



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KEMİK KANSERİNE YÖNELİK CİSPLATİN VE KIZILCIK BİTKİSİYLE GÜÇLENDİRİLMİŞ GELMA/HAP İÇERİKLİ DOKU İSKELESİ

AYŞEGÜL TIRYAKI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme

Mühendisliği

Ana Bilim Dalı

Metalurji ve Malzeme

Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceren ÇALIKOĞLU KOYUNCU

İSTANBUL, 2025



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KEMİK KANSERİNE YÖNELİK CİSPLATİN VE
KIZILCIK BİTKİSİYLE GÜÇLENDİRİLMİŞ
GELMA/HAP İÇERİKLİ DOKU İSKELESİ**

AYŞEGÜL TIRYAKI

(533322023)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme

Mühendisliği

Ana Bilim Dalı

Metalurji ve Malzeme

Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceren ÇALIKOĞLU KOYUNCU

İSTANBUL, 2025

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, hayatımın belki de en önemli akademik basamaklarından birini temsil ederken, bu yolculukta bana destek olan, cesaret veren ve yanımda olan kişilere minnettarlığımı bildirmek isterim.

Öncelikle, bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan Melih Musa Ayran'a en derin teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Onun bilgisi, deneyimi ve desteği olmadan bu çalışmayı tamamlamak çok daha zor olurdu. Bu süreçte de beni motive ederek yanımda olduğu için ona sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte, arkadaşlık ve dayanışmanın anlamını bana bir kez daha hatırlatan can dostum yakın arkadaşlarıma bana tez hakkında fikir sunan en yakın ahababıma da özellikle teşekkür etmek isterim.

Her şeyin ötesinde, bugüne kadar verdiğim tüm kararların arkasında duran ve beni her anlamda destekleyen canım aileme şükranlarımı sunuyorum. Özellikle bu tez sürecinde bana verdikleri maddi ve manevi destek için teşekkür ederim.

Son olarak, bu tez çalışmasının hazırlanmasında emeği geçen akademik danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceren Çalikoğlu Koyuncu, NBUAM bursiyerlerine ve eğitimcilerine, bana yardımcı olan herkese teşekkür ederim. Her birinizin katkısı, bu süreci tamamlamamda büyük bir önem taşımaktadır.

FYL-2024-11229 proje numarası ile tez çalışmama maddi desteği sağlayan Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu tez, kanser hastalığından mustarip ve yakınlarını kaybeden her bir insan için ufak bir umut oluşturan bir tedavinin sadece küçük bir parçası olacağını biliyorum. En ufak bir umuda tutunarak gidilen bu elim hastalıkta, toz tanesi kadar bile olsa insanlara fayda sağladığımı bilmek bana iyi hissettiriyor. Devam edecek olan akademik hayatımda da her canlıya fayda sağlayacak çalışmalarda yer almak istiyorum. Bu çalışma, geçmişin bilgeleri ve geleceğin buluşlarına katkı sağlaması dileğiyle bitirmek istiyorum. Bu yüzden bu çalışmayı bana destek sağlayan insanlara ithaf ediyorum.

OCAK 2025

Ayşegül TİRYAKİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kemik Yapısı.....	3
1.1.1. Modern görüntüleme teknikleri.....	6
1.1.2. Kemik doku mühendisliği malzemeleri ve yöntemleri.....	6
1.2. Üç Boyutlu Yazıcı Teknolojileri ve Biyomalzeme İskelelerinin Özellikleri ...	8
1.3. Kemik Kanserinin Epidemiyolojisi ve Mevcut Tedavi Yöntemleri.....	11
1.4. Cisplatinin Kanser Tedavisindeki Rolü.....	13
1.5. Kızılcık Bitkisi: Antioksidan ve Antikanser Özellikleri.....	14
1.6. Bu Çalışmanın Katkısı ve Gelecek Potansiyeli	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
2.1. Materyal.....	18
2.2. Yöntem	19
2.2.1. Gelma sentezi	19
2.2.2. Kızılcık ekstraksiyonu	20
2.2.3. Hidroksiapatit partiküllerinin hazırlanması	21
2.2.4. Cisplatin ve kıızılcık ekstraksiyonunun IC ₅₀ değeri belirlenmesi.....	22
2.2.5. Solüsyonların hazırlanması.....	25
2.2.6. DLP basım yöntemi	27

2.2.7.	Doku iskelelerin karakterizasyonu	27
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1.	Cisplatin ve Kızılıcık Ekstraksiyonunun IC ₅₀ Değeri Belirlenmesi	33
3.2.	Doku İskelelerin Karakterizasyonu	34
3.2.1.	İskele yapıların morfolojik analizleri (SEM).....	34
3.2.2.	Doku iskelelerinin termal analizi (DSC)	36
3.2.3.	İskele yapılarının mekanik analizi.....	38
3.2.4.	Doku iskelelerin şişme ve degradasyon analizi.....	39
3.2.5.	Doku iskelelerinin kimyasal analizi (FTIR).....	41
3.2.6.	Doku iskelelerinden ilaç salımı	42
3.2.7.	Hücreli doku iskelelerinin karakterizasyonu	45
3.2.8.	Bitki ekstraksiyonun antimikrobiyal testi.....	50
3.2.9.	Partikül boyutu ve yüzey yükü analizi	51
3.2.10.	<i>İn vitro</i> çizgi testi analizi	53
4.	SONUÇLAR	55
5.	KAYNAKÇA	58
	ÖZGEÇMİŞ	65

ÖZET

Bu tez çalışmasında, kemik kanseri tedavisinde biyomimetik doku iskelelerinin kullanımı üzerine bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel amacı, kemik rejenerasyonunu destekleyen ve aynı zamanda kanser tedavisinde etkili olan bir hibrid doku iskelesi geliştirmektir. Bu bağlamda, metakrilatlanmış jelatin (GelMA) ve hidroksiapatit (Hap) temelli iskelelere, cisplatin ve kızcılık ekstraktı yüklenmiştir. İskelenin mekanik dayanımı, biyouyumluluğu, antikanser ve antioksidan özellikleri detaylı şekilde analiz edilmiştir.

İlk olarak, GelMA/Hap bazlı içeriğinde cisplatin ve kızcılık ekstraktı yüklü doku iskeleleri, Digital Light Processing (DLP) teknolojisi kullanılarak 3B baskı yöntemiyle üretilmiştir. İskelelerin kontrollü ilaç salım kapasitesi, ilaç salım kinetikleri ve biyobozunur yapıları *in vitro* deneylerle değerlendirilmiştir. Cisplatin ve kızcılık ekstraktının yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri belirlenmiş ve bu ajanların hücre canlılığı üzerindeki etkileri hücre canlılık testi Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium (MTT) testi ile analiz edilmiştir.

İskelenin karakterizasyonu; taramalı elektron mikroskopu (SEM), Fourier dönüşümlü kızcilötesi spektroskopisi (FTIR) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, mekanik testler ile iskelelerin kemik dokusuna uygun elastikiyet ve dayanım gösterdiği kanıtlanmıştır. Hücresel analizlerde insan fetal osteoblast (hFOB) hücreleri kullanılmış ve iskelenin osteoblast proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmayı teşvik ettiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen GelMA/Hap bazlı içeriğinde farklı miktarlarda cisplatin ilacı ve kızcılık ekstraktı bulunan doku iskelelerinin kemik kanseri tedavisinde umut vaat eden bir yöntem olduğu görülmüştür. Kontrollü ilaç salımı ve rejeneratif özellikler bir araya getirilerek hem kemoterapötik hem de osteojenik destek sağlayan bir sistem elde edilmiştir. Bu hibrid doku iskelesi hem kanser tedavisi hem de kemik dokusu yenilenmesi için klinik uygulamalar açısından önemli bir potansiyele sahiptir.

ABSTRACT

In this thesis, a study was conducted on the use of biomimetic scaffolds in the treatment of bone cancer. The main purpose of the study was to develop a hybrid scaffold that supports bone regeneration and is also effective in cancer treatment. In this context, methacrylated gelatin (GelMA) and hydroxyapatite (Hap) based scaffolds were loaded with cisplatin and cranberry extract. The mechanical strength, biocompatibility, anticancer and antioxidant properties of the scaffold were analyzed in detail. First, GelMA/Hap based scaffolds loaded with cisplatin and cranberry extract were produced by 3D printing using Digital Light Processing (DLP) technology. The controlled drug release capacity, drug release kinetics and biodegradable structures of the scaffolds were evaluated by *in vitro* experiments. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of cisplatin and cranberry extract were determined and the effects of these agents on cell viability were analyzed by the cell viability test Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium (MTT) test.

The characterization of the scaffold was carried out by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) methods. In addition, mechanical tests proved that the scaffolds showed elasticity and strength suitable for bone tissue. Human fetal osteoblast (hFOB) cells were used in cellular analyses and it was observed that the scaffold promoted osteoblast proliferation and osteogenic differentiation.

As a result, it was seen that the developed GelMA/Hap-based scaffolds containing different amounts of cisplatin drug and cranberry extract are a promising method in the treatment of bone cancer. By combining controlled drug release and regenerative properties, a system that provides both chemotherapeutic and osteogenic support was obtained. This hybrid scaffold has significant potential for clinical applications for both cancer treatment and bone tissue regeneration.

SEMBOLLER

%T: Geçirgenlik değeri

μm : Mikrometre

cm: Santimetre

CO₂: Karbondioksit

g/ml: Gram/mililitre

g: Gram

kDA: Kilo Dalton

M: Molar

mg/ml: Miligram/mililitre

ml: Mililitre

mM: milimolar

M_w: Moleküler ağırlık

nm: Nanometre

Pa: Paskal

Rpm: Dakikadaki devir sayısı

T_g: Geçiş sıcaklığı

T_m: Erime sıcaklığı

v/v: Hacim/hacim

W₀: Başlangıç ağırlık

W_s: Son ağırlık

μl : Mikrolitre

μm : Mikrometre

KISALTMALAR

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

DLP: Digital Light Processing

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DSC: Differential Scanning Calorimetry

ECM: Hücre Dışı Matriks

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FBS: Fetal Bovine Serum

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GelMA: Metakrilatlanmış Jelatin

HA: Hiyaluronik asit

Hap: Hidroksiapatit

HCl: Hidroklorik Asit

hFOB: Human Fetal Osteoblast

IC₅₀: Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyon

LAP: Lithium Phenyl-2,4,6-Trimethylbenzoylphosphinate

MHA: Mueller-Hinton Agar

MTT: Hücre Canlılık Testi (Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium)

NaOH: Sodyum Hidroksit

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SEM: Scanning Electron Microscopy

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

UV-VIS: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Doku mühendisliğinin üç elemanı ve yapım yöntemleri	2
Şekil 1.2. Olgunlaşmamış ve olgun kemik diyagramı	4
Şekil 1.3. Basitleştirilmiş kemik yenilenme süreci	6
Şekil 1.4. Yaklaşık dört haftadır sağ diz ağrısı çeken	12
Şekil 1.5. Cisplatin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.6. Başlıca kızılçık polifenollerinin yapıları	16
Şekil 1.7. Çalışmada hedeflenen medikal yöntem.....	18
Şekil 2.1. Kızılçık ekstraktı	21
Şekil 2.2. Hap eleme işlemi.....	22
Şekil 2.3. A) Kızılçık hazırlanması B) Kızılçık solüsyonun filtrasyonu	24
Şekil 3.1. A) Kızılçık ekstraktının IC ₅₀ değeri B) Cisplatin ilacının IC ₅₀ değeri	34
Şekil 3.2. İskelelerin SEM görüntüleri	35
Şekil 3.3. 0°C -400°C arasında belirtilen malzemelerin DSC grafiği	37
Şekil 3.4. A) Şişme grafiği B) Bozunma grafiği	40
Şekil 3.5. A) GelHap grupların FTIR grafiği B) Hibrid gruplar	42
Şekil 3.6.A) Kızılçık absorbans grafiği B) Kızılçık kalibrasyon ve salım eğrisi	43
Şekil 3.7. A) Cisplatin absorbans grafiği B) Cisplatin kalibrasyon ve salım eğrisi	45
Şekil 3.8. A) Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 MTT testi.....	46
Şekil 3.9. Hibrid gruplar ile yapılan MTT analizi	47
Şekil 3.10. İskelelerin DAPI ile hücre çekirdeklerinin 1,3 ve 7. gün görüntüleri	48
Şekil 3.11. 3.gün iskele gruplarında hücre yapışması	49
Şekil 3.12. GelHap30 grubunun SEM görüntüleri	50
Şekil 3.13. Antibakteriyel aktivite test sonuçları.....	51
Şekil 3.14. Hap partiküllerin dinamik ışık saçılması.....	53
Şekil 3.15. Farklı iskele gruplarının yara kapanma oranlarına etkisi	54
Şekil 3.16. <i>In vitro</i> çizgi testi yara görüntüleri	55

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Hazırlanan cisplatin ve hacim miktarları.....	23
Tablo 2.2. Hazırlanan kızılıcık ve hacim miktarları	25
Tablo 2.3. İlk deneme Grup isimlendirmesi ve doku iskelesi içeriği	26
Tablo 2.4. Diğer denemeler sonrasında baz doku iskelesinin içeriğinin belirlenmesi ...	26
Tablo 2.5. Kızılıcık ve Cisplatin yüklü doku iskelelerinin belirlenmesi	27
Tablo 2.6. DLP basım yönteminde kullanılan parametreler	27
Tablo 3.1. Belirtilen doku iskelelerinin T_{onset} : T başlangıç sıcaklığı	37



1. GİRİŞ

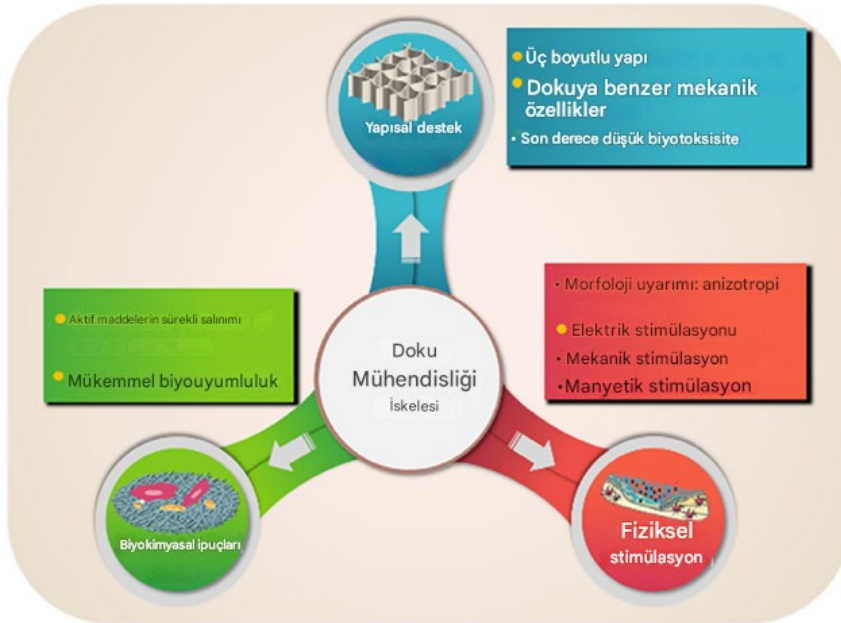
Doku mühendisliği, hasar görmüş veya kaybolmuş dokuların fonksiyonel olarak yenilenmesini sağlamak amacıyla biyomalzemeler, biyolojik faktörler ve hücrelerin bir arada kullanıldığı multidisipliner bir alandır. Özellikle kemik doku mühendisliğinde, osteogenez ve anjiyogenezi destekleyen biyoaktif iskeleler, yenilikçi tedavi yaklaşımlarının merkezinde yer almaktadır. Bu iskeleler, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu destekleyen uygun mikro-çevreler sunarak rejeneratif tıp alanında önemli katkılar sağlamaktadır (Black et al., 2015).

Doku mühendisliğinin temel kavramı, bu yapıların hücre dışı matriks (ECM) yapılarını taklit edebilme yeteneğidir. İskelelerin ECM'ye yapısal benzerlikleri sayesinde orijinal dokunun biyolojik fonksiyonlarını desteklemesi amaçlanır. Doku mühendisliği kapsamında kullanılan iskelelerin, uygulama alanlarına özgü özelliklere sahip olması beklenir. Doku mühendisliği iskeleleri, hücresel büyüme ve doku yenilenmesini destekleyen yapılar olup, yapısal destek, biyokimyasal sinyaller ve fiziksel uyarım olmak üzere üç temel özelliğe sahiptir. Üç boyutlu yapı, dokuya benzer mekanik özellikler ve düşük biyotoksinite, yapısal desteği sağlarken; aktif madde salınımı ve biyouyumluluk biyokimyasal katkılar sunar. Doku mühendisliğinde 3 temel elemanı ve yapım yöntemleri Şekil 1.1'de verilmiştir. Anizotropi, elektriksel, mekanik ve manyetik uyarımlar ise fiziksel desteği tamamlar. Bu özellikler, biyomimetik yapılar ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları için iskelelerin klinik potansiyelini artırmaktadır (Trybus et al., 2024). İskelelerin, vaskülarizasyon ve yeni doku oluşumuna alan tanınmasının yanı sıra dokuyla etkili bir etkileşim sağlayacak şekilde yeniden yapılanmaya izin vermesi gerekmektedir. Aynı zamanda, bu yapılar mekanik gerilmelere dayanıklı olmalı ve hasarlı dokunun yeniden inşa edilmesine uyum sağlayacak stabiliteyi sunmalıdır (Trybus et al., 2024).

Canlı dokuların viskoelastik özellikleri hem doku homeostazının hem de rejenerasyon sürecinin temel bileşenlerindedir. Bu özelliklerin hastalık oluşumunda ve ilerlemesinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Biyomalzemeler, genellikle vücudun kendi biyolojik yapısıyla uyum içinde çalışan ve görevlerini tamamladıktan sonra yavaş çözünerek dokulara zarar vermeyen yapılar olarak tasarlanmıştır. İskelelerin üretiminde çeşitli yöntemler uygulanabilir; hücrelerin hidrojellerle kaplanması, ECM salgılayan biyolojik

tabakaların kullanılması veya doğal ve sentetik materyallerden yapılan gözenekli iskelelerin tasarlanması gibi çeşitlilik gösterir (Suamte et al., 2023).

Kemik doku mühendisliği, iskelet sisteminde meydana gelen hasarların ve doku kayıplarının etkin bir şekilde onarılmasını sağlamaya yönelik yenilikçi bir bilim dalı olarak çağının en önemli tıbbi alanlarından biri haline gelmiştir. Yaşlanma, travma, hastalıklar ve cerrahi müdahaleler gibi durumlar kemik dokusunda ciddi kayıplara yol açabilir ve bu durum bireylerin yaşam kalitesini düşürerek toplum için büyük bir ekonomik yük oluşturur. Geleneksel tedavi yaklaşımları, bu zorlukları aşmak için yetersiz kalabilirken, biyoteknolojik yenilikler önümüze yeni olanaklar sunmaktadır. Kemik dokusu, kendini iyileştirme kapasitesine sahip olsa da kritik seviyedeki hasarları onarma kapasitesi sınırlıdır. Osteoblastlar, osteoklastlar ve endotel hücreleri arasındaki karmaşık biyokimyasal etkileşimler osteogenez ve anjiyogenez süreçlerini öne çıkarır. Ancak bu mekanizmaların bozulması veya baskılanması durumunda, vücudun doku yenileme yeteneği zayıflar. Bu biyolojik temelleri daha iyi anlamak, doku mühendisliği uygulamalarının etkinliğini artırmak için temel oluşturur (Kumar et al., 2019).



Şekil 1.1. Doku mühendisliğinin üç elemanı ve yapım yöntemleri (Trybus et al., 2024)

Biyomalzeme tabanlı iskelelerin, doku mühendisliğindeki zorlukların üstesinden gelme potansiyeli, bu malzemelere olan ilgi ve uygulamaların giderek artmasına neden olmuştur (Khan ve ark., 2008). Bu iskeleler, doku iyileşmesi ve rejenerasyonu süreçlerinde kritik

bir rol oynayan biyomalzemelerdir. Doku mühendisliği uygulamalarında, iskeleler hasar gören dokuların onarımına ve yenilenmesine destek olurken, hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması için gerekli faktörlerin en iyi seviyede olmasını sağlar (Prem Ananth & Jayram, 2024).

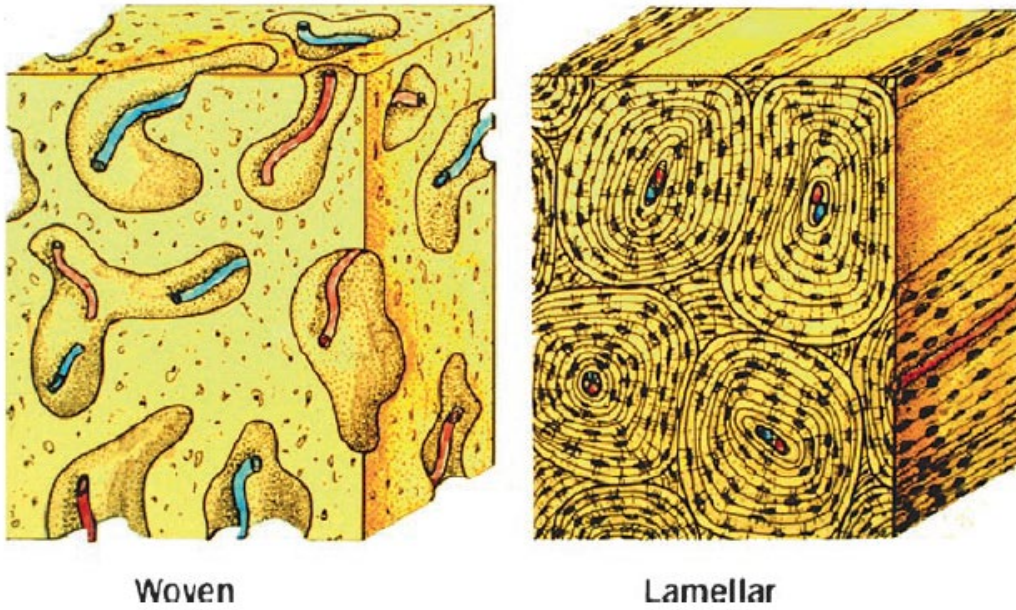
Biyomalzemeler, rejeneratif tıpta büyük bir potansiyele sahiptir. Hidroksiapatit gibi biyoseramikler, kolajen ve fibrin gibi doğal polimerler ve çeşitli sentetik malzemeler, kemik rejenerasyonunda sıkça kullanılmaktadır. Bu materyaller, osteojenik aktiviteyi destekleyen yapılar sunarak yeni dokunun oluşumunu hızlandırabilir. Aynı zamanda, biyoaktif moleküllerin salınımını kontrol eden akıllı tasarımlarıyla tedavi etkinliğini artırırlar.

Kemik rejenerasyonunun başarısı, etkin bir damar ağı oluşumuna bağlıdır. Vaskülerizasyon, oksijen ve besin maddelerinin hasarlı bölgeye ulaşmasını sağlarken metabolik atıkları uzaklaştırır. Endotelial hücreler ve osteoblastlar arasındaki etkileşimler, bu sürecin yönetilmesinde kritik bir rol oynar. Bu nedenle, vasküler yapıları hedef alan biyomalzeme tasarımları, doku mühendisliği alanında yenilikler sunabilir.

1.1.Kemik Yapısı

İnsan ve diğer iskelet sistemine sahip canlılarda hareketin sağlayıcılarından biridir. Omurgalı canlılarda dik durabilme yeteneğini de sağlamaktadır. Kemikler yani iskelet sistemi canlı vücudunun temel yapı taşlarındandır. İnsanda farklı kemik türleri bulunmaktadır. Temel olarak 4 ana bölmeye ayrılabilir. İlk olarak yassı kemikler; toraks bölgesinde bulunan göğüs kafesi kostaları, kalça kemikleri, kafatası kemikleri, kürek kemiğidir. Uzun kemikler kollar ve bacaklarda bulunmaktadır. Kısa kemikler parmak bölgelerinde bulunur. Düzensiz kemikler omurgalarda bulunmaktadır. Bununla beraber kemiği oluşturan bir kemik dokusu bulunmaktadır. Kemik dokusu, vücudun destek sistemi için kritik öneme sahip bir biyolojik materyaldir. Mekanik stabilite sağlama, mineral depolama ve kan üretimi gibi temel işlevlerin yanı sıra, dinamik yapısı sayesinde sürekli yenilenme ve mekanik uyarılara uyum sağlama özelliklerine sahiptir (Safadi et al., 2009). Kemik dokusunun bu dinamik yapısı, bireylerin yaş, hormonal değişiklikler ve çevresel faktörlere bağlı olarak iskelet sisteminde meydana gelen değişikliklere uyum sağlamasına olanak tanır (Müller, 2009).

Makroskobik düzeyde kemik, kortikal (kompakt) ve trabeküler (süngerimsi) yapı olmak üzere iki temel bileşene ayrılır. Kortikal kemik, sert ve yoğun bir dış tabaka olarak mekanik dayanıklılığı artırırken, trabeküler kemik daha hafif ve metabolik olarak aktiftir. Özellikle trabeküler kemik, mineral homeostazında ve hızlı kemik yenilenmesinde önemli bir rol oynar (Florencio-Silva et al., 2015) Uzun kemiklerde epifiz (uç), metafiz (ara bölge) ve diafiz (gövde) olmak üzere üç temel bölge bulunur. Bu yapılar, kemiğin büyüme ve işlev süreçleri için kritik öneme sahiptir (Safadi et al., 2009).



Şekil 1.2. Olgunlaşmamış ve olgun kemik diyagramı (Safadi et al., 2009)

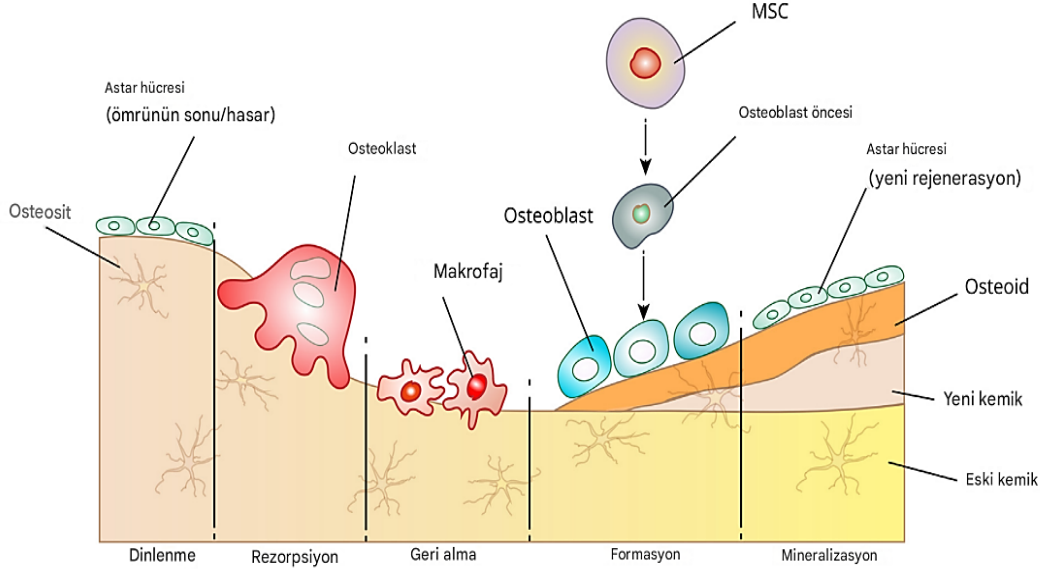
Olgunlaşmamış (örgülü) kemik, kolajen liflerinin iç içe geçmiş düzeni nedeniyle düzensiz bir lamel görünümü sergiler. Hücreler (osteoblastlar ve osteositler) rastgele düzenlenme eğilimindeyken, olgun kemikteki hücreler Haversian sisteminin lameller yapısını yansıtan dairesel bir şekilde düzenlenmiştir. Olgun kemikteki rezorpsiyon kanallarının uzun eksenleri Haversian kanallarıyla aynı yöndedir (Safadi et al., 2009).

Mikroskobik düzeyde ise kemik dokusu, düzensiz (woven) ve düzenli (lamellar) olmak üzere iki farklı yapı sergiler. Şekil 1.2’de woven ve lamellar kemik gösterilmiştir. Woven kemik, hızlı büyüme veya iyileşme dönemlerinde üretilir ve düzensiz bir kolajen organizasyonu ile karakterizedir (Olszta et al., 2007). Buna karşın lamellar kemik, daha organize bir kolajen matriks yapısına sahiptir ve dayanıklılığı artırır (Safadi et al., 2009).

Kemik dokusunun ekstrasellüler matrisi (ECM), dayanıklılık ve esneklik özelliklerini belirleyen organik ve inorganik bileşenlerden oluşur. ECM'nin organik kısmı, toplam matrisin %40'ını oluşturur ve temel bileşeni Tip I kolajendir. Kolajen, kemiğin çekme dayanıklılığını artıran fibriler bir yapıdır (Florencio-Silva et al., 2015). Bunun yanı sıra osteokalsin, osteonektin ve proteoglikanlar gibi proteinler, ECM'nin biyolojik işlevlerini destekler ve mineralizasyon sürecinde önemli roller üstlenir (Safadi et al., 2009). İnorganik bileşenler ise çoğunlukla hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Hidroksiapatit, kalsiyum ve fosfat iyonlarından meydana gelir ve kemiğe mekanik dayanıklılık kazandırır (Olszta et al., 2007). Diğer ECM bileşenleri arasında yer alan glikozaminoglikanlar (GAG'ler), özellikle hiyalüronik asit, ECM'nin su tutma kapasitesini artırarak dokunun esnekliğini ve elastikiyetini artırır. ECM içeriğindeki proteoglikanlar, hücre-matris etkileşimlerini düzenleyerek, hücre davranışları ve matrisin remodelizasyonunu kontrol eder. Glikoproteinler, özellikle osteopontin, osteoblastların ECM ile etkileşimini modüle ederek kemik mineralizasyonunu teşvik eder (Lin et al., 2020).

Kemik dokusundaki hücresel bileşenler, kemiğin dinamik bir doku olarak sürekli yenilenmesini sağlar. Bu hücreler dört ana gruba ayrılır. Kemik matrisi sentezinden sorumlu olan osteoblastlar, Tip I kolajen ve diğer organik bileşenleri salgılar. Bu hücrelerin farklılaşması, Runx2, Dlx5 ve Osterix gibi transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (Safadi et al., 2009). Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonunu gerçekleştiren bu hücreler, hidrojen iyonları ve proteolitik enzimler salgılayarak matrisi parçalar (Olszta et al., 2007). Osteoklastlar, kemik remodeling sürecinde dengeleyici bir rol oynar (Müller, 2009). Osteositler, osteoblastlardan türeyen osteositler, matriks içinde yerleşiktir ve mekanosensör işlevi görerek remodeling süreçlerini düzenler (Florencio-Silva et al., 2015). Ayrıca kemik mikro çatlaklarının algılanmasında ve onarım süreçlerinin başlatılmasında kritik öneme sahiptir (Safadi et al., 2009). Kemik yüzeyi hücreleri, kemiğin yüzeyini kaplayan düz yapılar olup gerektiğinde osteoblastlara dönüşerek kemik yapımına katkıda bulunur (Florencio-Silva et al., 2015). Kemik ECM'sinin mineralizasyonu, osteoblastlar tarafından sentezlenen ve hidroksiapatit kristalleriyle zenginleşen bir süreçtir. Bu mineralizasyon, kemik dokusunun dayanıklılığını sağlarken, ECM'nin osteoblastlar ve osteositler ile olan etkileşimi, kemik matrisinin dinamik bir şekilde yenilenmesini sağlar. Kemik ECM'si, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar gibi hücreler arasındaki etkileşimleri yönlendirerek kemik remodelizasyonunu düzenler.

Osteoblastlar, ECM bileşenlerini sentezlerken, osteoklastlar kemik yıkımını gerçekleştirir ve bu süreçlerin uyumlu bir şekilde yönetilmesi kemik sağlığı için hayati öneme sahiptir (Lin et al., 2020). Şekil 1.3'te kemik rejenerasyon süreci şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Basitleştirilmiş kemik yenilenme süreci (Astar hücresi: Lining cell) (Wubneh et al., 2018)

1.1.1. Modern görüntüleme teknikleri

Kemik dokusunun detaylı incelenmesi için geliştirilen modern görüntüleme teknikleri, mikro ve ultra strüktürel analizlerde önemli bir yer tutmaktadır. Mikro-CT ve nano-CT gibi yöntemler, özellikle trabeküler yapının değerlendirilmesi ve mikro çatlakların tespiti için kullanılır (Müller, 2009). Bu yöntemler, kemik dokusunun farklı rezolüsyonlarda incelenmesine olanak sağlar ve mineralizasyon süreçlerinin detaylı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunur (Olszta et al., 2007).

1.1.2. Kemik doku mühendisliği malzemeleri ve yöntemleri

Kemik doku mühendisliği, kemik hasarları ve defektlerinin tedavisinde önemli bir alan olup, biyomalzeme ve üretim teknolojilerinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Kemik iyileşmesini destekleyecek malzemelerin tasarımı ve üretimi, biyolojik uyumlulukları, mekanik özellikleri ve hücresel etkileşimleri simüle etme kabiliyeti açısından büyük önem taşır. Kemik doku mühendisliği için kullanılan malzemeler, doğal malzemeler,

sentetik polimerler ve kompozit malzemeler gibi farklı kategorilere ayrılabilir. Her malzeme türü, kemik iyileşmesi için avantajlar ve sınırlamalar sunmaktadır.

1.1.2.1.Doğal malzemeler

Kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan doğal malzemeler arasında kolajen, hidroksiapatit ve kitosan gibi bileşenler yer alır. Bu malzemeler biyoyumludur ve doğal kemik ECM'sinde bulunan bileşenleri taklit eder. Kolajen, özellikle kemik oluşumu ve mineralizasyonu üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Ancak, bu malzemeler çoğu zaman yeterli mekanik direnç sunmayabilir ve kemik doku mühendisliğinde genellikle diğer malzemelerle kombinasyon halinde kullanılır (Koons et al., 2020).

1.1.2.2.Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, kemik doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Polilaktik asit (PLA), poliglolik asit (PGA) ve polilaktid-co-glikolik asit (PLGA) gibi biyobozunur polimerler, biyomalzeme iskelelerinin üretiminde yaygın olarak tercih edilir. Bu polimerler, kontrollü biyobozunma hızları ve iyi mekanik özellikleri ile kemik yenilenmesini destekler. Ayrıca, bu malzemeler üzerine biyolojik işaretleyiciler eklenerek hücrel yanıtlar da artırılabilir. Sentetik polimerler, özellikle kişiselleştirilmiş tedavi seçenekleri sunma potansiyeline sahipken, mekanik performanslarını geliştirmek için ek iyileştirmelere ihtiyaç duyabilirler (Wubneh et al., 2018).

1.1.2.3.Kompozit malzemeler

Kompozit malzemeler, biyomineraller ve biyopolimerlerin birleşimiyle oluşturulan materyallerdir ve kemik doku mühendisliği için oldukça umut verici malzemelerdir. Bu malzemeler hem biyolojik uyumluluğu hem de mekanik dayanıklılığı bir arada sunar. Örneğin, hidroksiapatit ve kolajen karışımları, kemik dokusunun yapısını taklit eder ve iyileşme sürecini hızlandırır. Bu tür kompozitler, doğal kemik yapısına benzer özellikler sergileyerek etkili bir kemik rejenerasyonu sağlamak için kullanılır. Kompozit malzemelerin tasarımı, biyolojik, mekanik ve biyobozunabilirlik özelliklerinin optimize edilmesini hedefler (Barui, 2021).

1.1.2.4.İleri üretim yöntemleri

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemelerin üretim teknikleri de önemli bir gelişim göstermektedir. 3B baskı gibi ileri üretim yöntemleri, kemik iskelelerinin kişiye özel olarak üretilmesini mümkün kılar. Bu teknolojiler, iskelelerin karmaşık ve fonksiyonel yapılarla tasarlanmasına olanak tanır ve hücrelerin bu yapılarla etkileşimini iyileştirir. Ayrıca, biyomalzeme modifikasyonları, iskelelerin dayanıklılığını artırarak kemik iyileşmesi sürecini daha verimli hale getirebilir. 3B baskı teknolojisi, bireylerin ihtiyaçlarına uygun özelleştirilmiş çözümler sunma açısından önemli bir potansiyele sahiptir (S. Wang et al., 2022). İleri üretim yöntemleri başlık 1.2' de detaylı olarak bahsedilmiştir.

1.1.2.5.Nanoteknoloji ve biyomühendislik

Nanoteknoloji, kemik doku mühendisliğinde son yıllarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Nanomalzemeler, hücresel düzeyde biyolojik etkileşimleri geliştirebilir ve kemik büyümesini teşvik edebilir. Nanoteknolojik yaklaşımlar, biyoyumluluğu artırabilir ve biyolojik sinyalleri düzenleyerek iyileşme süreçlerini hızlandırabilir. Ayrıca, nanokompozit malzemeler, biyolojik olarak uyumlu nanopartiküller ve biyopolimerlerin birleşimiyle, kemik dokusunun yapısal ve fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için kullanılabilir (Koons et al., 2020).

1.2. Üç Boyutlu Yazıcı Teknolojileri ve Biyomalzeme İskelelerinin Özellikleri

3B yazıcı teknolojisi, tıbbi alanda önemli bir potansiyele sahip olup, farklı üretim yöntemleri ve teknolojilerin entegrasyonu ile çeşitli tıbbi ihtiyaçlara yönelik çözümler sunmaktadır. Bu teknoloji, dijital modellerden katmanlı üretim (additive manufacturing) prensibine dayanarak fiziksel nesnelere üretir. Kullanılan başlıca yazıcı teknolojileri arasında Fused Deposition Modeling (FDM), Stereolithography (SLA) ve Selective Laser Sintering (SLS) bulunur. Her bir yöntem, belirli tıbbi uygulamalara uygun özellikler ve avantajlar sunmaktadır (Yan et al., 2018).

FDM, genellikle biyoyumlu polimerler gibi malzemelerle çalışarak, katman-katman üretim sağlar ve kişiselleştirilmiş implantların üretilmesinde yaygın olarak kullanılır. SLA, sıvı reçinelerin ultraviyole ışıkla sertleştirilmesiyle çalışan bir yöntem olup, yüksek

hassasiyet gerektiren tıbbi cihazların ve modellerin üretiminde tercih edilir. Bu teknoloji, ayrıca cerrahlar için eğitim amaçlı anatomi modelleri oluşturulmasında da sıklıkla kullanılmaktadır. SLS, metal veya polimer tozlarının lazerle sinterlenmesi yoluyla sağlam ve dayanıklı yapılar elde edilmesine olanak tanır. Bu yöntem, cerrahi implantlar ve protezler gibi yüksek mekanik dayanım gerektiren ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Zhu et al., 2016).

3B yazıcılarla üretilen malzemeler, biyouyumluluk, biyobozunabilirlik ve güvenlik gibi önemli özelliklere göre seçilmektedir. Polimerler, biyobozunur özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilirken, metal alaşımlar ve biyolojik malzemeler, cerrahi implantlar ve protezlerde kullanılmaktadır. Bu malzemeler, hücrelerin büyümesi ve etkileşimleri için uygun ortamlar sağlayarak, doku mühendisliğinde büyük bir potansiyel sunar. Ayrıca, nanoteknoloji gibi gelişmiş mühendislik teknikleri, bu malzemelerin biyolojik uyumunu ve mekanik özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır (Arifin et al., 2022).

Bu yazıcı teknolojileri ve malzemeler, tıbbi uygulamalarda kişiye özel tedavi, organ mühendisliği ve prototip tasarımı gibi alanlarda önemli faydalar sağlamaktadır. Ancak, biyouyumluluk, üretim hızları ve maliyetler gibi bazı zorluklar söz konusu olabilmektedir. Bununla birlikte, malzeme bilimi ve yazıcı teknolojilerindeki ilerlemeler, bu engellerin aşılmasına olanak tanıyacak ve tıbbi uygulamaların daha geniş bir yelpazede uygulanabilmesini sağlayacaktır. Gelecekte, 3B yazıcı teknolojisinin tıp alanındaki etkisinin daha da artması ve daha verimli, özelleştirilmiş tedavi yöntemlerinin sunulması beklenmektedir (Shahrubudin et al., 2019).

SLA yönteminin çeşidi olan DLP yöntemi, fotopolimerizasyon prensibiyle çalışan bir 3B yazıcı teknolojisidir. Bu yöntem, hızlı üretim süresi, çok katmanlı yapıları hassas bir şekilde üretme yeteneği ve biyoaktif malzemelerle uyumlu çalışma avantajları sunar. DLP ile üretilen Hap ve GelMA tabanlı iskeleler, mekanik dayanıklılık ve biyoaktivite arasında optimum bir dengenin sağlanmasını mümkün kılar.

DLP teknolojisi, katmanlı üretim alanında biyomühendislik ve tıbbi uygulamalar için önemli bir gelişim göstermektedir. DLP, fotopolimerlerin ultraviyole (UV) ışık ile sertleştirilmesi prensibine dayanan bir üretim yöntemidir. Bu teknoloji, biyolojik yapıların ve fonksiyonel biyomalzemelerin üretimi için kritik bir potansiyele sahiptir.

Özellikle yüksek çözünürlük, üretim hızı ve hassasiyet gereksinimlerini karşılaması, DLP'yi doku mühendisliğinde sıkça tercih edilen bir teknoloji haline getirmiştir. DLP, doku mühendisliği, biyoyazıcı ve hastalık modelleme gibi uygulamalarda son derece faydalı bir araçtır (Zhu et al., 2016).

DLP, ışık kaynağının bir projektör aracılığıyla fotopolimer üzerine yansıtılması ve bu fotopolimerin belirli bölgelerinin ışık ile sertleşmesi süreciyle çalışır. Bu şekilde katman katman üretim yapılırken, her katman aynı anda ışıkla sertleştirilir. DLP'nin bu yönü, geleneksel 3B yazıcı teknolojilerinden farklı olarak üretim sürecini hızlandırır. Diğer teknolojilerde her katman tek tek işlenirken, DLP tüm katmanı paralel olarak işler, böylece daha hızlı ve verimli bir üretim sağlanır. Bu avantaj, özellikle biyoteknoloji alanında hız ve yüksek hassasiyet gereksinimlerini karşılamak için önemlidir. DLP'nin bu özellikleri, organ mühendisliği ve doku mühendisliği gibi alanlarda önemli bir kullanım alanı sunar (Li et al., 2023).

DLP, biyomimetik yapıların üretiminde özellikle kullanışlıdır. Bu tür yapılar, doğal biyolojik dokuları taklit etmeye yönelik olarak tasarlanır ve üretilir. DLP teknolojisi, biyoyumlu polimerlerin, kolajen, aljinat, hiyalüronik asit gibi biyolojik malzemelerle birleştirilmesini sağlar. Bu kombinasyonlar, hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını destekleyen uygun mikro ortamları yaratır. Yüksek çözünürlük, doku mühendisliğinde karmaşık yapıları hassas bir şekilde inşa etmeye olanak tanır. Bu nedenle, hücresel etkileşimleri teşvik eden fonksiyonel ve biyolojik açıdan uyumlu yapılar oluşturmak için DLP kullanımı oldukça yaygındır (Zhu et al., 2016).

DLP teknolojisi, biyolojik doku mühendisliği alanında mikro yapılar oluşturma ve biyolojik etkileşimleri optimize etme potansiyeline sahiptir. Bu süreç, biyomimetik yapıların üretiminin yanı sıra, hücresel düzeyde fonksiyonel iyileşmeleri teşvik eden yapılar sunar. Örneğin, DLP ile kan damarlarını taklit eden mikro kanallar üretilebilir. Bu tür yapılar, organ rejenerasyonu ve hastalık modelleme alanlarında önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, DLP teknolojisi, biyolojik ve biyoyumlu malzemelerin işlenmesiyle kişiselleştirilmiş implantlar ve tıbbi cihazlar üretmeye olanak tanır, bu da tıbbi uygulamalarda bireyselleştirilmiş tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yardımcı olur (Li et al., 2023).

DLP teknolojisinin geleceği, doku mühendisliği ve biyomühendislik alanlarında büyük bir potansiyel taşımaktadır. Kişiyeye özel tedavi çözümleri, organ mühendisliği ve biyolojik yapıları taklit etme kapasitesi, DLP' nin kullanım alanlarını genişletmektedir. Biyouyumlu malzemelerin geliştirilmesi ve biyolojik etkileşimlerin optimize edilmesi, bu teknolojinin gelecekte daha etkili ve fonksiyonel ürünler üretmesine olanak tanıyacaktır. Bu yönleriyle DLP, sağlık hizmetlerinde devrim yaratacak bir teknoloji olma potansiyeline sahiptir (Arifin et al., 2022).

1.3. Kemik Kanserinin Epidemiyolojisi ve Mevcut Tedavi Yöntemleri

Kemik kanserleri, iskelet sistemi içinde nadiren ortaya çıkan ancak önemli ölçüde morbidite ve mortaliteye yol açan malignitelerdir. Bu kanser türleri, diğer organlardan (örneğin meme, akciğer, böbrek ve prostat) metastaz olarak görülebileceği gibi, primer olarak kemik dokusunda da gelişebilir. Primer kemik kanserleri arasında osteosarkom, Ewing sarkomu ve kondrosarkom bulunmaktadır. Bu türler, tüm kanser vakalarının yalnızca %1'inden daha azını oluştursa da yüksek agresiflik ve geç tanı gibi nedenlerle klinik zorluklar yaratmaktadır Şekil 1.4' te klinik bir çalışma görüntüsü verilmiştir (Ferguson & Turner, 2018).

Osteosarkom, en sık görülen primer kemik kanseri olup, genellikle büyümenin en hızlı olduğu dönemlerde, çocukluk ve ergenlik çağında ortaya çıkar. Bu malignite, uzun kemiklerin metafiz bölgelerinde, özellikle distal femur, proksimal tibia ve proksimal humerus gibi bölgelerde gelişme eğilimindedir. Osteosarkomların hücresel kökeni, osteoblastlara dönüşen ve malign osteoid matrisi üreten primitif mezenkimal hücrelerdir. Tedavide, preop (ameliyat öncesi) kemoterapi ile tümör boyutunun küçültülmesi, ardından cerrahi rezeksiyon ve postop (ameliyat sonrası) kemoterapi uygulanır. Bu yaklaşım, lokalize hastalığı olan hastalarda sağkalım oranlarını %70'in üzerine çıkarmıştır. Akciğer metastazları sık görüldüğünden, metastatik hastalığın yönetimi için de kemoterapi ve cerrahi kullanılmaktadır (Gonçalves et al., 2015).

Ewing sarkomu, osteosarkomdan sonra en sık görülen kemik kanseridir. Çocukluk ve ergenlik dönemlerinde, özellikle pelvis, uzun kemiklerin diafiz bölgeleri, kaburga ve skapula gibi bölgelerde ortaya çıkar. Bu tümörler, genellikle akciğerglere ve diğer kemiklerin metastaz yapar. Tedavi süreci, preop kemoterapi, cerrahi eksizyon ve bazı durumlarda radyoterapiden oluşan multidisipliner bir yaklaşımla yürütülür. Özellikle

radoterapi, cerrahinin mümkün olmadığı durumlarda, nörolojik komplikasyonların olduğu spinal tümörlerde veya metastatik akciğer lezyonlarının yönetiminde tercih edilir. Bununla birlikte, radyoterapinin çocukluk döneminde büyümeyi engelleyebileceği ve ikincil malignitelere yol açabileceği unutulmamalıdır (L. Wang et al., 2020).

Kondrosarkom, genellikle 40 yaş üstü yetişkinlerde görülür ve kıkırdak üreten hücrelerden kaynaklanır. Osteosarkom ve Ewing sarkomunun aksine, kemoterapiye dirençlidir. Bunun nedeni, malign kıkırdak hücrelerinin sınırlı vasküler bağlantılara sahip olması ve bu nedenle kemoterapötik ajanların tümör içine etkin bir şekilde ulaşamamasıdır. Ana tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur. Tümör derecesine bağlı olarak prognoz değişiklik gösterir; düşük dereceli (Grade 1) tümörlerde sağkalım oranları %90'a kadar çıkabilirken, yüksek dereceli (Grade 3) tümörlerde bu oran %30-50'ye düşmektedir (L. Wang et al., 2020).

Kemik kanserlerinin tanısı genellikle gecikir çünkü semptomlar çoğunlukla kas-iskelet sistemi yaralanmalarını taklit eder. Sürekli kemik ağrısı, gece uykudan uyandıran ağrılar veya belirgin bir travma hikayesi olmaksızın gelişen şişlik gibi belirtiler, kemik kanseri şüphesini arttırmalıdır. Tanıda, öncelikle röntgen tercih edilmekte olup, lezyonun kapsamını ve metastatik durumunu değerlendirmek için manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi ileri görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (Sharma et al., 2021).



Şekil 1.4. Yaklaşık dört haftadır sağ diz ağrısı çeken 11 yaşında bir çocuğun sağ dizinin görüntülenmesi. Belirli bir travma öyküsü olmamasına rağmen, hasta ve ailesi ağrıyı günlük basketbol katılımına bağladı. (A) Ön-arka görünümde distal sağ femoral

metafizde iyi tanımlanmamış karışık sklerotik ve litik lezyon görülüyor. (B) Yan görünümde ön yumuşak doku şişmesi ve osteoid matris birikimi görülüyor. (C) Radyografiden sonra koronal manyetik rezonans görüntüleme tümör tutulumunun kapsamını daha iyi tanımlıyor. (D) Sagittal manyetik rezonans görüntüleme ön yumuşak doku tümör uzantısını daha iyi gösteriyor. Lezyonun daha sonraki biyopsisi yüksek dereceli osteosarkomu doğruladı (Ferguson & Turner, 2018).

1.4. Cisplatinin Kanser Tedavisindeki Rolü

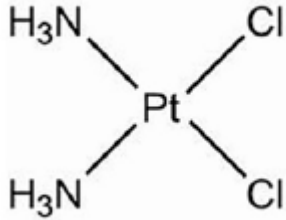
Cisplatin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ajanıdır. Bu platin bazlı bileşik, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) purin bazlarıyla çapraz bağlar oluşturarak kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarını engeller ve nihayetinde hücre apoptozuna yol açar. Cisplatinin etkinliği, özellikle katı tümörlerin tedavisinde kanıtlanmıştır; ancak, tedavi sırasında gözlenen direnç gelişimi ve toksisite, klinik kullanımını sınırlayan temel zorluklardır. Cisplatin, DNA'ya bağlanarak replikasyonu ve transkripsiyonu bozan, kanser hücrelerini apoptoza zorlayan etkili bir kemoterapötik ajandır. Ancak, sistemik uygulamaları ciddi nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, cisplatinin yerel salınım sistemleri aracılığıyla kullanılması, etkinliğinin artırılması ve yan etkilerin azaltılması için umut vadetmektedir. Cisplatin kimyasal yapısı Şekil 1.5'te verilmiştir (Brown et al., 2019).

Cisplatin, hücre içine difüzyon yoluyla girer ve sitoplazmada su molekülleriyle aktif bir elektrofille dönüşür. Bu dönüşüm, DNA bazları ve hücre proteinleriyle güçlü bağlar oluşturarak hem hücre replikasyonunu hem de DNA tamirini durdurur. Ayrıca, cisplatin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olur ve mitokondriyal disfonksiyon yoluyla apoptozu tetikler (Cohen & Lippard, 2001).

Cisplatin tedavisindeki en büyük zorluklardan biri, kanser hücrelerinde zamanla gelişen ilaç direncidir. Bu direnç mekanizmaları arasında DNA tamir kapasitesinin artışı, ilaç atılımının hızlanması ve glutathion/metallotionein seviyelerindeki artış yer alır. Özellikle, metallotioneinler ve glutatyon, cisplatin moleküllerini bağlayarak hücre toksisiteyi azaltır ancak bu süreç, kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını da düşürür (Cohen & Lippard, 2001).

Cisplatin tedavisinin başlıca yan etkileri arasında nefrotoksisite, hepatotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite yer alır. Böbrek hasarı, özellikle cisplatin birikiminin yoğun olduğu proksimal tübüllerde daha belirgindir. Benzer şekilde, ototoksisite, işitme kaybına neden olan koklear hücre hasarı ile ilişkilidir. Bu toksik etkileri azaltmak için hidrasyon protokolleri ve magnezyum takviyesi gibi destekleyici tedaviler kullanılmaktadır. Cisplatin, akciğer, mide, yumurtalık, baş ve boyun gibi birçok kanser türünün tedavisinde birinci basamak veya tamamlayıcı bir ajan olarak kullanılır. Ayrıca, cisplatin genellikle diğer kemoterapi ilaçlarıyla (örneğin, paklitaksel, doksorubisin) kombinasyon halinde uygulanır. Bu kombinasyonlar, ilaç etkinliğini artırabilirken toksisiteyi sınırlama potansiyeline sahiptir (Florea & Büsselberg, 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, cisplatinin sadece sitotoksik değil, aynı zamanda immünomodülatör etkileri olduğunu da göstermiştir. Cisplatin, kanser hücrelerinde MHC sınıf I ekspresyonunu artırarak sitotoksik T hücrelerinin aktivitesini güçlendirebilir. Ayrıca, bağışıklık hücrelerinin tümör mikro çevresine çekilmesi ve çoğalması üzerinde de olumlu etkiler göstermektedir (Romani, 2022).



CISPLATIN (1978)

Şekil 1.5. Cisplatin kimyasal yapısı (Romani, 2022)

1.5. Kızılcık Bitkisi: Antioksidan ve Antikanser Özellikleri

Kızılcık bitkisi (*Vaccinium macrocarpon*), zengin fenolik bileşikleri, proantosiyanidinleri ve flavonoidleri ile antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser özellikler sunar. Bu bileşikler, oksidatif stresi düzenleme ve tümör hücre proliferasyonunu inhibe etme yetenekleriyle dikkat çeker. Ayrıca, kızılcık türevi ekstraktların kemik mineral yoğunluğunu artırdığı ve osteogenezi desteklediği gösterilmiştir (Villarreal et al., 2007).

Kızılcık, çeşitli fenolik bileşikler, flavonoidler, proantosiyanidinler ve organik asitler gibi biyolojik olarak aktif moleküller içerir. Bu bileşikler, kızılcığın kanser önleyici ve tedavi

edici özelliklerini destekleyen temel unsurlardır. Proantosiyanidinler, kızılıcıkta bulunan önemli antioksidanlardan biridir ve bu bileşiklerin kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemeye yönelik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Weh et al., 2016) Ayrıca, kızılıcık ekstraktlarının, özellikle kolon kanseri ve prostat kanseri üzerinde inhibe edici etkileri olduğu klinik öncesi çalışmalarla desteklenmiştir. Kızılıcık bileşenleri, serbest radikal tahribatını azaltarak hücrel oksidatif stresi önler ve bu mekanizma kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir (McKay & Blumberg, 2007).

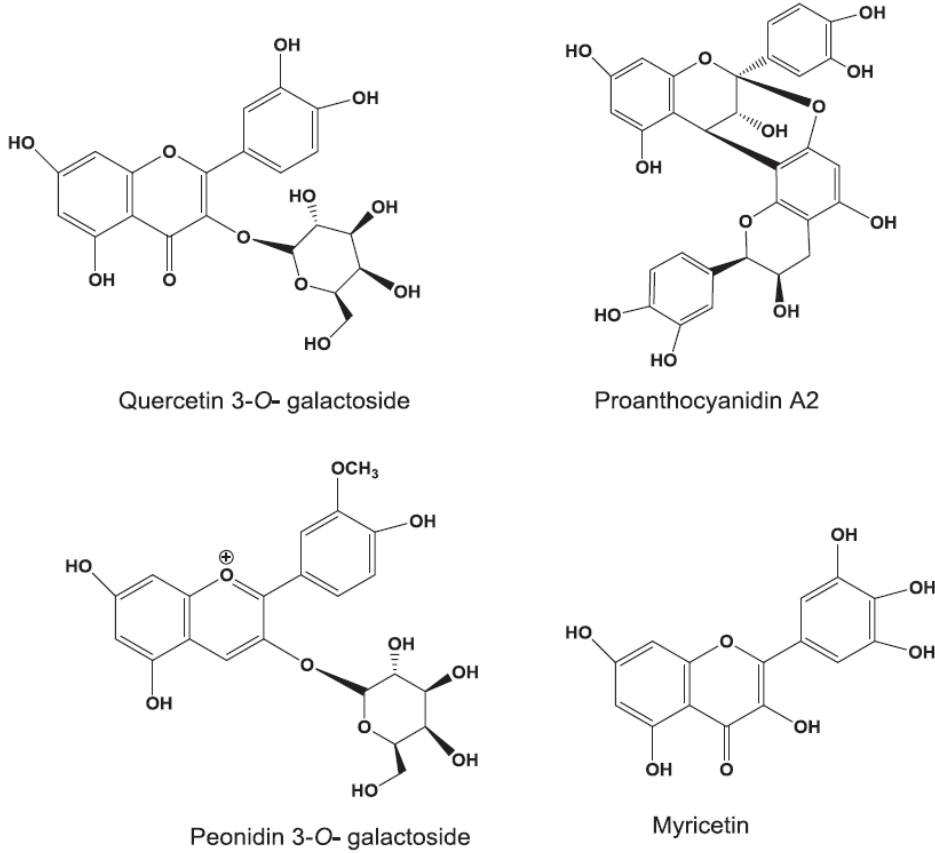
Kızılıcığın anti-kanser özelliklerinin ortaya çıkmasında, fenolik bileşiklerin metabolizması önemli bir rol oynar. (Prasain et al., 2019) çalışmasında, kızılıcık bileşenlerinin vücutta nasıl metabolize olduğunu ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerini detaylı şekilde ele almıştır. Araştırmalar, kızılıcık bileşiklerinin vücutta hızla emildiğini ve biyoyararlanımının arttığını göstermektedir. Bu bileşiklerin, kanser hücreleri ile etkileşime girerek hücrel yolları modüle etmesi, kanser tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Özellikle kızılıcık içeriğindeki A-type proantosiyanidinler, kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederek metastazı azaltabilir ve apoptoz yollarını tetikleyebilir (Weh et al., 2016).

Kızılıcık, kanser tedavisinde tamamlayıcı bir alternatif olarak kullanabileceği gibi, mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırabilir. Kızılıcık hem tek başına hem de kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarla birlikte kullanılacak potansiyele sahiptir. Kızılıcığın tedavi edici özelliklerinin temelinde, hücrel büyümeyi inhibe etme, inflamasyonu azaltma ve kanser hücrelerinin ölümünü teşvik etme yeteneği yatmaktadır (Özkahraman et al., 2024). Özellikle, kızılıcık ekstraktlarının kemoterapi ve radyoterapi tedavileriyle birlikte kullanıldığında, tedaviye duyarlılığı artırdığı ve kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç göstermesini engellediği gösterilmiştir. Şekil 1.6'da kızılıcık bitkisinin başlıca kızılıcık polifenollerinin yapıları verilmiştir (Prasain et al., 2019)

Kızılıcık bileşiklerinin kanser tedavisindeki etkileri, öncelikle hücrel düzeydeki moleküler mekanizmaları hedef alır. Kanser hücrelerinde bulunan NF- κ B, MAPK, ve PI3K/Akt gibi sinyal yollarının modülasyonu, kızılıcığın kanser üzerindeki etkilerinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu mekanizmalar, hücre büyümesi ve hayatta kalma sinyallerini düzenler. Kızılıcık bileşenleri, bu sinyal yollarını inhibe ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını engeller (Prasain et al., 2019).

Preklinik çalışmalar, kızılıcığın kanser öncesi ve erken evre kanser tedavisinde potansiyel bir tedavi aracı olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, kızılıcık bileşenlerinin kanser hücreleri üzerinde antimetastatik ve antitümör etkileri olduğu gözlemlenmiştir. (Weh et al., 2016) tarafından yapılan bir çalışma, kızılıcık özlerinin kolon kanseri hücrelerinde tümör büyümesini engellediğini ve metastatik potansiyeli azalttığını ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, prostat kanseri ve meme kanseri gibi diğer kanser türlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (McKay & Blumberg, 2007).

Kızılıcık, içeriğindeki biyolojik aktif bileşikler sayesinde kanser öncesi ve kanser tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. Hem tek başına hem de diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanıldığında, kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir ve tedaviye duyarlılığı artırabilir. Kızılıcığın anti-kanser etkileri, hücresel düzeydeki metabolik yolları ve moleküler sinyal iletim yollarını modüle etmesiyle gerçekleşir. Bu bulgular, kızılıcığın kanser tedavisinde destekleyici bir tedavi aracı olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Tanabe et al., 2011).



Şekil 1.6. Başlıca kızılıcık polifenollerinin yapıları (Prasain et al., 2019)

1.6. Bu Çalışmanın Katkısı ve Gelecek Potansiyeli

Bu çalışma, kemik kanseri tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım sunarak, cisplatin ve kızılçık ekstraktını birleştiren GelMA/Hap iskelelerin tasarımını ve karakterizasyonunu hedeflemiştir. Bu hibrid sistemin kontrollü ilaç salımı, antikanser etkinlik, osteojenik destek ve antiinflamatuvar özellikler sunarak, rejeneratif tıp alanında çağ atlatıcı bir potansiyele sahip olduğu değerlendirilmiştir. Özellikle, bu çalışma, biyoaktif materyallerin gelecekte klinik uygulamalar için optimize edilmesine yönelik önemli bir adım olarak konumlanmaktadır.

Çalışmada, kemik kanseri tedavisinde yeni bir yaklaşım olan biyomedikal mühendislik uygulamaları kullanılmıştır. Bu yaklaşım, geleneksel tedavi yöntemlerinin bazı yan etkilerini azaltma potansiyeline sahiptir. Çalışmada geliştirilen doku iskelesi, kemik dokusunun yapısal özelliklerini taklit eden bir yapıya sahiptir. Bu durum, kemik hücrelerinin doku iskelesine tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırmıştır. Doku iskelesi, kanser hücrelerini öldürücü veya büyümesini durdurucu etkiye sahip iki farklı madde içermektedir. Bu maddeler, birlikte çalışarak kanserin daha etkili bir şekilde tedavisini sağlayabilir. Çalışmada, doku iskelesinin kemik kanseri tedavisinde etkinliği ve güvenliği deneysel olarak araştırılacaktır. Bu durum, çalışmanın sonuçlarının klinik uygulamaya aktarılmasını kolaylaştırmıştır.

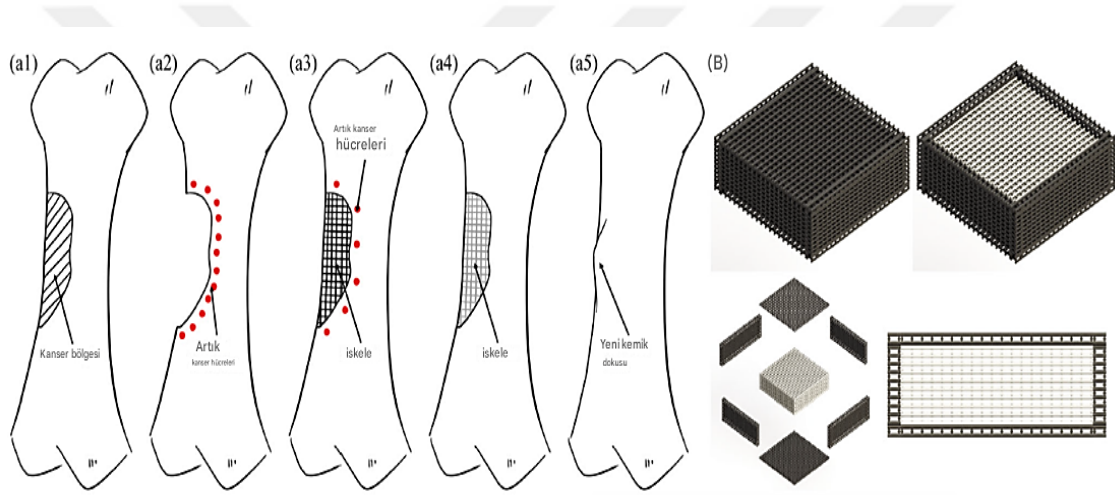
Özellikle, çalışmada geliştirilen doku iskelesinin kemik dokusunun yapısal özelliklerini taklit eden bir yapıya sahip olması, bu çalışmanın özgün değerini artırmaktadır. Bu durum, kemik hücrelerinin doku iskelesine tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırarak, doku iskelesinin kemik kanseri tedavisinde daha etkili olmasını sağlamıştır.

Ayrıca, çalışmada kullanılan cisplatin ve kızılçık bitkisi, kanser hücrelerini öldürücü veya büyümesini durdurucu etkiye sahip iki farklı maddedir. Bu maddelerin birlikte çalışarak kanserin daha etkili bir şekilde tedavisine katkı sağlayabilecek olması çalışmaya özgünlük katmaktadır. Aynı zamanda kızılçık ekstraktının *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı etkisi de ispatlanmıştır. Bu durum hastane enfeksiyonunu oluşturan bakteriye karşı etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada yapılmaktan istenen medikal yöntem Şekil 1.7’de verilmiştir.

Çalışmada üretilen tüm 3B baskılı doku iskelelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem, hücrelerin metabolik aktivitesine dayanarak

hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksosite hakkında bilgi sağlayan yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Motamedian et al., 2015). MTT, canlı hücrelerde bulunan NAD(P)H bağımlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından formazan kristallerine indirgenir. Formazan, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücüler yardımıyla çözülerek renkli bir çözeltinin oluşmasını sağlar. Bu çözeltinin rengi, hücresel metabolik aktivitenin bir göstergesi olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Üretilen doku iskeleleri üzerine hFOB ekilerek 1., 3. ve 7. günlerde hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın kemik kanseri tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği geliştirme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Aynı zamanda böyle bir çalışmanın yapılmamış olması bu malzeme alanı için ilk olması özgünlüğünü arttırmaktadır.



Şekil 1.7. Çalışmada hedeflenen medikal yöntem (Hou et al., 2022)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

GelMa sentezi için kullanılan malzemeler

- Tip A Jelatin (Merck Ltd.)
- 0,1 M Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltisi (CB)
- %94 Metakrilik Anhidrit
- 5 M Sodyum Hidroksit (NaOH)
- 6 M Hidroklorik Asit (HCl)

- Ultrasaf Su (Ultrapure Water)
- Glisidil metakrilat (Sigm-Aldrich)
- 12–14 kDa diyaliz tüpleri (Thermo Scientific).
- LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate)

Kızılıcık ekstraksiyonu için kullanılan malzemeler:

- Kızılıcık meyvesi
- Aseton
- Metanol
- Saf su
- Formik Asit
- Kaba filtre kağıdı

Diğer malzemeler;

- Hidroksiapatit (Sigma-Aldrich Ltd.)
- Cisplatin
- Hiyaluronik asit (Akçan Kimya)
- 0,22 µm şırınga filtresi

2.2. Yöntem

2.2.1. GelMA sentezi

İlk olarak, 300 gram jelatin, homojen bir çözelti elde etmek amacıyla 50 °C’de, 0,1 M karbonat-bikarbonat tampon çözeltisi (CB) (pH 9) içinde çözündürülmüştür. Bu işlem, manyetik bir karıştırıcı yardımıyla 500 rpm karıştırma hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, kullanılan tampon çözeltisi, jelatinin çözünmesini kolaylaştırmak ve reaksiyon koşullarını stabilize etmek için seçilmiştir.

Jelatin çözeltisi homojen hale geldikten sonra, metakrilasyon reaksiyonunu başlatmak için çözeltiye %94 metakrilik anhidrit yavaşça, damla damla eklenmiştir. Reaksiyon boyunca sıcaklık, sabit olarak 50 °C’ de tutulmuş ve çözeltinin pH’ı 9 civarında korunmuştur. Bu pH kontrolü, reaksiyon verimliliğini artırmak amacıyla 5 M sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek sağlanmıştır. Metakrilasyon işleminin tamamlanması için

çözeltinin 3 saat boyunca karıştırılması sağlanmıştır. Reaksiyon süresi dolduktan sonra, pH ayarlaması yapılmış ve reaksiyonun kontrollü bir şekilde sonlandırılması sağlanmıştır. Bunun için çözeltiliye 6 M hidroklorik asit (HCl) ilave edilerek pH değeri 7,4'e ayarlanmıştır.

Elde edilen metakrilatlanmış jelatin çözeltisi, reaksiyondan kaynaklanan safsızlıkların, kullanılmamış kimyasal maddelerin ve tuzların uzaklaştırılması için diyaliz yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu işlemde 14 kDa kesme sınırına sahip diyaliz tüpleri kullanılmış ve saflaştırma işlemi, ultrasaf su (ultrapure water) içinde, 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Diyaliz süresi toplamda 7 gün olarak belirlenmiş ve bu süre boyunca çözelti belirli aralıklarla yenilenmiştir.

Saflaştırma tamamlandıktan sonra, diyaliz edilen jelatin çözeltisi liyofilizasyon işlemine alınmıştır. Bu işlem, çözeltinin dondurularak kurutulmasını sağlayarak toz haline getirilmiştir. Elde edilen kuru toz formundaki GelMA, gelecekteki deneylerde kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır. Nihai ürün, -20 °C'de hava almayan bir ortamda muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Kızılçık ekstraksiyonu

Bu çalışmada, -80°C'de muhafaza edilen taze kızılçık meyveleri (*Vaccinium macrocarpon*) işleme alınmıştır. Meyvelerin çekirdekleri çıkarılmış ve toplamda 242,41 g olacak şekilde tartılmıştır. Daha sonra meyveler, blender yardımıyla parçalanarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Ekstraksiyon çözeltisi, %40:40:19:1 (v/v) oranında aseton/metanol/su/formik asit karışımı olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu oran, literatürde bildirilen bir çalışmadan uyarlanmıştır (Neto et al., 2006).

Ekstraksiyon işlemi sırasında ilk olarak formik asit ve su karışımı, homojenize edilen kızılçık püresine eklenmiştir. Ardından metanol ve aseton sırasıyla ilave edilerek karışım iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım, içerikteki ışığa duyarlı bileşiklerin korunması için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, 37°C sıcaklıkta ve çalkalamalı bir inkübatörde 24 saat gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3. Filtrasyon ve konsantre etme

Ekstraksiyon sürecinin ardından elde edilen karışım, filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve sıvı faz ile katı atık (posa) birbirinden ayrılmıştır. Filtrasyondan elde edilen

sıvı faz (filtrat), çözücülerin buharlaştırılması amacıyla rotary evaporator cihazına aktarılmıştır. Bu işlem, 53°C sıcaklık ve 300 Pascal basınç altında yaklaşık 4 saat boyunca sürdürülmüştür. İşlem sonucunda filtrat yoğunlaştırılarak daha konsantre bir forma getirilmiştir.

2.2.2.4.Kurutma işlemi

Yoğunlaştırılan filtrat, kalan nemin giderilmesi için 45°C’de bir fırında 48 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutma işlemini takiben, ürün tamamen kuru hale gelmesi amacıyla liyofilizatöre yerleştirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi tamamlandığında, elde edilen kuru ürün tartılmış ve nihai kütesinin 16,0146 g olduğu belirlenmiştir. Şekil 2.1’de kıızılcık ekstrakte edilmiş hali verilmiştir.



Şekil 2.1. Kızılcık ekstraktı

2.2.3. Hidroksiapatit partiküllerinin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan ticari hidroksiapatit, farklı boyutlarda partiküller içeren bir formda tedarik edilmiştir. Ancak, doku iskelesi üretiminde malzemenin homojen bir yapıya sahip olması büyük önem taşımaktadır. Homojenliği sağlamak ve partikül boyutlarındaki farklılıkların olumsuz etkilerini önlemek amacıyla hidroksiapatit partikülleri eleme işlemine tabi tutulmuştur.

Eleme işlemi, partiküllerin istenilen boyut aralığına getirilmesi için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 63 µm geçirgenliğe sahip bir elek kullanılmıştır (Şekil 2.2). Eleme sırasında, 63 µm'den daha büyük partiküller elenirken, iskelede kullanılacak uygun boyuttaki partiküller ayrıştırılmıştır. Bu süreç, doku iskelesinin mekanik dayanımını ve yüzey homojenliğini artırmaya yönelik kritik bir adım olarak değerlendirilmiştir.

İşlem boyunca, partikül boyutlarının eşitlenmesi hem malzeme homojenliğini sağlamakta hem de doku iskelesinin biyouyumluluk ve biyomekanik özelliklerini optimize etmektedir. Eleme işlemiyle ilgili süreç Şekil 2.2'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Hap eleme işlemi

2.2.4. Cisplatin ve kızcılık ekstraksiyonunun IC₅₀ değeri belirlenmesi

Çalışmada, kızcılık ekstraktı ve cisplatinin hFOB hücre hatları üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla deneysel bir protokol uygulanmıştır. Bu kapsamda, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu (96-well) kültür plakalarına hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler ekim işleminden sonra yaklaşık 12 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ içeren bir inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sürecini takiben, farklı konsantrasyonlarda cisplatin ve kızcılık ekstraktı hücrelere uygulanmıştır.

Uygulamanın ardından hücre canlılık oranları, 1. ve 3. günlerde MTT testi ile değerlendirilmiştir.

2.2.4.3. Cisplatin (Cp) çözeltisinin hazırlanması

Cisplatin çözeltisi, hücre kültürlerinde kullanılmak üzere uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Ticari olarak sağlanan cisplatin çözeltisinin başlangıç konsantrasyonu 1 mg/ml olarak belirtilmiştir. Bu çözeltiden, 1 molar (1 M) konsantrasyona sahip bir stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisi kullanılarak cisplatin, Tablo 2.1’de uygun olarak farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiş ve hücrelere uygulanmıştır. Denklem 2.1’de miktar hesaplama yöntemi verilmiştir.

Tablo 2.1. Hazırlanan cisplatin ve hacim miktarları

Miktarlar (μ M)	Miktarlar (mg/ml)	Cisplatinden alınan miktar (μ l)	Toplam hacim (ml)
1	0,0003011	0.48	1600
3	0.0009033	1.44	1600
6	0.0018066	3.04	1600
10	0,003011	4.8	1600
20	0,006022	9.6	1600
50	0,015055	24.088	1600
70	0,021077	33.72	1600
80	0,024088	98.5	1600
100	0,03011	48.18	1600

Cisplatinin molar konsantrasyonu, stok çözeltisinden şu şekilde hesaplanmıştır. Aynı zamanda birimlerin kıvılcık bitkisiyle aynı birimden olması için mg/ml şeklinde hesabı yapılmıştır:

$$1M \text{ cisplatin} = \frac{301,1g}{mol} \rightarrow \frac{1g}{\frac{301,1g}{mol}} = 3.33 \text{ mM} \quad \text{Denklem 2.1}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$3330\mu M * V_1 = 1\mu M * 1600\mu l$$

$$V_1 = 0.48\mu l$$

1 μ M cisplatini mg/ml konsantrasyon birimine çevirmek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır. Diğer birim hesaplamalarını da buna göre yapılmıştır.

$$\text{Molarite} * \text{mol kütlesi} = \text{mg/ml} \quad \text{Denklem 2.2}$$

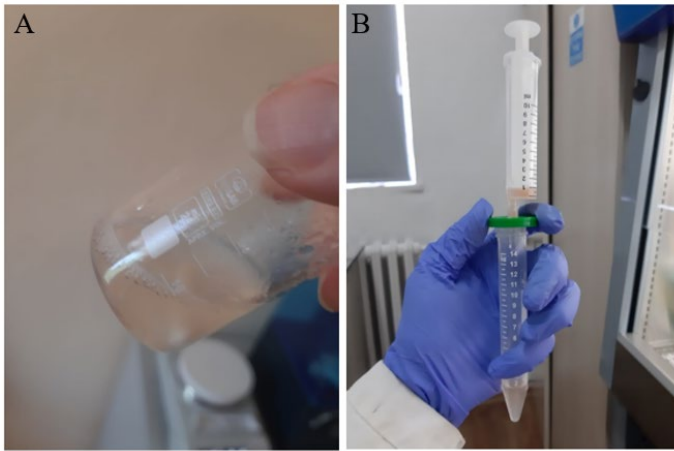
$$1 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{litre}} * \frac{301,1\text{g}}{\text{mol}} = \frac{0,0003011\text{g}}{\text{litre}}$$
$$\frac{0,0003011\text{g}}{\text{litre}} * \frac{1\text{litre}}{1000\text{ml}} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 0,0003011 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

2.2.4.4. Kızılçık ekstraktının hazırlanması ve uygulaması

Cisplatin çözeltisinin hazırlanmasına benzer bir şekilde kızılçık ekstraktı için de stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisi, 100 mg/ml konsantrasyona sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla, 1000 mg kızılçık ekstraktı, 10 ml F-12 medium içerisinde 40°C'de, 600 rpm hızında karıştırılarak çözündürülmüştür. Yaklaşık 40 dakikalık karıştırma işleminden sonra oluşan süspansiyon, 0.22 μ m por çapına sahip enjektör filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Şekil 2.3'te çözelti hazırlama ve filtrasyon basamağı gösterilmiştir. Kızılçık ekstraktının hücre kültürlerinde kullanılacak konsantrasyonları aşağıdaki hesaplama yöntemi ile belirlenmiştir. Denklem 2.2'de miktar hesaplama yöntemi verilmiştir. Kızılçık ekstraksiyon miktarları Tablo 2.2'de verilmiştir.

$$\frac{100\text{mg}}{\text{ml}} * V_1 = \frac{1\text{mg}}{\text{ml}} * 1600\mu l \quad \text{Denklem 2.2}$$

$$V_1 = 16\mu l$$



Şekil 2.3. A) Kızılçık ekstraksiyonunun hazırlanması B) Kızılçık solüsyonun filtrasyonu

Tablo 2.2. Hazırlanan kızılçık ve hacim miktarları

Miktarlar (mg/ml)	Kızılçıktan alınan miktar (μ l)	Toplam hacim (ml)
1	16	1600
3	48	1600
6	96	1600
10	160	1600
20	320	1600
50	800	1600
70	1120	1600
80	1280	1600
100	1600	1600

2.2.4.5.Hücre canlılık analizi (MTT testi)

Kızılçık ekstraktı ve cisplatin uygulamalarını takiben, hücre canlılığı MTT testi ile ölçülmüştür. Bu amaçla, $5 \cdot 10^3$ hFOB, 37°C 'de ve %5 CO_2 ortamında büyütülmüştür. Hücreler %80-90 yayılma oluşturduktan sonra belirlenen ilaçlar uygulanmıştır. MTT mix çözeltisi 1 ve 3. gün sonrasında, 1:2 oranında (1 birim MTT çözeltisi ve 2 birim medium) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kuyucuklara eklendikten sonra hücreler, 37°C 'de ve %5 CO_2 ortamında 2,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından, kuyucuklardaki MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve üzerine DMSO eklenmiştir. Hücre canlılığı, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda ölçülmüştür.

2.2.5. Solüsyonların hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılan solüsyonlar, belirli konsantrasyonlarda GelMA, Hap, HA, cisplatin ve kızılçık ekstraktı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Solüsyonların hazırlanma süreci aşağıdaki basamaklar halinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.3.GelMA çözeltisinin hazırlanması

GelMA (20%, w/v) çözeltisi, 30°C 'de, 200 rpm hızında karıştırılarak PBS (phosphate-buffered saline) içerisinde çözündürülmüştür. Tam çözünme sağlanana kadar karıştırma işlemi sürdürülmüştür.

2.2.5.4.Hap ve hiyalüronik asit ilavesi

GelMA çözeltisine %30 (w/v) Hap ve gerekli miktarda hiyalüronik asit eklenmiştir. Karışımın homojenliği, 300 rpm hızında en az 30 dakika boyunca karıştırılarak sağlanmıştır.

2.2.5.5.İlaç ve kızılçık ekstraktının eklenmesi

Çözeltiye, belirlenen konsantrasyonlarda cisplatin ve kızılçık ekstraktı eklenmiştir. Kullanılan ilaç ve ekstrakt miktarları Tablo 3'te belirtilmiştir.

2.2.5.6.LAP ilavesi ve karıştırma

Karışım tamamlandıktan sonra, polimerizasyonu başlatmak amacıyla uygun miktarda LAP (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate) eklenmiştir. LAP eklenmesinin ardından, tüm bileşenlerin homojen bir şekilde dağılması için karışım tekrar karıştırılmıştır. Hazırlanan deney grupları Tablo 2.3, Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.3. İlk deneme Grup isimlendirmesi ve doku iskelesi içeriği

	GelMA (%)	Hap (%)	Hap boyut (micrometer)	HA (%)	LAP (%)
Grup 1	20	10	200	1	1
Grup 2	20	20	200	1	1
Grup 3	20	30	200	1	1
Grup 4	20	40	200	1	1
Grup 5	20	50	200	1	1

Tablo 2.4. Diğer denemeler sonrasında baz doku iskelesinin içeriğinin belirlenmesi

	GelMA (%)	Hap (%)	Hap boyut (µm)	HA (%)	LAP (%)
GelHap10	20	10	63	1	0,5
GelHap20	20	20	63	1	0,5
GelHap30	20	30	63	1	0,5

Tablo 2.5. Kızılıcık ve Cisplatin yüklü doku iskelelerinin belirlenmesi

	GelMA (%)	Hap (%)	Cisplatin (mg/ml)	Kızılıcık Ekstraktı (mg/ml)
GelHap30-CP1-CR1	20	30	0,0006022	2
GelHap30-CP2-CR2	20	30	0,0012366	4,818
GelHap30-CP3-CR3	20	30	0,0024088	8

2.2.6. DLP basım yöntemi

Doku iskelesi üretiminde DLP 3B yazıcı teknolojisi kullanılmıştır. Bu teknoloji, ışığa duyarlı fotopolimer malzemelerin katman katman polimerizasyonunu sağlayarak, yüksek hassasiyetli ve kontrollü doku iskelesi yapıları elde edilmesini sağlamaktadır (Ayran et al., 2024). Baskı sürecinde kullanılan temel parametreler Tablo 2.6’da verilmiştir.

Tablo 2.6. DLP basım yönteminde kullanılan parametreler

Parametre	Değer
Bottom Layer	1,0
Exposure off	2,0 (s)
Bottom exposure	10,0 (s)
Normal exposure	20,0 (s)

2.2.7. Doku iskelelerin karakterizasyonu

2.2.7.3. İskele yapıların morfolojik analizleri (SEM)

Üretilen doku iskelesinin yüzey özelliklerini ve gözenek yapısını incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SEM (EVO MA-10 Carl Zeiss, ABD) cihazı kullanılmıştır. SEM analizinden önce, numuneler yüzey iletkenliğini artırmak ve daha net görüntüler elde etmek için yaklaşık 2 dakika boyunca Sputter Coater (QUORUM SC7620) kullanılarak düşük vakum altında altın ile kaplanmıştır. Yüzey morfolojisinin, gözenek boyutlarının ve homojenliğin değerlendirilmesi için uygun büyütme oranlarında görüntüleme yapılmıştır.

2.2.7.4.Doku iskelelerinin termal analizi (DSC)

Çalışmada, üretilen doku iskelelerinin termal özelliklerini incelemek için Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) cihazı kullanılmıştır. Analiz işlemleri, 25°C ile 500°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Numuneler, azot atmosferi altında ve sabit bir ısıtma hızıyla analiz edilmiştir. Bu analiz sırasında, numunenin termal stabilitesi, faz geçişleri ve erime davranışı gibi özellikler kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, doku iskelesinin uygulama sırasında karşılaşılabileceği sıcaklık koşullarına uygunluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Termal analiz sonuçları, iskelenin yapısal bütünlüğünün ısı işlem koşullarında korunup korunamayacağına dair önemli bilgiler sağlamıştır.

2.2.7.5.İskele yapılarının mekanik analizi

Üretilen doku iskelelerinin mekanik dayanımını değerlendirmek amacıyla basma testi gerçekleştirilmiştir. Testler, numunelerin biyomekanik özelliklerini belirlemek ve doku iskelesinin uygulama sırasında karşılaşılabileceği mekanik yükler altındaki davranışını incelemek için yapılmıştır. Numuneler, Shimadzu (Japonya) cihazında 1 mm/dakika deformasyon hızında teste tabi tutulmuştur. Numunelerin basma modülünü hesaplamak için yük-deformasyon eğrileri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, doku iskelesinin biyomekanik uygunluğunu ve elastik davranışını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Doku iskelesinin çekme dayanımını belirlemek için çekme testleri gerçekleştirilmiştir. Testler, numunelerin elastik modülü, maksimum gerilme dayanımı ve kopma uzaması gibi mekanik özelliklerini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Numuneler, Shimadzu cihazında 2 mm/dakika çekme hızı ile test edilmiştir. Çekme testinden elde edilen yük-uzama eğrileri, numunenin mekanik dayanımını ve elastik özelliklerini incelemek için analiz edilmiştir. Sonuçlar, iskelenin biyolojik ortamda hücre sel büyümeyi desteklerken mekanik stabiliteyi de sağlayabileceğini göstermek için yorumlanmıştır.

2.2.7.6.Doku iskelelerin şişme ve degradasyon analizi

Bu çalışmada, doku iskelelerinin şişme ve degradasyon davranışları gravimetrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk olarak, yeni üretilen tüm iskeleler oda sıcaklığında 3 gün boyunca kurutulmuş ve ardından hassas bir terazi kullanılarak başlangıç ağırlıkları (W_0) ölçülmüştür. Şişme testinde, kuru numuneler 37°C’de ve pH 7.4’e sahip PBS içerisine daldırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında, numuneler PBS’ten çıkarılmış,

yüzeyde biriken sıvı faz filtre kağıdı ile dikkatlice alınmış ve tekrar tartılmıştır (W_s). Şişme oranı, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Denklem 2.3'te Şişme oranı hesaplaması verilmiştir.

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \frac{W_s - W_o}{W_o} * 100 \quad \text{Denklem 2.3}$$

Bu formülde, W_o kuru iskelenin başlangıç ağırlığını, W_s ise belirli zaman aralıklarında tartılan şişmiş ağırlığını ifade etmektedir. Testler üç bağımsız numune üzerinden gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler ortalama değerler ve standart hata ile sunulmuştur.

Degradasyon testi, şişme testine benzer bir protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve başlangıç ağırlığı ölçülen iskeleler (W_o), her biri 5 mL pH 7.4 PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Numuneler, 37°C'de tutularak belirli zaman aralıklarında PBS'ten çıkarılmış ve üç kez deiyonize su ile durulanmıştır. Ardından, iskeleler bir gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve son ağırlıkları (W_s) kaydedilmiştir. Degradasyon oranı şu denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Denklem 2.4'te degradasyon oranı hesabı verilmiştir.

$$\text{Degradasyon Oranı (\%)} = \frac{W_o - W_s}{W_o} * 100 \quad \text{Denklem 2.4}$$

Bu hesaplamada, W_o iskelenin başlangıçtaki kuru ağırlığını, W_s ise belirli zaman aralıklarında ölçülen kuru ağırlığını göstermektedir. Tüm deneyler üç farklı numune ile tekrarlanmış, veriler ortalama ve standart hata değerleriyle birlikte rapor edilmiştir.

2.2.7.7.Doku iskelelerinin kimyasal analizi (FTIR)

Çalışmada, üretilen doku iskelelerinin kimyasal yapısını incelemek için Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. Analizler, JASCO-4000 FTIR (ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ölçümler iletim modu aracılığıyla yapılmıştır. Spektrumlar, 4000 ile 400 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükle elde edilmiştir.

FTIR analizi sırasında, numunelerin ışık geçirgenliği değerleri (%T) kaydedilerek, iskele yapısında bulunan kimyasal bağlar ve fonksiyonel gruplar tanımlanmıştır. Bu yöntem, doku iskelesinin bileşimsel doğruluğunu değerlendirmek ve kullanılan malzemelerin kimyasal özelliklerini detaylı bir şekilde ortaya koymak amacıyla uygulanmıştır. Analiz

sonuçları, iskele yapısında bulunan karakteristik fonksiyonel grupları belirlemek için kullanılmıştır.

2.2.7.8.Doku iskelelerinden ilaç salımı

Bu çalışmada, üretilen doku iskelelerinin ilaç salım profillerini incelemek için *in vitro* salım testi gerçekleştirilmiştir. Her bir test için, 15 mg ağırlığındaki doku iskeleleri steril 2 mL tüplere yerleştirilmiş ve üzerlerine 1 mL fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.4) eklenmiştir. Tüpler, 37°C sabit sıcaklıkta ve çalkalamalı bir inkübatörde salım işlemi için bekletilmiştir.

Belirlenen zaman aralıklarında (15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat, 4 gün, 5gün 6 gün ve 7. gün) tüplere içerisindeki çözültiden 1 mL örnek alınmıştır. Alınan örnekler, her bir kuyucuk 1 mL olacak şekilde 48 kuyucuklu kültür plakalarına aktarılmıştır. Örnekleme işleminin ardından, tüplerde kalan çözültinin yerine taze 1 mL PBS eklenmiştir. Bu işlem, tüm zaman aralıklarında tekrarlanarak ilaç salımının devamlılığı sağlanmıştır.

Örneklerin ilaç konsantrasyonları, bir UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak cisplatin ilacı için 305nm ve kızılötesi ekstrasizyonu için 280nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür ((Prasain et al., 2019; Romani, 2022)). Ölçüm sonuçları, salınan ilacın miktarını belirlemek amacıyla daha önce hazırlanmış kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmıştır.

Bu yöntem, iskelelerin ilaç salım özelliklerini ayrıntılı bir şekilde incelemek ve kontrollü salım kapasitelerini değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır (Ayran et al., 2024).

2.2.7.9.Hücreli doku iskelelerinin karakterizasyonu

hFOB hücrelerinin büyüülmesi

Hücreler Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, F-12 %10 FBS ve %1 Penisilin/Stroptomycin ile zenginleştirilmiş Gibco) içerisinde kültürlenmiştir. Kültür ortamına, 2×10^6 hücre/ml yoğunluğunda hücre eklenmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde, 37°C'de inkübe edilmiştir. Kültür ortamı her iki günde bir yenilenmiş, hücreler yaklaşık %80 konfluansa ulaştığında tripsin-EDTA (Gibco) kullanılarak tripsinize edilmiştir.

MTT testi için 96 kuyucuklu kültür plakaları hazırlanmıştır. Her kuyucuktaki iskele başına yaklaşık 5×10^3 hücre ekilmiştir. Doku iskeleleri üzerine ekilen hücreler, belirlenen

sürelerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklara MTT çözeltilisi eklenmiş ve hücreler 37°C’de karanlık bir ortamda 2,5 saat bekletilmiştir. Daha sonra, kuyucuklardan sıvı ortam uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa DMSO eklenerek formazan kristalleri çözülmüştür. Elde edilen çözeltilerin absorbansı, 570 nm dalga boyunda bir mikroparka okuyucusu kullanılarak ölçülmüştür. Her deney, üç kez tekrarlanmıştır ve sonuçlar ortalama standart hata olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, her inkübasyon sonrası hücrelerin morfolojik durumu ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin çekirdek yapılarını ve aktin filamentlerini görüntülemek için DAPI ve Alexa Fluor® 488-phalloidin boyaları kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücreler, PBS ile üç kez yıkanmış ve %4 paraformaldehit çözeltilisi ile 15 dakika süreyle sabitlenmiştir. Sabitlenen hücreler, permeabilizasyon işlemi için %0,1 Triton X-200 çözeltilisi ile 5 dakika boyunca muamele edilmiştir. Daha sonra, DAPI ve Alexa Fluor 488® boyaları, üretici talimatlarına uygun şekilde hazırlanarak numunelere uygulanmış ve belirli bir süre inkübe edilmiştir. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve floresan mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

SEM hücre numuneleri 3 ve 7 gün boyunca hFOB ile aynı ortamda tutulan GelHap30 grubu, morfolojilerini değerlendirmek için SEM ile incelendi. Hücrelere zarar vermeden kültür ortamından çıkarılan GelHap30 grubu, 0,1 m kakodilat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı ve 20 dakika boyunca %2,5 glutaraldehitte fiksasyon yapıldı. SEM analizine hazırlanmak için örnekler daha sonra 2 saat boyunca dondurularak kurutuldu.

2.2.7.10. Bitki ekstraksiyonun antimikrobiyal testi

İlgili bakteri türleri, besiyeri olarak kullanılan Mueller-Hinton Agar (MHA) ortamına inoküle edilmiştir. Bakteriler, 18-24 saat 37°C’de inkübe edilerek gece kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen bakteri kültürleri, densiteleri McFarland 0,5 standardına göre ayarlanarak (yaklaşık $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır.

Hazırlanan bakteri süspansiyonları, steril pamuklu çubuklar yardımıyla Mueller-Hinton Agar plakalarının yüzeyine eşit bir şekilde yayılmıştır. Bu işlem, agar yüzeyinde homojen bir bakteri tabakası oluşturmak için dikkatlice gerçekleştirilmiştir.

Besiyeri üzerinde oluşturulan bakteri tabakasına, steril bir alet kullanılarak 6 mm çapında kuyular açılmıştır. Açılan kuyuların birbirlerine eşit mesafede ve çaplarının standartlara uygun olmasına dikkat edilmiştir.

Kızılçık ekstraktının farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltileri, her kuyuya 100 µL olacak şekilde dikkatlice eklenmiştir. Kuyuların taşmaması ve numunenin kuyulara homojen olarak dağıtılması sağlanmıştır.

Numune uygulanan MHA plakaları, ters çevrilerek inkübatöre yerleştirilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu süreçte numunenin bakteriler üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için uygun süre ve sıcaklık koşulları sağlanmıştır.

İnkübasyonun ardından, agar yüzeyinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları, hassas bir şekilde cetvel yardımıyla ölçülmüştür. İnhibisyon zon çaplarının milimetre (mm) cinsinden değerleri kaydedilerek antibakteriyel aktivite değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların inhibisyon zonu çapları arasındaki farklar incelenmiş ve konsantrasyona bağlı etkinlik değerlendirilmiştir.

2.2.7.11. Partikül boyutu ve yüzey yükü analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) (Malvern Zetasizer ZEN3690, ABD) ve zeta potansiyel ölçümleri için numuneler şu şekilde hazırlanmıştır: 0,01 g nanopartikül tozu, 20 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. Homojen bir süspansiyon elde etmek için karışım bir manyetik karıştırıcıda belirli bir süre karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, partiküllerin boyut dağılımını ve yüzey yükünü etkileyebilecek büyük parçacıkların uzaklaştırılması amacıyla Whatman No. 1 filtre kağıdından süzülmüştür.

Filtrasyonun ardından, elde edilen süpernatant DLS ve zeta potansiyel analizleri için doğrudan kullanılmıştır. Ölçümler sırasında süpernatant, küvetlere dikkatlice transfer edilmiş ve cihazın talimatlarına uygun şekilde analiz edilmiştir.

2.2.7.10. *In vitro* çizgi testi

24 kuyucuklu kültür plakalarına (well plate) 30.000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda hFOB ekilmiştir. Hücreler, %10 FBS ve %1 P/S içeren standart hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde gerçekleştirilmiştir.

Doku iskelelerinin hazırlanması ve standartlara uygun olarak test edilmesi için ISO 10993-Part 12 protokolü uygulanmıştır. Bu kapsamda, her bir doku iskelesi tartılmış ve 0,1 g doku iskelesi başına %2,5 FBS ve %1 P/S içeren F12 DMEM çözeltisi eklenmiştir. Doku iskeleleri, 37°C'de 24 saat inkübe edilerek test için hazır hale getirilmiştir.

İnkübasyonun ardından, konfluent duruma ulaşmış hücrelerin ilk halleri ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Her bir kuyucuktaki hücreler, 200 µL pipet ucu kullanılarak çizilmiştir. Çizim işleminin ardından, medyum ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler DPBS ile nazikçe yıkanmıştır.

Yıkama işleminden sonra, iskeleler ile hazırlanan ve önceden 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş medyumlar kuyucuklara eklenmiştir. Hücrelerin iyileşme ve büyüme süreçleri sırasıyla 0., 2., 4., 13., 15. ve 26. saatlerde mikroskop ile görüntülenmiştir.

Kontrol grubundaki doku iskelelerinde diğer deney gruplarına kıyasla anlamlı bir hücre büyümesi gözlenmemiştir. Bu durum, doku iskelelerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için diğer gruplarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Cisplatin ve Kızılçık Ekstraksiyonunun IC₅₀ Değeri Belirlenmesi

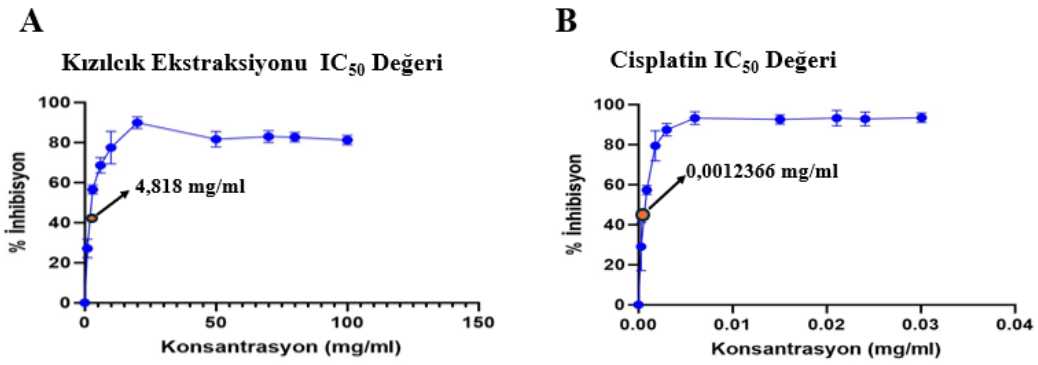
Cisplatin ve kızılçık ekstraktının hücre üzerindeki inhibitör etkileri IC₅₀ değerleri ile analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, cisplatin için IC₅₀ değeri 0,0012366 mg/ml (4,107 µM), kızılçık ekstraktı için ise 4,818 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Cisplatinin IC₅₀ değeri, literatürde bildirilen ve farklı kanser hücre hatlarında gözlemlenen değerlere oldukça yakın bir aralıkta bulunmuştur. İnsan osteosarkom hücrelerinde yapılan bir çalışmada, cisplatin IC₅₀ değerinin genellikle 3–5 µM arasında olduğu rapor edilmiştir (Fanelli et al., 2020) Bu durum, cisplatinin düşük konsantrasyonlarda bile yüksek etkinliğe sahip olduğunu ve etkili bir kemoterapötik ajan olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır.

Kızılçık ekstraktı için belirlenen IC₅₀ değeri ise doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerini değerlendiren diğer çalışmalardaki sonuçlarla uyumludur. Kızılçık, proantosiyanidinler

gibi fenolik bileşikler açısından zengin olup, bu bileşiklerin oksidatif stres düzenleyici ve hücre büyümesini inhibe edici özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Seeram et al., 2004) .Bununla birlikte, IC₅₀ değerinin farmasötik ajanlara kıyasla daha yüksek olması, doğal ürünlerin biyolojik etkinliklerinin yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıktığını göstermektedir.

Bu bulgular, cisplatinin hücre büyümesini DNA hasarı yoluyla doğrudan inhibe eden güçlü bir antikanser ajan olduğunu, kıızılık ekstraktının ise antioksidan ve inflamasyon düzenleyici mekanizmalar aracılığıyla daha destekleyici bir rol oynadığını işaret etmektedir. Sonuç olarak, her iki maddenin hücre büyümesini baskılayıcı etkileri doğrulanmış ve bu etkiler farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşmiştir. Şekil 3.1' de kıızılık ekstraksiyonu ve cisplatin ilacının IC₅₀ değer tablosu gösterilmiştir.



Şekil 3.1. A) Kızılcık ekstraktının IC₅₀ değeri B) Cisplatin ilacının IC₅₀ değeri

3.2. Doku İskelelerin Karakterizasyonu

3.2.1. İskele yapıların morfolojik analizleri (SEM)

Hibrid grup olarak belirlenen ve içeriği oluşturulan GelHap grupları Tablo 5'te verildiği gibi hazırlanmıştır. Kızılcık ekstraktı ve cisplatin içeren gruplar için belirlenen 3 farklı doku iskelesi içeriği ve en iyi sonuç veren GelHap30 doku iskelesinin SEM cihazı ile morfolojik yapısı incelenmiştir.

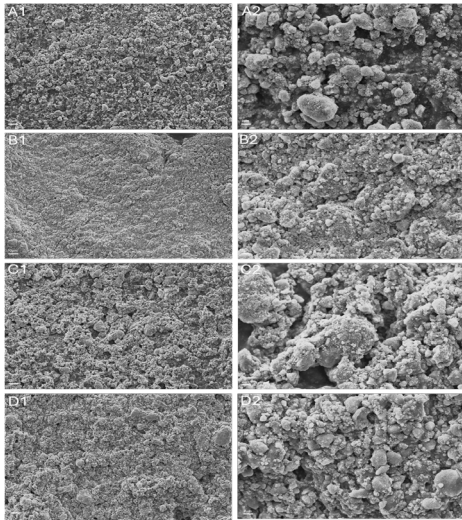
Özellikle GelHap30-CP1-CR1 grubunun düşük konsantrasyonda kıızılık ekstraktı ve cisplatin içermesine rağmen, gözenekli yapısı ve uygun partikül dağılımı ile hücrel proliferasyonu desteklediği gözlemlenmiştir. SEM görüntüleri, yüzeyin homojen

olmayan ancak biyolojik uyumluluk açısından kabul edilebilir düzeyde olduğunu göstermiştir. Kızılıcık ekstraktı ve cisplatinin düşük konsantrasyonlarda kullanımı, toksisiteyi sınırlarken, kontrollü bir antikanser etki sağlamıştır.

GelHap30-CP2-CR2 grubu, homojen gözenek yapısıyla dengeli bir performans sergilemiş ancak yüksek konsantrasyondaki GelHap30-CP3-CR3 grubu, yüzey yoğunluğu nedeniyle hücre penetrasyonunu sınırlayıcı bir yapı göstermiştir. GelHap30 grubu ise antikanser ve antioksidan etkilerden yoksun olmasına rağmen hücresel büyüme için uygun bir mikro çevre sunmuştur.

Literatürle uyumlu olarak, düşük fenolik bileşik ve cisplatin konsantrasyonlarının biyolojik etkinliği artırdığı ve toksisiteyi azalttığı sonucuna varılmıştır (Kumar et al., 2019). GelHap30-CP1-CR1 grubunun bu özellikleri hem biyolojik uyumluluk hem de antikanser etkiler açısından umut vadetmektedir.

Sonuç olarak, GelHap30-CP1-CR1 grubu, kontrollü içeriği sayesinde hücresel büyüme ve biyolojik uyumluluk açısından başarılı bir yapı sunmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında bu tür dengeli tasarımlar, biyolojik ve mekanik gereksinimleri karşılamak için etkili bir yaklaşım olabilir. Şekil 3.2’de doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2. A1 (GelHap30-CP1-CR1), B1 (GelHap30-CP2-CR2), C1 (GelHap30-CP3-CR3), D1 (GelHap30) 1X büyütme görüntüsü, A2 (GelHap30-CP1-CR1), B2 (GelHap30-CP2-CR2), C2 (GelHap30-CP3-CR3), D2 (GelHap30) 5X büyütme görüntüsü

3.2.2. Doku iskelelerinin termal analizi (DSC)

GelHap30, GelHap30-CP1-CR1, GelHap30-CP2-CR2 ve GelHap30-CP3-CR3 doku iskelelerinin termal davranışları DSC analizi ile incelenmiştir. Elde edilen veriler, kızılçık ekstraktı ve cisplatin içeriğinin doku iskelelerinin termal stabilitesi üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermektedir.

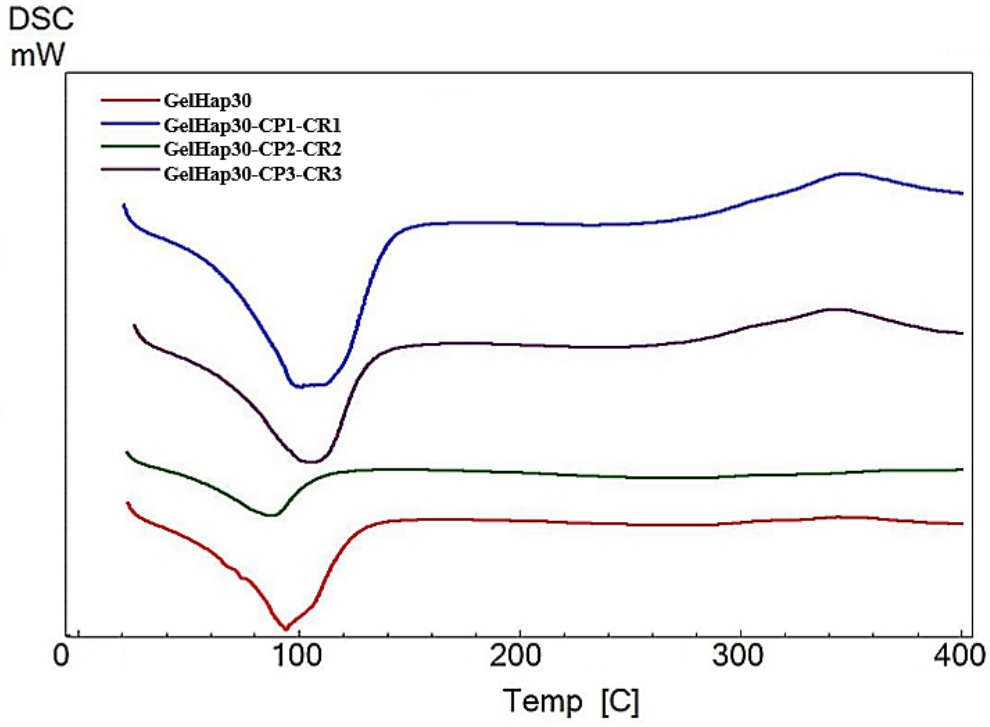
GelHap30 grubunda, 94,3°C'de belirgin bir erime sıcaklığı tespit edilmiştir. Bu durum, kızılçık ekstraktı ve cisplatin içermeyen bu iskelelerin, temel bileşenlerinin termal özelliklerini yansıttığını göstermektedir.

GelHap30-CP1-CR1 grubunda, erime sıcaklığının 87,7°C'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Düşük konsantrasyondaki kızılçık ekstraktı ve cisplatin içeriğinin, iskelelerin termal stabilitesini olumsuz etkilediği ve yapının termal dayanıklılığını azalttığı anlaşılmaktadır.

GelHap30-CP2-CR2 grubunda ise, erime sıcaklığının 106,2°C'ye yükseldiği saptanmıştır. Orta düzeydeki kızılçık ekstraktı ve cisplatin içeriğinin, iskelelerin termal stabilitesini artırdığı ve yapının termal dayanıklılığını olumlu yönde etkilediği görülmektedir.

GelHap30-CP3-CR3 grubunda, erime sıcaklığının 101,4°C olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyondaki kızılçık ekstraktı ve cisplatin içeriğinin, termal stabiliteyi artırdığı ancak bu etkinin orta düzey konsantrasyon kadar belirgin olmadığı anlaşılmaktadır.

Doku iskelelerinde katkı maddelerinin homojen dağılımının termal dayanıklılığı artırabileceği, ancak yüksek katkı konsantrasyonlarının yapının stabilitesini olumsuz etkileyebileceği daha önce de belirtilmiştir (Shi et al., 2021). Özellikle, organik ve inorganik katkıların dengeli bir şekilde dağıtılması, termal stabiliteyi optimize etmek açısından kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda da GelHap30-CP2-CR2 grubunun, bu dengenin sağlandığı en uygun yapı olduğu görülmüştür. Şekil 10' da belirtilen doku iskelelerinin DSC grafiği verilmiştir. Şekil 3.3 ve Tablo 3.1'de DSC değerleri verilmiştir.



Şekil 3.3. 0°C -400°C arasında belirtilen malzemelerin DSC grafiği

Tablo 3.1. Belirtilen doku iskelelerinin T_{onset} : T başlangıç sıcaklığı, T_{peak} : Zirve sıcaklığı, T_{endset} : Bitiş sıcaklığı

Numune	Başlangıç Sıcaklığı (T_{onset}) (°C)	Zirve Sıcaklığı (T_{peak}) (°C)	Bitiş Sıcaklığı (T_{endset}) (°C)
GelHap30	85.5	94.3	115.3
GelHap30-CP1-CR1	75.3	87.7	96.9
GelHap30-CP2-CR2	86.5	106.2	123.8
GelHap30-CP3-CR3	92.5	101.4	130.8

3.2.3. İskele yapılarının mekanik analizi

Farklı konsantrasyonlarda saf GelHap gruplarına sahip hidrojeller ve ilaç yüklü hibrid iskelelerin basma testi sonuçları ile yüzdelik uzama değerleri Tablo 8’de sunulmuştur. Saf gruplar ile ilaç eklenmiş gruplar arasında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, saf gruplar arasında Hap konsantrasyonunun artışı ile basma dayanımında anlamlı bir yükselme gözlenmiştir. Özellikle, GelHap30 grubu 6.91 ± 0.06 MPa basma dayanımı ile saf gruplar arasında en yüksek dayanım değerine ulaşmıştır.

Hap mikro ve nanopartiküllerinin yoğunluğundaki artışın, sıkıştırma işlemi sırasında yüzdelik uzama değerlerinde hafif bir azalma eğilimine neden olduğu görülmüştür. Buna karşılık, ilaç konsantrasyonlarının hibrid iskelelerin basma dayanımı üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Yüzdelik uzama değerlerinin tüm gruplar için %20 ile %29 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular üretilen iskelelerin kemik doku uygulamaları için potansiyel bir biyomalzeme olduğunu göstermektedir. Özellikle, basma dayanımının trabeküler kemik dokusu için literatürde minimum gereklilik olarak belirtilen 2 MPa değerini aşması (Obada et al., 2021), bu malzemelerin kemik doku uygulamalarında kullanımına yönelik umut vadettiğini ortaya koymaktadır. Tablo 3.2’ de değerler verilmiştir.

Tablo 3.2. Grupların basma ve çekme test değerleri

Grup	Basma dayanımı (MPa)	Uzama (%)
GelHap10	6.41 ± 0.10	28.9 ± 2.1
GelHap20	6.72 ± 0.01	27.8 ± 1.4
GelHap30	6.91 ± 0.06	24.0 ± 1.3
GelHap30-CP1-CR1	6.91 ± 0.09	25.1 ± 2.2
GelHap30-CP2-CR2	6.89 ± 0.10	23.7 ± 1.8
GelHap30-CP3-CR3	6.90 ± 0.05	24.3 ± 2.1

3.2.4. Doku iskelelerin şişme ve degradasyon analizi

Doku iskelelerinin su absorpsiyon kapasiteleri, doku iskelelerinin biyolojik sistemlere adaptasyonu açısından önemli bir parametredir. Çalışmanın sonuçları, GelHap30-CP3-CR3 grubunun en yüksek şişme oranına (~450%) ulaştığını ve bu durumun yüksek miktardaki hidroksiapatit ve polimer içeriğinden kaynaklandığını göstermiştir. GelHap30-CP2-CR2 grubu ise yaklaşık %400'lük bir şişme oranıyla dengeli bir yapı sergilemiştir. Bu özellik, hücresel rejenerasyonu desteklerken mekanik stabiliteyi korumak açısından ideal bir performansa işaret etmektedir.

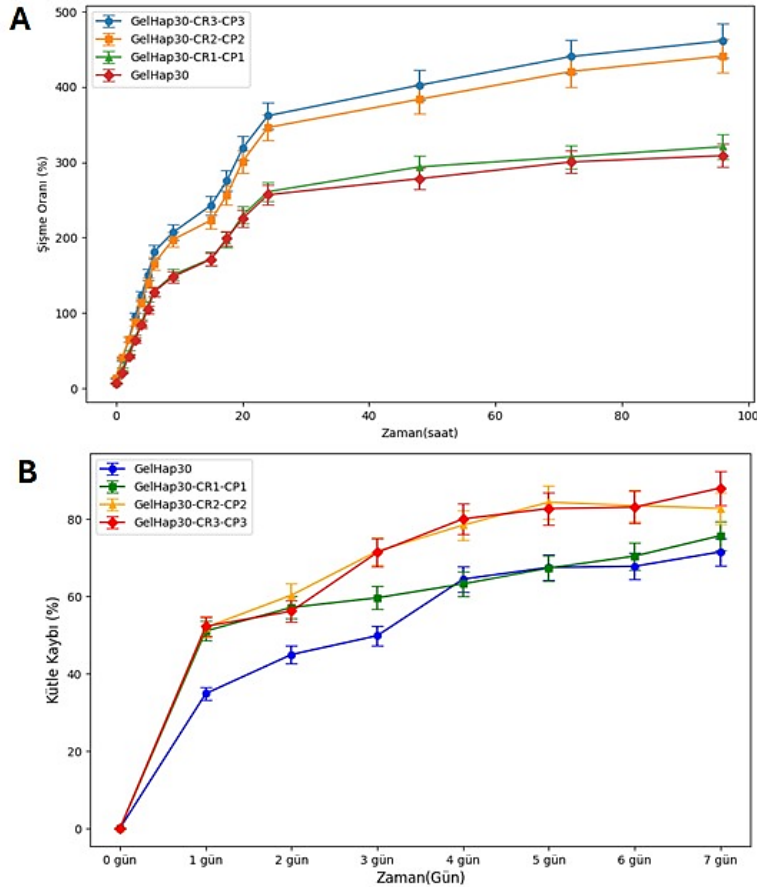
GelHap30-CP1-CR1 grubunda gözlenen yaklaşık %300'lük şişme oranı, düşük kızılçık ekstraktı ve cisplatin miktarına bağlı olarak daha sınırlı bir su tutma kapasitesi göstermiştir. Ancak bu durum, kontrollü su absorpsiyon kapasitesi ve mekanik dayanıklılık açısından avantaj sağlayabilir. Diğer yandan, GelHap30 grubunda şişme oranı ~250% olarak ölçülmüş ve katkı maddesi içermemesi nedeniyle en düşük su absorpsiyon kapasitesini sergilemiştir. Literatürde belirtildiği üzere, yüksek şişme oranları metabolit değişimi ve besin taşınmasını kolaylaştırırken, aşırı şişme mekanik stabiliteyi olumsuz etkileyebilir (Zhang et al., 2018). Bu bağlamda, GelHap30-CP2-CR2 grubu, biyolojik ve mekanik gereksinimler açısından dengeli bir performans göstermektedir. Şişme ve bozunma grafiği Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Bozunma analizleri, doku iskelelerinin biyolojik ortamda biyobozunurluk özelliklerini değerlendirmek için yapılmıştır. GelHap30-CP1-CR1 grubunda, bozunma oranı ilk iki gün içinde hızlı bir artış göstermiş (~%60) ve daha sonra stabilize olmuştur. Bu durum, düşük kızılçık ekstraktı ve cisplatin içeriğinin yapı iskelelerinde daha kontrollü bir bozunma süreci sunduğunu ortaya koymaktadır.

GelHap30-CP2-CR2 grubunda bozunma oranı, yedinci gün sonunda %80'in üzerine çıkmıştır. Bu grubun biyobozunurluk profili, kontrollü ilaç salımı ve hücre büyümesini destekleyen bir yapıyı temsil etmektedir. GelHap30-CP3-CR3 grubunda ise bozunma oranı en yüksek seviyeye ulaşmış (%85–90) ve katkı maddelerinin fazla miktarda bulunması nedeniyle daha hızlı bir bozunma göstermiştir. Ancak bu durum, mekanik dayanıklılığın korunmasını zorlaştırabilir. GelHap30 grubunun en düşük bozunma oranını (~%40) göstermesi, yoğun yapısal özelliklere ve katkı maddesi içermemesine bağlıdır.

Bu özellik, uzun süreli stabilite gerektiren uygulamalar için bu grubu avantajlı hale getirebilir. Bozunma grafiği Şekil 6'da gösterilmiştir.

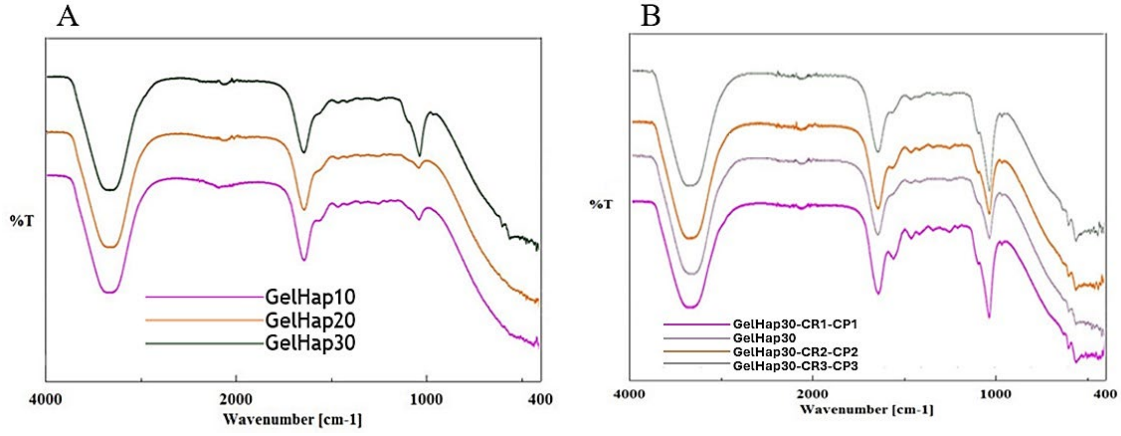
Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, iskelelerin kompozisyonlarındaki kızılılık ekstraktı ve cisplatin oranlarının fizikokimyasal özellikler üzerinde belirleyici olduğunu göstermiştir. GelHap30-CP2-CR2 grubu, dengeli şişme (~%400) ve kontrollü bozunma özellikleri ile biyomedikal uygulamalarda en uygun performansı sunmuştur. GelHap30-CP1-CR1 grubu, daha düşük şişme ve bozunma oranları ile mekanik dayanıklılığı artırırken, biyoyumluluğun korunmasını sağlamaktadır. GelHap30-CP3-CR3 grubunun yüksek şişme ve bozunma oranları, kısa vadeli ilaç salımı uygulamaları için ideal bir özellik sunarken mekanik dayanıklılığı sınırlayabilir. GelHap30 ise daha düşük şişme ve bozunma oranlarıyla, uzun süreli stabilite gerektiren uygulamalar için uygun bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 3.4. A) Şişme grafiği B) Bozunma grafiği

3.2.5. Doku iskelelerinin kimyasal analizi (FTIR)

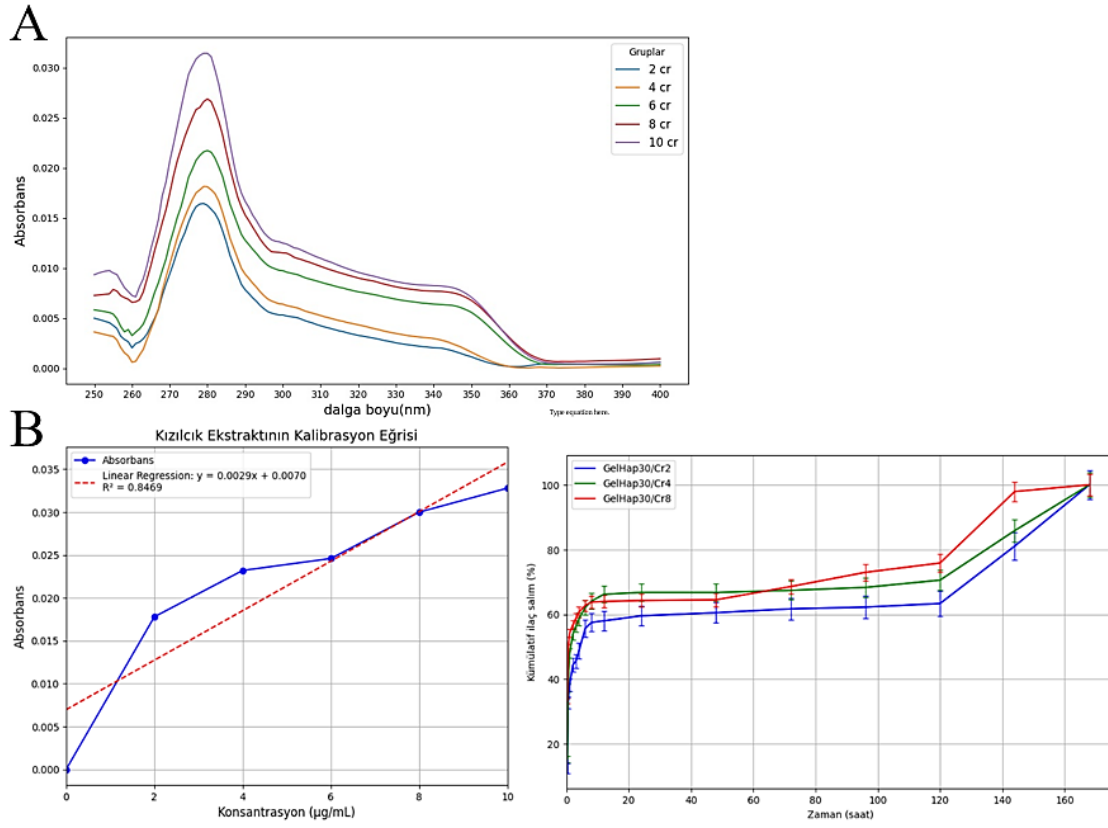
Sentezlenen numunelerin FTIR analizinin hem GelMa matrisinin yapısal özelliklerini hem de ek kimyasal modifikasyonları vurgulayan önemli fonksiyonel grupların varlığını Şekil 3.5' te ortaya koyduğunu göstermektedir. 3305 cm^{-1} de gözlemlenen emilim bandı, jelatin yapısı içindeki hidrokisprolin kalıntılarının karakteristiği olan O-H gerilme titreşimine karşılık gelir. 1633 cm^{-1} deki tepe noktası, GelMa' nın karakteristik piki olan amid I' den gelen C=O gerilme titreşimini temsil eder ve peptit omurgasının korunduğunu doğrular. Dahası, 1031 cm^{-1} deki bant, fosfat içeren yapıların numuneye entegre edildiğini gösteren fosfat gruplarının (P=O gerilmesi) varlığını gösterir. Karşılaştırma için, (Alexa ve ark., 2021) tarafından bildirildiği gibi, sentetik karbonatlı hidrokisapatit (c-Hap) örnekleri, $1090\text{--}1032$, 960 ve $600\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ de PO_4^{3-} ile ilgili belirgin FTIR bantlarının yanı sıra 1550 , 1460 , 1445 , 1415 ve 870 cm^{-1} de karbonatla ilgili pikler sergiledi. Mevcut çalışmada, 1031 cm^{-1} deki fosfatla ilgili pik, bu bulgularla yakından örtüşmekte ve sentezlenen malzeme ile c-Hap arasındaki yapısal benzerlikleri göstermektedir. Ek olarak, 3305 cm^{-1} deki O-H gerilme titreşimi, hidrokisapatit yapıların tipik özellikleri olan hidroksil ve fosfat gruplarının bir arada varlığını daha da desteklemektedir (Reyes-Gasga et al., 2013). Literatürde bildirilen değerlere kıyasla O-H gerilmesinin (3305 cm^{-1}) ve C=O gerilmesinin (1633 cm^{-1}) tepe pozisyonlarındaki hafif sapmalar, numune hazırlama yöntemlerindeki veya modifikasyon derecelerindeki farklılıklara atfedilebilir. Bu sonuçlar, fosfat gruplarının GelMa matrisine başarıyla entegre edildiğini doğrularak, malzemenin gelişmiş işlevsel özellikler gerektiren uygulamalar için potansiyelini göstermektedir. Yüklenmemiş ve yüklenmiş gruplar arasında tepe farkı gözlenmemiştir. Bu, kızılılık ekstraktı ve cisplatin nedeniyle GelMa ve Hap tepelerini bastırmıştır.



Şekil 3.5. A) GelHap grupların FTIR grafiği B) Hibrid gruplar ve GelHap30 FTIR grafiği

3.2.6. Doku iskelelerinden ilaç salımı

In vitro ilaç salınım analizleri kapsamında, cisplatin ve kızcılık solüsyonları, PBS ortamında altı farklı konsantrasyonda (2, 4, 6, 8 ve 10 µg/ml) hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Cisplatin için 305 nm, kızcılık için ise 280 nm dalga boylarında absorban ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına dayanarak standart bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve kümülatif ilaç salım grafikleri hazırlanmıştır. Bu grafikler, kızcılık için Şekil 3.6'da, cisplatin için ise Şekil 3.7'de sunulmuştur. Şekil 3.6A'da kızcılık ekstraksiyonun 250nm ile 400nm arasında absorban grafiği çizilmiştir. Bu grafiğe göre, kızcılık ekstraksiyonunun verdiği pik değeri 280nm olarak elde edilmiştir. Şekil 3.7A'da cisplatin için 250nm ile 400nm arasında absorban grafiği çizilmiştir. Bu grafiğe göre, cisplatin ilacının verdiği pik değeri 305nm olarak elde edilmiştir. Her iki malzeme için salım profilleri ayrı ayrı incelenmiş ve IC₅₀ değerlerine göre belirlenen farklı konsantrasyonlar temelinde üçerli gruplar oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, her iki ilacın PBS ortamında belirgin salınım desenleri sergilediğini ortaya koymuştur. Grup formülasyonları arasındaki farklı salım davranışları detaylı bir şekilde değerlendirilmiş ve Hap formülasyonu ile yapılan ilaç taşıyıcı yapıların kızcılık ve cisplatin için benzer ilaç salım davranışları gösterdiği belirlenmiştir. Taşıyıcı mekanizmanın aynı olmasından dolayı, kümülatif ilaç salım grafiklerinin benzer profiller sergilemesi beklenmekte olup, bu durum deney sonuçlarıyla da uyumlu bulunmuştur.



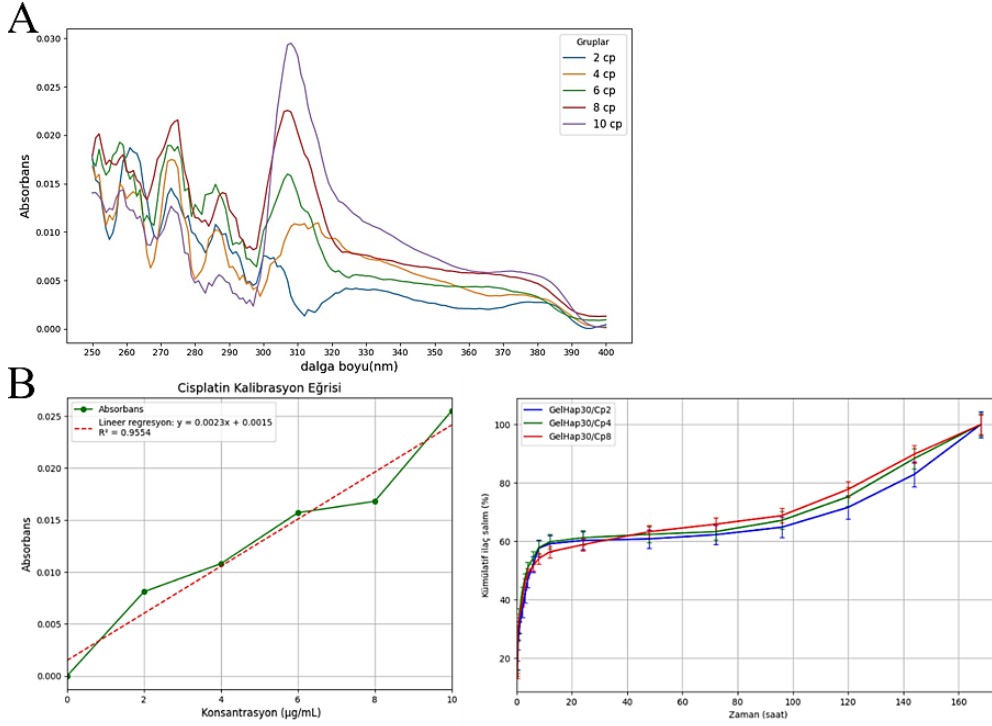
Şekil 3.6.A) Kızılcık ekstraksiyonun absorbans grafiği B) Kızılcık ekstraksiyonun kalibrasyon eğrisi ve kızılcık yüklü iskelelerin yüzdelik kümülatif salım grafiği

Kızılcık-Hap tabanlı iskelelerden gerçekleştirilen salım profili incelendiğinde, ilk 30 dakika içerisinde hızlı bir salım fazının meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu dönemde, GelHap30/Cr2 için %32,7, GelHap30/Cr4 için %37,2 ve GelHap30/Cr8 için %49,7 oranında ani bir salım gerçekleşmiştir. Salım süresi 4 saate ulaştığında, GelHap30/Cr2 grubunun %48,7, GelHap30/Cr4 grubunun %58,6 ve GelHap30/Cr8 grubunun %60,73 oranında ilaç salımı gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu veriler, ilaç konsantrasyonundaki artışın salım miktarını da artırdığını göstermektedir. Salım süresinin 6 saatten sonra tüm gruplarda belirli bir doyum seviyesine ulaştığı ve stabil bir salım profilinin oluştuğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 120 saat sonunda ilaç salımının devam ettiği ve özellikle GelHap30/Cr8 grubunun %97 oranına ulaştığı gözlemlenmiştir. 7. gün itibarıyla, kızılcık yüklenmiş grupların tamamı ilaç salım sürecini tamamlamıştır.

Cisplatin ilacının GelHap30 tabanlı iskelelerden salım profili incelendiğinde, ilk 30 dakika içerisinde GelHap30/Cp2 (%24,6), GelHap30/Cp4 (%27,2) ve GelHap30/Cp8

(%29,7) gruplarında ani bir salım (burst release) meydana gelmiştir. Bu salım oranının kızılılık için daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Salım süresi 6 saate ulaştığında, GelHap30/Cp2 (%52,2), GelHap30/Cp4 (%54,4) ve GelHap30/Cp8 (%51,6) grupları toplam ilaç miktarının yaklaşık yarısını salmıştır. Tüm grupların salım oranları arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir. 8 saat sonrasında ise tüm gruplar belirli bir stabiliteye ulaşarak durgun bir salım profili sergilemiştir. Yedi günlük süreç sonunda cisplatin yüklü grupların ilaç salımının tamamlandığı belirlenmiştir. Şekil 3.7’de cisplatin için absorbans grafiği, kalibrasyon eğrisi ve kümülatif salım grafiği verilmiştir.

Ayrı ayrı kızılılık ekstraktı ve cisplatin yüklü iskelelerin salım profillerinde, ani salımın ardından kontrollü bir salım davranışı gözlemlenmiştir. Kızılılık için bu süreç yaklaşık 120 saat, cisplatin için ise 96 saat sonunda tekrar bir artış göstermiştir. Bu farkın, cisplatin ve kızılığın farklı kimyasal yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu salım profillerinin, iki fazlı bir salım mekanizması ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. İlk fazın, iskelenin yüzeyinde biriken ilacın PBS ortamına temas etmesi sonucu meydana gelen ani salımdan kaynaklandığı öngörülmektedir. İkinci faz ise iskelenin içindeki Hap mikro partiküllere yapışan ilaçların kontrollü salım mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Ancak kontrollü salımın gerçekleşmemesi durumunda, özellikle fitofarmasötiklerin toksik seviyenin altında bir konsantrasyonda tutulması zorlaşabilir. Kontrolsüz salım, başlangıçta aşırı miktarda ilaç salımına neden olarak toksik etkilere yol açabilir (Szcześna et al., 2021). Bu nedenle, ilaç konsantrasyonlarının optimizasyonu için IC₅₀ test protokolleri kullanılarak gerekli düzenlemeler yapılmıştır. IC₅₀ testleri, ilaçların hücrelerde toksik etkiler yaratmadan terapötik etkinlik gösterebileceği optimum konsantrasyon aralığını belirlemek için uygulanmıştır. Bu protokoller, ilacın toksisite sınırlarını tanımlayarak, kontrollü salım mekanizmasının etkin bir şekilde tasarlanmasına katkı sağlamıştır.



Şekil 3.7. A) Cisplatin ilacı için absorbans grafiği B) Cisplatin ekstraksiyonun kalibrasyon eğrisi ve Cisplatin yüklü iskelelerin yüzdelik kümülatif salım grafiği

3.2.7. Hücreli doku iskelelerinin karakterizasyonu

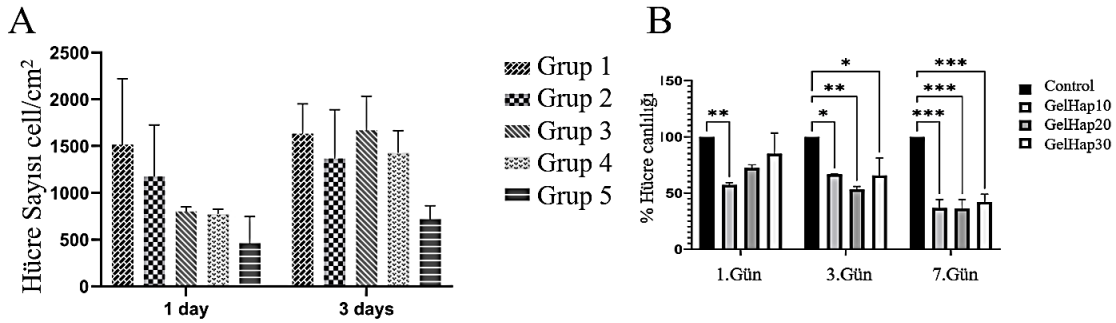
Hap boyutunun (200 µm ve 63 µm) ve LAP konsantrasyonunun (%1-%0,5) hücre davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. İlk deney setinde 200 µm Hap, ikinci setinde ise 63 µm Hap kullanılmıştır.

Şekil 3.8A'da Tablo 3 gruplarının hücre canlılığı değerleri verilmiştir. Bu grafiğe göre, 200 µm Hap kullanılan gruplarda artan Hap konsantrasyonunun 1. günde hücre sayısında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda 3. gün itibarıyla hücre artışı gözlenirken, yüksek konsantrasyonlar bu artışı sınırlamıştır. Şekil 3.8B' de 63 µm Hap kullanılan GelHap10, GelHap20 ve GelHap30 grupları verilmiştir. 63 µm Hap kullanıldığında ise aynı konsantrasyonlarda daha yüksek hücre sayısı tespit edilmiştir, bu da küçük boyutlu Hap partiküllerinin hücre tutunmasını daha etkin şekilde desteklediğini göstermiştir.

Her iki deneyde de artan Hap ve LAP konsantrasyonu, hücre canlılığında doza bağımlı bir düşüşe neden olmuştur. Ancak GelHap30 hücre canlılığında istikrarlı bir değer sergilemiştir. Ancak GelHap10 ve GelHap20 doku iskelelerinde 7.güne gelindiğinde

toksik etki göstermeye başlamıştır. Bu durum, 63 µm Hap kullanılan gruplarda 3.günde toksik olmadığını ancak 7.güne geldiğinde canlılığı düşürmüştür. Ancak genel olarak hücre canlılığı 200 µm Hap boyutuna göre daha yüksek seviyelerde kaydedilmiştir.

Sonuçlar, Hap'ın hücre davranışı üzerindeki etkilerinin hem konsantrasyon hem de boyut faktörlerine bağlı olduğunu göstermektedir. Daha küçük Hap partiküllerinin (63 µm) daha geniş yüzey alanı sağlayarak hücre etkileşimlerini artırdığı düşünülmektedir. Bu bulgular, Hap bazlı biyomalzemelerin biyomedikal uygulamalarda (örneğin kemik doku mühendisliği) kullanılabilmesi için konsantrasyon ve boyut optimizasyonunun kritik bir parametre olduğunu vurgulamaktadır. Aynı zamanda LAP miktarının hücre sayısında ve canlılığında belirgin bir etki yarattığını göstermiştir.



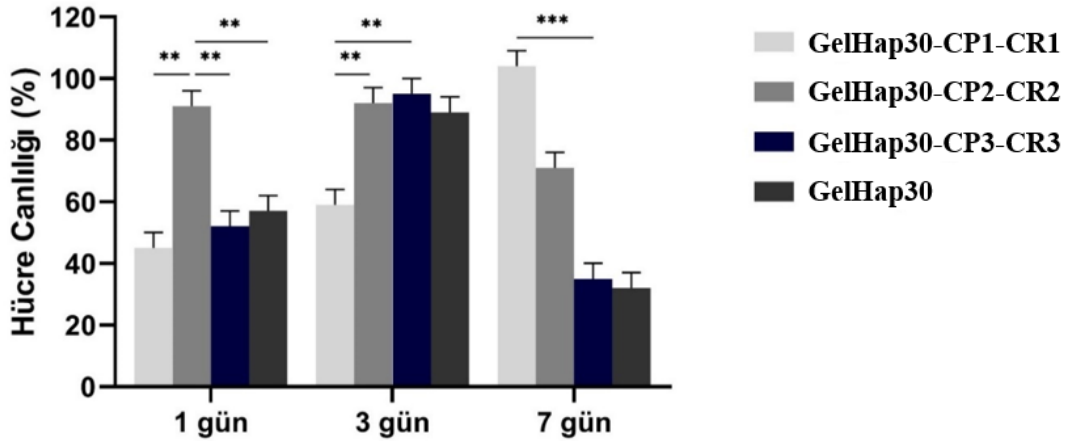
Şekil 3.8. A) Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 MTT testi ile hücre sayısının 1 ve 3. Gün değerleri B) GelHap10, GelHap20 ve GelHap30 doku iskelelerinin MTT testi ile 1,3 ve 7.gün hücre canlılığı değerleri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,1$, (***) $p < 0,001$ ve (****) $p < 0,0001$ olarak belirtilmiştir.

Hibrid gruplar, özellikle düşük ve orta konsantrasyonlarda (GelHap30-CP1-CR1 ve GelHap30-CP2-CR2), GelHap30 ile karşılaştırıldığında 1. günde önemli ölçüde daha yüksek hücre canlılığı gösterdi. Şekil 3.9' da hibrid gruplar MTT testi ile hücre canlılığı değerleri verilmiştir. Yedinci günde, tüm gruplarda hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlemlenirken, hibrid formülasyonlar GelHap30'a göre üstün hücre canlılığı sergiledi.

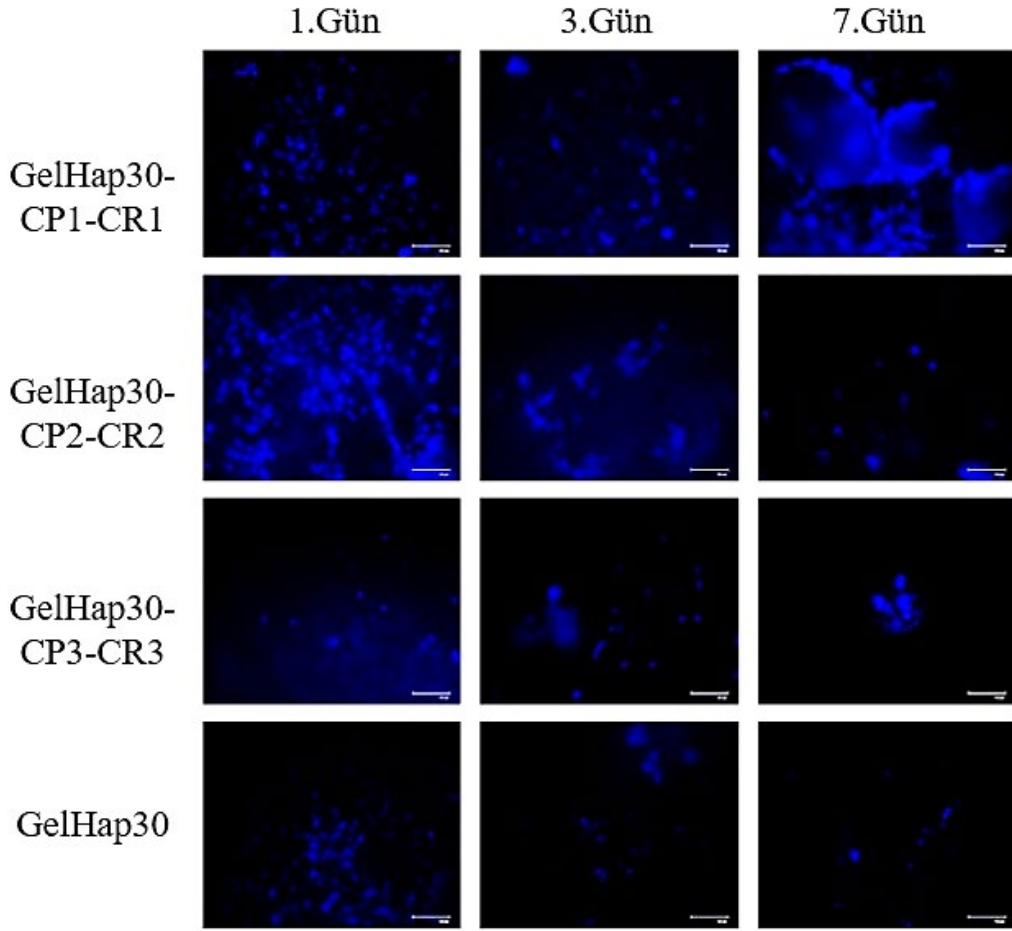
Bu araştırma, cisplatin ve kızcılık ekstraksiyonunun Hap ile hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçlar, düşük ve orta konsantrasyonlardaki hibrid formülasyonların tedavinin ilk aşamalarında hücreler üzerinde koruyucu bir etki gösterebileceğini göstermektedir. GelHap30-CP1-CR1 grubunda 7.günde gözlemlenen

%104 hücre canlılığı hücrenin çoğalmasını artırıcı etki gösterdiğini vurgulamaktadır. Özellikle 7.günde oldukça yüksek sonuç vermesi doku iskelesinden salgılanan ilaç miktarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bununla beraber 7. günde gözlenen GelHap30-CP2-CR2 grubu da toksik olmadığı görülmüştür. GelHap30-CP3-CR3 grubu içerisinde bulunan yüksek cisplatin ve kızılçık ekstraktı miktarı hücre canlılığını ciddi şekilde etkilemiştir. Kızılçık ekstraksiyonunun antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerinin, en azından kısmen, Hap ve cisplatinin sitotoksik etkilerini hafiflettiği varsayılmaktadır. Bu durum, GelHap30 ile karşılaştırıldığında hibrid gruplarda gözlemlenen daha yüksek hücre canlılığını açıklamaktadır. Ancak, 7. günde gözlemlenen hücre canlılığındaki önemli azalma hem Hap hem de cisplatin ile ilişkili uzun vadeli sitotoksik etkilerin varlığını göstermektedir. Bu bulgular, bu materyallerin *in vivo* modellerde uzun süreli etkilerinin değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Ayrıca, sonuçlar, özellikle kanser tedavisi bağlamında, Hap bazlı materyallerin biyoyumluluğunu iyileştirmek için cisplatin ve kızılçık ekstraktı gibi ajanların dahil edilmesinin potansiyelini vurgulamaktadır.

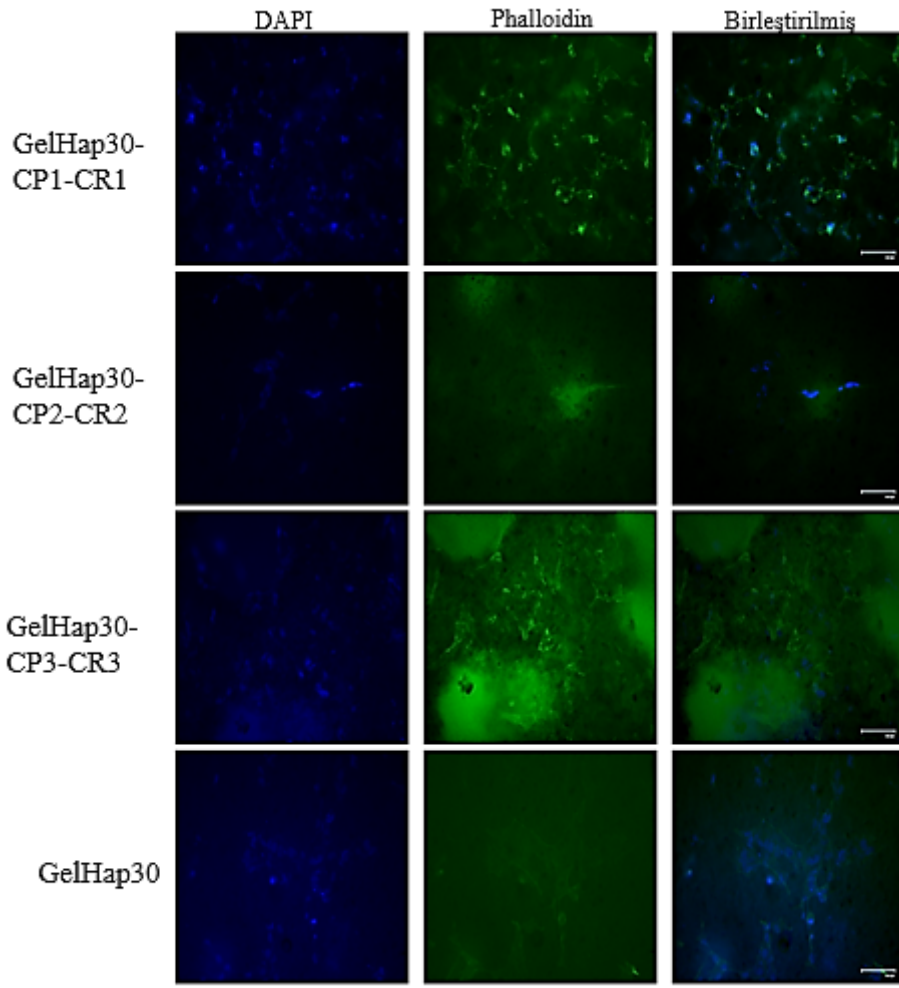


Şekil 3.9. GelHap30-CP1-CR1, GelHap30-CP2-CR2, GelHap30-CP3-CR3 ve GelHap30 MTT testi ile 1,3 ve 7.gün hücre canlılığı değerleri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri (*) p <0,05, (**) p <0,1, (***) p <0,001 ve (****) p <0,0001 olarak belirtilmiştir



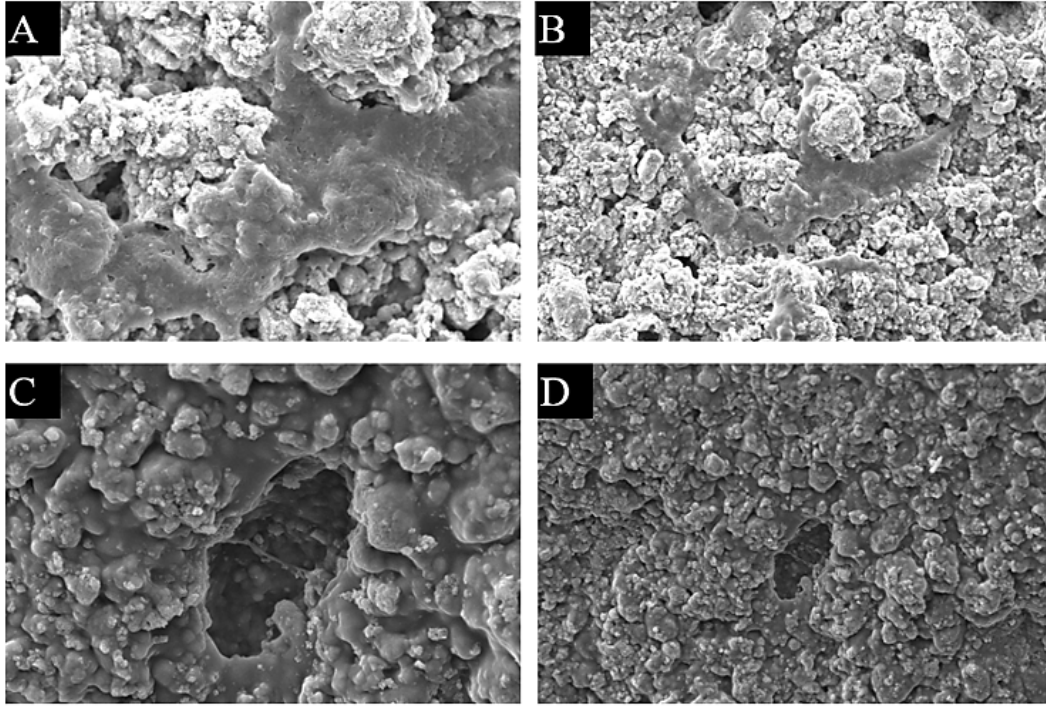
Şekil 3.10. İskelelerin DAPI ile hücre çekirdeklerinin 1,3 ve 7. gün görüntüleri

Şekil 3.10' da 1, 3 ve 7 günlük inkübasyondan sonra grupların üzerindeki DAPI boyalı hFOB' ların floresan görüntüleri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, hücreler bir haftalık kültür periyodu boyunca her iskeleye tutunarak canlılık göstermiştir. Aynı zamanda Şekil 3.11' de DAPI ve Alexa Fluor® 488-phalloidin boyamaları 3.gün için birlikte verilmiştir. Hücre çekirdekleriyle beraber hücrelerin fibrilleri de net olarak görülmektedir. GelHap30-CP1-CR1 grubunda hücre tutunmasının en fazla olduğu hücre çekirdeği yoğunluğundan anlaşılmaktadır.



Şekil 3.11. 3.gün iskele gruplarında hücre yapışması ve morfolojisinin değerlendirilmesi için DAPI ve Alexa Fluor® 488-phalloidin ile yapılan boyama testleri. Sol sütun, hücre çekirdeklerinin DAPI ile boyanmasını (mavi); orta sütun, aktin filamentlerinin Alexa Fluor® 488-phalloidin ile boyanmasını (yeşil); sağ sütun ise DAPI ve Alexa Fluor® 488-phalloidin boyamalarının birleştirilmiş görüntüleri

SEM testleri GelHap30 için yüksek hücre canlılığı gösterdi. Hücreler hFOB benzeri morfoloji gösterdi, bu da GelHap30 grubunun toksisiteye neden olmadığını gösteriyor. Şekil 3.12' de GelHap30 üzerindeki hFOB hücrelerinin 3. ve 7. gün SEM görüntüleri gösterilmektedir. SEM görüntülerinin incelenmesi hücrelerin 7 gün içinde iskele yüzeyine yayıldığını ve hücre yapışmasını desteklediğini gösterdi.



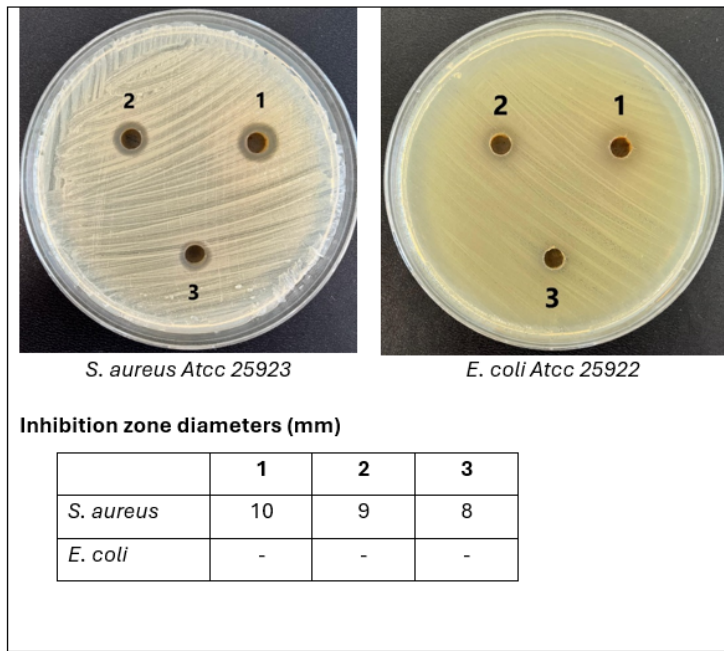
Şekil 3.12. GelHap30 grubunun SEM görüntüleri A) 3. gün 2X ölçeklendirme B) 3.gün 10X ölçeklendirme C) 7. gün 2X ölçeklendirme D) 7. gün 10X ölçeklendirme

3.2.8. Bitki ekstraksiyonun antimikrobiyal testi

Kızılcık ekstraktının sağlıkla ilgili birçok alanda potansiyel etkilerinin olduğu ve özellikle idrar yolu enfeksiyonlarının önlenmesinden, antioksidan, antiinflamatuvar ve potansiyel antikanser etkilerinin gösterilmesine kadar geniş bir etki spektrumu sunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, kıızılcık ekstraktının antibakteriyel etkileri incelenmiş ve özellikle *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı belirgin bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Şekil 3.13' te, kıızılcık ekstraktının farklı konsantrasyonlarında oluşan inhibisyon zon çapları verilmiştir.

Çalışma bulguları, kıızılcık ekstraktının konsantrasyon arttıkça antibakteriyel etkinliğinin de arttığını göstermiştir. Bu durum, ekstraktın doza bağımlı bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, gram-negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* üzerinde etkinliğinin oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. Gram-negatif bakterilerdeki bu sınırlı etkinlik, kıızılcık ekstraktının antibakteriyel spektrumunun dar olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, kıvılcık ekstraktının antibakteriyel özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Ancak, özellikle gram-negatif bakterilere karşı etkisinin zayıf olması, bu ekstraktın tek başına kullanıldığında sınırlı bir etki spektrumu sunduğunu göstermektedir. Daha geniş bir etki spektrumu sağlanabilmesi için, kıvılcık ekstraktının farklı antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmasının uygun bir strateji olabileceği değerlendirilmektedir. Bu sayede, kıvılcık ekstraktı bazlı formülasyonların antimikrobiyal etkinlikleri artırılarak, daha geniş bir bakteriyel spektrum üzerinde etkinlik göstermesi sağlanabilir.



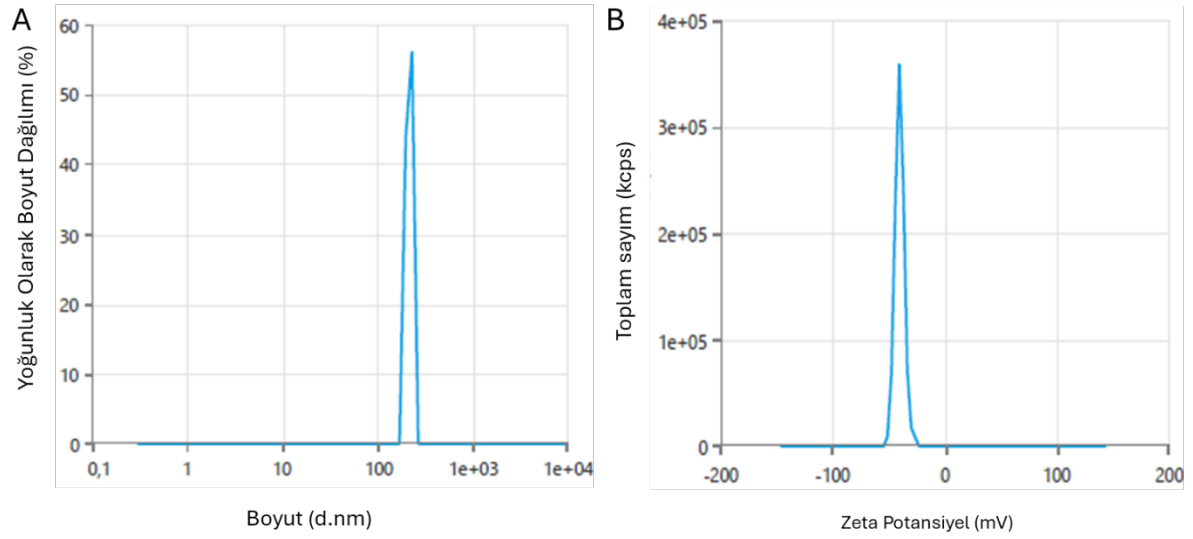
Şekil 3.13. Antibakteriyel aktivite test sonuçları ve inhibisyon zon çapları (1.zon 50 mg/ml, 2. zon 25 mg/ml, 3. zon 12,5 mg/ml.)

3.2.9. Partikül boyutu ve yüzey yükü analizi

GelHap30 grubunda bulunan Hap partiküllerinin boyutunu belirlemek amacıyla DLS testi, yüzey yükü analizini gerçekleştirmek için ise zeta potansiyel ölçümü yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.14'te sunulmuştur. DLS testiyle elde edilen Z-ortalama, partiküllerin hidrodinamik çaplarının ağırlıklı ortalamasını ifade eden ve ölçümdeki en önemli parametrelerden biridir. Bu değer, partiküllerin çözeltideki boyut dağılımını temsil eder (Jia et al., 2023). Test sonuçları, GelHap30 grubundaki partiküllerin Z-ortalama değerinin 2325 nm (2,325 µm) olduğunu göstermektedir. Bu değer, partiküllerin mikro boyut aralığında olduğunu ve oldukça büyük bir partikül boyutuna işaret etmektedir. DLS

testinde elde edilen bir diğeri önemli parametre olan Polidispersite İndeksi (PI), numunenin boyut dağılımının homojenliğini ölçer. PI değeri, 0,1-0,3 aralığında olduğunda homojen bir sistem olarak değerlendirilirken (Danaei et al., 2018), PI = 1 değeri, boyut dağılımının son derece heterojen olduğunu göstermektedir. GelHap30 grubunda PI değerinin 1 olarak ölçülmesi, parçacıkların heterojen bir dağılıma sahip olduğunu ve ortamda yalnızca Hap partiküllerinin bulunmadığını göstermektedir. Bu durum, numunede agregasyon (parçacıkların birleşmesi) olabileceğine işaret etmektedir.

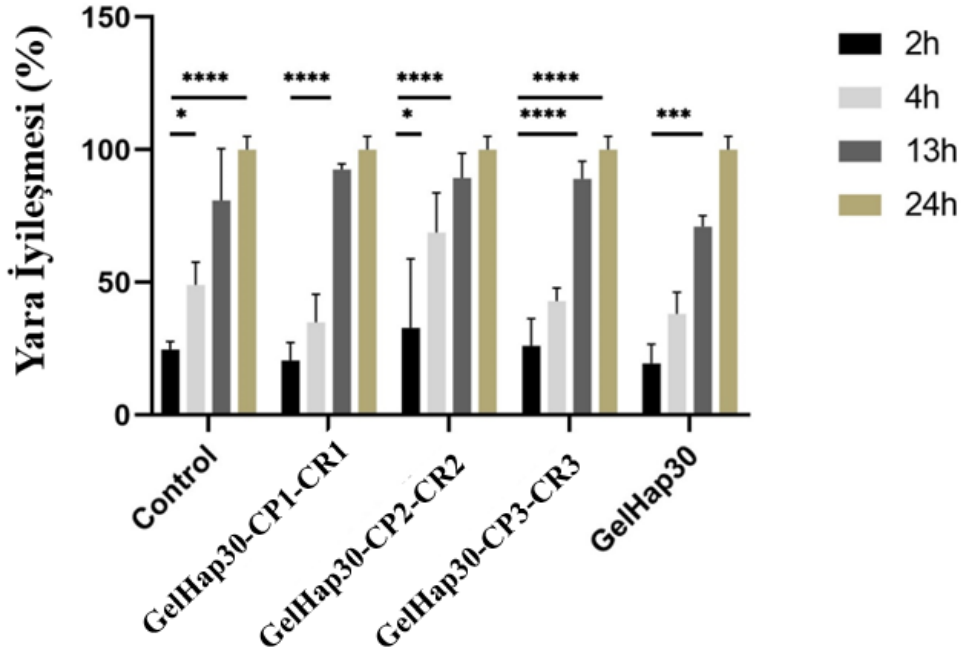
Zeta potansiyel ölçümleri, partiküllerin yüzey yükü ve stabilitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre, GelHap30 partiküllerinin zeta potansiyel değeri -40,38 mV olarak bulunmuştur. Literatürde, zeta potansiyel değerinin $|\pm 30 \text{ mV}|$ üzerinde olması, partiküllerin kolloidal stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir (Liu et al., 2020). Bu durum, partiküller arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinin van der Waals çekim kuvvetlerini aşmasıyla sağlanır. Dolayısıyla, elde edilen -40,38 mV değeri, partiküllerin oldukça stabil olduğunu ve birbirleriyle minimum düzeyde etkileşim (agregasyon) gösterdiğini ortaya koymaktadır. Zeta potansiyel ölçümünde ayrıca zeta sapma değeri 4,169 mV olarak tespit edilmiştir. Düşük sapma değeri, partiküllerin büyük bir kısmının benzer yüzey yüklerine sahip olduğunu ve homojen bir stabilite sergilediğini ifade etmektedir. Eğer zeta sapma değeri yüksek olsaydı, bazı partiküllerin düşük zeta potansiyel değerine sahip olduğu ve bu partiküllerin agregasyona daha yatkın olabileceği düşünülürdü (Bhattacharjee, 2016). Ancak mevcut değer, partiküllerin yüzey yüklerinin homojen dağılımını desteklemektedir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan partiküllerin stabilitesi son derece önemlidir. Stabil partiküller, biyolojik ortamlarda homojen bir dağılım sağlar ve bu durum, uygulamalarda etkinlik açısından kritik bir rol oynar. Agregasyon oluşumu, partiküllerin çaplarının büyümesine yol açarak biyolojik aktiviteyi olumsuz etkileyebilir (Dolai et al., 2021). GelHap30 grubundaki partiküllerin stabil olması, bu partiküllerin kemik doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyelini desteklemektedir.



Şekil 3.14. Hap partiküllerin dinamik ışık saçılması (DLS) ve zeta potansiyel test sonuçları. A) Partiküllerin boyut dağılımı (yoğunluk yüzdesine göre) B) Zeta potansiyeli ölçümleri

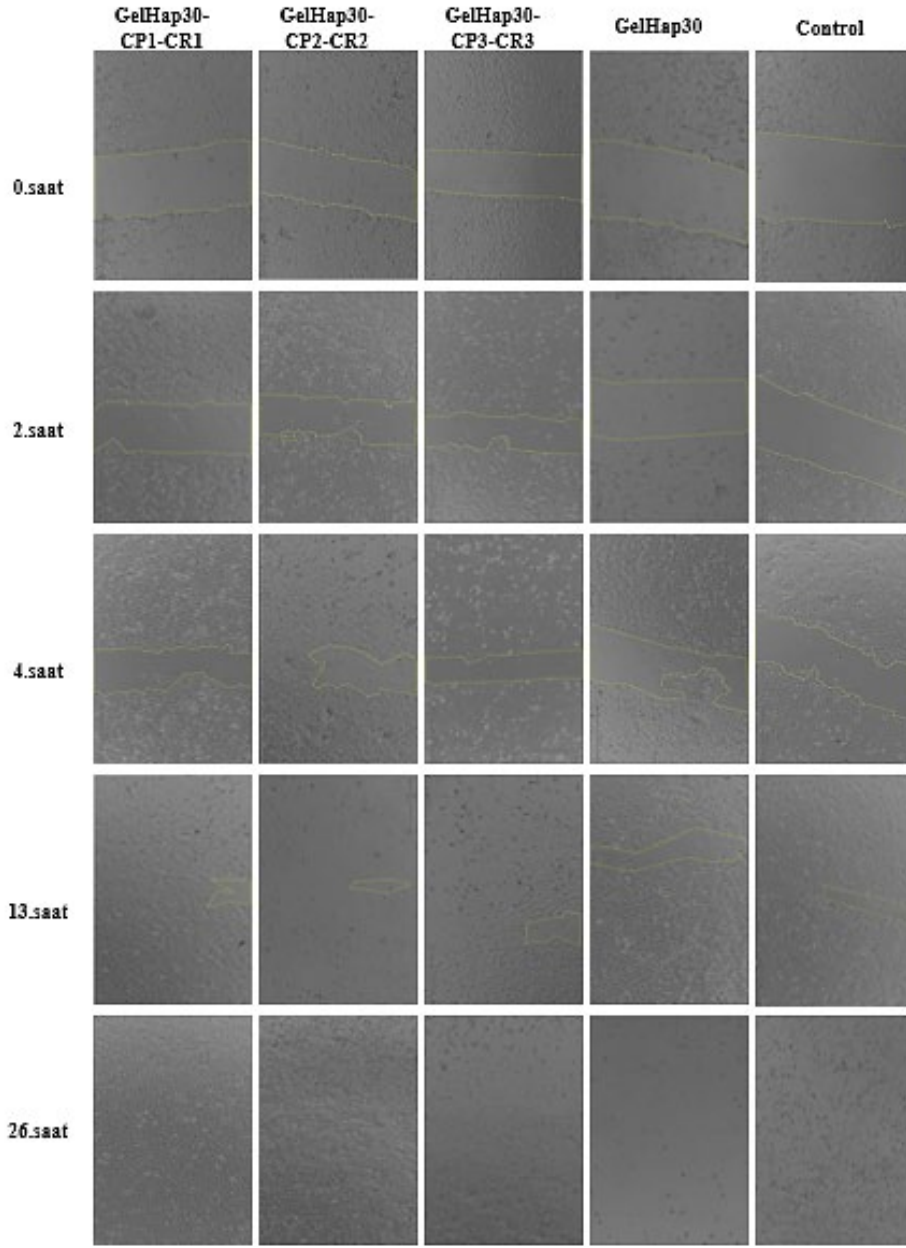
3.2.10. *In vitro* çizgi testi analizi

Kemik hücresi olan hFOB hücrelerin gelişmiş çoğalması ve göçü, başarılı yara iyileşmesi için birincil kriterlerden biridir. Bu kriterlere göre 24 saat sonrasında iskelelerde ve kontrol grubunda yara tamamen kapanmış. Şekil 3.15' te görüldüğü gibi doku iskeleleri kontrol grubundan daha önce yara iyileşmesi sağlamıştır. Şekil 3.16' da yara oluşumu ve kapanma süreci gösterilmiştir. Kontrol grubu ile benzer sürede ve hızda kapanan yaralar doku iskelelerinin yara oluşuktan sonra iyileşmesine katkı sağladığını göstermektedir. Özellikle 2. saatte GelHap30-CP2-CR2 grubu en fazla iyileşmeyi göstermiştir. Bunun nedeni içerisinde bulunan kızılçık ekstraktının salımı olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda 13. saate gelindiğinde GelHap30 grubundan ziyade ilaç ve kızılçık yüklü grupların daha fazla yarayı kapattığı görülmektedir. Yara oluşumu hFOB hücreleri üzerinde denenerek kemik yaralanması sonrasında doku iskelelerinin etkisi ortaya konmuştur. Bu hücre hattı ile yapılan ilk yara örtüsü deneyi olması sayesinde literatüre katkıda bulunmuştur.



Şekil 3.15. Farklı iskele gruplarının yara kapanma oranlarına etkisi. Kontrol, GelHap30-CP1-CR1, GelHap30-CP2-CR2, GelHap30-CP3-CR3 ve GelHap30 grupları üzerinde yapılan çizgi testi sonuçları, 2 saat, 4 saat, 13 saat ve 24 saatlik süreçlerde yara kapanma yüzdelerini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,1$, (***) $p < 0,001$ ve (****) $p < 0,0001$ olarak belirtilmiştir

Kızılıcık ekstraktı kullanılarak yapılan bir başka çalışmada benzer şekilde 24. saate gelindiğinde yaranın tamamen kapandığı ispatlanmıştır. Yapılan çalışmada deri hücresi olan 3T3 kullanılmıştır (Özkahraman et al., 2024). Bu durumda kızılıcık bitkisinin yara iyileşmesini hızlandırdığı kanıtlanmıştır.



Şekil 3.16. *In vitro* çizgi testi yara görüntüleri (Objektif: 4X)

4. SONUÇLAR

Bu tez, cisplatin ve kızcılık ekstraktının Hap tabanlı 3B DLP yazıcı teknolojisini kullanarak, kemik kanserine yönelik biyoiskelelerin üretilmesini hedeflemektedir. İlaçların hücre üzerindeki inhibitör etkilerini araştırmış ve doku iskelelerinin biyolojik, termal, mekanik, şişme, bozunma, ilaç salım, parçacık boyutları ve yara kapanma özelliklerini değerlendirmiştir. Cisplatin ve kızcılık ekstraktının IC50 testi ile

konsantrasyon olarak optimum değerleri belirlenmiştir. Kızılıcık ekstraktı antioksidan ve inflamasyon düzenleyici mekanizmalar aracılığıyla daha destekleyici bir etki göstermektedir. Her iki bileşenin hücre büyümesini inhibe etme yetenekleri, farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir. Doku iskelelerinin morfolojik analizi SEM ile yapılmış ve GelHap30-CP1-CR1 grubu, düşük konsantrasyondaki kızılıcık ekstraktı ve cisplatin içeriğiyle en iyi biyolojik uyumluluğu ve hcreysel proliferasyonu destekleyen yapıyı göstermiştir. Termal analizler ise, GelHap30-CP2-CR2 grubunun termal stabilite açısından en iyi performansı gösterdiğini ortaya koymuştur. Mekanik analizler, tüm gruplarda benzer basma dayanımı ve uzama değerleri sunmuş, ancak özellikle GelHap30 grubunun en yüksek dayanımı sergilediği belirlenmiştir. şişme ve bozunma analizleri, GelHap30-CP2-CR2 grubunun biyomedikal uygulamalarda en iyi performansı sunduğunu, GelHap30-CP1-CR1 grubunun ise daha düşük şişme ve bozunma oranlarıyla mekanik dayanıklılığı artırdığını göstermektedir. İlaç salımı analizleri, her iki ilaç için benzer salım profilleri gösterdiğini ve kızılıcık yüklü grupların 120 saat sonunda %97 oranında salım gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Cisplatin yüklü iskelelerin salım davranışları da benzer şekilde incelenmiştir. Hibrid formülasyonlar, özellikle düşük ve orta konsantrasyonlarda (GelHap30-CP1-CR1 ve GelHap30-CP2-CR2), GelHap30 ile kıyaslandığında 1. günde önemli derecede daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. 7. günde ise tüm gruplarda hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlemlenmiş, ancak hibrid formülasyonlar GelHap30'a kıyasla üstün hücre canlılığı sergilemiştir. Bu bulgular, hibrid formülasyonların tedavi süreçlerinin erken aşamalarında hücreleri koruyucu bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, düşük ve orta konsantrasyondaki GelHap30-CP1-CR1 grubunda 7. günde gözlemlenen %104 hücre canlılığı, hücre çoğalmasını artırıcı etkileri ortaya koymaktadır. Kızılıcık ekstraktı ve cisplatinin etkisiyle yapılan hibrid formülasyonlar, özellikle antikanser tedavisi bağlamında biyoyumluluğu artırma potansiyeli sunmaktadır. Kızılıcık ztnn antioksidan ve anti-inflamatuar zellikleri, Hap ve cisplatinin sitotoksik etkilerini kısmen hafifletmiştir. Bununla birlikte, 7. günde gözlemlenen hücre canlılığındaki azalma, bu materyallerin uzun vadeli etkilerinin *in vivo* modellerde daha fazla incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, kızılıcık özütünün antibakteriyel özellikleri incelenmiş ve özellikle *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı belirgin bir inhibisyon etkisi gösterdiği, ancak Gram-negatif bakteriler üzerinde etkinliğinin sınırlı olduğu

belirlenmiştir. Son olarak, GelHap30 grubundaki Hap partiküllerinin DLS testi ve zeta potansiyel ölçümleri, partiküllerin oldukça stabil olduğunu ve homojen bir yüzey yüküne sahip olduğunu göstermiştir. Bu özellikler, bu partiküllerin biyomedikal uygulamalarda, özellikle kemik doku mühendisliği gibi alanlarda kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Bu çalışma, kızcılık ekstraktı ve cisplatin ile geliştirilmiş Hap tabanlı biyomalzemelerin kemik kanseri tedavisi için umut vadeden bir yaklaşım sunduğunu göstermektedir. Bu bulgular, hibrid grupların biyouyumluluk ve hücre koruyuculuğu açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymakla birlikte, uzun vadeli biyolojik etkilerin ve ilaç salım profillerinin *in vivo* modellerde doğrulanması gerekliliğini işaret etmektedir. Çalışma, ayrıca kızcılık özütünün antibakteriyel etkinliğinin genişletilmesi ve hibrid yapıların bireyselleştirilmiş tıp ve ileri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılma potansiyeline dair önemli bir temel sağlamaktadır. Bu yönler, antikanser tedavilerde biyomalzemelerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

5. KAYNAKÇA

- Arifin, N., Sudin, I., Ngadiman, N. H. A., & Ishak, M. S. A. (2022). A Comprehensive Review of Biopolymer Fabrication in Additive Manufacturing Processing for 3D-Tissue-Engineering Scaffolds. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 2119, 14(10), 2119. <https://doi.org/10.3390/POLYM14102119>
- Ayran, M., Goyuk, Y., Tiryaki, A., Ulag, S., Koyuncu, A. C. C., Turhan, S. A., & Gunduz, O. (2024). Light-Processed 3D Bioprinting of Symbplepharon Rings Fortified with L-Ascorbic Acid for Ocular Tissue Engineering. *Macromolecular Materials and Engineering*. <https://doi.org/10.1002/mame.202400057>
- Barui, S. (2021). 3D inkjet printing of biomaterials: Principles and applications. *MEDICAL DEVICES & SENSORS*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/mds3.10143>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>
- Black, C. R. M., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S., & Oreffo, R. O. C. (2015). Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*, 1(3), 132–140. <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0022-2>
- Brown, A., Kumar, S., & Tchounwou, P. B. (2019). Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 11(4), 97. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7059781/>
- Cohen, S. M., & Lippard, S. J. (2001). Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 67, 93–130. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)67026-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)67026-0)
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>
- Dolai, J., Mandal, K., & Jana, N. R. (2021). Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Applied Nano Materials*, 4(7), 6471–6496.

https://doi.org/10.1021/ACSANM.1C00987/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AN1C00987_0018.GIF

Fanelli, M., Tavanti, E., Patrizio, M. P., Vella, S., Fernandez-Ramos, A., Magagnoli, F., Luppi, S., Hattinger, C. M., & Serra, M. (2020). Cisplatin Resistance in Osteosarcoma: In vitro Validation of Candidate DNA Repair-Related Therapeutic Targets and Drugs for Tailored Treatments. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00331>

Ferguson, J. L., & Turner, S. P. (2018). Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. *American Family Physician*, 98(4), 205–213. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2018/0815/p205.html>

Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers 2011*, Vol. 3, Pages 1351-1371, 3(1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3011351>

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>

Gonçalves, S., Dourado, F., Rodrigues, L. R., Gonçalves, S., Dourado, F., & Rodrigues, L. R. (2015). Overview on Cell-Biomaterial Interactions. *Advanced Polymers in Medicine*, 91–128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12478-0_4

Hou, Y., Wang, W., & Bartolo, P. (2022). Application of additively manufactured 3D scaffolds for bone cancer treatment: a review. In *Bio-Design and Manufacturing* (Vol. 5, Issue 3, pp. 556–579). Springer. <https://doi.org/10.1007/s42242-022-00182-7>

Jia, Z., Li, J., Gao, L., Yang, D., & Kanaev, A. (2023). Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. *Colloids and Interfaces 2023*, Vol. 7, Page 15, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS7010015>

- Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials* 2020 5:8, 5(8), 584–603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
- Kumar, A., Kargozar, S., Baino, F., & Han, S. S. (2019). Additive Manufacturing Methods for Producing Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Composite Scaffolds: A Review. In *Frontiers in Materials* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00313>
- Li, H., Dai, J., Wang, Z., Zheng, H., Li, W., Wang, M., & Cheng, F. (2023). Digital light processing (DLP)-based (bio)printing strategies for tissue modeling and regeneration. *Aggregate*, 4(2), e270. <https://doi.org/10.1002/AGT2.270>
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
- Liu, J., Tu, L., Cheng, M., Feng, J., & Jin, Y. (2020). Mechanisms for oral absorption enhancement of drugs by nanocrystals. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101607. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101607>
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2007). Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and Cardiovascular Disease Risk Factors. *Nutrition Reviews*, 65(11), 490–502. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2007.TB00273.X>
- Motamedian, S. R., Hosseinpour, S., Ahsaie, M. G., & Khojasteh, A. (2015). Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World Journal of Stem Cells*, 7(3), 657. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V7.I3.657>
- Müller, R. (2009). Hierarchical microimaging of bone structure and function. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 5, Issue 7, pp. 373–381). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.107>
- Neto, C. C., Krueger, C. G., Lamoureaux, T. L., Kondo, M., Vaisberg, A. J., Hurta, R. A. R., Curtis, S., Matchett, M. D., Yeung, H., Sweeney, M. I., & Reed, J. D. (2006). MALDI-TOF MS characterization of proanthocyanidins from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*) that inhibit tumor cell growth and matrix

- metalloproteinase expression in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 18–25. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2347>
- Obada, D. O., Osseni, S. A., Sina, H., Salami, K. A., Oyedeji, A. N., Dodoo-Arhin, D., Bansod, N. D., Csaki, S., Atta, A. Y., Fasanya, O. O., Sowunmi, A. R., Kuburi, L. S., Dauda, M., Abifarin, J. K., & Dauda, E. T. (2021). Fabrication of novel kaolin-reinforced hydroxyapatite scaffolds with robust compressive strengths for bone regeneration. *Applied Clay Science*, 215, 106298. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2021.106298>
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. In *Materials Science and Engineering R: Reports* (Vol. 58, Issues 3–5, pp. 77–116). <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- Özkahraman, B., Torkay, G., İdil, N., Özbaş, Z., & Bal-Öztürk, A. (2024). Antibacterial, Antioxidant, and Healing Potential of Wound Dressings Utilizing Cranberry Extract in Combination with Methacrylated Polyvinyl Alcohol and Methacrylated Sericin. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 10(4), 577–589. <https://doi.org/10.1007/S40883-024-00346-0/FIGURES/8>
- Prasain, J. K., Grubbs, C., & Barnes, S. (2019). Cranberry anti-cancer compounds and their uptake and metabolism: An updated review. *Journal of Berry Research*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.3233/jbr-180370>
- Prem Ananth, K., & Jayram, N. D. (2024). A comprehensive review of 3D printing techniques for biomaterial-based scaffold fabrication in bone tissue engineering. In *Annals of 3D Printed Medicine* (Vol. 13). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.stlm.2023.100141>
- Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñero, E. L., Rodríguez-Álvarez, G., Tiznado-Orozco, G. E., García-García, R., & Brès, E. F. (2013). XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), 4568–4574. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.07.014>
- Romani, A. M. P. (2022). Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*, 206, 115323. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2022.115323>

- Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., & Popoff, S. N. (2009). Bone structure, development and bone biology. In *Bone Pathology* (pp. 1–50). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9_1
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., & Heber, D. (2004). Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2512–2517. <https://doi.org/10.1021/jf0352778>
- Shahrubudin, N., Lee, T. C., & Ramlan, R. (2019). An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications. *Procedia Manufacturing*, 35, 1286–1296. <https://doi.org/10.1016/J.PROMFG.2019.06.089>
- Sharma, A., Yadav, D. P., Garg, H., Kumar, M., Sharma, B., & Koundal, D. (2021). Bone Cancer Detection Using Feature Extraction Based Machine Learning Model. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2021(1), 7433186. <https://doi.org/10.1155/2021/7433186>
- Shi, F., Xiao, D., Zhang, C., Zhi, W., Liu, Y., & Weng, J. (2021). The effect of macropore size of hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells under perfusion culture. *Regenerative Biomaterials*, 8(6). <https://doi.org/10.1093/rb/rbab050>
- Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Jayasekhar Babu, P. (2023). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. In *Smart Materials in Manufacturing* (Vol. 1). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>
- Szczęsna, W., Tsigotis-Maniecka, M., Szyk-Warszyńska, L., Balicki, S., Warszyński, P., & Wilk, K. A. (2021). Insight into multilayered alginate/chitosan microparticles for oral administration of large cranberry fruit extract. *European Polymer Journal*, 160, 110776. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2021.110776>
- Tanabe, S., Santos, J., La, V. D., Howell, A. B., & Grenier, D. (2011). A-Type Cranberry Proanthocyanidins Inhibit the RANKL-Dependent Differentiation and Function of Human Osteoclasts. *Molecules* 2011, Vol. 16, Pages 2365-2374, 16(3), 2365–2374. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES16032365>

- Trybus, E., We,gierek, A., Ciuk, W.-, Brodzicka, A., Galanty, A., & Pa'sko, P. P. (2024). *Modulation of Multidrug Resistance Transporters by Food Components and Dietary Supplements: Implications for Cancer Therapy Efficacy and Safety*. <https://doi.org/10.3390/cimb46090576>
- Villarreal, A., Stoecker, B. J., Garcia, C., Garcia, K., Rios, R., Gonzales, C., Mandadi, K., Faraji, B., Patil, B. S., & Deyhim, F. (2007). Cranberry juice improved antioxidant status without affecting bone quality in orchidectomized male rats. *Phytomedicine*, *14*(12), 815–820. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2007.04.004>
- Wang, L., Fang, D., Xu, J., & Luo, R. (2020). Various pathways of zoledronic acid against osteoclasts and bone cancer metastasis: a brief review. *BMC Cancer* *20*:1, *20*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12885-020-07568-9>
- Wang, S., Zhao, S., Yu, J., Gu, Z., & Zhang, Y. (2022). Advances in Translational 3D Printing for Cartilage, Bone, and Osteochondral Tissue Engineering. *Small*, *18*(36), 1–22. <https://doi.org/10.1002/sml.202201869>
- Weh, K. M., Clarke, J., & Kresty, L. A. (2016). Cranberries and cancer: An update of preclinical studies evaluating the cancer inhibitory potential of cranberry and cranberry derived constituents. In *Antioxidants* (Vol. 5, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox5030027>
- Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018a). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *80*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.09.031>
- Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018b). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *80*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.09.031>
- Yan, Q., Dong, H., Su, J., Han, J., Song, B., Wei, Q., & Shi, Y. (2018). A Review of 3D Printing Technology for Medical Applications. *Engineering*, *4*(5), 729–742. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2018.07.021>

Zhu, W., Ma, X., Gou, M., Mei, D., Zhang, K., & Chen, S. (2016). 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2016.03.014>



ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül TIRYAKI

Eğitim bilgileri

Yüksek Lisans

Marmara Üniversitesi

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

2023-2025

Lisans

Gebze Teknik Üniversitesi

Biyomühendislik

2017-2022

Yayınlar & Konferanslar

Başlık

Yıl

[ChocOmega-3: Innovative manufacturing of \$\omega\$ -3-enriched chocolate](#)

2024

International Journal of Bioprinting, 3969

[Light-Processed 3D Bioprinting of Symbplepharon Rings Fortified with L-Ascorbic Acid for Ocular Tissue Engineering](#)

2024

Macromolecular Materials and Engineering, 2400057

[Effect of Rheum ribes extract on periodontal cell viability](#)

2024

International Dental Journal 74, S164

[The effect of okra extract on periodontal cell viability](#)

2024

International Dental Journal 74, S270-S271

[Effect of Indigo Naturalis on the Viability of Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells: An In Vitro Study](#)

2024

European Journal of Research in Dentistry 8 (2), 49-54

[Production of Individualized Symbplepharon Rings](#)

M Ayran, Y Goyuk, A Tiryaki, S Ulağ, O Gündüz

[Antimicrobial and biodegradable electrospun nanofiber composite for wound dressing](#)

A Yaqub, M Ayran, E Kaya, A Tiryaki, S Ulağ, G Tınaz, O Gündüz

Applications of Chemistry in Nanoscience and Biomaterials Engineering 2024 (Sözlü sunum)