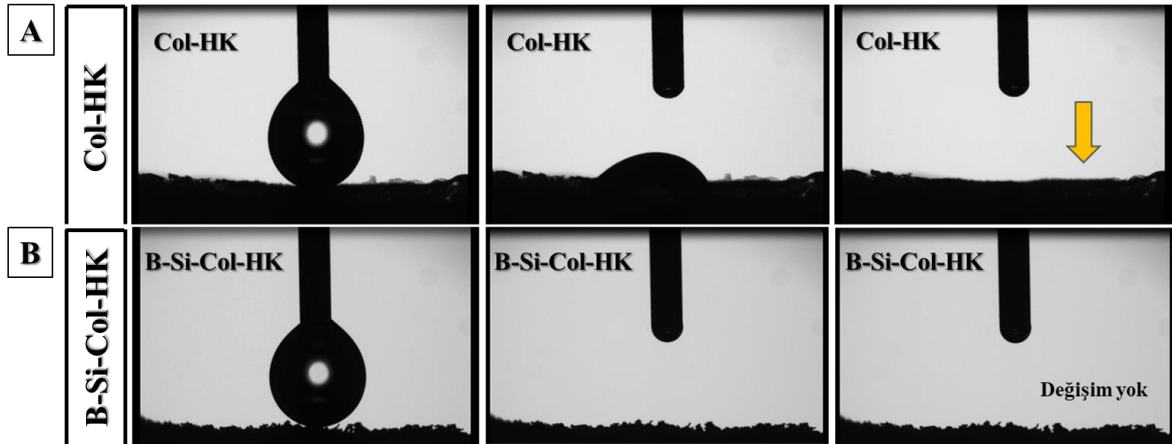
rastgele kaplanmasıyla pürüzlü bir yapı elde edilmiştir. Ayrıca, kriyojelin *in vitro* hücre kültürü uygulamalarında kullanılmak üzere hücrelerin tutunarak yeterli oksijeni ve besin kaynağını sağlayacak uygun bir biyomalzeme olabileceği düşünülmektedir (León-Mancilla, vd., 2016). Son olarak, geliştirilen B-Si-Col-HK kriyojelinin özellikleri dikkate alındığında, BET-BJH ve gözeneklilik testinden elde edilen sonuçları birbiriyle tutarlıdır.

Tablo 9
Biyo-iskele ve kriyojellerin BET-BJH analiz sonuçları

Numune	BET Yüzey alanı (m ² /g)	BJH (Barrett-Joyner-Halenda Metodu)		
		Yüzey alanı (m ² /g)	Por Hacmi (ml/g)	Por Çapı (nm)
Col-HK	2,315	2,949	0,006	2,482
B-Si-Col-HK	5,401	5,957	0,031	8,777

4.11. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Temas Açısı Testi ile Islanabilirlik Özellikleri

Kemik doku mühendisliği için kullanılan malzemelerin yüzey kimyası çok önemlidir. Bu özellik, malzemenin hidrofilitelerini etkiler, kemik rejenerasyonu için çoğalması ve farklılaşması amacıyla iskele yüzeyine hücre bağlanması için gereklidir. Bu bağlamda, çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin yüzey ıslanabilirlik özellikleri, temas açısı ölçümü yapılarak belirlenmiştir.

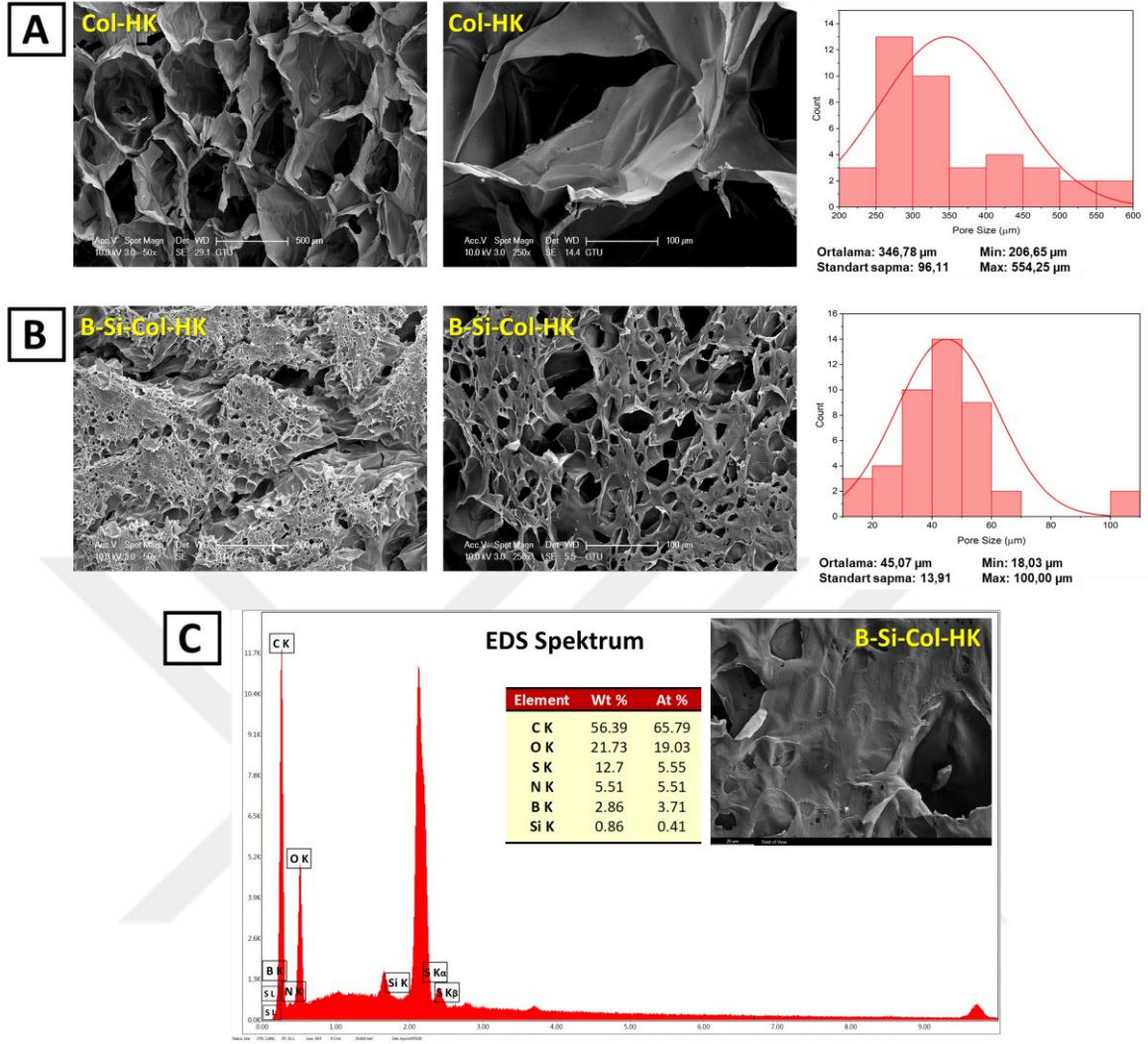


Şekil 47. Çapraz bağlı Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin su ile temas açısı ölçümü görüntüleri (Sarı okla, su emilimi sonunda iskele yapısındaki değişim gösterilmektedir.)

Şekil 47’de görüldüğü üzere, gözenekli yapıda suyun hızlı emilmesi nedeniyle statik temas açısı değerleri belirlenememiştir. Ancak her iki malzemenin de anlık görünen temas açısı değerleri 90° altında ölçülmüş ve 5 µl saf suyu emdiği gözlemlenmiştir. Bu durumda, hidrofilik özellik gösteren Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelleri için su emme oranları yüksek hızlı bir kamera kullanarak $14,7 \pm 1,0$ µL/sn ve $71,4 \pm 1,1$ µL/sn olarak ölçülmüştür. Daha yüksek absorpsiyon oranı, iskele yüzeylerinin hidrofilik karakterine ve gözenek boyutuna bağlıdır (Yılmaz, vd., 2021). Bu durumda, kriyojelin çapraz bağlı yapı iskelesinden yaklaşık 4 kat daha hızlı emilim gösterdiği görülmektedir. B-Si-Col-HK kriyojelleri, içerdiği B ve Si nanopartikülleri nedeniyle gözeneklilik boyutunu ve polimerin yüzey pürüzlülüğünü arttırarak emilim hızını da arttırdığı söylenebilir. Literatürde borun hidrofilik karakteri önemli ölçüde geliştirdiği ve yapı iskelelerine Si eklenerek silanol gruplarına (-Si-OH) atfedilen hidrofilikliğin artmasıyla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Belaid, vd., 2020; Pattnaik, vd., 2011). Artan hidrofiliklik, nihayetinde protein adsorpsiyonu için daha fazla alan sağlayacak ve böylece hücrel etkileşimi artıracaktır.

4.12. Biyo-iskele ve Kriyojellerin SEM-EDS İncelemesi

Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin 50X ve 250X büyütmelelerinde alınan SEM mikrografları Şekil 48’de verilmiştir. Liyofilizasyon aşaması sonrası her iki malzemede de 3B ve gözenekli yapılar gözlenmiştir. Biyoiskele ve kriyojellerin ortalama gözenek boyutu sırasıyla $346,78 \pm 91,11$ µm ve $45,07 \pm 13,91$ µm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, biyo-iskeleye kıyasla kriyojellerin daha küçük gözeneklere ve yoğun bir ağ yapısına sahip olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, bor ve silisyumun yapıda moleküler arası oluşturdukları çapraz bağ ile birbirine bağlantılı yapılar oluşturduğu sonucuna varılabilir (Ahtzaz, vd., 2020). Kriyojellerin EDS spektrumu incelendiğinde, yapıda ilgili elementlerin tespiti gerçekleştirilmiş, bor ve Si atomlarının protein yapılarına katıldığını doğrulamıştır.



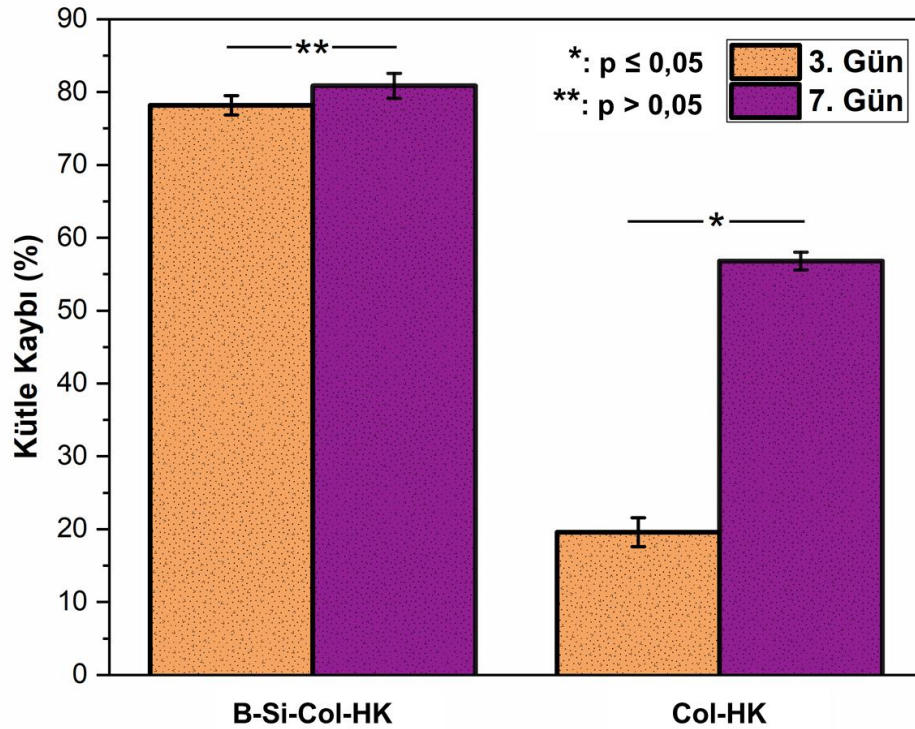
Şekil 48. Col-HK biyo-iskele ve B-Si-Col-HK kriyojelin SEM-EDS analizleri. (A) Col-HK biyo-iskelelerin ve (B) B-Si-Col-HK kriyojellerin 50x ve 250x büyütmede gözenek boyutu dağılımları (μm) (C) Kriyojelin EDS spektrumu

4.13. Biyo-iskele ve Kriyojellerin Biyobozunurluk Özellikleri

Biyobozunurluk, kemik dokusu rejenerasyonu için kritik bir tasarım parametresidir. Bu nedenle, geliştirilebilecek biyomalzemelerin bozunma hızı, yeni doku oluşumu hızını yansıtmalı ve kemiğin iyileşme süreci hızına karşılık gelmelidir. Biyomalzemelerin bozunmasından sonra oluşan yan ürünleri ise, toksik olmamalı ve vücut tarafından rahatlıkla emilebilir olmalıdır. Ayrıca, malzemenin mekanik özelliklerinde gözlenen değişiklik, dokunun rejenerasyon süresiyle uyumlu olması gerekmektedir (Erol, vd., 2012; Jasmine and Mandal, 2014). Bu amaçla Col-HK biyo-iskelelerinin ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin *in vitro* biyobozunma oranları, 3 ve 7 günlük inkübasyon için bir proteinaz

K enziminin uygulanmasıyla incelenmiştir. Şekil 49, bu test sonucunda elde edilen % kütle kaybı verilerini göstermektedir.

Proteinaz K içeren tampon çözelti içerisinde inkübasyonun 3. gününde Col-HK biyo-iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojellerin toplam kütle kaybı sırasıyla $19,60 \pm 1,9$ ve $78,18 \pm 1,3$ ($n=3$) olarak bulunmuştur. 7. gününde ise Col-HK biyo-iskelelerinin ($56,8 \pm 1,2$, $n=3$) kütle kaybı ~3 kat artarken, B-Si-Col-HK kriyojellerinin ($80,8 \pm 1,7$, $n=3$) kütle kaybında önemli bir değişiklik olmamıştır. Elde edilen sonuçlar üzerinde gerçekleştirilen ANOVA testi sonucunda, toplam kütle kaybı değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Ancak, B-Si-Col-HK kriyojellerinin 3. ve 7. günlerine ait değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın gösterilmediği tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



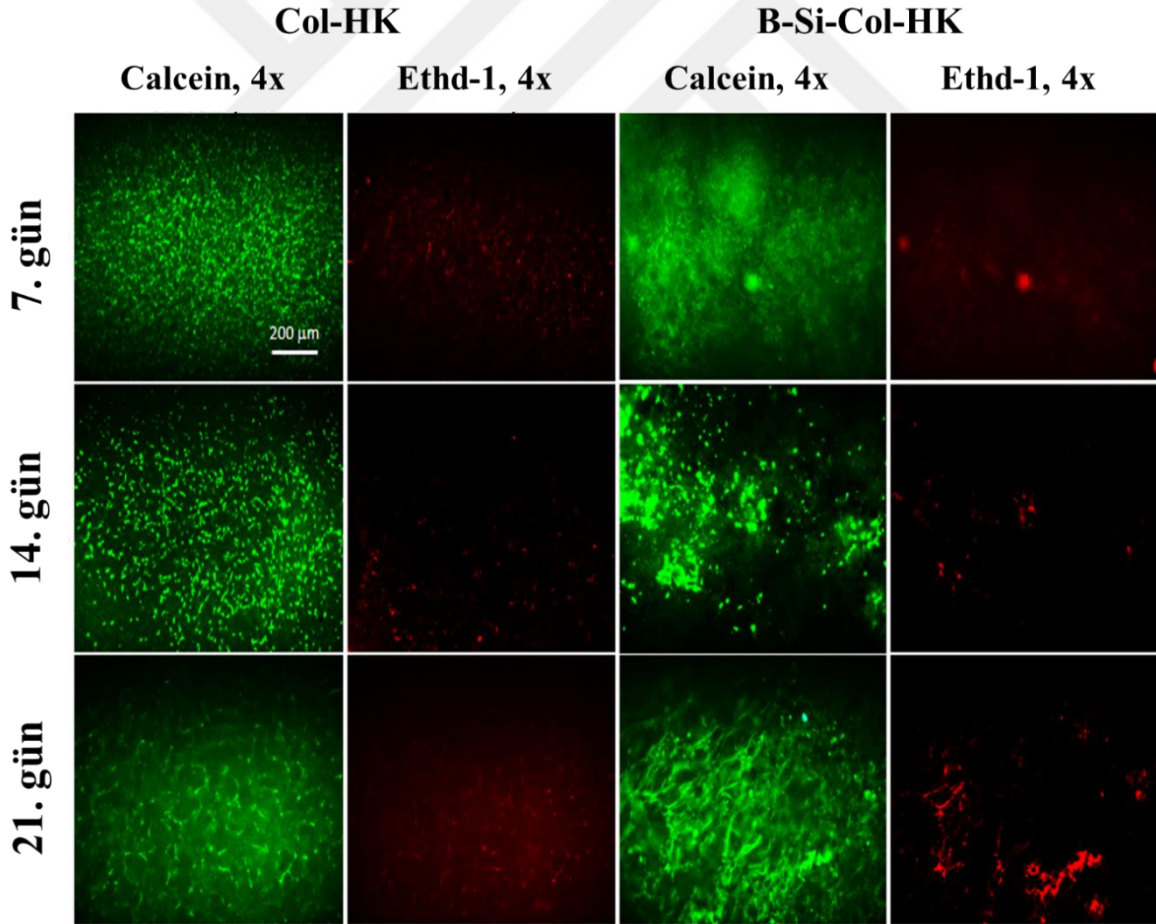
Şekil 49. İskele ve kriyojellerin 3. ve 7. gün periyotlarındaki bozunma oranları

Biyobozunma süreci karmaşık bir olgudur ve gözeneklilik, hidrofilitiklik, toplam yüzey alanı gibi çeşitli yapısal özelliklere ek olarak biyo-iskelelerin hazırlanma yöntemine bağlıdır (Jasmine and Mandal, 2014; Qasim, vd., 2017). Bu nedenle, Col-HK biyo-iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojelleri (kriyojellerde ~4 kat daha yüksek) arasındaki 3 günlük inkübasyondaki bozunma hızı farkı, bahsedilen malzeme özelliklerine bağlanabilir. Col-HK biyo-iskelesi ile karşılaştırıldığında, B ve Si elementlerinin keratin ve kollajen

zincirlerine bağlanmasıyla elde edilen katı ve/veya gözenekli ağlara sahip B-Si-Col-HK kriyojelleri daha yüksek gözenek çaplarına, su emme kapasitesine ve spesifik yüzey alanına sahiptir. Bor ve silisyumun polimer matriksine dahil edilmesi, malzemenin su alma eğilimini arttırmış ve bu da kriyojellerin ağırlık kaybını hızlandırarak bozunma kinetiklerinde değişikliklere yol açmıştır. Ek olarak, B-Si-Col-HK kriyojellerinin daha yüksek su emme oranları hidrolitik ataklara neden olarak bozunma hızını arttırmıştır (Tamburaci, vd., 2019).

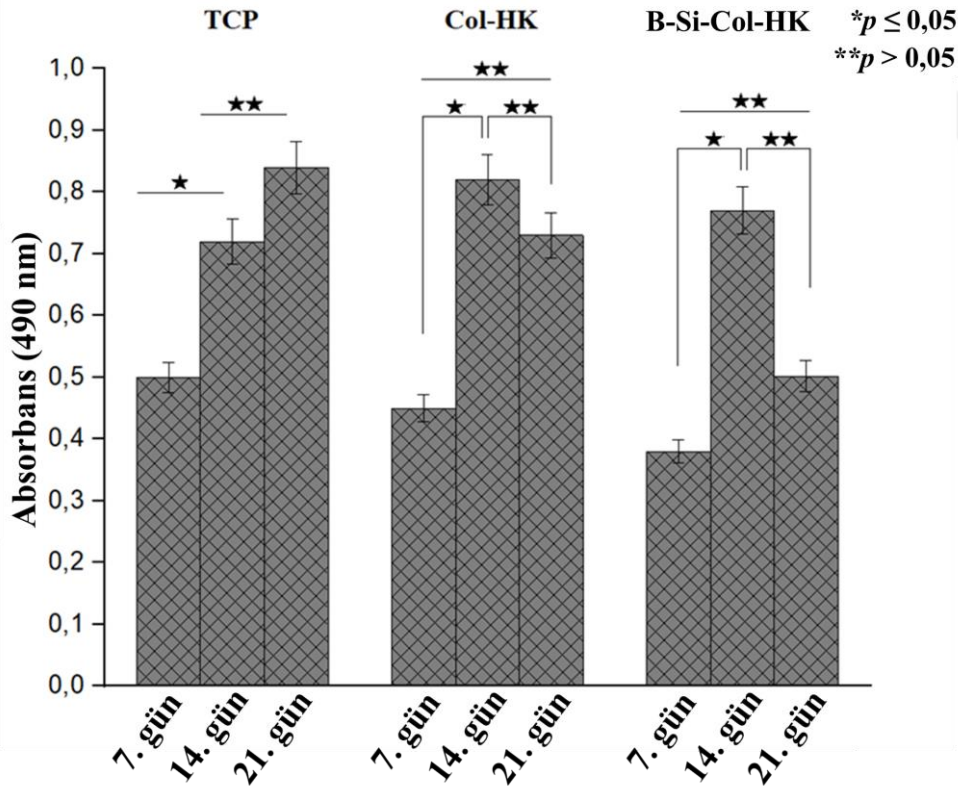
4.14. *In Vitro* Hücre Kültürü Uygulamaları: İskele ve Kriyojellerin Hücre Uyumluluğu

Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin biyouyumluluğunu değerlendirmek için hücre canlılığı ve çoğalması, live/dead (canlı/ölü) testi ile kalitatif ve MTS testi ile de kantitatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 50. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin live/dead testi sonucu elde edilen spektrumu

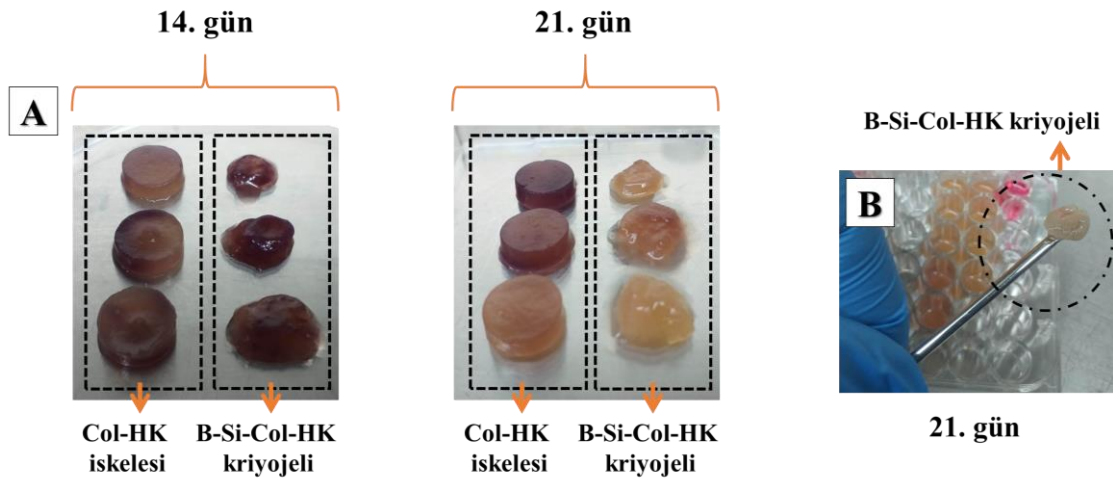
Live/dead testinde calcein-AM, canlı hücrelerde hücre içi esteraz enzimi ile reaksiyona girerek yeşil floresan, Ethd-1 ise bozuk ölü hücrelerin zarından geçerek nükleik asit molekülleri ile etkileşime girmesi sonucu kırmızı floresan emisyonu vermektedir. Şekil 50'de gösterildiği gibi, hem Col-HK biyo-iskelesi hem de B-Si-Col-HK kriyojelleri kültürlendiğinde hücrelerde güçlü yeşil floresan emisyonları görülmektedir. Bu güçlü emisyonlar, uzun vadeli kültür için iskele ve kriyojeller içerisinde korunarak 21 günlük kültürden sonra bile canlılığını devam ettirme kabiliyetine sahiptir. B-Si-Col-HK kriyojellerinde indüklenen hücrelerin, 21 günlük kültür itibariyle doku benzeri yapı oluşturma eğiliminde oldukları görülmüştür. Aksine, Col-HK biyo-iskeleleri içerisinde inkübe edilen hücrelerin ise önceki yetiştirme dönemlerine benzer şekilde, daha az hücre-hücre etkileşimi ile tek katmanlı kültür olarak hayatta kalmaya devam ettiği gözlemlenmiştir. Tüm bu gözlemler, farklılaşan iAMKH'lerin, Col-HK biyo-iskelelerine kıyasla B-Si-Col-HK kriyojellerinde kemik dokusu oluşturmaya daha yatkın olduğu fikrini doğrulamıştır.



Şekil 51. Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin üzerinde çoğalan iAMKH'lerin MTS grafiği

İskele ve kriyojellerin hücre uyumluluğunu güçlendirmek için MTS testi de yapılmıştır. MTS sonuçlarına ait grafik ise şekil 51’de gösterilmiştir. Test sonucunda elde edilen veriler 490 nm’de belirlenen absorpsiyon değerleri bazında verilmiştir. Hücre ekimi sonrası hücreler biyo-iskele ve kriyojeller üzerinde tutunmuş ve çoğalmaya devam etmiştir. Dolayısıyla, MTS sonuçları ile her iki biyomalzeme üzerindeki hücrelerin sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Genel olarak MTS verileri incelendiğinde, hücrelerin Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerinde 14. güne kadar muazzam bir şekilde çoğaldığını göstermiştir. Biyo-iskele ve kriyojellerin kendi aralarında 7. ve 14. günlere ait sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($*p \leq 0,05$) olduğu görülmektedir. Bu da hücrelerin osteojenik farklılaşmaya doğru giderken canlılıklarını koruduklarının göstergesi olmuştur. Bu bağlamda, her iki grubun hücrelerin tutunup çoğalması için uygun ortam olduğu görülmektedir. 14. günde hücre canlılığı her iki biyomalzeme için de en yüksek değerine ulaşmıştır. 14. günden sonra ise hücre canlılığı her iki grupta da kontak inhibisyona bağlı olarak, proliferasyonun yavaşlaması sonucu azalma göstermiştir. 14. günden 21. güne kadar olan azalma dikkate alındığında, iskele ve kriyojeller kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemişlerdir ($**p > 0,05$). Genellikle hücrelerin çoğalması ve farklılaşması arasında ters bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hücrelerin üremesindeki bu azalış, hücre proliferasyonunda bir yavaşlamaya yol açan iAMKH'lerin osteojenik farklılaşması ile açıklanabilir (Ruijtenberg and van den Heuvel, 2016). Böyle bir açıklama, biyo-iskele ve kriyojellerde osteojenezin de bir işareti olacaktır.



Şekil 52. Hücre kültürü sona eren biyo-iskele ve kriyojellerin son görüntüleri A) MTS reaktifi ile boyanmış 14. ve 21. günlere ait iskele ve kriyojellerin makro görüntüsü, B) 21. günün sonunda osteojenik farklılaşma gösteren hücreli kriyojelin görseli

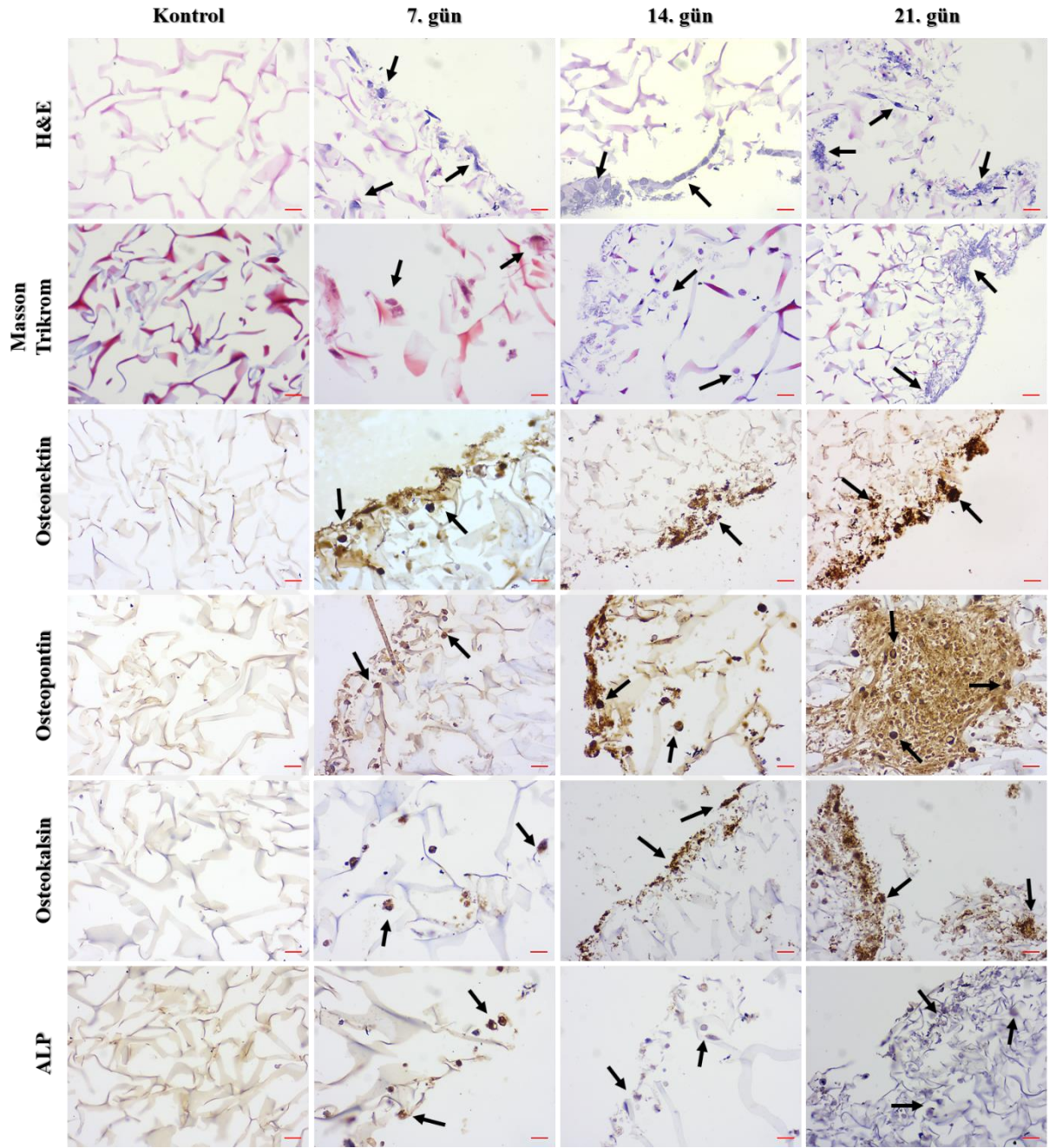
Şekil 52-A'da MTS reaktifi ile muamele edilmiş iskele ve kriyojellerin görüntüleri mevcuttur. Burada inkübasyon sonunda, içeriğinde hücrelerin bulunduğu malzemelerin son hali gösterilmek istenmiştir. Görselde B-Si-Col-HK kriyojelinin iskele morfolojisi bozulmuş olup, hidrojel halini benimsediği gözlenmektedir. 7., 14. ve 21. günün sonunda elde edilen kriyojeller kıyaslandığında, 7. gün kriyojelinin ıslandıktan sonraki mekanik mukavemeti en düşük olduğu gözlemlenirken, osteojenik farklılaşmanın etkisiyle 21. gün kriyojelinin pens ile tutulabilir duruma ulaşarak sert bir yapıya büründüğü gözlemlenmiştir (Şekil 52-B). Dolayısıyla morfolojik açıdan da kriyojelin farklılaşmaya yöneldiği görülmüştür.

4.15. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

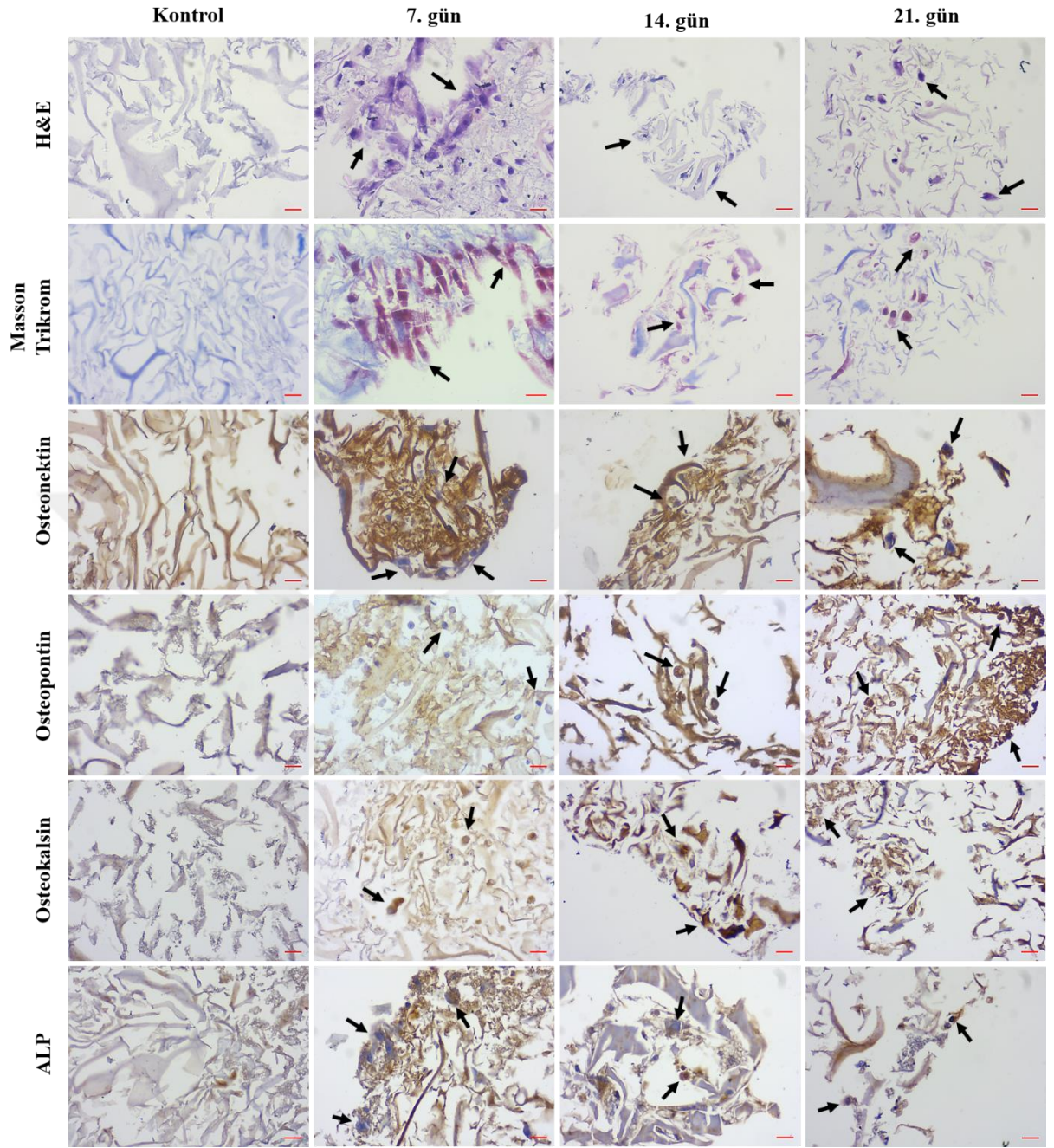
Üç boyutlu Col-HK biyo-iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojelleri üzerindeki hücrelerin davranışları, histokimyasal ve immünohistokimyasal analizler ile karakterize edilmiştir. Bu analizlerde hücrelere ait osteojenik potansiyelin belirlenebilmesi için antikor ilişkili boyalar kullanılmıştır. Bu boyaların, hücrelerin osteojenik farklılaşmasıyla oluşturdukları özel bir antijen (protein) yapıları ile spesifik bir şekilde bağlanması sonucu morfolojik açıdan osteojenik farklılaşmanın tespiti gerçekleşmektedir. Osteojenik farklılaşma için uyarılan hücreler üzerinde H&E, masson trikrom, osteonektin, osteopontin, osteokalsin ve ALP boyamaları uygulanmış ve kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yapılan bu boyamalar optik mikroskop altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 53 ve Şekil 54'te sunulmuştur.

Histokimyasal karakterizasyonda osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olarak mineralize matriks oluşumu ve genel histomorfoloji, H&E ve MT boyamaları ile belirlenmiştir. H&E ayrıca tüm numuneler için bir karşıt boya olarak kullanılmıştır. Col-HK biyo-iskeleleri ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin H&E boyaması incelendiğinde, bu yapılarda uygun hücre infiltrasyonu ve gelişimi görülebilir. Kollajen liflerini (mavi renk) görselleştirmek için kullanılan masson trikrom boyaması, her iki hücre yüklü yapıda da kontrol gruplarına (hücresiz yapılar) kıyasla daha fazla kollajen birikimi sergilediğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, hücre yüklü B-Si-Col-HK kriyojelleri, osteoblastlar tarafından daha yüksek düzeyde hücre dışı matriks sentezine dayanan mavi renkte daha yoğun bir boya göstermiştir (Zhang, vd., 2017).

Col-HK biyo-iskelelerinin ve B-Si-Col-HK kriyojellerinin osteoindüktif potansiyelleri, anti-ON, anti-OP, anti-OC ve anti-ALP gibi immünohistokimyasal belirteçlerle incelenmiştir. ON, OP ve OC, osteoblastlar tarafından salgılanan kollajen olmayan hücre dışı matris proteinleridir ve ayrıca kemikleşme sürecinde önemli roller üstlendiği iyi bilinmektedir. Literatürdeki birçok raporda osteonektin ve osteopontinin osteoblast farklılaşması ve mineralizasyonunda erken ve etkili belirteçler olduğu, osteokalsinin ise kemik oluşumunun sonraki aşaması olduğu belirtilmektedir (Thorwarth, vd., 2005; Yılmaz, vd., 2021). Benzer şekilde ALP, kemik oluşumunda rol oynayan ve ilk iki hafta boyunca osteoblastlar tarafından maksimum düzeyde eksprese edilen ve daha sonra giderek azalan bir diğer önemli erken belirteçtir (Calabrese, vd., 2016). Şekil 53 ve 54'te, kahverengi renk yoğunluğu, siyah oklarla gösterilen canlı osteoblast benzeri hücreler de eksprese edilen protein seviyelerine karşılık gelmektedir. Her zaman noktasındaki tüm gruplarda ON, OP ve OC'nin artan ekspresyon değerleri görülmüştür. Öte yandan, 14. günden sonraki her iki grupta da osteokalsin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Osteoblast benzeri hücrelerin ALP aktivitesi, hücre kültürü periyodunun ilk 7. gününde güçlü bir şekilde başlamış ve gün geçtikçe ekspresyon seviyelerinde kademeli bir düşüş gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar literatürle yakın ilişki içindedir (Yılmaz, vd., 2021). Bulgularımız, bu erken ve geç osteojenik belirteçlere ait ekspresyon seviyelerinin, kontrol ve Col-HK biyo-iskelelerine kıyasla B-Si-Col-HK kriyojellerinde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bu durum, iAMKH'lerin kriyojel yapısında bulunan inorganik (B ve Si) bileşenler tarafından indüklenmesiyle osteoblastik kökene farklılaşmasını düşündürmektedir. Ayrıca literatürde, bor (Shalehin, vd., 2020; Yin, vd., 2020) ve silikon bazlı materyallerin (Anitha, vd., 2017; Yılmaz, vd., 2021) erken faz kemik mineralizasyonu ve *in vitro* osteojenik farklılaşması üzerindeki iyileştirici etkileri de birkaç grup tarafından gösterilmiştir. Son olarak, bu görsel değerlendirmeler kantitatif RT-PCR analizi ile de desteklenmiştir.



Şekil 53. Col-HK biyo-iskelelerindeki osteojenik farklılaşmanın histokimyasal-immünohistokimyasal boyamaları (Kırmızı ölçek çubukları 100 µm'yi, siyah ok imleci ise hücre nodülleri ve hatlarını göstermektedir.)



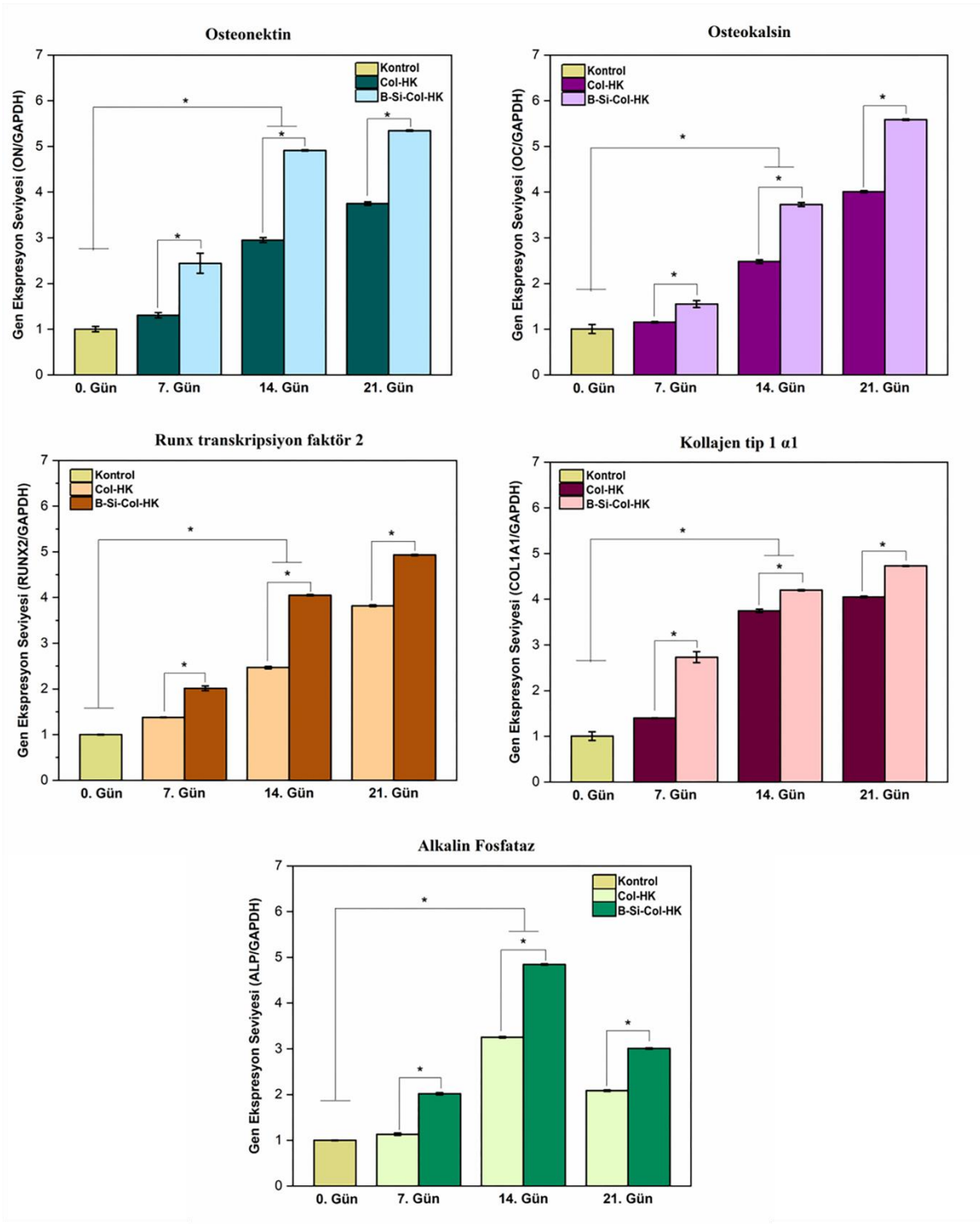
Şekil 54. B-Si-Col-HK kriyojellerindeki osteojenik farklılaşmanın histokimyasal-immünohistokimyasal boyamaları (Kırmızı ölçek çubukları 100 µm'yi, siyah ok imleci ise hücre nodülleri ve hatlarını göstermektedir.)

4.16. Osteojenik Farklılaşma ile İlgili Gen İfadeleri: qRT-PCR Analizleri

Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin osteojenik potansiyelleri, ekimi yapılan iAMKH'lerin 7., 14. ve 21. kültür günleri sonunda incelenmesiyle analiz edilmiştir. Hücreler üzerinde osteojenik farklılaşma ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için kantitatif RT-PCR analizi yapılmıştır. Analiz sonunda NanoDrop'ta gerçekleştirilen absorbans ölçümleriyle RNA saflığı doğrulanmış ve tüm Ct değerleri <35 olarak bulunmuştur. ON, OC, RUNX2, COL1A1 ve ALP genlerinin kontrol grubu olarak kullanılan farklılaşmamış iAMKH'ler, Col-HK yapı iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojelleri üzerindeki farklılaşmış hücrelerin GAPDH geni seviyelerine göre normalize edilmiş ekspresyon seviyeleri Şekil 55'te gösterilmiştir. Kantitatif RT-PCR analizinde, 21 günde tamamlanan incelemenin her noktasında kontrol gruplarına kıyasla bor ve silika içeren kriyojellerin ON, OC, RUNX2 ve COL1A1 mRNA ifadelerinde osteojenik farklılaşma ile ilgili yukarı regülasyonu (up-regülasyon) gözlemlenmiştir. ALP'nin ekspresyonu ise ilk 14. gün için önemli ölçüde yukarı regüle edildiği görülmektedir (Şekil 55).

Mevcut çalışmalarda açıklandığı gibi, borun kemik rejenerasyonu potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Rico, vd., 2020; Rondanelli, vd., 2020). Çalışmamızda, bor içeren kriyojeller, osteoblastik soyun oluşturucusu olarak kabul edilen RUNX2 ve COL1A1 gibi bazı osteogenez ile ilişkili genlerin ve osteoblast olgunlaşmasını içeren, sonrasında olgun kemik hücrelerinde oluşan bir geç aşama farklılaştırma markörü olarak OC'nin yüksek ekspresyon seviyelerini indüklemiştir (Javed, vd., 2010). Sonuçlarımıza benzer şekilde, OC ve COL1A1'i kodlayan genin ekspresyonunda yukarı regülasyonu, borla tedavi edilmiş osteoblastik hücrelerde ve kemik mezenkimal kök hücrelerde (KMKH'ler) gözlemlenmiştir (Hakki, vd., 2010). Başka bir çalışmada, borun memeli osteoblastik hücrelerindeki çoğalma ve farklılaşma etkisi, kalsiyum iyonlarının akışını hızlandırarak da gösterilmiştir (Capati, vd., 2016). Bor ile entegre üç boyutlu baskılı iskeleler Zhao ve diğerleri (2020) tarafından üretilmiş ve iskelelerde kültürlenmiş KMKH'lerin osteojenik genlerinin ifadeleri de mükemmel osteojenik aktivitelerini doğrulamıştır. Buna karşılık, Ferreira ve diğerleri (2015) arap zıncığı ile işlevselleştirilmiş bor nitrür nanotüplerin sıçan MKH'lerinin farklılaşması üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve 21 günlük kültürü takiben elde ettikleri sonuçlar, bor uygulamasının COL1A1 haricinde ana osteogenez markör genlerinin transkripsiyonunu geliştirmedeğini

göstermiştir. Borun kemik sağlığı üzerindeki moleküler mekanizmalarının anlaşılmasını geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



Şekil 55. iAMKH'ler, Col-HK biyo-iskelesi ve B-Si-Col-HK kriyojellerin qRT-PCR analizi sonucu elde edilen OC, ON, RUNX2, COL1A1 ve ALP genlerinin ekspresyon seviyeleri

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Milyonlarca insan, yaşlanan bir popülasyon, hastalık veya travma nedeniyle hasar gören doku ve organlardan muzdariptir ve nakil yoluyla tedavi edilmek üzere beklemektedir. Bu durumda, doku ve organlardaki eksiklikler ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, hasarlı dokuların rejenerasyonu için fizyolojik süreçleri taklit ederek ileri yaklaşımlar sunan biyomedikal alanlar olarak ortaya çıkmıştır. "Doku mühendisliği" terimi ilk olarak Langer ve Vacanti tarafından 1987'de kullanılmış ve yapı-işlevi tanımlamada biyolojik dokuları iyileştirmek veya değiştirmek için yaşam bilimleri ve mühendislik ilkelerinin birleşimiyle oluşturulan çok disiplinli bir alan olarak tanımlanmıştır. Gün geçtikçe artan organ ihtiyacı, doku mühendisliği uygulamalarındaki araştırmaları da arttırmıştır. Birbirinden farklı sağlık sorunlarına yeni ve güncel yenilikler sunan doku mühendisliğinin başlıca bileşenleri; dokuya spesifik hücreler, biyomalzemeler ve doku oluşumunu destekleyici uygun çevre koşullarıdır. Gelişmiş doku mühendisliği araçları olarak kabul gören iskeleler genel olarak, işlevselleştirilmiş yüzey ve uygun gözenek özellikleri ile hücre-iskele etkileşimlerinin kolaylıkla desteklenebilmesi için biyouyumlu olacak şekilde tasarlanmalı ve ihtiyaca göre düzenlenebilmelidir. Ayrıca, HDM ortamını taklit ederek doku rejenerasyonunu kolaylaştırmak ve optimum hücre yapışması, proliferasyonu ve farklılaşmasının sağlanması için biyo-uyumlu ve biyobozunabilir özelliklere sahip olmalıdır.

Her kemik dokusu, değişen biyomekanik kuvvetlere uyum sağlamak amacıyla yaşam boyunca sürekli olarak yenilenerek mikro hasarlı kemiği yeniden yapılandırma yeteneğine sahiptir. Ancak, kemik dokunun hasar görmesiyle meydana gelen ileri derecedeki rahatsızlıklarda (travma, osteoporoz, büyük parçalı kırıklar vb. gibi) kemik dokusunun rejenerasyonu yetersiz kalmaktadır. Doku onarımı gerçekleşmeyecek vakalarda, kemik rejenerasyonunun tetiklenmesi ve bu süreçte mekanik ve yapısal desteğin sağlanabilmesi için kemik üzerindeki defektlerin uygun DM malzemeleri kullanılarak doldurulması büyük önem taşır. KDM'de uygulanabilecek kemik defektine uygun ideal materyallerin oluşturulması, sürekli olarak materyallerin optimizasyonunu gerektirmektedir. Optimizasyon çalışmalarında, esas olarak kemik dokusunun rejeneratif gereksinimlerini karşılamada istenen mekanik özellikler ve doğal kemik dokusuna en yakın biyomalzemelerin kullanımına dikkat edilmektedir. Malzemelerin geliştirilmesinde genel

olarak polimerler, seramikler ve metallerin biyolojik destek olarak kullanımı bildirilmiş, ancak seramik ve metallerin getirdiği dezavantajlar, çalışmalarda diğer alternatif materyal ve tekniklerin kullanımına yönlendirmiştir. Çoğu araştırmacı bu yaklaşım çerçevesinde KDM uygulamaları için, polimer esaslı biyomalzemelerin geliştirilmesine öncülük etmiştir.

Doğal kemik dokusu, HDM ve hücrelerden oluşan mineralize bir bağ dokusudur, matriksi ise organik/inorganik bileşenlerden oluşan bir kompozit yapıdır. Kemiğin yapısı gereği organik bileşenleri, özellikle doğal polimer temelli malzemelerin sentezi ve geliştirilmesinde alternatif oluşturmuş ve HDM yapısını taklit eden malzemelerin iyi seviyede rejenerasyon sergilediği yapılan birçok çalışmalarla desteklenmiştir. Öte yandan, HDM'nin inorganik bileşeni, doğal polimer ile inorganik moleküllerin birleştirilebileceği düşüncesini uyarmış ve doğal polimerlerin, kemik rejenerasyonunda tek başına kullanıldıklarındaki karşılaşılan bazı sorunların giderilmesi, özellikle de mekanik ve termal olarak direnç kazandırabilmek amacıyla kombine edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Son zamanlarda da hibrit biyomalzemeleri konu alan birçok çalışmada, farklı polimerler ve inorganik fazları çoklu seviyelerde birleştirerek yüksek derecede özel fizikokimyasal özellikler ve biyoaktiviteler sentezleyebildikleri bildirilmiştir. Halen, sentez, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla destekleme çabaları devam etmektedir.

Özellikle kemik doku rejenerasyonu ve rekonstrüksiyonunda kullanılacak ideal iskelelerin, uygun osteokondüktif ve osteoindüktif gibi özellikleri ile gerekli yapısal sistemleri içermesi gerekmektedir. Materyal üzerine uygulanacak kök hücrelerin yalnızca mikroçevresel sinyallerle düzenlenip yönlendirilebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, osteoindüktif ve/veya osteokondüktif ajanlar da kök hücre farklılaşmasını kontrol etmek ve etkili kemik rejenerasyonunda iyileşme süresini azaltmak için iskele sistemlerine entegre edilmelidir. Literatür araştırmaları kapsamında, osteoindüktif ve/veya osteokondüktif etki sağlayacak ajanların kalsiyum, bor, silisyum, magnezyum vb. gibi minerallerin olabileceği pek çok çalışmada belirtilmiştir.

Sunulan bu tez çalışmasında doğal kemik dokusunun organik/inorganik yapısı göz önünde bulundurularak tip I memeli kollajen ve insan saç keratin polimerlerinin organik bileşeni, bor ve silisyum moleküllerinin ise inorganik bileşeni taklit ettiği gerekçesiyle, polimer ve minerallerin birbirinden farklı eşsiz özellikleri birleştirilmiştir. Kollajenin hücre dışı matriksin ana proteini olması ve keratinin ise matrikse benzer fiziksel ve biyokimyasal özellik sergilemesi nedeniyle bu iki polimer, organik bileşen olarak biyomalzemenin temelini oluşturmuştur. Öte yandan, osteojenik farklılaşmanın bir modülatörü olarak bor ve

silisyum ile, malzemeye osteokondüktif/osteoinduktif özellik kazandırarak rejenerasyon süresini kısaltmak ve yenileme verimliliğini arttırmak istenmiştir. Bu amaçla, bor ve silika molekülleri sol-jel reaksiyonu ile kollajen ve keratin proteinlerine modifiye edilerek yeni üç boyutlu osteokondüktif özellikte biyokompozit kriyojeller (B-Si-Col-HK) sentezlenmiştir. Reaksiyon aşamasında tip I memeli kollajenler, sıçan kuyruğundan izole edilmiş ve pepsinde sindirilerek atelokollajen formu kullanılmıştır. Keratin kaynağı olarak, insan saç keratini kullanılmış ve saç bakım merkezlerinden getirilen saç örneklerinin sülfitolizis yöntemiyle ekstraksiyonu sonucu elde edilmiştir. Ekstraksiyonu gerçekleştirilen insan saç keratini ve sıçan kuyruğu kollajeni biyokimyasal olarak, Lowry protein tayini, -SH grup tayini, amino asit içerik, hidroksiprolin, SDS-PAGE ve MALDI-TOF analizleri ile karakterize edilmiştir. Biyokimyasal karakterizasyonlar ile kollajenin yapısında bulunan toplam hidroksiprolin miktarı, keratinlerin ise total protein içeriği ve serbest sülfidril gruplarının miktarı belirlenmiştir. Ayrıca, SDS-PAGE analizi ile proteinlerin moleküler büyüklüğü ve spesifik bantları belirtilmiştir. Özellikle de keratinin sülfitolizis yöntemiyle ekstraksiyonu sonucu aşırı alkali ortamda yapılan hidroliz işlemlerinden önemli ölçüde etkilendiği ve 6-7 kDa'daki küçük fraksiyonlarına kadar ayrıştığı görülmüştür. Bu durum, MALDI-TOF analizi ile de gözlenerek yakın değerler bulunmuştur. Spesifik olarak, SDS-PAGE analizi ile küçük moleküler ağırlıklı bantlar ortaya çıkarılırken, MALDI-TOF kütle spektroskopisi, MW dağılım analizinde piklerin yoğunluğunu vurgulamaktadır.

İnorganik bileşenlerin öncülü olarak borik asit (pH:9,0) ve TEOS kimyasallarından yararlanılmıştır. Reaksiyon sonunda, üretilen hidrojjellerin dondurarak kurutma tekniğinden geçirilmesi ile kriyojellerin üç boyutlu gözenekli yapısı elde edilmiştir. Kriyojel yapısındaki protein ile aynı oranlarda hazırlanan Col-HK iskelesi, ilgili karakterizasyon tekniklerinde mekanik dayanım kazandırmak amaçlı EDC/NHS çapraz bağlama ajanları ile çapraz bağlanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan hazırlanmış Col-HK iskelesi, sentezlenen kriyojeller ile birlikte karakterize edilmiştir.

Sol-jel reaksiyonu sonunda kalıptan çıkartılarak elde edilmiş üç boyutlu B-Si-Col-HK hidrojjellerin stabilitesi ve mekanik mukavemetinin belirlenmesi için yapılan reolojik ölçümler, reoloji analizi ile gerçekleştirilmiştir. Kompozit iskele ve kriyojellerin kimyasal yapısındaki fonksiyonel grupları ATR-FTIR analizi ile belirlenmiş, kristal yapı özellikleri ise XRD analizi ile incelenmiştir. Biyoiskele ve kriyojellere ait termal stabilite özellikleri TGA ve DSC analizleri ile, mekanik dayanımlarının etkisi ise mekanik basma testi

yapılarak belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; B-Si-Col-HK kriyojellerin yapısındaki bor ve silika moleküllerinin kimyasal ve fonksiyonel gruplarının tespit edildiği ve aynı zamanda yapıya mekanik dayanım ve termal direnç kazandırdığı gözlemlenmiştir. Kompozit iskele ve kriyojellerin spesifik yüzey alanları ve gözenekliliği, BET ve porozite testleri ile belirlenmiştir. Ayrıca bu üç boyutlu kompozitlere şişme ve sıvı alım kapasite testleri de yapılmıştır. İskele ve kriyojellerin *in vitro* bozunma davranışı, enzimatik bozunma testi ile incelenmiştir. Ek olarak, yüzey ıslanabilirlik özellikleri de temas açısı ölçümü analizi yapılarak açığa çıkarılmıştır. Kriyojel yapıların sol-jel reaksiyonu ile moleküler içi veya moleküler arası bor ve silika grupları aracılığıyla güçlü bir şekilde bağlı olduğu bilinmektedir. Bu durum, şişme ve PBS alım testlerinde kriyojelin iskele yapısına kıyasla biraz daha az sıvı emdiğini göstermektedir. Ayrıca, BET, gözeneklilik ve temas açısı testleri kriyojel yapısındaki bor ve silika nano-partiküllerinin, yüzey alanı boyunca rastgele kaplanmasıyla polimerin yüzey pürüzlülüğünü arttırdığı, dolayısıyla emilim hızının da arttığı ve *in vitro* hücre kültürü uygulamalarında kullanılmak üzere, hücrelerin tutunarak yeterli besin ve oksijeni sağlayacak uygun bir biyomalzeme olabileceğini düşündürmüştür. Artan hidrofilitiklik, nihayetinde nihayetinde protein adsorpsiyonu için daha fazla alan sağlayacak ve böylece hücrel etkileşimi artıracaktır. Sentezlenen kriyojeller hücre kültürü uygulamalarında da karakterize edilmiştir. Yapılan testlerden iskele ve kriyojellerin optimum 150 µl sıvı alabildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, *in vitro* hücre kültüründe kriyojeller üzerine iAMKH'lerin ekimi 150 µl besiyeri içerisinde 100.000 hücre/iskele olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İskele ve kriyojellerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için hücre canlılığı ve çoğalması, 7., 14. ve 21. kültür günlerinde Live/Dead (canlı/ölü) testi ile kalitatif ve MTS testi ile de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Belirli kültür günlerinde yapılan Live/Dead ve MTS testi verilerinden elde edilen tüm bu gözlemler, hücre canlılığının arttığını ve farklılaşan iAMKH'lerin, Col-HK iskelelerine kıyasla B-Si-Col-HK kriyojellerinde kemik dokusu oluşturmaya daha yatkın olduğu fikrini doğrulamıştır. Dolayısıyla, bu sonuçlar ile her iki biyomalzeme üzerindeki hücrelerin sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, yapı iskelesi ve kriyojeller üzerindeki iAMKH'lerin, davranışı, takibi ve osteobiyolojik etkileri için histokimyasal/immünohistokimyasal ve gen ekspresyon testleri de yapılmıştır. Histokimyasal/immünohistokimyasal test bulguları, B-Si-Col-HK kriyojeli üzerinde gerçekleştirilen tüm boyamaların, Col-HK yapı iskelesine kıyasla daha fazla oranda boyandığı ve hücrelerin kriyojel yapısında bulunan inorganik bileşenler tarafından

indüklenerek osteojenik farklılaşmanın tespiti gerçekleşmiştir. Hücrelerin osteogenez için benimseyebileceği daha iyi bir yapı ortamı sunduğu açıkça görülmektedir. RT-PCR analizi ile de osteoblastik farklılaşma izlenmiş, RUNX2, osteonektin, osteopontin, COL1A1 ve ALP genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Sonuçlarımız doğrultusunda, KDM uygulamaları kapsamında sentezlenen osteokondüktif biyokompozit B-Si-Col-HK kriyojellerin klinik uygulamalarda kullanıma geçmesi ve ileriki zamanlarda kemik doku rejenerasyonundaki etkilerinin aydınlatılması için *in vivo* testler ile de sonuçlarımızın desteklenmesi beklenilmektedir. Sonuç olarak, sentezlenen osteokondüktif özellikteki biyokompozit malzemenin kemik doku rejenerasyonu için uygun bir malzeme olduğu ve yeni bir alternatif yol sunacağı düşünülmektedir. KDM kapsamında, bor ve/veya silisyumun iskele materyali olarak kullanıldığı sınırlı sayıda çalışması mevcuttur. Ancak, kollajen ve keratin ile düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmiş sentezi ilk defa bu tez çalışmasında sunulmuş ve kemik metabolizması üzerindeki etkinliği de bu çalışmada araştırılmıştır. İlk defa sentezi gerçekleştirilen bu osteokondüktif biyokompozit malzeme ile rejeneratif tıp ve kemik doku mühendisliği kapsamında literatüre katkıda bulunmaktayız. Biyokompozit malzemenin temelini oluşturan keratin kaynağının sınırsız insan saçından temin edilebilmesi ve özellikle de insan kaynaklı olması, tamamen hastalara özel olarak kişiye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine alternatif sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Agarwal, V., Panicker, A. G., Indrakumar, S., and Chatterjee, K. (2019). "Comparative study of keratin extraction from human hair". *International Journal of Biological Macromolecules*, 133(June), 382–390. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.098>
- Aggarwal, J., Sharma, S., Kamyab, H., and Kumar, A. (2020). "The Realm of Biopolymers and Their Usage : An Overview". *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 8(2), 1005–1016.
- Ahtzaz, S., Sher Waris, T., Shahzadi, L., Anwar Chaudhry, A., Ur Rehman, I., and Yar, M. (2020). "Boron for tissue regeneration-it's loading into chitosan/collagen hydrogels and testing on chorioallantoic membrane to study the effect on angiogenesis". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(8), 525–534. Retrieved: <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581202>
- Akter, F., and Ibanez, J. (2016). "Bone and Cartilage Tissue Engineering. in: *Tissue Engineering Made Easy*". (ss. 77–97). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00008-4>
- Albrektsson, T., and Johansson, C. (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration". *European Spine Journal*, 10, S96–S101. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
- Altuntaş, E., Özkan, B., and Yener, G. (2017). "Porous scaffolds". In: *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100963-5.00003-3>
- Aluigi, A., Tonetti, C., Rombaldoni, F., Puglia, D., Fortunati, E., Armentano, I., Santulli, C., Torre, L., and Kenny, J. M. (2014). "Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres as potential fillers for PLLA-based biocomposites". *Journal of Materials Science*, 49(18), 6257–6269. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8350-9>
- Aluigi, Annalisa, Corbellini, A., Rombaldoni, F., Zoccola, M., and Canetti, M. (2013). "Morphological and structural investigation of wool-derived keratin nanofibres crosslinked by thermal treatment". *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 30–37. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.013>

- Alvarez, K., and Nakajima, H. (2009). "Metallic Scaffolds for Bone Regeneration". *Materials*, 790–832. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma2030790>
- Angeli, F., Charpentier, T., De Ligny, D., and Cailleteau, C. (2010). "Boron Speciation in Soda-Lime Borosilicate Glasses Containing Zirconium". *Journal of the American Ceramic Society*, 93(9), 2693–2704. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.03771.x>
- Anitha, A., Menon, D., T. B, S., Koyakutty, M., Mohan, C. C., Nair, S. V., and Nair, M. B. (2017). "Bioinspired Composite Matrix Containing Hydroxyapatite–Silica Core–Shell Nanorods for Bone Tissue Engineering". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(32), 26707–26718. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07131>
- Anonim2020a. BOREN - Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü. Erişim adresi: <http://www.boren.gov.tr/tr>
- Anonim2020b. Mineraller – Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yer Bilimleri and Doğa Tarihi Müzesi. Erişim adresi: https://ybm.comu.edu.tr/?page_id=6475
- Anonim2021a. Re: What is a chemical equation for hair relaxers. Erişim adresi: <http://www.madsci.org/posts/archives/2009-12/1261029576.Ch.r.html>
- Ansari, M. (2019). "Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies". *Progress in Biomaterials*, 8(4), 223–237. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Aran, S., Zahri, S., Asadi, A., Khaksar, F., and Abdolmaleki, A. (2020). "Hair follicle stem cells differentiation into bone cells on collagen scaffold". *Cell and Tissue Banking*, 21(2), 181–188. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09812-9>
- Araújo-Gomes, N., Romero-Gavilán, F., Lara-Sáez, I., Elortza, F., Azkargorta, M., Iloro, I., Martínez-Ibañez, M., Martín de Llano, J. J., Gurruchaga, M., Goñi, I., Suay, J., and Sánchez-Pérez, A. M. (2018). "Silica–gelatin hybrid sol–gel coatings: A proteomic study with biocompatibility implications". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(7), 1769–1779. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/term.2708>
- Ardeshiryajimi, A., Farhadian, S., Adegani, F. J., Mirzaei, S., Zomorrod, M. S., Langroudi, L., Doostmohammadi, A., Seyedjafari, E., and Soleimani, M. (2015). "Enhanced osteoconductivity of polyethersulphone nanofibres loaded with bioactive glass nanoparticles in in vitro and in vivo models". *Cell Proliferation*, 48(4), 455–464. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/cpr.12198>

- Arora, M., and Arora, E. (2017). "The Promise of Silicon: bone regeneration and increased bone density". *Journal of Arthroscopy and Joint Surgery*, 4(3), 103–105. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jajs.2017.10.003>
- Arslan, A., Çakmak, S., and Gümüşderelioğlu, M. (2018). "Enhanced osteogenic activity with boron-doped co-terephthalate) fibrous 3D matrix". *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(S2), S790–S799. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1470522>
- Arslan, Y. E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., Emregul, E., and Emregul, K. C. (2017). "Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 160–170. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.03.034>
- Aşkar, T. K., Er, H., Demirdöğen, R. E., Aşkar, T. K., Er, H., and Demirdöğen, R. E. (2018). "The Effects of Boron on Bone Metabolism as a Nutraceutical: A Review". *Eurasian Journal Of Health Sciences*, 1(1), 7–12.
- Atila, D., Karataş, A., Evcin, A., Keskin, D., and Tezcaner, A. (2019). "Bacterial cellulose-reinforced boron-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds for bone tissue engineering". *Cellulose*, 26(18), 9765–9785. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02741-1>
- Aydın, T., Gönen, B., and Eseceli, H. (2018). "Bor 'un İnsan Sağlığı and Beslenme Üzerine Etkisi". *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 119–122. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22312/sdusbed.409170>
- Bag, S. (2019). "Biodegradable composite scaffold for bone tissue regeneration". in: *Biomedical Engineering and its Applications in Healthcare* (ss. 657–679). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3705-5_27
- Balaji, S., Kumar, R., Sripriya, R., Rao, U., Mandal, A., Kakkar, P., Reddy, P. N., and Sehgal, P. K. (2012). "Characterization of keratin-collagen 3D scaffold for biomedical applications". *Polymers for Advanced Technologies*, 23(3), 500–507. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/pat.1905>
- Balasubramanian, P., Büttner, T., Miguez Pacheco, V., and Boccaccini, A. R. (2018). "Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering". *Journal of the European Ceramic Society*, 38(3), 855–869. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>

- Bartl, R., and Bartl, C. (2017). "Structure and Architecture of Bone". in: *Bone Disorders* (ss. 11–20). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29182-6>
- Bazrafshan, Z., and Stylios, G. K. (2019, Mayıs 15). "Spinnability of collagen as a biomimetic material: A review". *International Journal of Biological Macromolecules*, C. 129, ss. 693–705. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.024>
- Bedossa, P., Paradis, V., and Zucman-Rossi, J. (2018). "Cellular and Molecular Techniques". in: *MacSween's Pathology of the Liver* (ss. 88–110). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6697-9.00002-9>
- Belaid, H., Nagarajan, S., Barou, C., Huon, V., Bares, J., Balme, S., Miele, P., Cornu, D., Cavailles, V., Teyssier, C., and Bechelany, M. (2020). "Boron Nitride Based Nanobiocomposites: Design by 3D Printing for Bone Tissue Engineering". *ACS Applied Bio Materials*, 3(4), 1865–1874. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00965>
- Bhardwaj, N., and Kundu, S. C. (2011). "Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications". *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 325–333. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.027>
- Bhattarai, D. P., Aguilar, L. E., Park, C. H., and Kim, C. S. (2018). "A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering". *Membranes*, 8(3). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/membranes8030062>
- Białek, M., Czauderna, M., Krajewska, K. A., and Przybylski, W. (2019). "Selected physiological effects of boron compounds for animals and humans . A review". *Journal of Animal and Feed Sciences*, 28, 307–320.
- Black, C. R. M., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S., and Oreffo, R. O. C. (2015). "Bone Tissue Engineering". *Current molecular biology reports*, 1(3), 132–140. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0022-2>
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., and Blevins, D. (2004). "Why boron ?" *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 907–912. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.11.002>
- Calabrese, G., Giuffrida, R., Fabbi, C., Figallo, E., Furno, D. Lo, Gulino, R., Colarossi, C., Fullone, F., Giuffrida, R., Parenti, R., Memeo, L., and Forte, S. (2016). "Collagen-Hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic

- differentiation *in Vitro*". *PLoS ONE*, *11*(3). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181>
- Capati, M. L. F., Nakazono, A., Igawa, K., Ookubo, K., Yamamoto, Y., Yanagiguchi, K., Kubo, S., Yamada, S., and Hayashi, Y. (2016). "Boron Accelerates Cultured Osteoblastic Cell Activity through Calcium Flux". *Biological Trace Element Research*, *174*(2), 300–308. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0719-y>
- Cardamone, J. M. (2010). "Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR)". *Journal of Molecular Structure*, *969*(1–3), 97–105. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.01.048>
- Cardiff, P. (2012). *Development of the Finite Volume Method for Hip Joint Stress Analysis by Philip Cardiff*. National University of Ireland.
- Carlisle, E. M. (1986). "Silicon as an essential trace element in animal nutrition". *Ciba Foundation symposium*, *121*, 123–139. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/07315724.1989.10738115>
- Chaliewsak, J., and Charuchinda, S. (2013). "Extraction of keratins from human hair at low pressure and their characterization". *Advanced Materials Research*, *747*, 694–697. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.747.694>
- Chen, J., Li, M., Yi, R., Bai, K., Wang, G., Tan, R., Sun, S., and Xu, N. (2019). "Electrodialysis Extraction of Pufferfish Skin (*Takifugu flavidus*): A promising source of collagen". *Marine Drugs*, *17*(1), 1–15. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/md17010025>
- Chen, P., Tao, J., Zhu, S., Cai, Y., Mao, Q., Yu, D., Dai, J., and Ouyang, H. W. (2015). "Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing". *Biomaterials*, *39*, 114–123. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.049>
- Chen, Y., Qian, W., Chen, R., Zhang, H., Li, X., Shi, D., Dong, W., Chen, M., and Zhao, Y. (2017). "One-Pot Preparation of Autonomously Self-Healable Elastomeric Hydrogel from Boric Acid and Random Copolymer Bearing Hydroxyl Groups". *ACS Macro Letters*, *6*(10), 1129–1133. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00611>
- Cheng, D., Liu, D., Tang, T., Zhang, X., Jia, X., Cai, Q., and Yang, X. (2017). "Effects of Ca/P molar ratios on regulating biological functions of hybridized carbon nanofibers

- containing bioactive glass nanoparticles". *Biomedical Materials (Bristol)*, 12(2). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa6521>
- Chocholata, P., Kulda, V., and Babuska, V. (2019). "Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration". *Materials*, 12(4). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Chowdhury, S., Jiang, Y., Muthukaruppan, S., and Balasubramanian, R. (2018). "Effect of boron doping level on the photocatalytic activity of graphene aerogels". *Carbon*, 128, 237–248. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.11.089>
- Christy, P. N., Basha, S. K., Kumari, V. S., Bashir, A. K. H., Maaza, M., Kaviyarasu, K., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., and Ignacimuthu, S. (2020). "Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55(November 2019), 101452. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101452>
- Clarke, B. (2008). "Normal Bone Anatomy and Physiology". *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3, 131–139. Erişim adresi: <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., and Neves, N. M. (2011). "Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan". *Tissue Engineering - Part B*, 17(5). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0704>
- Costa, F., Silva, R., and Boccaccini, A. R. (2018). "Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair". in: *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* (ss. 175–204). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00007-3>
- Cui, X., Xu, S., Su, W., Sun, Z., Yi, Z., Ma, X., Chen, G., Chen, X., Guo, B., and Li, X. (2019). "Freeze–thaw cycles for biocompatible, mechanically robust scaffolds of human hair keratins". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107(5), 1452–1461. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34237>
- Cunniffe, G. M., Dickson, G. R., Partap, S., Stanton, K. T., and O'Brien, F. J. (2010). "Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(8), 2293–2298. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3964-1>
- de Guzman, R. C., Saul, J. M., Ellenburg, M. D., Merrill, M. R., Coan, H. B., Smith, T. L.,

- and Van Dyke, M. E. (2013). "Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds". *Biomaterials*, 34(6), 1644–1656. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.11.002>
- De Santis, R., Guarino, V., and Ambrosio, L. (2019). "Composite biomaterials for bone repair". in: *Bone Repair Biomaterials* (Second Edi). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102451-5.00010-x>
- Demirer, S., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozdemir, H., Ozer, H., and Ay, S. (2012). "Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats". *Archives of Oral Biology*, 57(1), 60–65. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2011.07.012>
- Demirtaş, A. (2010). "Bor'un İnsan Beslenmesi and Sağlığı Açısından Önemi". *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(1), 75–80.
- Derkus, B., Arslan, Y. E., Bayrac, A. T., Kantarcioglu, I., Emregul, K. C., and Emregul, E. (2016). "Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 725–736. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.095>
- Derkus, B., Okesola, B. O., Barrett, D. W., D'Este, M., Chowdhury, T. T., Eglin, D., and Mata, A. (2020). "Multicomponent hydrogels for the formation of vascularized bone-like constructs *in vitro*". *Acta Biomaterialia*, 109, 82–94. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.025>
- Deveci, M. Z. Y., Gönenci, R., Canpolat, İ., and Kanat, Ö. (2020). "*In vivo* biocompatibility and fracture healing of hydroxyapatite-hexagonal boron nitride-chitosan-collagen biocomposite coating in rats". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44, 76–88. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3906/vet-1906-21>
- Dhivya, S., Ajita, J., and Selvamurugan, N. (2015). "Metallic nanomaterials for bone tissue engineering". *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(10), 1675–1700. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2115>
- Djambaski, P., Aleksieva, P., Emanuilova, E., Chernev, G., Spasova, D., Nacheva, L., Kabaivanova, L., Salvado, I. M. M., and Samuneva, B. (2009). "Sol-gel nanomaterials with algal heteropolysaccharide for immobilization of microbial cells, producing a-galactosidase and nitrilase". *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(2), 1270–1274. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817652>

- Doğan, A., Demirci, S., Bayir, Y., Halici, Z., Karakus, E., Aydın, A., Cadirci, E., Albayrak, A., Demirci, E., Karaman, A., Ayan, A. K., Gundogdu, C., and Şahin, F. (2014). "Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, 44, 246–253. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.08.035>
- Donato, R. K., and Mija, A. (2020). "Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review". *Polymers*, 12(1), 1–64. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/polym12010032>
- Donnalaja, F., Jacchetti, E., Soncini, M., and Raimondi, M. T. (2020). "Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization". *Polymers*, 12(4), 905. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/polym12040905>
- Du, L.-S., and Stebbins, J. F. (2003). "Nature of Silicon–Boron Mixing in Sodium Borosilicate Glasses: A High-Resolution ¹¹B and ¹⁷O NMR Study". *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(37), 10063–10076. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/jp0340481>
- Eivazzadeh-Keihan, R., Chenab, K. K., Taheri-Ledari, R., Mosafer, J., Hashemi, S. M., Mokhtarzadeh, A., Maleki, A., and Hamblin, M. R. (2020). "Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering C*, 107, 110267. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110267>
- Erol-Taygun, M., Unalan, I., Idris, M. I. B., Mano, J. F., and Boccaccini, A. R. (2019). "Bioactive Glass-Polymer Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration Applications: A Review". *Advanced Engineering Materials*, 21(8), 1–24. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/adem.201900287>
- Erol, M. M., Mouriño, V., Newby, P., Chatzistavrou, X., Roether, J. A., Hupa, L., and Boccaccini, A. R. (2012). "Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering". *Acta Biomaterialia*, 8(2), 792–801. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.013>
- Ertuş, E. B., Vakıfahmetoğlu, Ç., and Öztürk, A. (2016). "Production of Nanoporous Glass Fiber by Selective Leaching Method". *18th International Metallurgy & Materials Congressd*, 44–46.
- Esparza, Y., Bandara, N., Ullah, A., and Wu, J. (2018). "Hydrogels from feather keratin show higher viscoelastic properties and cell proliferation than those from hair and

- wool keratins". *Materials Science and Engineering: C*, 90, 446–453. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.067>
- Fattore, A. Del, Teti, A., and Rucci, N. (2012). "Bone cells and the mechanisms of bone remodelling Andrea". *Frontiers in Bioscience*, 4, 2302–2321.
- Feng, J., Yan, A. W., and Gou, A. Z. (2007). "Stimulating effect of silica-containing nanospheres on proliferation of osteoblast-like cells". *J Mater Sci: Mater Med*, 18, 2167–2172. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3229-9>
- Feroz, S., Muhammad, N., Ranayake, J., and Dias, G. (2020). "Keratin - Based materials for biomedical applications". *Bioactive Materials*, 5(3), 496–509. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007>
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., and Ciardelli, G. (2012, Eylül 1). "Collagen for bone tissue regeneration". *Acta Biomaterialia*, C. 8, ss. 3191–3200. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
- Ferreira, T. H., Rocca, A., Marino, A., Mattoli, V., de Sousa, E. M. B., and Ciofani, G. (2015). "Evaluation of the effects of boron nitride nanotubes functionalized with gum arabic on the differentiation of rat mesenchymal stem cells". *RSC Advances*, 5(56), 45431–45438. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C5RA05091J>
- Fild, C., Shantz, D. F., Lobo, R. F., and Koller, H. (2000). "Cation-induced transformation of boron-coordination in zeolites". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(13), 3091–3098. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/b002134m>
- Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., and Scherberich, A. (2020). "Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(May). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00474>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., and Zeller, R. (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections". *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 3–5. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Gadhve, R. V., Kasbe, P. S., Mahanwar, P. A., and Gadekar, P. T. (2018). "To study the effect of boric acid modification on starch–polyvinyl alcohol blend wood adhesive". *Journal of the Indian Academy of Wood Science*, 15(2), 190–198. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s13196-018-0225-2>
- Garrett, D. E. (1998). *Borates*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-276060-0.X5000-1>
- George, J., and Sabapathi, S. N. (2015). "Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional

- properties, and applications". *Nanotechnology, Science and Applications*, 8, 45–54.
Erişim adresi: <https://doi.org/10.2147/NSA.S64386>
- Ghanaati, S. M., Thimm, B. W., Unger, R. E., Orth, C., Kohler, T., Barbeck, M., Müller, R., and Kirkpatrick, C. J. (2010). "Collagen-embedded hydroxylapatite-beta-tricalcium phosphate-silicon dioxide bone substitute granules assist rapid vascularization and promote cell growth". *Biomedical Materials*, 5(2), 025004. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/2/025004>
- Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., and Moradi, A. (2018, Mart 1). "Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering". *Archives of Bone and Joint Surgery*, C. 6, ss. 90–99. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22038/abjs.2018.26340.1713>
- Giasuddin, A. B. M., and Britt, D. W. (2019). "Microwave assisted sol-gel synthesis of silica-spider silk composites". *Molecules*, 24(14). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/molecules24142521>
- Gil, V., and Del Río, J. A. (2012). "Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue". *Nature Protocols*, 7(2), 268–280. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.445>
- Gizer, M., Köse, S., Karaosmanoglu, B., Taskiran, E. Z., Berkkan, A., Timuçin, M., Korkusuz, F., and Korkusuz, P. (2020). "The Effect of Boron-Containing Nano-Hydroxyapatite on Bone Cells". *Biological Trace Element Research*, 193(2), 364–376. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01710-w>
- Glenske, K., Donkiewicz, P., Köwitsch, A., Milosevic-Oljaca, N., Rider, P., Rofall, S., Franke, J., Jung, O., Smeets, R., Schnettler, R., Wenisch, S., and Barbeck, M. (2018). "Applications of metals for bone regeneration". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–32. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ijms19030826>
- Glowacki, J., and Mizuno, S. (2008). "Collagen scaffolds for tissue engineering". *Biopolymers*, 89(5), 338–344. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/bip.20871>
- Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H., and Guglielmotti, M. B. (2008). "A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet". *Archives of Oral Biology*, 53(7), 677–682. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.01.011>
- Götz, W., Tobiasch, E., Witzleben, S., and Schulze, M. (2019, Mart 1). "Effects of silicon compounds on biomineralization, osteogenesis, and hard tissue formation".

- Pharmaceutics*, C. 11. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030117>
- Grabska-Zielińska, S., Sionkowska, A., Reczyńska, K., and Pamuła, E. (2020). "Physico-chemical characterization and biological tests of collagen/silk fibroin/chitosan scaffolds cross-linked by dialdehyde starch". *Polymers*, 12(2). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/polym12020372>
- Griffin, M., Nayyer, L., Butler, P. E., Palgrave, R. G., Seifalian, A. M., and Kalaskar, D. M. (2016). "Development of mechano-responsive polymeric scaffolds using functionalized silica nano-fillers for the control of cellular functions". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(6), 1725–1733. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.02.011>
- Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Aydın, S. T., and Hakkı, S. S. (2015). "Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120–128. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2015.03.008>
- Guo, J., Li, C., Ling, S., Huang, W., Chen, Y., and Kaplan, D. L. (2017). "Multiscale design and synthesis of biomimetic gradient protein/biosilica composites for interfacial tissue engineering". *Biomaterials*, 145, 44–55. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.025>
- Haeri, S. M. J., Sadeghi, Y., Salehi, M., Farahani, R. M., and Mohsen, N. (2016). "Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on gum tragacanth hydrogel". *Biologicals*, 44(3), 123–128. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.03.004>
- Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., and Hakki, E. E. (2010). "Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1)". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243–250. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.03.003>
- Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., Baspinar, N., Basoglu, A., and Nielsen, F. H. (2013). "Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(2), 148–153. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.07.001>
- Hartrianti, P., Nguyen, L. T. H., Johanes, J., Chou, S. M., Zhu, P., Tan, N. S., Tang, M. B. Y., and Ng, K. W. (2017). "Fabrication and characterization of a novel crosslinked

- human keratin-alginate sponge". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(9), 2590–2602. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/term.2159>
- Hench, L. L., and Paschall, H. A. (1973). "Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle". *Journal of Biomedical Materials Research*, 7(3), 25–42. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.820070304>
- Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., and Rodríguez-Lorenzob, L. M. (2020). "Synthesis of in-Situ Silica-Alginate Hybrid Hydrogels By a Sol-Gel Route". *Carbohydrate Polymers*, 250(July). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116877>
- Hill, P., Brantley, H., and Van Dyke, M. (2010). "Some properties of keratin biomaterials: Kerateines". *Biomaterials*, 31(4), 585–593. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.076>
- Huang, Y.-Z., Xie, H.-Q., and Li, X. (2020). "Scaffolds in Bone Tissue Engineering: Research Progress and Current Applications". in: *Encyclopedia of Bone Biology*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.11205-x>
- Hunt, C. D. (2012). "Dietary boron: Progress in establishing essential roles in human physiology". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2–3), 157–160. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.03.014>
- Iyer, K. M. (2019). "Anatomy of Bone, Fracture, and Fracture Healing". in: *General Principles of Orthopedics and Trauma* (ss. 1–17). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15089-1>
- Jasmine, S., and Mandal, B. B. (2014). "Types and properties of non-mulberry silk biomaterials for tissue engineering applications". in: *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (ss. 275–298). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1533/9780857097064.2.275>
- Javed, A., Chen, H., and Ghori, F. Y. (2010). "Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation". *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 22(3), 283–293. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2010.05.001>
- Jell, G., and Stevens, M. M. (2006). "Gene activation by bioactive glasses". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 997–1002. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0435-9>
- Ji, Y., Chen, J., Lv, J., Li, Z., Xing, L., and Ding, S. (2014). "Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather". *Separation and Purification Technology*, 132,

- 577–583. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.049>
- Jugdaohsingh, R. (2007). "Silicon and Bone Health". *J Nutr Health Aging*, 11(2), 99–110.
- Jugdaohsingh, Ravin, Pedro, L. D., Watson, A., and Powell, J. J. (2015). "Bone Reports Silicon and boron differ in their localization and loading in bone". *Bone Reports*, 1, 9–15. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2014.10.002>
- Kabu, M., and Akosman, M. S. (2013). "Biological Effects of Boron". in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (ss. 57–75). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6470-9>
- Kaczmarek, B., Sionkowska, A., and Osyczka, A. M. (2018). "Scaffolds based on chitosan and collagen with glycosaminoglycans cross-linked by tannic acid". *Polymer Testing*, 65, 163–168. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.11.026>
- Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Kozłowska, J., and Osyczka, A. M. (2018). New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 247–253. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.173>
- Kakkar, P., and Madhan, B. (2016). "Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications". *Materials Science and Engineering: C*, 66, 178–184. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.067>
- Kakkar, P., Verma, S., Manjubala, I., and Madhan, B. (2014). "Development of keratin – chitosan – gelatin composite scaffold for soft tissue engineering". *Materials Science & Engineering C*, 45, 343–347. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.021>
- Kang, K. S., Hong, J. M., Kang, J. A., Rhie, J. W., Jeong, Y. H., and Cho, D. W. (2013). "Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions". *Experimental and Molecular Medicine*, 45(1). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.11>
- Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., and Kamble, R. R. (2014). "Polymer Synthesis and Processing". in: *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (ss. 1–31). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00001-6>
- Kattimani, V. S., Kondaka, S., and Lingamaneni, K. P. (2016). "Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration". *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7, BTRI.S36138. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4137/btri.s36138>

- Kazimierczak, P., and Przekora, A. (2020). "Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review". *Coatings*, 10(10), 1–25. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/coatings10100971>
- Khaliq, H., Juming, Z., and Ke-Mei, P. (2018, Kasım 1). "The Physiological Role of Boron on Health". *Biological Trace Element Research*, C. 186, ss. 31–51. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1284-3>
- Khurshid, Z., Husain, S., Alotaibi, H., Rehman, R., Zafar, M. S., Farooq, I., and Khan, A. S. (2018). "Novel techniques of scaffold fabrication for bioactive glasses". in: *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102196-5.00018-5>
- Koller, H., Fild, C., and Lobo, R. F. (2005). "Variable anchoring of boron in zeolite beta". *Microporous and Mesoporous Materials*, 79(1–3), 215–224. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2004.10.035>
- Koons, G. L., Diba, M., and Mikos, A. G. (2020, Ağustos 1). "Materials design for bone-tissue engineering". *Nature Reviews Materials*, C. 5, ss. 584–603. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
- Kumar, S., Malik, M. M., and Purohit, R. (2017). "Synthesis Methods of Mesoporous Silica Materials". *Materials Today: Proceedings*, 4(2), 350–357. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.032>
- Kumawat, T. K., Sharma, A., Sharma, V., and Chandra, S. (2018). "Keratin Waste: The Biodegradable Polymers". in: *Keratin*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79502>
- Kurien, T., Pearson, R. G., and Scammell, B. E. (2013). "Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: The evidence for their use". *Bone and Joint Journal*, ss. 583–597. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.95B5.30286>
- Kuru, R., and Yarat, A. (2017). "Bor and Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış". *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7, 107–114. Erişim adresi: <https://doi.org/10.5152/clinexphealthsci.2017>
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 227(5259), 680–685. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lai, Y., Cao, H., Wang, X., Chen, S., Zhang, M., Wang, N., Yao, Z., Dai, Y., Xie, X., Zhang, P., and Yao, X. (2018). "Biomaterials Porous composite scaffold incorporating

- osteogenic phytomolecule icariin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits". *Biomaterials*, 153, 1–13. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.025>
- Le, B., Nurcombe, V., Cool, S., van Blitterswijk, C., de Boer, J., and LaPointe, V. (2018). "The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration". *Materials*, 11(1), 14. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma11010014>
- Lee, H., Noh, K., Lee, S. C., Kwon, I., Han, D., Lee, I., and Hwang, Y. (2014). "Human Hair Keratin and Its-Based Biomaterials for Biomedical Applications". *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(4), 255–265. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s13770-014-0029-4>
- Lei, B., Guo, B., Rambhia, K. J., and Ma, P. X. (2019). "Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration". *Frontiers of Medicine*, 13(2), 189–201. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0664-6>
- León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O., and Piña-Barba, M. C. (2016). "Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering". *Journal of Applied Research and Technology*, 14(1), 77–85. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>
- Lewandowska-Łańcucka, J., Fiejdasz, S., Rodzik, Ł., Kozieł, M., and Nowakowska, M. (2015). "Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: A potential injectable scaffold for bone tissue engineering". *Biomedical Materials*, 10(1). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015020>
- Li, K., Sun, H., Sui, H., Zhang, Y., Liang, H., Wu, X., and Zhao, Q. (2015). "Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering". *RSC Advances*, 5(23), 17541–17549. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c4ra15232h>
- Li, S., Chen, F., Zhang, B., Luo, Z., Li, H., and Zhao, T. (2016). "Structure and improved thermal stability of phenolic resin containing silicon and boron elements". *Polymer Degradation and Stability*, 133, 321–329. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.07.020>
- Li, X., Wang, X., Jiang, X., Yamaguchi, M., Ito, A., Bando, Y., and Golberg, D. (2015). "Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 104(2), 323–329. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33391>
- Li, X., Wang, X., Jiang, X., Yamaguchi, M., Ito, A., Bando, Y., and Golberg, D. (2016).

- "Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 104(2), 323–329. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33391>
- Li, Z., Gu, X., Lou, S., and Zheng, Y. (2008). "The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone". *Biomaterials*, 29(10), 1329–1344. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.021>
- Lin, Q., Hao, S., Hu, W., Wang, M., Zang, Z., Zhu, L., Du, J., and Tang, X. (2019). "Human hair keratin for physically transient resistive switching memory devices". *Journal of Materials Chemistry C*, 7(11), 3315–3321. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C8TC05334K>
- Lindahl, A., Brittberg, M., Gibbs, D., Dawson, J. I., Kanczler, J., Black, C., Tare, R., and Oreffo, R. O. C. (2015). "Cartilage and Bone Regeneration". in: *Tissue Engineering: Second Edition* (ss. 529–582). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00016-X>
- Liu, X., Zheng, C., Luo, X., Wang, X., and Jiang, H. (2019). "Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications". *Materials Science and Engineering C*, 99, 1509–1522. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.070>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Randall, R. J., and Lewis, A. (1951). "Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent". *The Journal of The Biological Chemistry*, 265–275.
- Luz, G. M., and Mano, J. F. (2012). "A nanotectonics approach to produce hierarchically organized bioactive glass nanoparticles-based macrospheres". *Nanoscale*, 4(20), 6293–6297. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c2nr31895d>
- Ly, X. G., Li, Z., Chen, S. Y., Xie, M. K., Huang, J. W., Peng, X. F., Yang, R. X., Wang, H. P., Xu, Y. M., and Feng, C. (2016). "Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering". *Biomaterials*, 84, 99–110. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.032>
- Lynnerup, N., and Klaus, H. D. (2019). "Fundamentals of human bone and dental biology". in: *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains* (ss. 35–58). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809738-0.00004-1>
- Mahdavi, F. S., Salehi, A., Seyedjafari, E., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., and

- Ardeshirylajimi, A. (2017). "Bioactive glass ceramic nanoparticles-coated poly(L-lactic acid) scaffold improved osteogenic differentiation of adipose stem cells in equine". *Tissue and Cell*, 49(5), 565–572. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.07.003>
- Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., and Bissoyi, A. (2016). "Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering". *International Journal of Biomaterials*, 2016. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>
- Martínez-Vázquez, F. J., Cabañas, M. V., Paris, J. L., Lozano, D., and Vallet-Regí, M. (2015). "Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration". *Acta Biomaterialia*, 15, 200–209. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.021>
- Matsuno, T., Hashimoto, Y., Adachi, S., Omata, K., Yoshitaka, Y., Ozeki, Y., Umezu, Y., Tabata, Y., Nakamura, M., and Satoh, T. (2008). "Preparation of injectable 3D-formed .BETA.-tricalcium phosphate bead/alginate composite for bone tissue engineering". *Dental Materials Journal*, 27(6), 827–834. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4012/dmj.27.827>
- Matyašovský, J., Sedliačik, J., Valachová, K., Novák, I., Jurkovič, P., Duchovič, P., Mičušík, M., Kleinová, A., and Šoké, L. (2017). "Antioxidant effects of keratin hydrolysates". *Journal of the American Leather Chemists Association*, 112(10), 327–337.
- Miyazaki, T., Takeda, Y., Akane, S., Itou, T., Hoshiko, A., and En, K. (2010). "Role of boric acid for a poly (vinyl alcohol) film as a cross-linking agent: Melting behaviors of the films with boric acid". *Polymer*, 51(23), 5539–5549. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.09.048>
- Mizuno, M., Shindo, M., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Amemiya, A., and Kuboki, Y. (1997). "Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels *in vivo*". *Bone*, 20(2), 101–107. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00349-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00349-3)
- Mohseni, M., Jahandideh, A., Abedi, G., Akbarzadeh, A., and Hesaraki, S. (2018). "Assessment of tricalcium phosphate/collagen (TCP/collagene)nanocomposite scaffold compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits". *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(2), 242–249.

Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1324463>

- Mori, H., and Hara, M. (2018). "Transparent biocompatible wool keratin film prepared by mechanical compression of porous keratin hydrogel". *Materials Science and Engineering C*, 91, 19–25. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.021>
- Moses, J. C., Dey, M., Devi, K. B., Roy, M., Nandi, S. K., and Mandal, B. B. (2019). "Synergistic Effects of Silicon/Zinc Doped Brushite and Silk Scaffolding in Augmenting the Osteogenic and Angiogenic Potential of Composite Biomimetic Bone Grafts". *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1462–1475. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01350>
- Mülazım, Y., Kahraman, M. V., Apohan, N. K., Kızıldağ, S., and Güngör, A. (2011). "Preparation and characterization of UV-curable, boron-containing, transparent hybrid coatings". *Journal of Applied Polymer Science*, 120(4), 2112–2121. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/app.33358>
- Nagarajan, S., Belaid, H., Pochat-Bohatier, C., Teyssier, C., Iatsunskyi, I., Coy, E., Balme, S., Cornu, D., Miele, P., Kalkura, N. S., Cavallès, V., and Bechelany, M. (2017). "Design of Boron Nitride/Gelatin Electrospun Nanofibers for Bone Tissue Engineering". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(39), 33695–33706. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13199>
- Najafabadi, B.-A.-H. M., and Abnosi, M. H. (2016). "Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells". *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(1), 62–73. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3988>
- Neffe, A. T., Julich-Gruner, K. K., and Lendlein, A. (2014). "Combinations of biopolymers and synthetic polymers for bone regeneration". in: *Biomaterials for Bone Regeneration: Novel Techniques and Applications*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1533/9780857098104.1.87>
- Nielsen, F. H., and Stoecker, B. J. (2009). "Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(3), 195–203. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2009.03.003>
- Öner, M., Kızıllı, G., Keskin, G., Pochat-Bohatier, C., and Bechelany, M. (2018). "The effect of boron nitride on the thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)". *Nanomaterials*, 8(11), 1–20. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13199>

<https://doi.org/10.3390/nano8110940>

- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., and Maffulli, N. (2014). "Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. Journal of orthopaedic surgery and research". *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1), 1–27. Erişim adresi: <https://josr-online.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1749-799X-9-18>
- Patrucco, A., Visai, L., Fassina, L., Magenes, G., and Tonin, C. (2019). "Keratin-based matrices from wool fibers and human hair". in: *Materials for Biomedical Engineering* (ss. 375–403). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00013-3>
- Pattnaik, S., Nethala, S., Tripathi, A., Saravanan, S., Moorthi, A., and Selvamurugan, N. (2011). "Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1167–1172. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.016>
- Pereira, H. F., Cengiz, I. F., Samuel, F., Rui, S., Reis, L., and Oliveira, J. M. (2020). "Scaffolds and coatings for bone regeneration". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(27), 2–16. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y>
- Perumal, S., Ramadass, S. kumar, Gopinath, A., Madhan, B., Shanmugam, G., Rajadas, J., and Mandal, A. B. (2015). "Altering the concentration of silica tunes the functional properties of collagen-silica composite scaffolds to suit various clinical requirements". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 52, 131–138. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.04.006>
- Pizzorno, L. (2015). "Nothing boring about boron". *Integrative Medicine (Boulder)*, C. 14, ss. 35–48. Erişim adresi: [/pmc/articles/PMC4712861/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2712861/)
- Price, C. T., Langford, J. R., and Liporace, F. A. (2012). "Essential Nutrients for Bone Health and a Review of their Availability in the Average North American Diet". *The Open Orthopaedics Journal*, 6, 143–149.
- Qasim, M., Chae, D. S., and Lee, N. (2019). "Advancements and frontiers in nano-based 3d and 4d scaffolds for bone and cartilage tissue engineering". *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4333–4351. Erişim adresi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S209431>
- Qasim, S. B., Husain, S., Huang, Y., Pogorielov, M., Deineka, V., Lyndin, M., Rawlinson, A., and Rehman, I. U. (2017). "*In-vitro* and *in-vivo* degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications". *Polymer Degradation and Stability*, 136, 31–38. Erişim adresi:

- <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018>
- Qu, H., Fu, H., Han, Z., and Sun, Y. (2019). "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review". *RSC Advances*, 9(45), 26252–26262. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>
- Radhakrishnan, S., Nagarajan, S., Bechelany, M., and Kalkura, S. N. (2020). "Collagen based biomaterials for tissue engineering applications: A review". in: *Processes and Phenomena on the Boundary Between Biogenic and Abiogenic Nature* (ss. 3–22). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-21614-6_1
- Rajan, N., Habermehl, J., Coté, M. F., Doillon, C. J., and Mantovani, D. (2007). "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications". *Nature Protocols*, 1(6), 2753–2758. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.430>
- Ranganathan, S., Balagangadharan, K., and Selvamurugan, N. (2019, Temmuz 15). "Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules*, C. 133, ss. 354–364. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.115>
- Ranoux, A., Djanashvili, K., Arends, I. W. C. E., and Hanefeld, U. (2013). "B-TUD-1: a versatile mesoporous catalyst". *RSC Advances*, 3(44), 21524. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c3ra44406f>
- Rastian, Z., Pütz, S., Wang, Y. J., Kumar, S., Fleissner, F., Weidner, T., and Parekh, S. H. (2018). "Type I Collagen from Jellyfish *Catostylus mosaicus* for Biomaterial Applications". *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(6), 2115–2125. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00979>
- Reffitt, D. M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H., Powell, J. J., and Hampson, G. N. (2003). "Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*". *Bone*, 32(2), 127–135. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00950-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00950-X)
- Ribas, R. G., Schatkoski, V. M., Larissa, T., Rossi, B., Menezes, C. De, Stegemann, C., Marcel, D., and Leite, G. (2019). "Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review". *Ceramics International*, 45(17), 21051–21061. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>
- Rico, P., Rodrigo-Navarro, A., Sánchez Pérez, L., and Salmeron-Sanchez, M. (2020).

- "Boron induces osteogenesis by stimulating NaBC1 in cooperation with BMPR1A". *bioRxiv*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.995001>
- Rogalla, H., and Römheld, V. (2002). "Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L". *Plant, Cell and Environment*, 25, 549–555.
- Rondanelli, M., Faliva, M. A., Peroni, G., Infantino, V., Gasparri, C., Iannello, G., Perna, S., Riva, A., Petrangolini, G., and Tartara, A. (2020). "Pivotal role of boron supplementation on bone health: A narrative review". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126577. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126577>
- Röbber, S., Unbehau, R., Gemming, T., Kruppke, B., Wiesmann, H. P., and Hanke, T. (2020). "Calcite incorporated in silica/collagen xerogels mediates calcium release and enhances osteoblast proliferation and differentiation". *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56023-8>
- Rouse, J. G., and Van Dyke, M. E. (2010). "A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications". *Materials*, 3(2), 999–1014. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma3020999>
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., and Saha, P. (2009). "Importance of viscoelastic property measurement of a new hydrogel for health care". *AIP Conference Proceedings*, 1152, 210–216. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1063/1.3203272>
- Ruijtenberg, S., and van den Heuvel, S. (2016). "Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression". *Cell Cycle*, 15(2), 196–212. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>
- Sabir, M. I., Xu, X., and Li, L. (2009). "A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications". *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>
- Sağlam, M., Köseoğlu, S., and Enhoş, Ş. (2013). "Periodontolojide Bor". *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(1), 70–75.
- Saha, S., Arshad, M., Zubair, M., and Ullah, A. (2019). "Keratin as a Biopolymer". in: *Keratin as a Protein Biopolymer* (ss. 163–185). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2_6
- Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B., and Longaker, M. T. (2020, Kasım 1). "Mechanisms of

- bone development and repair". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 21, ss. 696–711. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>
- Saravanan, S., Vimalraj, S., Lakshmanan, G., Jindal, A., Sundaramurthi, D., and Bhattacharya, J. (2019). "Chitosan-Based Biocomposite Scaffolds and Hydrogels for Bone Tissue Regeneration". in: *Marine-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications* (ss. 413–442). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-8855-2_18
- Saris, N. E. L., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A., and Lewenstam, A. (2000, Nisan 1). "Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects". *Clinica Chimica Acta*, C. 294, ss. 1–26. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00258-2)
- Seaborn, C. D., and Nielsen, F. H. (2002). "Dietary silicon and arginine affect mineral element composition of rat femur and vertebra". *Biological Trace Element Research*, 89(3), 239–250. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1385/BTER:89:3:239>
- Sembiring, S. (2011). "Synthesis and Characterisation Of Rice Husk Silica Based Borosilicate (B₂SiO₅) Ceramic By Sol-Gel Routes". *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(1), 85–89. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22146/ijc.21425>
- Sezgin Arslan, T. (2017). "Keratin Temelli İskele Üretimi and Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Etkinliğinin Değerlendirilmesi". Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi.
- Shadjou, N., and Hasanzadeh, M. (2015, Haziran 4). "Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress". *Materials Science and Engineering C*, C. 55, ss. 401–409. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.027>
- Shahbazarab, Z., Teimouri, A., Chermahini, A. N., and Azadi, M. (2018). "Fabrication and characterization of nanobiocomposite scaffold of zein/chitosan/nanohydroxyapatite prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1017–1027. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.017>
- Shalehin, N., Hosoya, A., Takebe, H., Hasan, M. R., and Irie, K. (2020). "Boric acid inhibits alveolar bone loss in rat experimental periodontitis through diminished bone resorption and enhanced osteoblast formation". *Journal of Dental Sciences*, 15(4), 437–444. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jds.2019.09.009>

- Sharma, S., Gupta, A., and Kumar, A. (2019). "Keratin : An Introduction". in *Keratin as a Protein Biopolymer*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2>
- Sharma, S., Gupta, A., Kumar, A., Kee, C. G., Kamyab, H., and Saufi, S. M. (2018). "An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film". *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(10), 2157–2167. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2>
- Shavandi, A., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., and Bekhit, A. (2017). "Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 32(2), 163–177. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/0883911516662069>
- Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., and Bekhit, A. E.-D. A. (2017). "Keratin: dissolution, extraction and biomedical application". *Biomaterials Science*, 5(9), 1699–1735. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C7BM00411G>
- Shen, G., Hu, X., Guan, G., and Wang, L. (2015). "Surface modification and characterisation of silk fibroin fabric produced by the layer-by-layer self-assembly of multilayer alginate/regenerated silk fibroin". *PLoS ONE*, 10(4). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124811>
- Shi, Y., Héлары, C., and Coradin, T. (2019). "Exploring the cell–protein–mineral interfaces: Interplay of silica (nano)rods@collagen biocomposites with human dermal fibroblasts". *Materials Today Bio*, 1, 1–10. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100004>
- Shi, Z., Gao, X., Ullah, M. W., Li, S., Wang, Q., and Yang, G. (2016, Aralık 1). "Electroconductive natural polymer-based hydrogels". *Biomaterials*, C. 111, ss. 40–54. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.020>
- Silva, R., Singh, R., Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Juhasz, J. A., Roether, J. A., Cicha, I., Kaschta, J., Schubert, D. W., Chrissafis, K., Detsch, R., and Boccaccini, A. R. (2014). "Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering". *J. Mater. Chem. B*, 2(33), 5441–5451. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C4TB00776J>
- Singh, R., Lin, Y. T., Chuang, W. L., and Ko, F. H. (2017). "A new biodegradable gate dielectric material based on keratin protein for organic thin film transistors". *Organic Electronics*, 44, 198–209. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2017.02.024>
- Sionkowska, A., and Kaczmarek, B. (2016). "Modification of 3D materials based on

- chitosan and collagen blends by sodium alginate". *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 640(1), 39–45. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/15421406.2016.1255504>
- Sionkowska, Alina, and Kaczmarek, B. (2017). "Preparation and characterization of composites based on the blends of collagen, chitosan and hyaluronic acid with nano-hydroxyapatite". *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 658–666. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.196>
- Siqueira, R. L., Yoshida, I. V. P., Pardini, L. C., and Schiavon, M. A. (2007). "Poly(borosiloxanes) as precursors for carbon fiber ceramic matrix composites". *Materials Research*, 10(2), 147–151. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000200009>
- Spivack, A. J., Palmer, M. R., and Edmond, J. M. (1987). "The sedimentary cycle of the boron isotopes". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(7), 1939–1949. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90183-9)
- Strnad, P., Usachov, V., Debes, C., Gräter, F., Parry, D. A. D., and Omary, M. B. (2011). "Unique amino acid signatures that are evolutionarily conserved distinguish simple-type, epidermal and hair keratins". *Journal of Cell Science*, 124(24), 4221–4232. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1242/jcs.089516>
- Suvaneeth, P., and Nair, N. D. (2018). "Biomaterials and Biocompatibility". *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(10), 160–170. Erişim adresi: <https://doi.org/10.20959/wjpr201810-12253>
- Tachibana, A., Kaneko, S., Tanabe, T., and Yamauchi, K. (2005). "Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation". *Biomaterials*, 26(3), 297–302. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.032>
- Tamburaci, S., Cecen, B., Ustun, O., Ergur, B. U., Havitcioglu, H., and Tihminlioglu, F. (2019). "Production and Characterization of a Novel Bilayer Nanocomposite Scaffold Composed of Chitosan/Si-nHap and Zein/POSS Structures for Osteochondral Tissue Regeneration". *ACS Applied Bio Materials*, 2(4), 1440–1455. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00700>
- Tan, B. Y., Nguyen, L. T. H., Kim, H. S., Kim, J. H., and Ng, K. W. (2017). "Cultivation of human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes on keratin-coated silica bead substrates". *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(10), 2789–2798.

Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36142>

- Tasaki, K. (2020). "A novel thermal hydrolysis process for extraction of keratin from hog hair for commercial applications". *Waste Management*, 104, 33–41. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.12.042>
- Taşlı, P. N., Doğan, A., Demirci, S., and Şahin, F. (2013). "Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) *in vitro*". *Biological Trace Element Research*, 153(1–3), 419–427. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9657-0>
- Tavakolizadeh, A., Ahmadian, M., Fathi, M. H., Doostmohammadi, A., Seyedjafari, E., and Ardehshirylajimi, A. (2017). "Investigation of Osteoinductive Effects of Different Compositions of Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering". *ASAIO Journal*, 63(4), 512–517. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000509>
- Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, E., Wiltfang, J., and Schlegel, K. A. (2005). Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)—an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, 26(15), 2575–2584. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.041>
- Toker, H., Ozdemir, H., Balci Yuce, H., and Goze, F. (2016). "The effect of boron on alveolar bone loss in osteoporotic rats". *Journal of Dental Sciences*, 11(3), 331–337. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.011>
- Tonin, C., Aluigi, A., Vineis, C., Varesano, A., Montarsolo, A., and Ferrero, F. (2007). "Thermal And Structural Characterization Of Poly (Ethylene-Oxide)/ Keratin Blend Films". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 89(2), 601–608.
- Tronci, G., Russell, S. J., and Wood, D. J. (2013). "Photo-active collagen systems with controlled triple helix architecture". *Journal of Materials Chemistry B*, 1(30), 3705–3715. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c3tb20720j>
- Tunçay, E., Demirtaş, T. T., and Gümüşderelioğlu, M. (2017). "Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 72–81. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.12.005>
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., and Shu, W. (2018, Eylül 1). "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering". *Bioactive*

- Materials*, C. 3, ss. 278–314. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
- Tzelepi, V., Tsamandas, A. C., Zolota, V., and Scopa, C. D. (2009). "Bone Anatomy, Physiology and Function". in: *Bone Metastases* (ss. 3–29). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9819-2>
- Ulu, A., Balcioglu, S., Birhanli, E., Sarimeseli, A., Keskin, R., Koytepe, S., and Ates, B. (2018). "Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/boric acid composite hydrogel as soft contact lens material: Thermal, optical, rheological, and enhanced antibacterial properties". *Journal of Applied Polymer Science*, 135(35), 1–11. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/app.46575>
- Ulusik, I., Karakaya, H. C., and Koc, A. (2018). "The importance of boron in biological systems". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45(May 2016), 156–162. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.10.008>
- Van Gulick, L., Saby, C., Morjani, H., and Beljebbar, A. (2019). "Age-related changes in molecular organization of type I collagen in tendon as probed by polarized SHG and Raman microspectroscopy". *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43636-2>
- Vasconcelos, A., and Cavaco-paulo, A. (2013). "The Use of Keratin in Biomedical Applications". *Current Drug Targets*, 14, 612–619.
- Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A., and Garzón-Alvarado, D. A. (2015). "Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering". *BioMed Research International*, 2015. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1155/2015/729076>
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H., and Kim, S. K. (2015, Ocak 1). "Alginate composites for bone tissue engineering: A review." *International Journal of Biological Macromolecules*, C. 72, ss. 269–281. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>
- Vineis, C., Varesano, A., Varchi, G., and Aluigi, A. (2019). "Extraction and Characterization of Keratin from Different Biomasses". in: *Keratin as a Protein Biopolymer* (ss. 35–76). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2_3
- Wang, K., Li, R., Ma, J. H., Jian, Y. K., and Che, J. N. (2016). "Extracting keratin from wool by using L-cysteine". *Green Chemistry*, 476–481. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c5gc01254f>

- Wang, P., Zhao, L., Liu, J., Weir, M. D., Zhou, X., and Xu, H. H. K. (2014). "Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells". *Bone Research*, 2. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.17>
- Wang, Q. Q., Zhang, L., Wang, Q. Q., Liu, J., Zhu, P., and Jiang, Z. N. (2018). "Sodium sulphide extraction of human keratin". *Ferroelectrics*, 529(1), 105–112. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/00150193.2018.1458507>
- Wang, S., Taraballi, F., Tan, L. P., and Ng, K. W. (2012). "Human keratin hydrogels support fibroblast attachment and proliferation *in vitro*". *Cell and Tissue Research*, 347(3), 795–802. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1295-2>
- Wang, W., and Yeung, K. W. K. (2017). "Bioactive Materials Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair : A review". *Bioactive Materials*, 2(4), 224–247. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., Qian, M., Brandt, M., and Xie, Y. M. (2016, Mart 1). "Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review". *Biomaterials*, C, 83, ss. 127–141. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>
- Wang, Y., Zhang, H., Liu, M., Zhu, Y., Cui, Z., Lin, Y., Zhu, X., and Jiang, Z. (2014). "Preparation and properties of novel boric acid modified poly(aryl ether sulfone) membranes". *Journal of Applied Polymer Science*, 131(19), 1–7. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/app.40860>
- Wichuda, J., Sunthorn, C., and Busarakum, P. (2016). "Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid". *African Journal of Biotechnology*, 15(16), 642–648. Erişim adresi: <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15210>
- Wrześniewska-Tosik, K., and Adamiec, J. (2007). "Biocomposites with a Content of Keratin from Chicken Feathers". *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 15, 106–112.
- Xu, S., Sang, L., Zhang, Y., Wang, X., and Li, X. (2013). "Biological evaluation of human hair keratin scaffolds for skin wound repair and regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, 33, 648–655. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.10.011>
- Xue, Y., and Hu, X. (2020). "Electrospun silk-boron nitride nanofibers with tunable structure and properties". *Polymers*, 12(5), 1–10. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/POLYM12051093>

- Yakıncı, Z. D., and Kök, M. (2016). "Borun Sağlık Alanında Kullanımı". *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 4(1), 36–44.
- Yamauchi, C., Okazaki, W., Yoshida, T., and Karasawa, A. (2008). "Enzymatic degradation of keratin films and keratin fibers prepared from human hair". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 994–997. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.994>
- Yang, X., Li, Y., Liu, X., Huang, Q., He, W., Zhang, R., Feng, Q., and Benayahu, D. (2017). "The stimulatory effect of silica nanoparticles on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells". *Biomedical Materials*, 12(1). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/12/1/015001>
- Yiğitbaşoğlu, H. (2004). "Türkiye İçin Önemli Bir Maden Bor". *Co*, 2(2), 13–25. Erişim adresi: https://doi.org/10.1501/Cogbil_00000000046
- Yılmaz, H. D., Cengiz, U., Arslan, Y. E., Kiran, F., and Ceylan, A. (2021). "From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted sol e gel reaction". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131(4), 420–433. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.008>
- Yin, C., Jia, X., Zhao, Q., Zhao, Z., Wang, J., Zhang, Y., Li, Z., Sun, H., and Li, Z. (2020). "Transcription factor 7-like 2 promotes osteogenic differentiation and boron-induced bone repair via lipocalin 2". *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110671. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110671>
- Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., Rompis, F. A., Peng, L., and zhu Lu, C. (2011). "Effect of Boron on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells". *Biological Trace Element Research*, 144(1–3), 306–315. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9094-x>
- Zaokari, Y., Persaud, A., and Ibrahim, A. (2020). "Biomaterials for Adhesion in Orthopedic Applications: A Review". *Engineered Regeneration*, 1(July), 51–63. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.07.002>
- Zhang, C., Yan, B., Cui, Z., Cui, S., Zhang, T., Wang, X., Liu, D., Yang, R., Jiang, N., Zhou, Y., and Liu, Y. (2017). "Bone regeneration in minipigs by intrafibrillarly-mineralized collagen loaded with autologous periodontal ligament stem cells". *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017->

- Zhang, K., Fan, Y., Dunne, N., and Li, X. (2018). "Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering". *Regenerative Biomaterials*, 5(2), 115–124. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/rb/rby001>
- Zhang, W., Zheng, J., Tian, X., Tang, Y., Ding, G., Yang, Z., and Jin, H. (2019). "Pepsin-Soluble Collagen from the Skin of *Lophius litulo*: A Preliminary Study Evaluating Physicochemical, Antioxidant, and Wound Healing Properties". *Marine Drugs*, 17(12), 708. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/md17120708>
- Zhang, Y., Reddy, V. J., Wong, S. Y., Li, X., Su, B., Ramakrishna, S., and Lim, C. T. (2010). "Enhanced biomineralization in osteoblasts on a novel electrospun biocomposite nanofibrous substrate of hydroxyapatite/collagen/chitosan". *Tissue Engineering - Part A*, 16(6), 1949–1960. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0221>
- Zhao, C., Shen, A., Zhang, L., Lin, K., and Wang, X. (2020). "Borocarbonitrides nanosheets engineered 3D-printed scaffolds for integrated strategy of osteosarcoma therapy and bone regeneration". *Chemical Engineering Journal*, 401, 125989. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125989>
- Zhao, X., Lui, Y. S., Choo, C. K. C., Sow, W. T., Huang, C. L., Ng, K. W., Tan, L. P., and Loo, J. S. C. (2015). "Calcium phosphate coated Keratin–PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, 49, 746–753. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.01.084>
- Zhou, Y. L., Huan, Z. G., and Chang, J. (2015). "Silicate-Based Bioactive Composites for Tissue Regeneration". in: *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09230-0>
- Zofková, I., Nemcikova, P., and Matucha, P. (2013, Ağustos 1). "Trace elements and bone health". *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, C. 51, ss. 1555–1561. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0868>
- Zou, S., Ireland, D., Brooks, R. A., Rushton, N., and Best, S. (2009). "The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90 B(1), 123–130. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31262>

EKLER

EK 1

T.C. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İzin Belgesi



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-050.01.04-E.1900106880
Konu : Başvuru İncelemesi(Dr. Öğr.
Üyesi Yavuz Emre ARSLAN)

30/07/2019

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Rejeneratif Tıp Uygulamaları için Osteokondüktif Biyopolimer/Bor ve Biyopolimer/Silisyum Minerali Temelli Biyokompozit İskelelerin Üretimi ve Karakterizasyonu" başlıklı 2011-KAEK-27/2019-E.1900083766 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 24.07.2019 tarih ve 14-06 nolu karar aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 24.07.2019

Karar No :2019-14

Karar06)2011-KAEK-27/2019-E.1900083766 no'lu araştırma Etik Kurul üyeleri tarafından değerlendirilmiştir. Proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'ın sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." Kararı verilmiştir.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı