ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK DOĞAL KAYNAKLI İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Miray YILDIRIM

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK DOĞAL KAYNAKLI İSKELELERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Miray YILDIRIM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR

Bu tez çalışmasında, tendon hücre dışı matriksi (HDM) ve halloysit nanotüpleri (HNT) kullanarak kemik dokusu mühendisliği uygulamalarına yönelik kompozit yapı iskelelerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında, sığır tendon dokusu deselülerize edildi ve deselülerizasyon işleminin etkinliği SEM, FTIR, DNA içeriği analizi ve protein içeriği analizi ile değerlendirildi. İkinci aşamada deselülerize tendon hücre dışı matriksi (dtHDM) enzimatik olarak sindirildi. Sindirilme işleminin sonunda, akışkan viskoz çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandı. Bir sonraki aşamada, nötralize edilmiş dtHDM ön jel çözeltileri farklı konsantrasyonlarda HNT ile katkılandırıldı. Ele geçen homojen karışımlar kalıplara döküldü ve jelleşmeyi tamamlamak için 37°C'de inkübe edildi. Ardından -80°C'de dondurulan örneklerin liyofilize edilmesiyle üç boyutlu kompozit iskeleler (3B) üretildi. Kompozit iskelelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı analiz yöntemleri ile incelenirken, biyolojik uygulamalarda kullanım potansiyeli kan uyumluluğu ve in vitro sitotoksisite testleri ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, kompozit iskelenin kemik dokusu mühendisliği için potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir.

Mayıs 2024, 67 sayfa

Anahtar kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Halloysit, Hücre dışı matris, Kompozit iskele

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NATURALLY SOURCED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Miray YILDIRIM

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aysel KOÇ DEMİR

In this thesis, it is aimed to develop composite scaffolds for bone tissue engineering studies using tendon extracellular matrix (ECM) and halloysit nanotubes (HNT). For this purpose, in the first stage of the study, bovine tendon tissue cells were decellularized, and the effectiveness of the decellularization process was evaluated using SEM, FTIR, DNA content analysis and protein content analysis. In the second stage, the decellularized tendon extracellular matrix (dtECM) was enzymatically digested. At the end of the digestion procedure, the pH of the fluid viscous solution was adjusted to 7.4. In the next step, neutralized dtECM pre-gel solutions were supplemented with varying concentrations of HNT. The obtained homogeneous mixtures were cast into molds and incubated at 37°C to complete gelation. Subsequently, the samples were frozen at -80°C and lyophilized to produce three-dimensional composite scaffolds (3D). While the physical and chemical properties of the composite scaffolds were examined using various analysis methods, the potential for use in biological applications was evaluated through hemocompatibility and in vitro cytotoxicity tests. The results obtained indicate that the composite scaffold is a potential candidate for bone tissue engineering.

May 2024, 67 pages

Key Words: Bone tissue engineering, Halloysite, Extracellular matrix, Composite scaffold

ÖNSÖZ

Kemik dokusu mühendisliğinin (KDM) amacı, çeşitli kemik hastalıkları veya kırıklardan kaynaklanan kemik kusurlarını alternatif yaklaşımlarla tedavi etmektir. KDM yaklaşımının temel ilkesi, hücre, biyomalzeme ve çeşitli biyoaktif molekülleri birleştirerek hedeflenen dokuya veya organa özgü üç boyutlu, fonksiyonel biyolojik sistemler tasarlamak ve geliştirmektir. Hedefe başarılı bir şekilde ulaşılmasını sağlayan en önemli faktörlerden biri, hücreler için "yapay kültür ortamını" taklit edecek en ideal biyouyumlu ve biyobozunur üç boyutlu (3B) biyomalzemelerin geliştirilmesidir. Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında dtHDM ve HNT kullanarak kemik doku mühendisliği iskeleleri geliştirilmiş ardından karakterizasyonları yapılarak KDM için kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Yüksek lisans hayatım boyunca desteğini, ilgisini, bilgisini ve danışmanlığını esirgemeyen, araştırmalarımda ve çalışmamda bilgi birikimi ve tecrübesi ile her zaman yanımda olan, bir danışmandan ziyade hayattaki rol modelim olan her zaman ilerlememi sağlayan ve hayatıma ışık tutan danışmanım Sayın Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR'e,

Tezimin deneysel çalışmalarını Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan "Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı''nda gerçekleştirmeme olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

dtHDM'nin karakterizasyonu konusundaki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

FTIR ve TGA analizleri konusundaki desteklerinden dolayı Sayın Prof.Dr. Orhan ATAKOL'a,

Laboratuvardaki çalışmalarıma katkılarından dolayı arkadaşım Araş. Gör. Sayın Seyithan KANSIZ'a,

Mekanik test konusundaki katkılarından dolayı Sayın Dr. M. Taner VURAT'a

Hayatımın her alanında yanımda olan, beni her konuda aydınlık bir geleceğe taşıyan, her zaman yolumu aydınlatan, maddi ve manevi en büyük destekçim eşim Sayın Ahmet YILDIRIM'a

Üzerimde en büyük emeğe sahip olan beni yetiştiren, büyüten ve bugünlere gelmemi sağlayan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen dünyanın en güzel annesine; annem Sayın Şükran TORAMAN'a

Beni onlara örnek olmak için bilimin ışığında aydınlık bir geleceğe ilerlememe teşvik eden, sadece hayatımda var oluşlarının getirdiği derin sevgi nedeniyle en büyük destekçilerim olan ve bana hayatımın en büyük amacını bahşeden sevgili çocuklarım Uras ve Utku YILDIRIM'a

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Miray YILDIRIM
Ankara, Mayıs 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....
ETİK i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ iv
KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
ÇİZELGELER DİZİNİ v
1.GİRİŞ 1
2.KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Kemik 3
2.1.1 Kemik dokusu 3
2.1.2 Kemik hücreleri 4
2.1.3 Kemik matriksi 5
2.1.4 Kemik zarları 5
2.1.4.1 Periosteum 6
2.1.4.2 Endosteum 6
2.1.5 Kemik tipleri 6
2.1.5.1 Primer kemik dokusu 6
2.1.5.2 Sekonder kemik dokusu 6
2.1.6 Kemik gelişimi 8
2.1.6.1 İntramembranöz kemikleşme 8
2.1.6.2 Endokondral kemikleşme 9
3.DOKU MÜHENDİSLİĞİ 11
3.1 Kemik Doku Mühendisliği 12
3.1.1 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler 13
3.1.1.1 Metalik biyomalzemeler 14
3.1.1.2 Polimerik biyomalzemeler 14
3.1.1.3 Doğal polimerler 15
3.1.1.3.1 Kollajen 15
3.1.1.3.2 Alginat 16
3.1.1.3.3 Hücre dışı matriks 16

3.1.1.4 Yarı sentetik polimerler **17**
3.1.1.5 Sentetik polimerler **17**
3.1.1.6 Seramik biyomalzemeler **18**
3.1.1.7 Killer **20**
3.1.1.7.1 Halloysit nanotüpler (HNT) **21**
3.1.1.8 Kompozit biyomalzemeler **23**
3.1.2 Doku iskelesi üretim teknikleri **24**
3.1.2.1 Partikül uzaklaştırma yöntemi **25**
3.1.2.2 Dondurarak kurutma yöntemi **25**
3.1.2.3 Gazla köpüklendirme yöntemi **25**
3.1.2.4 Elektroeğirme yöntemi **26**
3.1.2.5 Bilgisayar destekli tasarım yöntemi **26**
3.2 Deselülerizasyon **26**
4.MATERYAL VE YÖNTEM **28**
4.1 Kompozit Biyomalzemenin Hazırlanması **28**
4.1.1 Doğal tendon dokusu deselülerizasyonu **28**
4.1.2 Deselülerize tendon dokusunun karakterizasyonu **29**
4.1.2.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi **29**
4.1.2.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy, FTIR) analizi **29**
4.1.2.3 DNA içeriği analizi **29**
4.1.2.4 Lowry protein analizi **30**
4.2 Jel Formunda Hücre Dışı Matriksin Eldesi ve Karakterizasyonu **30**
4.2.1 Jel formunda hücre dışı maktriks eldesi **30**
4.2.1.1 Türbidimetrik analiz **31**
4.3 Kompozit İskelelerin Karakterizasyonu **32**
4.3.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi **33**
4.3.2 X-Işını difraksiyonu (XRD) analizi **33**
4.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA) **33**
4.3.4 HNT-dtHDM iskelelerin *in vitro* biyoaktivitesinin belirlenmesi **33**
4.3.4.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi **35**
4.3.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) analizi **35**
4.3.5 HNT-dtHDM iskelelerin biyouyumluluk analizi **35**
4.3.5.1 *In vitro* sitotoksisite testi **35**

4.3.5.2 Hemoliz testi **35**
4.4 İstatistiksel Analizler **36**
5.BULGULAR **37**
5.1 Deselülerizasyon Etkinliğinin Karakterizasyon Bulguları **37**
5.1.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analiz bulguları **37**
5.1.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) analizi bulguları **37**
5.1.3 DNA içeriği analizi bulguları **38**
5.1.4 Lowry protein analizi bulguları **39**
5.2 Jel Formunda Hücre Dışı Matriksin Karakterizasyon Bulguları **40**
5.2.1 Türbidimetrik analiz bulguları **40**
5.3 Kompozit İskelelerin Karakterizasyon Bulguları **41**
5.3.1 Su tutma kapasitesi analizi bulguları **41**
5.3.2 Kütle kaybı analizi bulguları **42**
5.3.3 Basma testi bulguları **43**
5.3.4 SEM analiz bulguları **44**
5.3.5 XRD analizi bulguları **45**
5.3.6 TGA bulguları **46**
5.3.7 *In Vitro* biyoaktivite analiz bulguları **47**
5.3.7.1 SEM analizi bulguları **48**
5.3.7.2 FTIR analizi bulguları **49**
5.3.8 Biyouyumluluk testleri bulguları **53**
5.3.8.1 *In vitro* sitotoksisite testi bulguları **53**
5.3.8.2 Hemoliz testi bulguları **54**
6.TARTIŞMA VE SONUÇ **56**
KAYNAKLAR **61**
ÖZGEÇMİŞ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR DİZİNİ

$(CH_2OH)_3CNH_2$	Tris(hidroksimetil)aminometan
˚C	Derece Celcius
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
A	Absorbans
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
cm^{-1}	Dalga boyu
CO_3^{2-}	Karbonat
dk	Dakika
dtHDM	Deselülerize hücre dışı matriks
FTIR	Fourier-transform infrared
G	Yerçekimi Kuvveti
HCl	Hidroklorik asit
HDM	Hücre dışı matris
HNT	Halloysit
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
KDM	Kemik Doku Mühendisliği
M	Molar
mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre

PAA	Perasetik asit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)
PGA	Poliglikolik asit
pH	Asitlik derecesi
PK	Pozitif kontrol
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PO_4^{3-}	Fosfat
SBF	Simulated Body Fluid (Simüle Vücut Sıvısı)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Scanning Electron Microscopy
t	Zaman
TGA	Termogravimetrik Analiz
tHDM	Tendon hücre dışı matriks
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Makrodan nanoya kemik dokusu 3
Şekil 2.2 Kemik hücre tipleri 5
Şekil 2.3 Süngerimsi kemik oluşumu. (A) Süngerimsi kemik dokunun bulunduğu yer (B) Süngerimsi kemik dokunun mikrokobik yapısı 7
Şekil 2.4 Kemik dokusunun mikroskobik yapısı 8
Şekil 2.5 İntramembranöz kemikleşme (a) Mezenşimal hücre yoğunlaşması. (b) Kemikleşme merkezinin oluşumu. (c) Osteoblastlar tarafından osteoid oluşumu. (d) Osteoidin kalsifikasyonu ve osteoblastların osteosite dönüşümü. 9
Şekil 2.6 Endokondral Kemikleşme (a) Farklılaşan mezenşim hücrelerin yoğunlaşması. (b) Hyalin kıkırdak kalıbının oluşumu (c) Primer kemikleşme oluşumu (d) Kan damarlarının penetrasyonu (e) Sekonder kemikleşme merkezlerinin oluşumu. (f) Gelişimi tamamlanmış bir kemik yapı 10
Şekil 3.1 Biyoseramiklerin biyoaktivitelerine göre sınıflandırılması (a) biyoinert, (b) biyoaktif, (c) yüzey aktif (d) biyoemilebilir seramik malzeme 19
Şekil 3.2 Tetrahedral ve oktahedral tabakalar 21
Şekil 3.3 (a) Halloysitin kristal yapısının şematik diyagramı, (b) Halloysit parçacığının yapısı, (c–d) Halloysitin TEM ve AFM görüntüleri 22
Şekil 3.4 Halloysit nanotüp yapısı 23
Şekil 3.5 Kompozit malzeme oluşumu 23
Şekil 4.1 Sığır tendon dokusunun deselülerize edilme aşamaları 28
Şekil 4.2 Jel formundaki hücre dışı matriksin pH 7,4'e ayarlanması 31
Şekil 4.3 Jelasyon öncesi (A) ve sonrası (B) örneklere ait makroskobik görüntüler 32
Şekil 4.4 Yapay vücut sıvısının hazırlanması 34
Şekil 4.5 Hemoliz testi 36
Şekil 5.1 (A) doğal tendon dokusu ve (B) dtHDM dokusuna ait SEM görüntüleri 37
Şekil 5.2 Doğal HDM ve dtHDM yapılarına ait FTIR spektrumları 38
Şekil 5.3 Doğal tendon dokusu ve deselülerize tendon dokusuna ait DNA içerikleri 39
Şekil 5.4 Doğal tendon dokusunun ve deselülerize tendon dokusunun protein içerikleri 40
Şekil 5.6 Farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin su tutma kapasiteleri grafiği 42

Şekil 5.7 Farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin kütle kaybı grafiği 43
Şekil 5.8 dtHDM ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin basma testi sonuçları 44
Şekil 5.9 A: dtHDM, B: %1 HNT-dtHDM, C: %2 HNT-dtHDM, D: %4 HNT-dtHDM 45
Şekil 5.10 Kompozit iskele örneklerinin XRD analizi grafiği 46
Şekil 5.11 dtHDM, HNT ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan iskelelerin TGA grafiği 48
Şekil 5.12 Kompozit iskelelerin SBF içinde 3,7 ve 14 günlük inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri 48
Şekil 5.13 %1 HNT-dtHDM'ye ait SBF öncesinde ve sonrasındaki FTIR spektrumları 50
Şekil 5.14 %2 HNT-dtHDM'ye ait SBF öncesinde ve sonrasındaki FTIR spektrumları 50
Şekil 5.16 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 3. gün FTIR spekturumu 51
Şekil 5.17 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 7. gün FTIR spektrumu 52
Şekil 5.18 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 14. gün FTIR spekturumu 52
Şekil 5.19 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin % hücre canlılık oranları 53
Şekil 5.20 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin NK ve PK değerlerini içeren hemoliz yüzdeleri grafiği 54
Şekil 5.21 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin hemoliz grafiği 55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 SBF hazırlanırken kullanılan kimyasallar (1,5X konsantrasyon, 1L, pH 7,40) (Kokubo vd. 2006) 34

Çizelge 5.1 dtHDM, HNT ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan iskelelerin yapılarında sıcaklığa bağlı oluşan % kütle kayıpları 47

1. GİRİŞ

Vücutta yumuşak dokulardan meydana gelen yapıları destekleyen kemik dokusu, vücuda dayanıklılık kazandırmasının yanısıra kalsiyum-fosfat dengesini düzenleyen ve hematopoez için uygun ortam sağlayan oldukça dinamik ve çok yönlü bir dokudur (Amini vd. 2012).

Kemik dokusu ve bu dokunun rejenerasyon yeteneği tarih öncesi yıllardan beri insanlık için oldukça fazla önem arz etmiştir. Yaşanan kazalar ve travmalar sonucu hasar gören veya doğuştan eksik şekilde olabilen kemik dokusunun tedavisi konusunda uzun yıllardan beri yapılan çok çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Kemik dokusunun rejenerasyon yeteneği sınırlı olduğundan bir noktadan sonra hasar görmüş kemik dokusu dışarıdan tedavi desteğine ihtiyaç duymaktadır (Annamalai vd. 2017). Bu konuda süregelen geleneksel tedavi yöntemleri cerrahi müdahale eksikliği, nakil bekleme süreleri ve benzeri pek çok nedenden ötürü dezavantajlı olabilmekte ve eksik kalabilmektedir (Liu vd. 2013). Bu nedenle son yıllarda kemik dokusunun da yapay ortamda üretimi klinik tıp uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Bu bağlamda, laboratuvar koşullarında uygun biyomalzemeler kullanılarak insan vücudu ile uyumlu, biyobozunur yapay organ ve dokular üretmeyi amaçlayan doku mühendisliği çalışmaları devreye girmiştir (Cerroni vd. 2002).

Multidisipliner bir bilim olan doku mühendisliği çalışmalarının bir parçası olarak ortaya çıkan kemik doku mühendisliğinde kemik hasarlarının, yaralanmalarının ve eksikliklerinin giderilmesi amaçlanmış ve kemik dokusunun özelliklerine yakın, rejenerasyon yeteneği gösterebilen biyomalzemelerden üç boyutlu, hücre taşıyıcı doku iskelelerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda önemli gelişmeler elde edilmiştir (Amini vd. 2012).

Bu tez çalışmasının amacı sığırdan elde edilen deselülerize tendon ve halloysit kullanılarak kemik dokusu tedavilerinde kullanılabilecek potansiyele sahip bir yapı

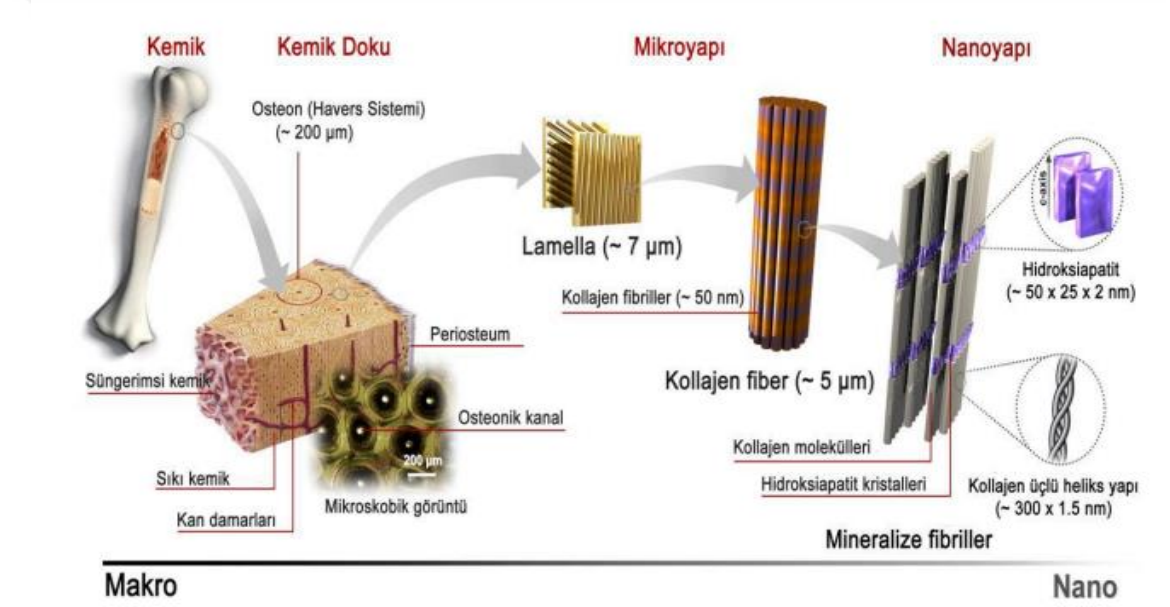
iskelesi geliştirmektir. Bu bağlamda jel formunda deselülerize tendon HDM (dtHDM), doğal halloysit ile belli oranlarda bir araya getirilerek 3B biyokompozit iskeleler geliştirilmiştir. Elde edilen dtHDM temelli biyokompozit iskelelerin fiziksel, kimyasal, mekanik, morfolojik ve biyolojik özellikleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kemik

2.1.1 Kemik dokusu

Kemik dokusu, kanın oluşumunu sağlayan kemik iliği ve bunları çevreleyen bağlardan oluşmuş aynı zamanda vücudun destek ve hareketinden sorumlu iskelet sisteminin yapı taşıdır **(Şekil 2.1)** (Topaloğlu vd. 2017).



Şekil 2.1 Makrodan nanoya kemik dokusu (Topaloğlu vd. 2017)

Kemik dokusu, kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesi sonucu güçlenmiş bir organik matristen oluşan mineralize bir dokudur. Bu nedenle doğal bir kompozit malzemedir.

Bir organizmada kemik dokusunun yerine getirdiği bazı görevler; destek ve koruma, mekanik dayanıklılık, hareket, kalsiyum-fosfat dengesi, hematopoez (kan hücrelerinin sentezi) için uygun ortam sağlama, kas ve tendonların tutunma yeri olma ve enerji depolama şeklinde sayılabilir.

2.1.2 Kemik hücreleri

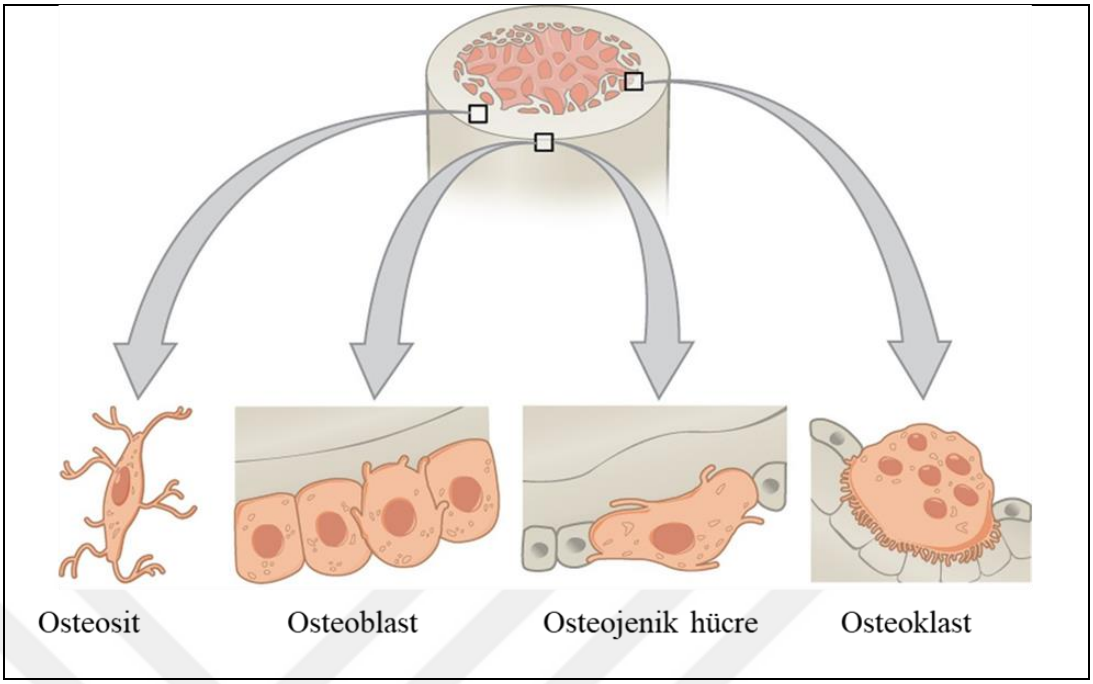
Kemiğin yapımı ve yeniden düzenlenmesi şeklindeki görevlere sahip hücre tipleri; osteojenik progenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır **(Şekil 2.2)** (Kaufmann vd. 2019).

Osteojenik hücre, mezenşim hücrelerinin kemik dokusunu meydana getirmek amacıyla farklılaşması sonucu oluşan öncü kemik hücreleridir. Hücrelerin bazıları bölünürken bazıları osteoblastlara dönüşür.

Osteoblastlar, tip 1 kollajen liflerini ve matriks proteinlerini sentezlerler. Bu sentezlerle osteoid dokuyu oluştururlar ve içinde gömülü kalırlar. Daha sonra basıklaşarak osteositlere dönüşürler (Topaloğlu vd. 2017).

Kemik dokusunun canlı kalabilmesini sağlayan osteositler, daha az organelli ve daha küçük olduklarından kemik matriksindeki laküne adı verilen boşluklarda bulunurlar. Osteositler mekanik dirence sahip olduklarından kemiğin yeniden şekillenmesinde görev alırlar ancak yaşlanıp ölen osteositler bulundukları yerdeki matriksi bozmaya başlayacağından osteoklastlar tarafından rezorbe edilir (Topaloğlu vd. 2017).

Kandan gelen monositler birleşerek osteoklastları oluştururlar. Osteoklastlar kemik dokusunun yıkımını gerçekleştirdiklerinden kemik yapımı sırasında ortaya çıkıp kemikler son şeklini alınca ortadan kaybolurlar.



Şekil 2.2 Kemik hücre tipleri (Kaufmann vd. 2019)

2.1.3 Kemik matriksi

Kemik matriksi %70 oranında mineral, %22 oranında protein ve %8 oranında sudan oluşmaktadır. Mineralleri oluşturanlar kalsiyum ve fosfattan oluşan hidroksiapatit kristalleridir. Bu kristaller kollajen moleküllerinin oluşturduğu boşluklarda birikerek kemiğin karakteristik sertliğini ve dayanıklılığını sağlarlar. Organik matriksin ise yaklaşık %90'ını kollajenler oluşturur ve bu kollajenler osteoblastlar tarafından üretilir. Geriye kalan %10'luk kısmı kollajen olmayan bağlayıcı ve büyümeden görev alan proteinler oluşturur.

2.1.4 Kemik zarları

Kemik dokusu iç ve dış yüzeyler olarak kemiğin oluşumunda rol oynayan bağ dokusu ve hücrelerden oluşan periosteum ve endosteum tabakaları ile kaplanmıştır.

2.1.4.1 Periosteum

Periosteum kemik dokusunu dıştan saran kalın bir tabakadır. Bu tabaka, dış fibröz ve iç hücresel tabaka olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Dış kısım kollajen lifleri, fibroblastları ve kan damarlarını içeren osteojenik özellikte bir yapıya sahiptir. İç hücresel tabaka osteojenik potansiyele sahip osteoprogenitör hücreleri içermektedir. Demetler halinde periostal kollajen liflerin biraraya gelmesiyle oluşan sharpey lifleri kemik matriksi içerisine entegre olarak periosteumu kemiğe bağlamaktadırlar.

2.1.4.2 Endosteum

Kemik dokusunun içinde kalan boşlukları örten, tek bir tabakadan oluşmuş osteoprogenitör hücreler, bağ dokusu ile bir miktar da osteoblast içeren bir yapıya sahiptir.

2.1.5 Kemik tipleri

Kemik tipleri genellikle primer kemik dokusu (olgunlaşmamış kemik) ve sekonder kemik dokusu (olgun kemik) olarak iki kategori altında incelenmektedir.

2.1.5.1 Primer kemik dokusu

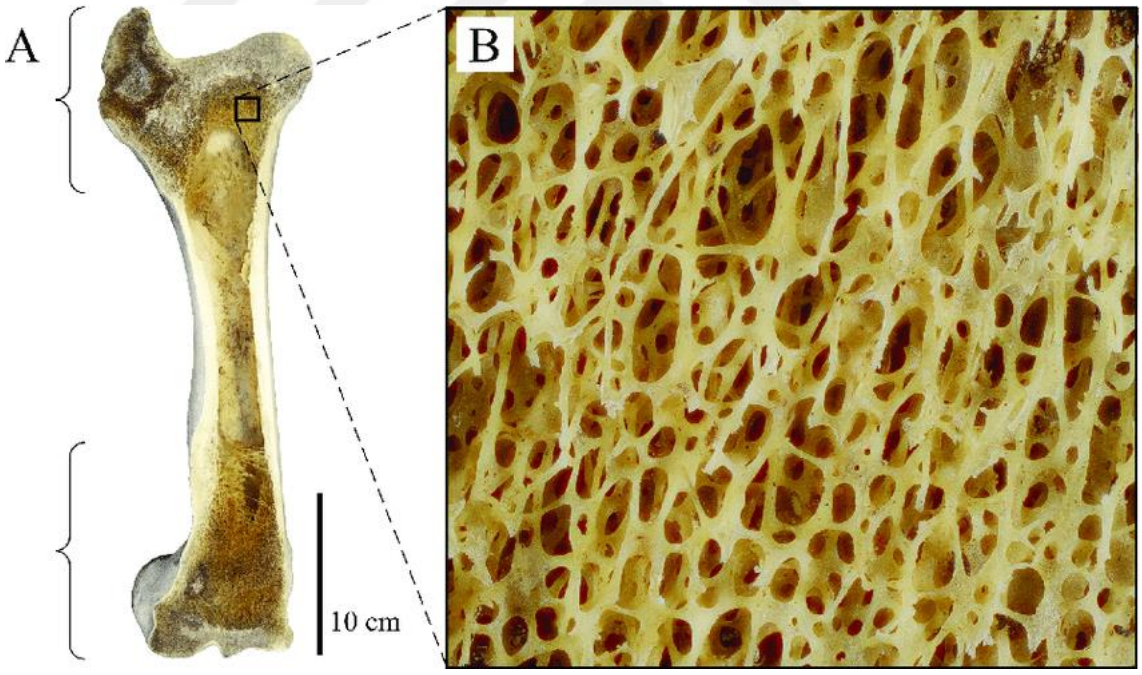
Primer (olgunlaşmamış) kemik dokusu hızla büyüyen ve değişen kemik dokusunu temsil etmektedir. Genellikle hızlı büyüme dönemlerinde, çocukluk ve ergenlik döneminde ve ayrıca kırık ile travma gibi onarım süreçlerinde ortaya çıkan kemik türüdür. Primer olan kemik dokusu geçicidir, yeniden şekillenmeye uğrayarak sekonder kemik dokusuna dönüşmektedir.

2.1.5.2 Sekonder kemik dokusu

Sekonder (olgun) kemik dokusu, primer kemik dokusunun yeniden şekillenmesi

neticesinde oluşmuştur. Kollajen lifleri bu dokuya özgü olarak lameller halinde organize olmuştur. Bu kollajen lifleri 3-7 μm kalınlığında olup ya birbirine paralel ya da vasküler bir kanal etrafına dairesel olarak yerleşen lameller halinde bulunmaktadır. Kalsiyum tuzlarının hidroksipatit kristalleri şeklinde kollajen lifler üzerinde birikmesiyle minerilizasyon işlemi gerçekleşmektedir. Sekonder kemik dokusunu oluşturan yapılar süngerimsi (spongiyöz, %20) ve kortikal (kompakt, %80) kemik olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır.

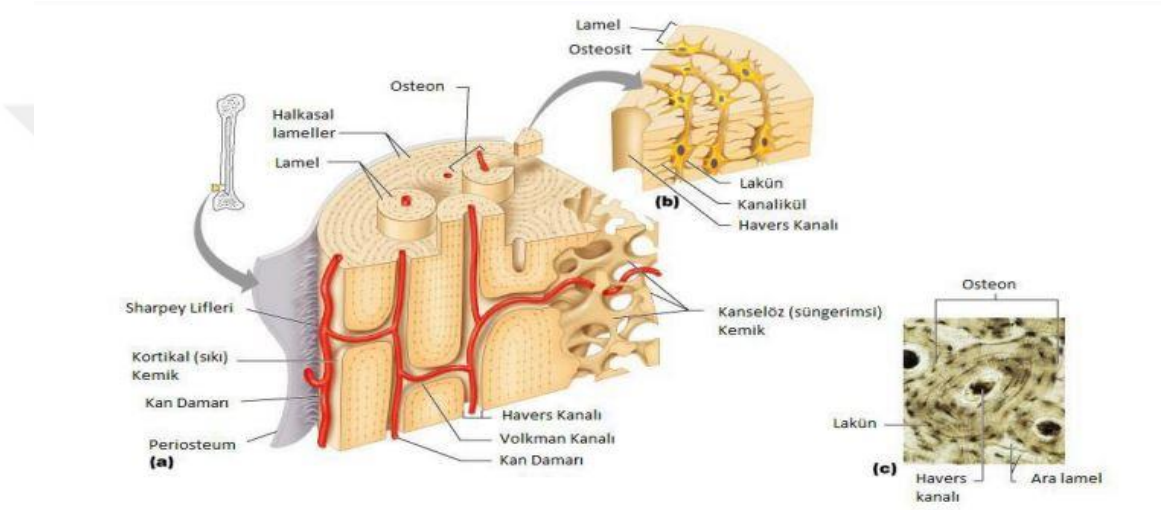
Süngerimsi kemik yüksek oranda gözenekliliğe (%50-90) sahip olup özellikle yassı kemiklerin iç yüzeyleri ile kısa ve uzun kemiklerin epifiz ve metafiz bölgelerinde bulunmaktadır. Birbiriyle anastomozlaşan kemik bölmeciklerinden oluşan sekonder kemiğin yapısında damar ya da volkman ve havers kanalları bulunmamaktadır **(Şekil 2.3)**.



Şekil 2.3 Süngerimsi kemik oluşumu. (A) Süngerimsi kemik dokunun bulunduğu yer (B) Süngerimsi kemik dokunun mikrokobik yapısı (Bishop vd. 2018)

Kompakt kemik yassı olan kemik dokusunun iç ve dış yüzeylerinde bulunurken uzun olan kemiklerin sadece dış yüzeyinde bulunan homojen ve sıkı bir yapıya sahip bir kemik

türüdür. Havers sistemi olarak bilinen silindirik sistemlerden oluşmaktadır. Havers sistemi etrafında kollajen lif ve mineralize matriksten oluşmuş yapıştırıcı özellikteki madde ile çevrelenmektedir. Havers sistemleri uzun ve sıkça dallanmış olup diyafizin uzun olan eksenine paralel yapılanmaktadır. Haver sistemleri 4 ila 20 dairesel lamelden oluşmaktadır. Havers sisteminin ana fonksiyonu ise besin maddelerini sert kemik dokusuna götürmektir. Bu sistem Volkman kanalı olarak anılan yan kanallar aracılığıyla kemik iliği boşluğu ve periosteum ile bağlantı kurmaktadır **(Şekil 2.4)**.



Şekil 2.4 Kemik dokusunun mikroskobik yapısı (Tunçay 2013)

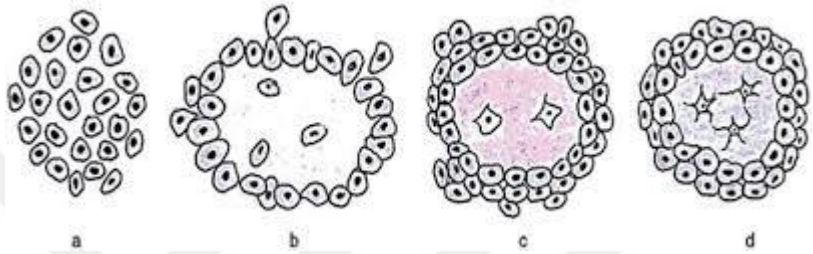
2.1.6 Kemik gelişimi

Kemik gelişimi intramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme olarak iki temel süreçle gerçekleşmektedir.

2.1.6.1 İntramembranöz kemikleşme

Bu tip kemikleşme, genellikle kafatası gibi düz kemiklerin oluşumundan ve kısa kemiklerin kalınlaşmasından sorumludur. Kemikleşme mezenkimal doku yoğunlaşması ile başlamakta ve mezenkimal hücrelerinin bir kısmının osteoblastlara dönüşmesi ile devam etmektedir. Osteoblastların kemik matriksini oluşturması ile kalsifikasyon

başlamaktadır. Osteoblastların bir kısmı osteositlere dönüşmektedir. Gelişmekte olan kemik adacıkları "spikül" adı verilen iğneciklere benzer yapılardır. Kollajen lifler, bu spiküllerin içinde gelişigüzel bulunmaktadır. Spiküller arasında, kapillerler, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler bulunan kaviteler vardır. Kemik iliği hücrelerinin oluşumu da kan damarları, bağ dokusu ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler ile sağlanmaktadır **(Şekil 2.5)**.

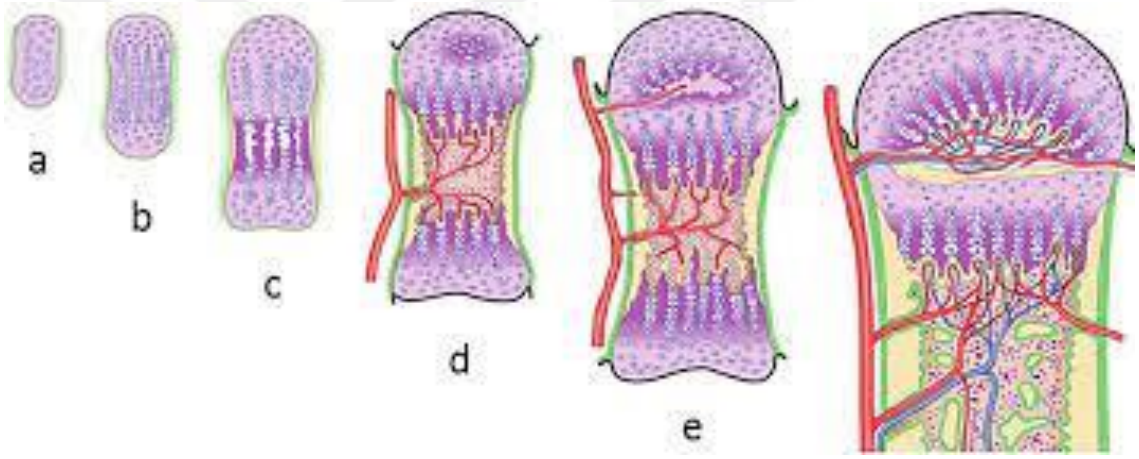


Şekil 2.5 İntramembranöz kemikleşme (a) Mezenşimal hücre yoğunlaşması. (b) Kemikleşme merkezinin oluşumu. (c) Osteoblastlar tarafından osteoid oluşumu. (d) Osteoidin kalsifikasyonu ve osteoblastların osteosite dönüşümü. (Kini ve Nandeesh 2012)

2.1.6.2 Endokondral kemikleşme

Endokonral kemikleşme, uzun ve kısa kemiklerin oluşumunu sağlamaktadır. Kemik oluşumu, hiyalin kıkırdaktan oluşan bir model içinde gerçekleşmektedir. Bu süreç temelde iki adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda, kemiğin modelinde yer alan kondrositlerin aşırı gelişimi ve harabiyeti vardır. Daha sonra osteojenik hücreler kalsifikasyonu başlatmaktadır. İlk oluşan kemik dokusu, perikondriumun içindeki intramembranöz kemikleşme yoluyla meydana gelmektedir. Bu durum, bir kemik tabakası oluşturduğundan kemik halkası adını almaktadır. Oluşan yeni kemik, kemik halkası tarafından sarıldığından içindeki kondrositler dejenere olup kıkırdak matriksi kalsifiye olmaktadır. Osteoklastların kemik halkasında açtığı deliklerden osteojenik tomurcuğunun kan damarları geçmekte ve yoğunlaşan kıkırdak matriks arasına girmektedir. Kan damarları ve ayrıca farklılaşan mezenşim hücrelerinin de devreye girmesiyle osteoblastlar oluşmaktadır. Osteoblastlar kıkırda matriksinde kalsifiye bir tabaka oluşturarak kemik dokunun sentezine başlamakta ve ardından kalsifiye kıkırdak artıkları osteoklastlar tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Kemik büyüdükçe,

resorbsiyonla ortaya çıkan kemik iliği kavitesi de büyümektedir. Uzunlamasına büyüme, kemik dokusunu oluşturan tüm diyafiz bölgeler kaplandığında gerçekleşmiş olmaktadır. Kemikleşmenin başından beri aktif olan osteoklastlar kemik dokusunun merkezinde yer alan kemik iliği kavitesini oluşturmaktadırlar. Kemik iliği kavitesi, kemikleşme tamamlanana kadar epifizlere kadar büyümeye devam etmektedir. Epifizlerin ortasında ise sekonder kemikleşme oluşmakta ve büyüme yönleri ise ışınsal olmaktadır. Epifizlerde sekonder kemik dokusunun işgali sonucu kıkırdak doku iki yerde hapsolmuş olmaktadır. Bunlar eklem kıkırdağı ve epizyal kıkırdaktır. Eklem kıkırdağı hayat boyu kalıcıdır ve kemik oluşumuna katılmamaktadır. Epifizyal kıkırdak ise epifizleri diyafizlere bağlamaktadır. Epifizyal kıkırdak büyüdüğünde kemik büyümesi de durmaktadır **(Şekil 2.6)**.



Şekil 2.6 Endokondral Kemikleşme (a) Farklılaşan mezenşim hücrelerin yoğunlaşması. (b) Hyalin kıkırdak kalıbının oluşumu (c) Primer kemikleşme oluşumu (d) Kan damarlarının penetrasyonu (e) Sekonder kemikleşme merkezlerinin oluşumu. (f) Gelişimi tamamlanmış bir kemik yapı (Standring 2016)

3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Belirli bir ölçüde rejenerasyon (yenilenme) kabiliyetine sahip olmamıza rağmen yaralanmalar, çeşitli hastalıklar ve konjenital malformasyonlar her zaman yaşantımızın olumsuz bir parçası olmuştur. Bir dokunun ya da organın hasara uğraması veya kaybı çoğu zaman insan ölümleri ile sonuçlanan ciddi bir sağlık problemidir. Bu kapsamda dokuların, organların ve hatta daha karmaşık canlı organizmaların yapay ortamda üretimi insanlık tarihinin en ilgi uyandıran konularından biri olmuştur. Uzuvları, dişleri ve diğer dokuları değiştirmek için geliştirilen yapay veya prostetik malzemeler (medikal biyomalzemeler) kaybedilen fonksiyonun kısmi restorasyonunu (onarımını) sağlamakla birlikte, bir dokunun bir diğerinin 'yerine kullanılabilme' fikrini de gündeme getirmiştir. Böylece bu tip sağlık problemlerinin tedavisinde organ naklini de içeren pek çok cerrahi yöntemin tedavilerde kullanımı söz konusu olmuştur.

Organizmadaki hasar görmüş dokuların tedavisinde otogreftlerin (hastadan alınan), allogreftlerin (diğer insanlardan alınan) ve zenogreftlerin (hayvanlardan alınan) kullanımı tercih edilmektedir. Otograft yaygın olarak tercih edilse de kısmi doku ölümleri, zaman alıcı ve pahalı olması gibi dezavantajları vardır. Allogreftta ise hastalık bulaşma ve immün yanıt oluşturma riskleri vardır. Zenogreft ise ileri derecede immün yanıt oluşturma eğilimindedirler (Elçin 2008). Bu şekilde mevcut tedavilerde ortaya çıkan yetersizlikler ve nakil için artan organ talepleri, bilim adamlarını yeni teknolojileri kullanarak, alternatif çözüm bulma yoluna yönlendirmiştir. Bu noktada yeni bir tedavi yaklaşımı olan 'Doku Mühendisliği' kavramı ortaya çıkmıştır.

1987'de Dr. Y.C. Fung'un doku mühendisliğini tanımlaması ve ardından Langer ve Vacanti (1993) tarafından daha ayrıntılı bir şekilde açıklanması, bu alanın temelini oluşturmuştur (Langer ve Vacanti 1993). Bu çalışmalar, doku mühendisliğinin sadece dokuları yeniden oluşturmakla kalmayıp, aynı zamanda fonksiyonel organların ve hatta karmaşık canlı sistemlerin yapay ortamda üretilmesi vizyonunu da içerdiğini belirtmiştir. Doku Mühendisliği (DM) için farklı tanımlamalar yapılmakla birlikte bu terim en güncel olarak şu şekilde ifade edilebilir: "Doku mühendisliği, hasar görmüş dokunun yerine, biyouyumlu ve biyobozunur biyomalzemelerle laboratuvar koşullarında yapay doku

üretmeyi amaçlayan multidisipliner bir bilim alanıdır (Yılgör Huri vd. 2010)".

Doku mühendisliği, modern tıbbın sınırlarını zorlayan ve insanlığın en derin arzularından biri olan "tamir ve yenilenme" ihtiyacına bilimsel bir çözüm sunma amacından yola çıkarak, insan vücudunun doğal iyileşme süreçlerini taklit ederek, hasar görmüş veya kaybedilmiş dokuların ve organların yerini alabilecek yeni yöntemler geliştirmeyi hedeflemektedir. Doku mühendisliği, sadece hastalıkların tedavisinde değil, aynı zamanda yaralanmaların iyileştirilmesinde ve yaşlanma sürecinin etkilerinin azaltılmasında da önemli bir rol oynamaktadır.

Doku mühendisliği biyomalzemeler, hücreler ve biyoaktif moleküller olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Biyomalzemeler, doku mühendisliğinde kritik bir rol oynamaktadırlar. Bunlar, doğal dokunun yapısını taklit eden, hücrelerin yapışmasını, büyümesini ve çoğalmasını destekleyen malzemelerdir. Doku iskeleleri olarak da bilinen bu malzemeler, hücrelerin yeni hücre dışı matriksleri oluşturmasına yardımcı olurken, aynı zamanda biyouyumlu ve biyobozunur olmalıdırlar. Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan hücreler, hastanın kendisinden (otogreft), diğer insanlardan (allogreft) veya hayvanlardan (zenogreft) elde edilebilir. Fonksiyonel bir doku oluşum sürecinde hücresel fonksiyonları desteklemek amacıyla kullanılan büyüme faktörleri, proteinler, sitokinler gibi uyarıcı etkiye sahip biyoaktif moleküllerdir (Blose vd. 2014).

DM çalışmalarında kullanılan bileşenlerin sayısına göre farklı yaklaşımlar mevcuttur. Yeni doku oluşumu için birinci yaklaşımda sadece biyomalzemelerin, ikinci yaklaşımda sadece hücrelerin, üçüncü yaklaşımda biyomalzemelerin ve biyolojik sinyallerin, dördüncü yaklaşımda ise biyomalzemelerin, hücrelerin ve biyolojik sinyallerin birarada kullanılmını söz konusudur.

3.1 Kemik Doku Mühendisliği

Kemik doku mühendisliği klinik çalışmalarda kullanılması amacıyla laboratuvar ortamında canlı ve fonksiyonel üç boyutlu kemik doku oluşturulması ile kemik kaybına

yol açan kırıklar ya da hastalıkların tedavisini mümkün kılmayı hedefleyen bir bilim alanıdır (Yılgör Huri vd. 2010).

Kemik doku mühendisliği alanında, hücrelerin üç boyutlu organizasyonlarını sağlamak amacıyla geliştirilen biyomalzemelere 'iskele' denmektedir (Püren Akgüner vd. 2021). Kemik doku iskelesi yapay bir hücre dışı matriks, osteoblastları, hücrelerin bağlanıp, farklılaşmasını aynı zamanda mineralize kemik dokunun oluşumunu destekleyen faktörleri içerisinde barındırmalıdır (Kang vd. 2018). Bu bağlamda hasarlı kemik dokusu en ince ayrıntısına kadar incelendikten sonra aynı şekilde ve sağlamlıkta üç boyutlu polimer biyomalzemelerden iskele yapılar oluşturulmaktadır. Bu yapılar yeterlilik testlerden geçirilir ve insan vücuduna yerleştirildikten sonra kemik hücreleriyle dolması beklenir. Kemik doku mühendisliğinin en önemli amacı, kemik dokusunu ve iyileşme aşamalarını en iyi şekilde canlandırabilmek için üç boyutlu iskele üzerinde yeterli miktarda mineralize doku elde edebilmektir (Yılgör Huri vd. 2010). Bu bağlamda iskelelerden beklenen özellikler biyouyumlu ve biyobozunur olmaları, yüksek gözeneğe ve geniş yüzey alanına sahip olmaları, mekanik olarak dayanıklı olmaları, hücre büyümesini arttırmaları, hücresel adezyonu ilerletmeleri ve gözeneklerinin birbirleriyle bağlantılı olarak homojen dağılım göstermesi olarak sayılabilir (Narayanan vd. 2016).

3.1.1 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Vücudun hastalıklı ve hasar görmüş bir bölümünü iyileştirmek ya da hasarlı dokunun yerine kullanmak için geliştirilen vücut içi sıvıları ile etkileşimde bulunan malzemeler biyomalzeme olarak tanımlanmaktır.

Doku mühendisliği yaklaşımında kullanılan biyomalzemelerin sahip olması gereken temel özellikler şu şekilde özetlenebilir (Vacanti ve Langer 1999).

- Tasarımının kolay ve üretilebilirliğinin tekrarlanabilir olması gerekir.
- Biyouyumlu olmalıdır.
- Biyolojik ve fizyolojik değişikliklere yanıt oluşturabilmek için çevresi ile etkileşim içinde olmalıdır.

- Doku oluşum sürecinde hücre yapışması ve büyümesi gibi hücresel işlevleri desteklemelidir.
- Biyobozunur olmalıdır. Ayrıca bozunma sürecince oluşan parçalanma ürünlerinin de toksik olmaması gerekmektedir.
- Yeni doku oluşumu gerçekleşinceye kadar mekaniksel özelliklerini sürdürebilmelidir.

Biyomalzemeler kimyasal yapısına göre metaller, seramikler, polimerler ve bunların kombinasyonlarından oluşan kompozit malzemeler olmak üzere olarak dört sınıf altında incelenmektedir (Roach vd. 2007; Narayan 2009; Wong vd. 2013).

3.1.1.1 Metalik biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler güçlü metalik bağları sayesinde üstün özellikler gösterirler ve kristal yapıya sahiptirler. Gösterdikleri iyi termal ve elektriksel iletkenlik gibi mekanik özellikleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Ancak biyouyumlulukları düşüktür ve korozyona uğrayabilirler. Bu nedenle canlı vücudunda belli bir miktarda ve belli bir süre boyunca kalabilirler. Protez yapımında; demir, krom, kobalt, nikel, titanyum vb. metaller az miktarda kullanılmak koşuluyla canlı vücuduna uygunluk gösterebilirler (Park ve Kon Kim 2000; Black 1992; Gümüşderelioğlu 2002).

3.1.1.2 Polimerik biyomalzemeler

Polimerler, monomer ismi verilen küçük birimlerin kovalent bağlarla bağlanması sonucu meydana gelen düz ya da dallanmış zincir şeklindeki yapıları ile yüksek molekül kütlesine sahip bileşiklerdir (Saçak 2015).

Değişken fiziksel yapıları sayesinde kalın levha, şeffaf film, blok veya ince iplik gibi istenilen şekillendirmenin kolaylıkla yapılabilmesi ve düşük maliyetli olması, ikincil işlem olanağı polimerlerin biyomedikal biyomalzeme olarak yaygınca tercih edilmesinin nedenleri arasında sayılabilmektedir (Akdoğan vd. 1999).

Polimerler, elde edildikleri kaynağa göre doğal, yarı sentetik ve sentetik olarak sınıflandırılırlar. Biyomedikal alanında ise hangi tür polimerin kullanılacağına uygulamanın amacına ve hedef dokuya göre karar verilmektedir.

3.1.1.3 Doğal polimerler

Doğada halihazırda bulunan polimerler doğal polimerlerdir. DNA, RNA ile birlikte kollajen, fibrin ve elastin gibi proteinler ve ayrıca kitin, hiyaluronik asit, ligin, selülöz gibi karbohidratlar doğal polimerlerdir. Biyomedikal uygulamalar doğrultusunda kullanılacak doğal polimer kaynaklı biyomalzemeler hayvan bünyelerinden elde edilebilmektedir (Demirkol 2013).

Yüksek sıcaklık gibi koşullarda yapılarının bozulması gibi nedenlerle doğal polimerlere şekil vermek zor olsa da sahip oldukları yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite nedeniyle çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir.

3.1.1.3.1 Kollajen

Kollajen, vücutta en bol bulunan ve yaklaşık olarak tüm vücut proteinlerinin üçte birini oluşturan bir doğal yapısal proteindir. Temel amino asit bileşimi %35 glisin, %12 prolin ve %9 hidroksiprolindir. Kollajen molekülü, üç alfa-heliks yapısındaki peptit zincirinin birbirini sarması ve sıkıca paketlenmesi sonucunda oluşan sola dönen bir heliks yapısına sahiptir. Bu özellikleri sayesinde, bulunduğu dokuya yüksek dayanıklılık ve esneklik kazandırmaktadır. Kollajen, hücre dışı matriksin doğal bir bileşeni olup yapının destek çatısını oluşturmaktadır. Hücreler ve diğer matriks bileşenleriyle özelleşmiş bağlar kurabilen antitrombojenik, antitoksik ve iyi biyouyumlu bir polimerdir (Emin 2012). Ayrıca, hücre adezyonunu, büyümesini ve farklılaşmasını artırabilmektedir. Kollajen, sığır, koyun, sıçan gibi hayvanların tendon, kıkırdak gibi kollajen içeriği zengin dokularından izole edilebilmektedir. İzolasyon sonrası karakterize edilen kollajen, farklı formda biyomalzemelerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.1.1.3.2 Alginat

1926 yılında, aljinik asitin bileşeni olarak keşfedilen daha sonra ise α-L-guluronik asit (G) ve β-D-mannuronik asit (M) monomerlerinden oluşmuş kopolimer yapıdaki bir polisakkarit olduğu anlaşılan alginat, doğada kahverengi deniz alglerinin hücre duvarlarında bulunabilmektedir (Khong 2013). Düşük maliyetli, biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olması gibi avantajlarından dolayı biyomalzeme olarak tercih edilmektedir (Draget 2005). İlaç endüstrisinde ise ilaç dağıtım ajanı olarak yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Alginat, yumuşak jelleşme süreci sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında da kullanımaktadır. Spesifik olarak, alginat hidrojelleri, hücre nakli veya immobilizasyonu için kullanıma elverişlidir (Lee 2001).

3.1.1.3.3 Hücre dışı matriks

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan kollajen, kitosan, alginat, hiyaluronik asit gibi biyomalzemelere ek olarak son yıllarda çeşitli dokulardan deselülerizasyon (hücresizleştirme) yoluyla elde edilen hücre dışı matrik (HDM) yapılarının da kullanımı yaygınlaşmıştır. HDM, hücrelerin çevrelerini çok iyi taklit ettiğinden hücrelere tutunup, çoğalabileceği bir ortam sunmakta ve aynı zamanda hücre iletişimi, göçü ve farklılaşması gibi süreçlerde de aktif rol oynamaktadır (Leor vd. 2005). Bu nedenle farklı doku veya organlardan elde edilebilen doğal HDM yapıları, sahip olduğu biyolojik avantajlardan dolayı özellikle kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır. HDM'nin sağladığı fonksiyonlar arasında hücrelerin mikroçevrelerine yanıtını kolaylaştımak, dokunun mekanik özelliklerini iyileştirmek, yapısal destek sağlayıp esnek bir fiziksel çevre sunmak sayılabilmektedir (Chan ve Leong 2008; Leor vd. 2005).

Dokuya özgü olarak değişen HDM heterojen bir yapıda olup yapısında ise kollajen, fibronektin, laminin, elastin gibi proteinler yer almaktadır (Ercan 2020). Hücrelerin HDM'ye bağlanması hücre yüzey reseptörleri tarafından gerçekleşmektedir. Bu sayede hücre göçü, çoğalması ve farklılaşması olabilmektedir (Frantz vd. 2010).

Hücrelerin HDM'den çıkarılmasını amaçlayan hücresizleştirme bilimini başlatan ilk çalışma 1948 yılında Poel ve arkadaşlarının -70˚C de dokuyu homojen hale gelinceye kadar küçük parçalara ayırmaları olmuştur (Poel vd. 1948). Santrifüjlemeden sonra bazı hücrelerin dokudan uzaklaştığı görülmüştür (Poel vd. 1948). İlerleyen yıllarda ise HDM kullanımı çalışmaları kalp kapakçığı, vasküler ve özofagus doku mühendisliği, kemik doku mühendisliği gibi alanlarda oldukça yaygınlaşmıştır (Gilbert, Sellaro ve Badylak 2006; Isch vd. 2001; Kaushal vd. 2001).

3.1.1.4 Yarı sentetik polimerler

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan biyomalzeme uygulamalarından bir diğeri ise doğal kaynaklı polimerlerin kimyasal tepkimeleri neticesinde elde edilen yarı sentetik polimerlerdir.

Doğal kaynaklı polimerlerin yetersiz kaldığı alanlarda çeşitli kimyasal modifikasyonlar sayesinde elde edilen yarı sentetik polimerler doğal polimerlere göre daha iyi termal ve mekanik özelliklere sahipken biyouyumluluk da göstermektedir.

Örneğin yengeç, karides, midye gibi kabuklu deniz canlılarındaki kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan yarı sentetik bir polimer olup vücut içi biyobozunur implantlarda kullanılmakta, kanama durdurucu ve yara iyileştirici özellik göstermektedir (Durkut vd. 2015; Durkut 2019).

3.1.1.5 Sentetik polimerler

Çeşitli kimyasal yöntemlerle monomerlerinden sentezlenen polimerler sentetik polimerlerdir. Biyomalzeme alanında kullanılan sentetik polimerler Poli(etilen) (PE), Poli(metil metakrilat) (PMMA), Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), Poli(glikolik asit) (PGA), Poli(laktik asit) (PLA), vb. şeklinde sayılabilir (Freed vd. 1994).

Sentetik polimerler doğal kaynaklı polimerlere kıyasla daha iyi mekanik özelliklere ve

termal kararlılığa sahip olması, yüksek dayanıklılık, parçalanma ürünlerinin zararsız olması, şekillendirme kolaylığı ve uzun süreli uygulamalarda kullanım avantajı gibi nedenlerle biyomalzeme alanında sıklıkla tercih edilmektedir (Reinholz vd. 2003).

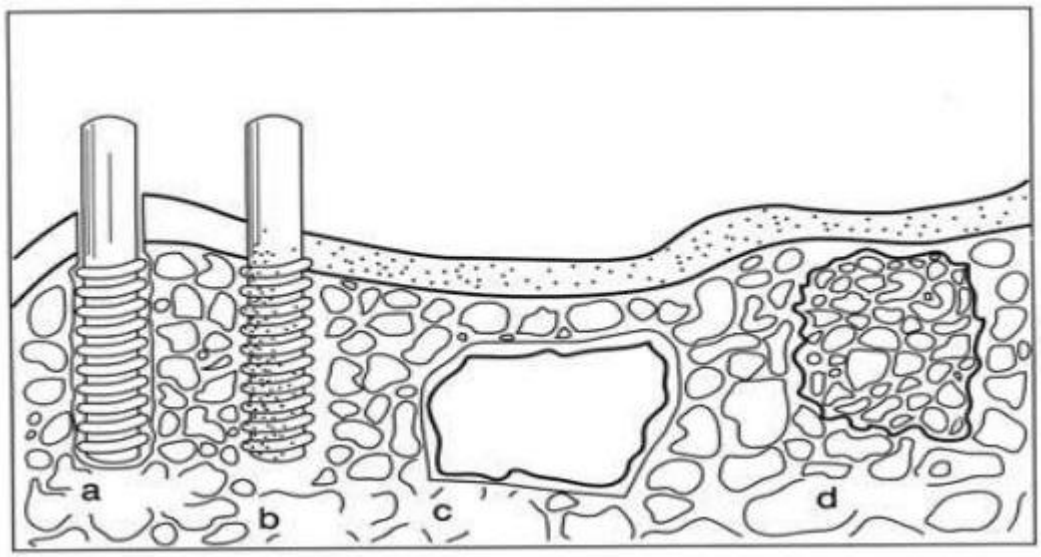
3.1.1.6 Seramik biyomalzemeler

Metal ve ametallerin inorganik türevleri seramik olarak isimlendirilmektedir. Vücudun eksik, hasarlı ya da yıpranan dokularını onarmak amacıyla üretilen seramiklere ise biyoseramikler denmektedir (Saenz vd. 1999).

Biyoseramik malzemeler, düşük darbe dayanımına, üretim zorluğuna ve kırılgan yapıya sahiptirler. Ancak bunun yanısıra yüksek biyouyumluluğa ve korozyon direncine sahip olmaları aynı zamanda düşük termal ve elektrik iletkenliği göstermeleri ve vücut içindeki kimyasal kararlılıkları gibi pek çok avantajlarından dolayı özellikle kas-iskelet sisteminde, ortopedik kaplamalarda, kemik dokusunda ve diş implantlarında oldukça sık tercih edilen malzemelerdir (Pina vd. 2021; Park ve Brozinoi 2002; Gümüşderelioğlu 2002).

Biyoseramik malzemeler, biyoaktif seramikler, biyoinert seramikler ve emilebilir seramikler olarak üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Wong vd. 2013).

Biyoaktif seramikler, vücutta çevre dokular ile etkileşime girmekte ve böylece kimyasal bağlanma gerçekleştirip vücuda dâhil olmaktadırlar (Kaur vd. 2019). Biyoaktif seramikler, biyoaktif apatit grubu **(Şekil 4.1b)** ve yüzeyaktif biyocam- cam seramik grubu **(Şekil 3.1c)** olarak sınıflandırılmaktadır (Heness ve Nissan 2004). Özellikle kemik doku mühendisliği çalışmalarında biyoaktif seramiklerin kemik dokusu ile etkileşime girerek bütünlük oluşturabilmesi tedaviden hızlı bir şekilde verim alınabilmesini sağlamaktadır (Kalkandelen 2016).



Şekil 3.1 Biyoseramiklerin biyoaktivitelerine göre sınıflandırılması (a) biyoinert, (b) biyoaktif, (c) yüzey aktif (d) biyoemilebilir seramik malzeme (Heness ve Nissan 2004)

Biyoinert seramik malzemelerde ise biyoaktif malzemelerin tersine herhangi bir etkileşim söz konusu olmamaktadır. Bunun nedeni **şekil 3.1 a**'da görüldüğü gibi biyoinert seramik malzemelerin kendi çevrelerinde ipliksi bir kapsülün oluşmasıdır. Bu kapsül, biyoinert seramik malzeme ile vücut içi dokuların etkileşimini sınırlamaktadır (Heness ve Nissan 2004). Biyoinert seramik malzemeler zirkonya ve alümina olarak adlandırılmaktadır (Heness ve Nissan 2004; Park ve Lakes 2007).

Alümina bazlı biyoinert seramik malzemeler kemik vidaları, çene kemiği, orta kulak kemiği, kornea replasmanları, diş implantları gibi pek çok alanda kullanılmakla birlikte kırılma dayanıklılığı düşük malzemelerdir (Kaur vd. 2019). Bu durum zirkonya ile sertleştirilmiş alümina kompozit malzemesi ile önemli ölçüde giderilebilmektedir (Pina vd. 2021).

Biyoemilebilir seramik malzemeler **şekil 3.1 d**'deki gibi zaman içinde vücut dokusuna karışmakta ve yerini doğal dokuya bırakmaktadır (Heness ve Nissan 2004). Biyoemilebilir seramik malzemelerin vücut içinde bozunma hızı malzemenin türüne ve üretim yöntemine göre değişmektedir. Genellikle kalsiyum fosfat yapısında olan

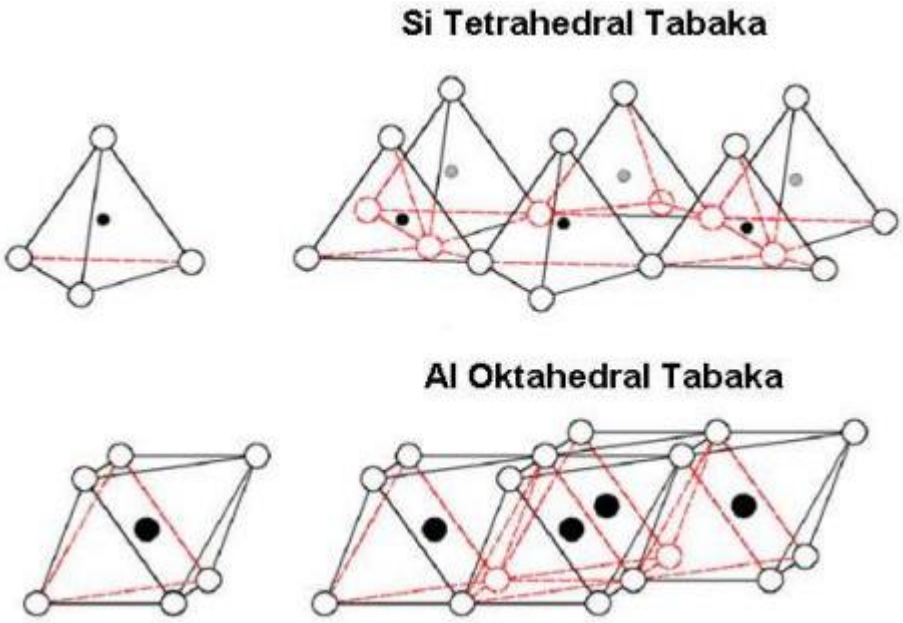
biyoemilebilir seramik malzemeler arasında Koralin, hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat en yaygın kullanılanlarıdır.

3.1.1.7 Killer

Son yıllarda kemik doku mühendisliğine yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılan killer, su içinde kendiliğinden 2 μm'den küçük olacak şekilde dağılabilen minerallerdir (Nadeau 1985). Magnezyum silikat ya da alüminyum silikat bileşikleri olan killerin iyon değiştirme güçleri ve su tutma kapasiteleri yüksektir. Doğada tabakalı, lifli veya her ikisini aynı anda barındıracak şekilde bulunabilirler (Kahraman 2008).

Doğada kimyasal yapılarına göre farklı renklerde bulunabilen killer mineral içeriklerine göre sınıflandırılabilirler. Kil mineralleri genel olarak oktahedron ve tetrahedron olarak düzgün sekizyüzlü ve düzgün dörtyüzlü şeklinde iki yapıya ayrılır. Oktahedronun (AlO_6^{6-}) merkezinde Alüminyum iyonu ve sekizyüzlünün köşelerinden birleşecek şekilde de oksijen iyonları bulunur. Tetrahedronun (SiO_4^{4-}) ise merkezinde Silisyum iyonu köşelerinde ise altılı halkalar verecek şekilde birleşen oksijen iyonları bulunur **(Şekil 3.2)**. Oktahedron tabakasına Alümina, Tetrahedron tabakasına ise Silika tabakası denmektedir (Grim 1968; Kahraman 2008).

Oktahedron ve tetrahedron tabakaları farklı oranlarda bir araya gelerek kil minerallerini oluşturur. Örneğin 1:1 oranlarında (TO) bir araya gelerek kaolin ve serpentin kil mineralleri grubunu oluşturmaktadırlar. 2:1 oranlarında (TOT) bir araya geldiklerinde ise klorit, vermikulit, simektit, talk-pirofilit ve mika mineral gruplarını oluşturur (Noyan 2007).



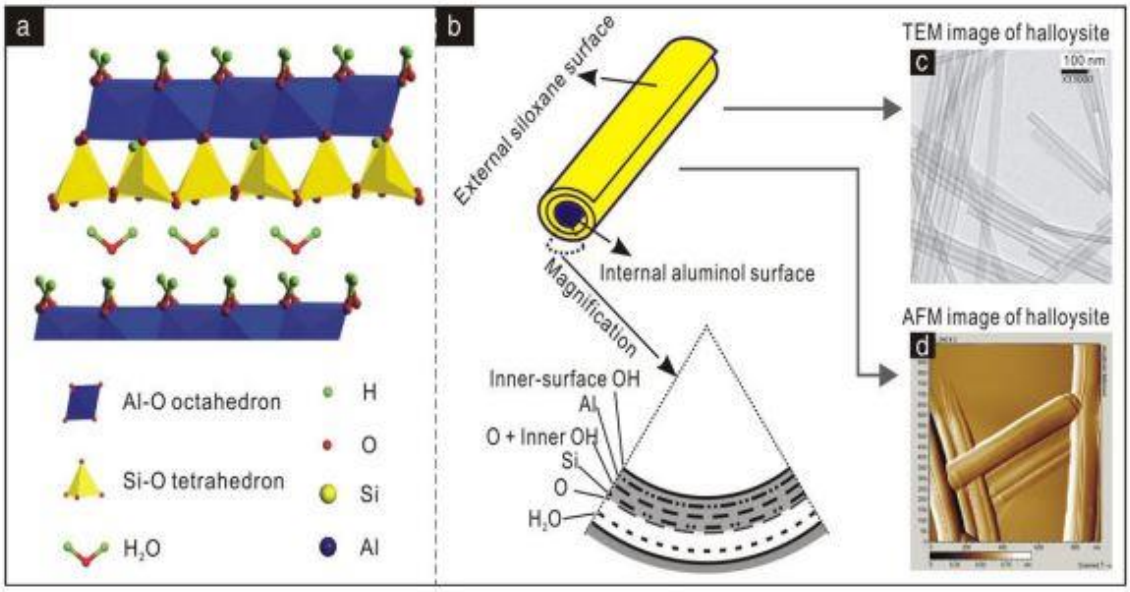
Şekil 3.2 Tetrahedral ve oktahedral tabakalar

Kaolin grubu kil mineralleri tetrahedron ve oktahedron katmanlarının 1:1 oranla birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Halloysit ise kaolin grubunda yer alan, ancak kaolinlere göre daha fazla hidrasyona uğramış olan bir kil türüdür.

3.1.1.7.1 Halloysit nanotüpler (HNT)

Türkiye'de en çok Çanakkale ve Balıkesir'de yüksek saflıkta rezervlere sahip olan halloysit kili beyaz renge sahiptir (Uygun 1999). Bu nedenle kaolin grubunda yer alan halloysit, diğer killere göre üstün özelliklere sahip bir kil mineralidir. Kaolinit minerali, silika tetrahedron tabakaları (Si_4O_{10}) ile alümina tabakasının ($Al_4O_4(OH)_8$) oktahedronlarının bazılarının oksijen köprüleri ile bağlanması sonucu oluşturmaktadır **(Şekil 3.3)** (Grim 1968). Kaolinit minerali, 0,7 nm kalınlığa sahip birim katmanların dizilmesi ile kaolinit partiküllerinin meydana gelmesi ve bu partiküllerin de gelişigüzel bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır (Bristow 1979). Kaolinit mineralleri katmanlarına su moleküllerinin girmesiyle oluşan halloysit mineralinin katmanı ise 1,0 nm kalınlıkta ve kimyasal formülü de $Si_4Al_4O_{10}(OH)_8.4H_2O$ olmaktadır (Churchman 1972; Carr 1975). Bununla birlikte su moleküllerinin arasındaki zayıf bağlar sebebiyle su

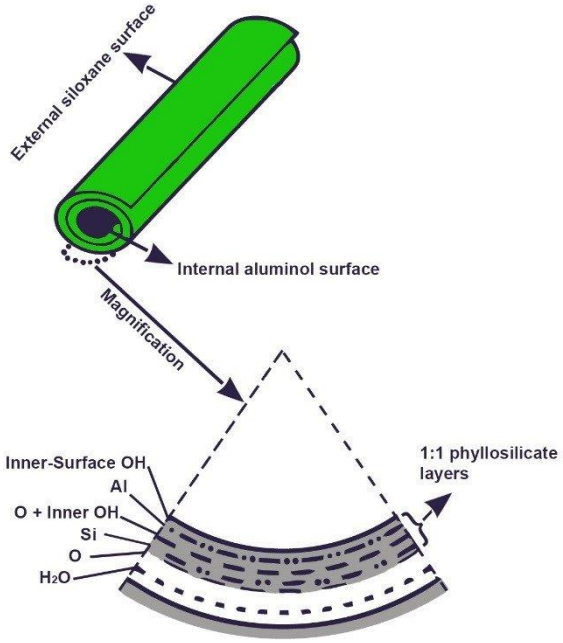
uzaklaştırıldığında susuz halloysit elde edilebilmektedir. Susuz halloysit en kararlı halloysit formudur (Joussein vd. 2006).



Şekil 3.3 (a) Halloysitin kristal yapısının şematik diyagramı, (b) Halloysit parçacığının yapısı, (c–d) Halloysitin TEM ve AFM görüntüleri (Yuan vd.2015)

Halloysitin doğada en sık karşılaşılan şekli tüp şeklindeki formudur (İsmail vd. 2008). Halloysit kil nanotüpleri (HNT) **şekil 3.4**'teki gibi alüminosilikat tabakalarının 15–20 kez kıvrılmasıyla oluşmuştur (Lvov vd. 2016; Kurczewska vd. 2017). Halloysit kil nanotüplerinin yüzey alanı yüksektir, içi boştur ve nanotüplerin hem iç hem de dıştaki yüzeyleri net negatif yük taşımaktadırlar. Bazı tüpler amfoter özellik göstererek düşük pH'larda pozitif yük, yüksek pH'larda ise negatif yük gibi davranırlar (Zhang vd. 2008).

Halloysit nanotüplerin son yıllarda kemik doku mühendisliğine yönelik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmesinin bazı sebepleri arasında biyouyumlu, çevre dostu, düşük maliyetli olması; kollajen gibi malzemelerin mekanik özelliklerini ve aynı zamanda pürüzlü yapısı sayesinde yüzey alanını arttırması buna bağlı olarak da hücrelerin tutunma ve çoğalma ortamını sağlaması sayılabilmektedir (Liu vd. 2012).

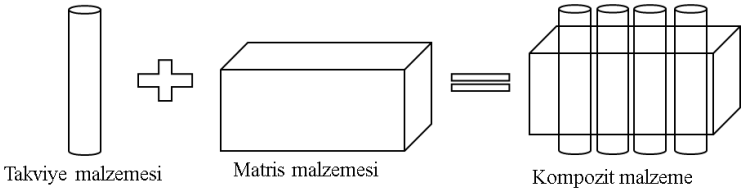


Şekil 3.4 Halloysit nanotüp yapısı (Nizar vd. 2018)

3.1.1.8 Kompozit biyomalzemeler

İki ya da daha fazla farklı malzemenin en sağlam özelliklerinin bir araya getirilmesi amaçlanarak birleştirilmesi sonucu oluşan ve tamamen yeni özelliklere sahip olan malzemelere kompozit malzeme adı verilmektedir.

Kompozit malzemeler, **şekil 3.5**'te gösterildiği gibi matris denilen bir ana malzeme ve takviye edici eleman denilen daha dayanıklı bir malzemenin birleşmesi sonucu oluşmaktadır.



Şekil 3.5 Kompozit malzeme oluşumu

Kompozit malzemeler, matris cinsine göre seramik matrisli kompozitler, metal matrisli kompozitler ve polimer matrisli kompozitler olarak sınıflandırılırken takviye edici elemana göre ise elyaflı kompozitler, parçacıklı kompozitler, karma kompozitler ve tabakalı kompozitler olarak sınıflandırılmaktadır.

Biyokompozit malzemeler ise biyobozunabilir matris ve takviye maddelerinden oluşan malzemelerdir.

Biyokompozit malzemelerin tüm elemanlarının biyouyumlu olması ve vücut içi faz bütünlüğünün sağlanması zor olsa da yüksek mukavemet, hafiflik, işlenebilirlik, korozyon ve ısıl dayanım, çeşitlilik vb. avantajlarından dolayı özellikle ortopedi ve dişhekimliği alanındaki çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (John vd. 2008; Abhiram vd. 2021).

3.1.2 Doku iskelesi üretim teknikleri

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında kemik onarımı konusunda yaşanan allogreftlerdeki immünolojik engeller, donör saha morbiditesi ve donör otogreft sıkıntısı vb sorunları çözmek adına doğal kemik yapısını taklit edebilecek, otogreftlerin gösterdiği performansı gösterebilecek fonksiyonel doku iskelelerinin geliştirilmesi ve üretilmesi amaçlanmaktadır (Koç vd. 2008).

Doku mühendisliği ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan bu doku iskeleleri, biyouyumlu, kolay üretilebilir, çevre doku ile etkileşim halinde, biyobozunur, gözenekli ve hücresel işlevleri destekleyici olmalıdır. Bu özelliklere ek olarak doku iskeleleri toksik olmamalıdır (Vacanti ve Langer 1999). Hücrelerin büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve birbiriyle iletişim kurması için en ideal 3 boyutlu, gözenekli, biyouyumlu ve biyobozunur doku iskeleleri doku mühendisliği çalışmalarının başarıya ulaşmasındaki en önemli unsurlardan biri olmaktadır. Bu bağlamda en temel bileşenlerden biri olan doku iskeleleri doğal veya sentetik biyobozunur polimerler ve/ veya kompozit yapılar kullanılarak elde edilmektedir. Bu yapıların avantaj ve

dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda son yıllarda doğal doku ve kaynaklardan elde edilen deselülerize (hücresizleştirilmiş) matriks yapıları doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak tercih edilmeye başlanmıştır (Badylak vd. 2009).

Doku iskelelerinin doğal doku mikroçevresini taklit ederek üç boyutlu bir yapıda üretilmeleri gerekmektedir. Bu amaca yönelik doku iskelelerinin elde edilmesinde partikül uzaklaştırma, dondurarak kurutma, gazla köpüklendirme, elektroeğirme ve bilgisayar destekli tasarım gibi yöntemler sayılabilmektedir.

3.1.2.1 Partikül uzaklaştırma yöntemi

Partikül uzaklaştırma yöntemiyle doku iskelesi elde edilmesinde uygun organik çözücüde çözünen polimer, tuz ve şeker gibi belli tanecik boyutuna sahip porojen partiküllerinin bulunduğu kaba dökülmektedir. Ardından organik çözücü buharlaştırılmakta ve katı polimerik yapı eldesinden sonra kalıp su içerisinde bekletilerek porojen partikülleri de uzaklaştırılmaktadır. Kurutma işleminin ardından belirli gözenek boyutuna sahip 3 boyutlu doku iskelesi elde edilmektedir (Mikos vd. 1993; Mikos vd. 1993b).

3.1.2.2 Dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma yönteminde polimer çözeltisi uygun şartlar altında dondurulmakta ve bu yapıdan donmuş buz kristalleri vakumlu ortamda yüksek basınç altında liyofilize edilerek yapıdan uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu yöntem ile yüksek oranda gözenekli yapıya sahip doku iskeleleri elde edilmektedir. Buz kristalleri ise porojen görevi görmektedir (Thomson vd. 2000).

3.1.2.3 Gazla köpüklendirme yöntemi

Gazla köpüklendirme yönteminde metilen klorür veya kloroform içerisinde polimer ile hazırlanan çözeltiye amonyum bikarbonat ilave edilmektedir. Daha sonra çözücü ortamdan uzaklaştırılmakta ve karışım vakum altında veya sıcak suda bekletilerek CO_2

gazı çıkışı gözlemlenmektedir. Bu süreçte yapıda gözenekler meydana gelmektedir (Mooney vd. 1996).

3.1.2.4 Elektroeğirme yöntemi

Elektroeğirme yönteminde organik bir çözücüdeki polimer çözeltisi bir enjektöre konulmaktadır. Ardından yüksek gerilim ortamında enjektörden polimer çözeltisinin damlatılmasıyla çözücü buharlaşmakta ve polimer katılaşıp lif formunda toplama panelinde birikmektedir (Baykan vd. 2014).

3.1.2.5 Bilgisayar destekli tasarım yöntemi

Bilgisayar destekli tasarım yönteminde üretilmek istenilen doku veya iskeleler tasarımları bilgisayarda modellenip katı, sıvı veya jel biyomürekkep kullanılarak uygun ısı, ışık, yapıştırıcı gibi şartlarda üç boyutlu yazıcı yardımıyla üretilmektedir. Bu yöntemde daha özellikli ve boyut ve dağılım açısından kontrollü gözeneklere sahip iskeleler elde edilebilmektedir (Leong vd. 2003; Gümüşderelioğlu 2002).

3.2 Deselülerizasyon

Deselülerizasyon, dokuların çeşitli yöntemlerle hücrelerinden arındırılması işlemi ve elde edilen hücre dışı matriksin farklı uygulamalarla biyomalzeme haline getirilmesi sürecidir. Deselülerizasyon genelde fiziksel, kimyasal ve/veya enzimatik işlemler kullanılarak yapılmaktadır. Dondurup çözme, karıştırma, sonikasyon gibi fiziksel işlemler tek başına yeterli olmadığından hücre zarının yıkımı ve hücre çekirdeğinin salınımı amacı ile hücresizleştirme işlemleri kimyasal ajanlar ile ve enzimatik olarak da desteklenmektedir. Bu işlemlerin ardından yapılan yıkamalar sonucunda hücresel kalıntılarından uzaklaştırılmış HDM'ler elde edilmektedir (Gilbert vd. 2006). Deselülerizasyon sonunda hücresizleştirme etkinliğini değerlendirmek amacıyla çeşitli kantitatif testler yapılmaktadır. Deselülerizasyon işlemleri sırasında doğal HDM'nin yapısal, biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri korunarak yalnızca hücreleri ve DNA gibi

genetik materyalleri uzaklaştırılmaktadır (Gilpin ve Yang 2017). Dolayısıyla bu yapılar içinde pek çok peptid, ligand ve biyoaktif bileşen doğal yapısını korumakta olup, yapıları türler arasında benzerlik gösterdiği için sentetik malzemelere oranla daha zengin ve uyumlu bir ortam oluşturmaktadır (Faulk vd.2015). Destek iskeleleri için kemik, kıkırdak ve tendon gibi materyallerden HDM eldesi mümkündür. Bu materyaller arasında tendon sahip olduğu %95 oranındaki tip 1 kollajenden ötürü KDM uygulamalarında HDM eldesi için sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte HDM'ler kemik doku mühendisliği uygulamalarının ihtiyaçlarını tek başına yerine getirmekte eksik kalmaktadır. Bu noktada seramik esaslı malzemeler ile kombine edilip kompozit malzeme elde edilmektedir. Bu bağlamda son yıllarda öne çıkan materyallerden olan doğal killer doku mühendisliği çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilerek kullanımı yaygınlaşan bir materyal olmuştur.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Kompozit Biyomalzemenin Hazırlanması

4.1.1 Doğal tendon dokusu deselülerizasyonu

Deselülerizasyon, çeşitli organ ve dokuların hücrelerinden arındırılması işlemidir. Bu şekilde hücrelerinden arındırılan hücre dışı matriksler farklı yöntemlerle kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere biyomalzeme haline getirilebilirler.

Bu çalışmada da deselülerizasyonu sağlamak amacıyla sığırlardan elde edilen tendon dokuları önce fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) sonra izotonik tuz çözeltisi ile yıkanarak 3 kez -80℃' de dondurma-çözme döngüsüne tâbi tutuldu. Ardından deselülerizasyon işleminin daha etkili olabilmesi için tendon dokusu bistüri yardımıyla dış zarından uzaklaştırıldı ve küçük parçalara ayrıldı. Bu parçalar sırayla hipotonik (%0,7) ve hipertonik (%1,1) tuz çözeltilerinde bekletilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra PBS içinde yıkama yapılarak 1 gün boyunca %1 SDS ile muamelesinden sonra köpüklenme gidene kadar su ile yıkandı. Sterilizasyon işlemi için perasetik asit ile muamele edilerek -80℃'de dondurulan örnekler liyofilize işlemine tabii tutuldu (Ercan vd. 2022). Liyofilize edilen örnekler daha sonra kullanılmak amacıyla + 4℃' de muhafaza edildi **(Şekil 4.1)**.



Şekil 4.1 Sığır tendon dokusunun deselülerize edilme aşamaları

4.1.2 Deselülerize tendon dokusunun karakterizasyonu

Deselülerize edilen sığır tendon dokusu (dtHDM) ve herhangi bir işlem uygulanmayan doğal sığır tendon dokusu (HDM) deselülerizasyonun başarılı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla çeşitli karakterizasyon testlerine tabii tutuldu.

4.1.2.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Deselülerize edilen tendon dokusu ve işlem uygulanmamış doğal tendon dokusunun morfolojileri SEM ile değerlendirilmek amacıyla %2,5 glutaraldehit içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 4℃' de tespit edildi. Daha sonra etanol/su serilerinden geçirilerek havada kurutuldu. Örnekler altın-paladyum tabakasıyla ince şekilde kaplandı ve SEM cihazında görüntülendi.

4.1.2.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy, FTIR) analizi

Deselülerizasyon işlemi sırasında hücre membranının ve membrandaki lipid tabakasının parçalanarak deselülerize aşamasının başarıyla tamamlanması amacıyla kullanılan SDS ve PAA gibi kimyasalların tendon dokusunun kollajen yapısında bir değişikliğe yol açma ihtimali FTIR analizi ile değerlendirildi.

4.1.2.3 DNA içeriği analizi

Deselülerizasyonun başarısını belirlemek ve deselülerize matriksin DNA miktarını tespit etmek amacıyla DNA analizi yapıldı. Bu amaçla, deselülerize edildikten sonra liyofilize edilen numuneler homojenize edildi ve 10 mg örnekler mikrosantrifüj tüplerine alındı. Ekstraksiyon için 20 mg/mL Proteinaz K içeren 1 mL ekstraksiyon tamponu eklendi ve örnekler 48 saat boyunca 55°C'de vortekslendi. Ardından, 4°C'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenip süpernatan toplandı. Süpernatana 1 mL 25:24:1 Fenol:Kloroform:İzoamil alkol çözeltisi eklendi ve tekrar 4°C'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatan toplandı. Üzerine 200 µL 3 M sodyum asetat (pH 5,5) ve 500 µL %95 etil

alkol eklenerek -80°C'de 20 dakika bekletildi, ardından 37°C'de 30 dakika çözdürüldü ve son olarak 25°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatan atıldı. Toplanan pellet 100 µL steril su ile seyreltildi ve ardından örneklerin ortalama DNA konsantrasyonları spektrometrik ölçümler ile tayin edildi (NanoDrop One, Thermo Scientific, Delaware, ABD).

4.1.2.4 Lowry protein analizi

Lowry protein analizi, çözeltideki toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir biyokimyasal analizdir. Bu analiz yöntemi, peptit bağları ile bakır iyonlarının alkali ortamda verdiği tepkimeler sonucunda mavi-mor renk oluşması ve bu rengin 750 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi ile gerçekleşmektedir. Hazırlanan standart çözeltiler ve örnekler 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilerek 750 nm dalga boyunda ölçümleri alındı. Doğal tendon dokusu ve deselülerize tendon dokusunun protein içerikleri standart kalibrasyon eğrisinden yola çıkılarak hesaplandı.

4.2 Jel Formunda Hücre Dışı Matriksin Eldesi ve Karakterizasyonu

4.2.1 Jel formunda hücre dışı maktriks eldesi

Yapılan deselülerizasyon işlemi neticesinde elde edilen HDM yapısı sıvı azot içinde dondurulduktan. Ardından enzim etkinliğini arttırmak amacıyla güzelce öğütülüp makas yardımıyla daha küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılmış dtHDM örnekleri 1 mg/mL pepsin çözeltisi (0,02N HCl) içerine eklendi (10:1). 48 saat boyunca manyetik karıştırıcı altında sindirim işleminin ardından 1N NaOH ile örneklerin pH'sı buz üzerinde 7,4'e ayarlanarak nötralizasyon sağlandı **(Şekil 4.2)**. Sonrasında 10x PBS yardımıyla tuz dengesi sağlandı.

4.2.1.1 Türbidimetrik analiz

Sindirim işlemi tamamlanmış jel formundaki dtHDM'den 200 µL örnekler alınıp kuyucuklu kültür kabına konularak 37℃ de 405 nm dalga boyunda 120 dakika süre boyunca her 2 dakikada bir ölçüm alınarak absorbans ölçümleri yapıldı. Eşitlik 4.1 yardımıyla normalize edilen absorbans değerleri grafiğe aktarıldı.

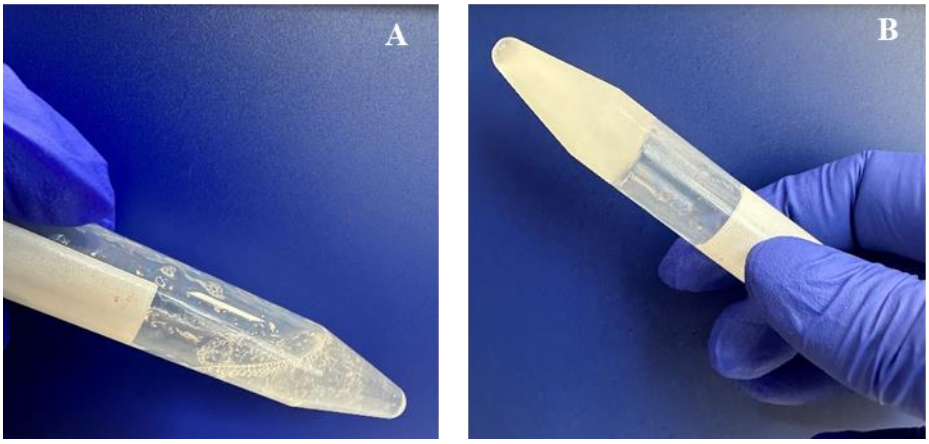
$$\text{Normalize Absorbans (NA)} = A\text{-}A_0 / A_{max}\text{-}A_0 \qquad \text{Eşitlik 4.1}$$

4.3 Kompozit İskelelerin Hazırlanması

Pepsinle çözünür hale getirilen dtHDM jelinin pH'si 0,1N NaOH ilavesi ile pH 7-7,4 arasına getirildi. Bu işlemi takiben elde edilen jel formundaki dtHDM farklı konsantrasyonlarda (%0-1-2-4) HNT ile katkılandırıldı. Çözelti homojen olana kadar süspansiyonlar buz üzerinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ele geçen kompozit süspansiyonlar 6 ve 24 kuyucuklu petri kaplarına döküldükten sonra 37℃'de 30-70 dk jelasyon işleme tâbi tutuldu. Jelleşme gerçekleştikten sonra örnekler -80 ℃'de dondurulup, liyofilize edildi **(Şekil 4.3)**.



Şekil 4.2 Jel formundaki hücre dışı matriksin pH 7,4'e ayarlanması



Şekil 4.3 Jelasyon öncesi (A) ve sonrası (B) örneklere ait makroskobik görüntüler

4.3 Kompozit İskelelerin Karakterizasyonu

İdeal kompozit iskele/iskelerinin tespiti için öncelikle hazırlanan örneklerin su tutma kapasiteleri ve in vitro biyobozunma davranışları belirlendi.

Su tutma kapasitelerinin belirlenmesi için hazırlanan örneklerin kuru kütleleri (m_1) tartıldı. Kuru kütleleri bilinen iskeleler 24 saat 37℃ sıcaklıkta fosfat tamponu (pH 7,4) içerisinde inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında fosfat tamponundan alınan örneklerden suyun fazlası uzaklaştırıldı ve tekrar kütle tartımı yapıldı (m_2). Oluşan kütle değişimleri Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = [(m_2 - m_1) / m_2] \times 100 \qquad \text{Eşitlik 4.2}$$

Hazırlanan örneklerin kütle kaybını belirlemek amacıyla kuru kütleleri (mi) bilinen örnekler fosfat tamponunda (pH 7,4) 37℃ sıcaklıkta inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında tampon çözelti değiştirildi. Farklı zamanlarda (3., 7., 14., 21. ve 28. gün) tampon çözeltideki örnekler alındıktan sonra 37℃'de kurutuldu ve kuru kütleleri tartıldı (ms). Örneklerde meydana gelen kütle kaybı miktarları Eşitlik 4.3'e göre hesaplandı.

$$\text{Kütle kaybı (\%)} = [(m_i - m_s) / m_i] \times 100 \qquad \text{Eşitlik 4.3}$$

Kompozit iskelelerin basma testi mekanik test cihazı ile dakikada 1 mm hızla ve %80 sıkıştırma uygulanarak gerçekleştirildi.

Bu işlemleri takiben iskelelerin yüzey ve kesit morfolojileri SEM, kimyasal bağ yapıları FTIR ve termal kararlılıkları TGA yöntemleriyle incelendi.

4.3.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Kompozit iskele örneklerinin yüzey morfolojileri SEM ile değerlendirildi. Bu analiz için kompozit iskele örnekleri önce %2,5 glutaraldehit bulunan 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,4) 4ºC sıcaklıkta tespit edildi. Daha sonra etanol/su (%60, %70, %80, %90, %95, %100) serilerinden geçirilen kompozit iskele örnekleri havada kurutma işleminden sonra, ince bir altın-paladyum tabakasıyla kaplandı ve SEM cihazında incelenip görüntülendi.

4.3.2 X-Işını difraksiyonu (XRD) analizi

Kompozit iskele örneklerinin kristal yapıları 20-70°C arasında dakikada 2° tarama hızı ile Ultima-IV model X-ışını toz difraktometresi cihazında analiz edilip değerlendirildi.

4.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

Kompozit iskele örneklerinin termal analizleri Schimadzu DTG-60H cihazı ile azot atmosferinde 25-500℃ sıcaklık aralığında ve dakikada 15℃ tarama hızı ile yapılarak kütle kayıplarının belirlenmesi sağlandı.

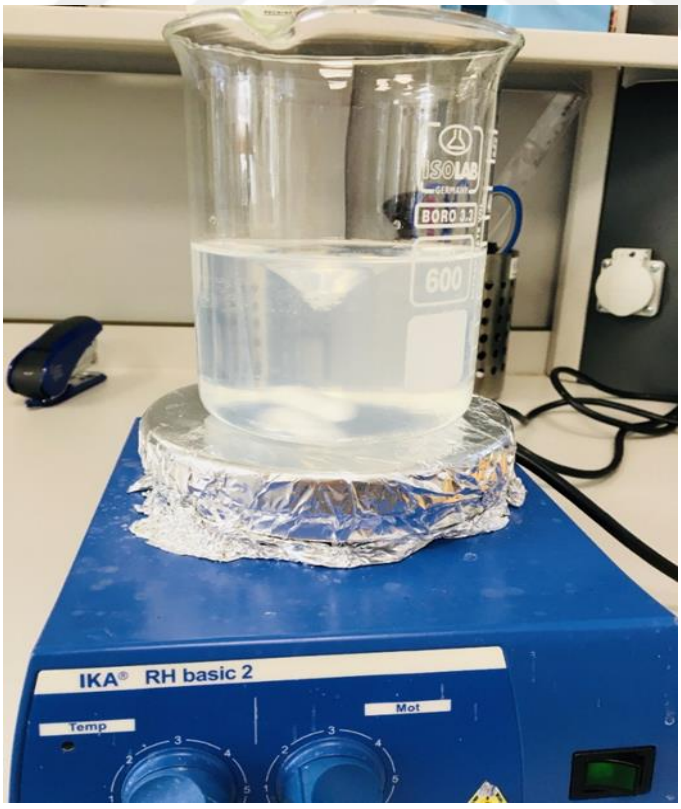
4.3.4 HNT-dtHDM iskelelerin *in vitro* biyoaktivitesinin belirlenmesi

Elde edilen kompozit biyomalzeme örneklerinin in vitro biyoaktivite analizlerinin yapılabilmesi amacıyla iyon derişimi kan plazması ile benzer olan yapay vücut sıvısı (Simulated Body Fluid, SBF) hazırlandı **(Çizelge 4.1) (Şekil 4.4)**.

Daha sonra örnekler etil alkol içerisinde sterilize edildikten sonra kuyucuklu kültür kaplarına konularak SBF içerisinde 14 gün boyunca inkübe edildi. Bu süreçte SBF çözeltisi günlük olarak değiştirildi. SBF ile muamele sonrasında örnekler FTIR ve SEM gibi analiz yöntemleri ile değerlendirildi.

Çizelge 4.1 SBF hazırlanırken kullanılan kimyasallar (1,5X konsantrasyon, 1L, pH 7,40) (Kokubo vd. 2006)

Eklenme sırası	**Kullanılan kimyasal**	**Kullanılan miktar**
1	NaCl	11,994 g
2	$NaHCO_3$	0,525 g
3	KCl	0,336 g
4	K_2HPO	0,261 g
5	$MgCl_2$	0,214 g
6	1M HCl	60 ml
7	$CaCl_2$	0,417 g
8	Na_2SO_4	0,107 g
9	$(CH_2OH)_3CNH_2$	9,086 g



Şekil 4.4 Yapay vücut sıvısının hazırlanması

4.3.4.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

SBF içerisinde 14 gün inkübe edilen kompozit iskelelerin yüzey morfolojileri 3., 7. ve 14. günlerde SEM ile incelenerek karşılaştırıldı.

4.3.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) analizi

Hazırlanan kompozit iskelelerin kimyasal yapıları 400-4000 cm^{-1} dalga boyunda FTIR cihazı ile incelendi ve karşılaştırıldı.

4.3.5 HNT-dtHDM iskelelerin biyouyumluluk analizi

4.3.5.1 *In vitro* sitotoksisite testi

Karakterizasyon çalışmalarını takiben nanokompozit iskelelerin biyouyumlulukları ISO-EN-10993-5 standartlarına göre indirekt sitotoksisite testi yapılarak belirlendi. Bu kapsamda, dermal fibroblast hücreleri 24-kuyucuklu petri kaplarına ekilip standart besiyerinde (%10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM:F12 içerisinde) 37°C'de %95 oranında hava, %5 oranında CO_2 ve %90 oranında nem içeren ortam koşullarında inkübe edildi. Eş zamanlı olarak uygun boyutlarda kesilip test öncesi 1 saat UV ışık kaynağı (254 nm) altında sterilize edilen örnekler 24 kuyucuklu çoklu petri kaplarına yerleştirildi ve standart besiyerinde 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda toplanan besiyerleri, hücrelerin üzerinde bulunan besiyerleri ile değiştirildi ve hücreler bu besiyerinin içinde 24 saat tekrar kültüre edildi. Bu sürenin sonunda hücre canlılığını MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür)] yöntemi kullanılarak incelendi.

4.3.5.2 Hemoliz testi

Kompozit iskelelerin hemouyumlulukları ISO 10993-4 standardına göre analiz edildi. Bu amaçla kompozit iskeleler önce PBS ile yıkandı ve ardından eppendorf tüp içine alınarak

1 mL PBS ilavesi yapıldı ve 37℃ etüvde çalkalanarak inkübe edildi. 2 mL taze tam kan 2,5 mL PBS ile seyreltildi. Birer adet eppendorf tüplerinin içine 1 mL distile su (pozitif kontrol, PK) ve 1 mL PBS (negatif kontrol, NK) kondu. 30 dakika inkübe edildikten sonra PBS içindeki örneklere ve kontrol tüplerinin her birine 20 µL seyreltilmiş kan ilave edildi. 1 saat 37℃'de inkübe edildi. Ardından tüm eppendorf tüpleri 520 G hızında 10 dakika santrifüjlendi. Oluşan süpernatan kısımlarından 200 µL alınarak 545 nm dalga boyunda ölçümler alındı **(Şekil 4.5)**. Hemoliz oranı Eşitlik 4.4 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Hemoliz (\%)} = [(A_{\text{örnek}} - A_{PK}) / A_{NK})] \times 100 \qquad \text{Eşitlik 4.4}$$



Şekil 4.5 Hemoliz testi

4.4 İstatistiksel Analizler

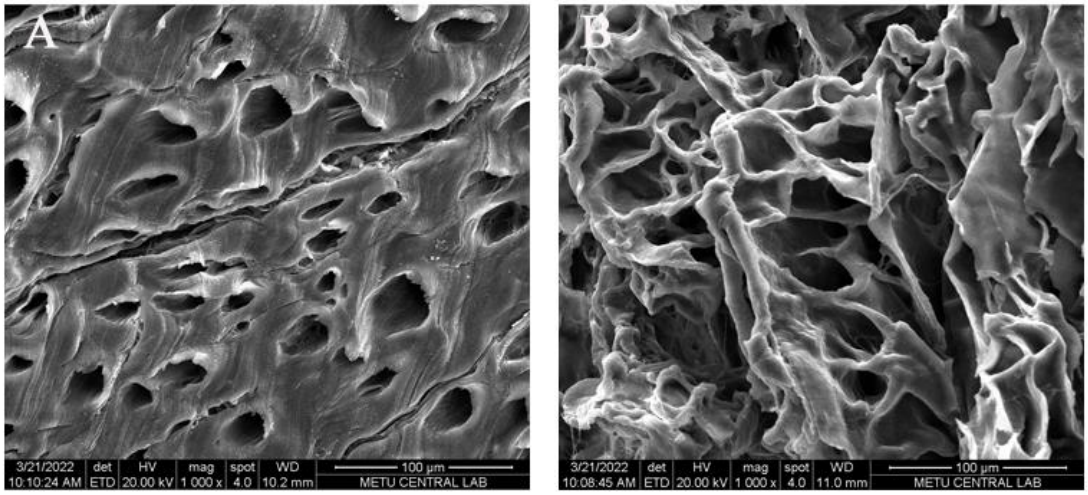
Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen bulguların bir kısmının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve grafiklerinin çizilmesi GraphPad Prism 8 programı (tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi (ANOVA)) ile, diğer bulgularının değerlendirilmesi t-testi (DNA analizi, Lowry analizi) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçların anlamlılığı için $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, ve $****p < 0.0001$ değerleri kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1 Deselülerizasyon Etkinliğinin Karakterizasyon Bulguları

5.1.1 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analiz bulguları

Deselülerizasyon etkinliğinin morfolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular, doğal tendon HDM yüzeyinin yüksek oranda hücre ve hücre dışı matriks ile kaplı olduğunu **(Şekil 5.1A)**, deselülerizasyon işlemi sonrasında doku bütünlüğünün bozulduğunu ve gözenekli yapıların ortaya çıktığı göstermiştir **(Şekil 5.2B).**

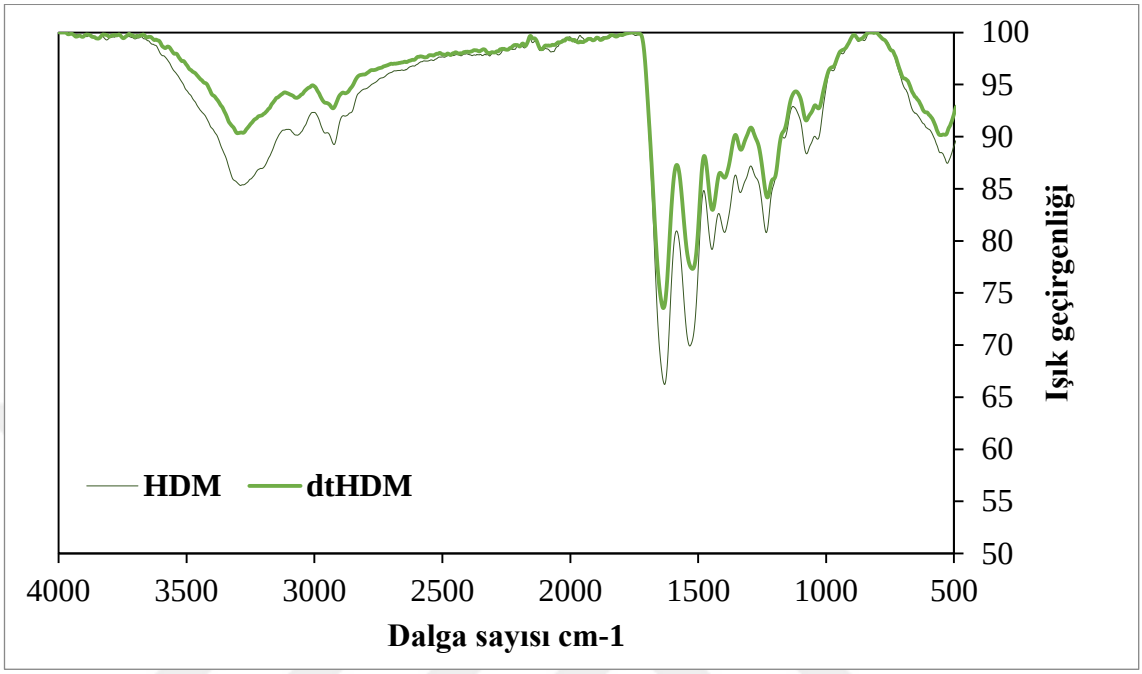


Şekil 5.1 (A) doğal tendon dokusu ve (B) dtHDM dokusuna ait SEM görüntüleri

5.1.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) analizi bulguları

Deselülerizasyon işleminde kullanılan SDS, PAA gibi kimyasalların tendon dokusunun kollajen yapısına zarar vermiş olması ihtimali FTIR analizi ile değerlendirildiğinde, 1920 cm^{-1}'de C-H gerilim bandı, 3289 cm^{-1}'de ise OH gerilim bandı gözlenmiştir **(Şekil 5.2)**. 1630 ve 1521 cm^{-1}'de arasındaki pikler sırasıyla amid-I ve amid-II piklerine karşılık gelmektedir. Bu sonuçlara göre doğal HDM ve dtHDM yapılarının birbirine büyük

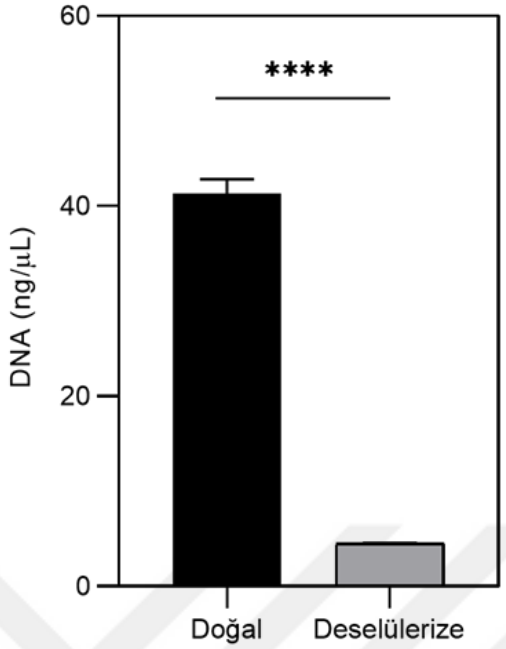
oranda benzediği ve deselülerizasyon işleminin tendon dokusunun kollajen yapısında zarar vermediği görülmüştür.



Şekil 5.2 Doğal HDM ve dtHDM yapılarına ait FTIR spektrumları

5.1.3 DNA içeriği analizi bulguları

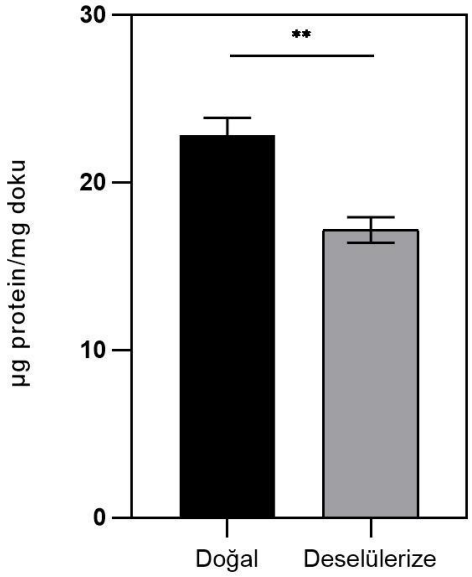
Deselülerizasyon işleminin başarısını değerlendirmek adına doğal tendon dokusunun ve deselülerize edilmiş tendon dokusunun DNA içerikleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma değerlendirildiğinde doğal tendon dokusunun 41(±1,52) ng DNA/µL içerdiği, deselülerize edilmiş tendon dokusunun ise 2,511 (± 0,016) ng DNA/µL içerdiği belirlenmiştir **(Şekil 5.3)**. Bu sonuçlar neticesinde DNA içeriğinde yaklaşık %83'e varan bir azalma olduğu ve deselülerizasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 5.3 Doğal tendon dokusu ve deselülerize tendon dokusuna ait DNA içerikleri

5.1.4 Lowry protein analizi bulguları

Doğal tendon dokusu ve deselülerize tendon dokusunun protein içerikleri Lowry protein analizi ile belirlenip karşılaştırıldığında doğal tendon dokusunun protein içeriğini deselülerizasyon işlemini takiben yaklaşık %74 oranında koruduğu belirlenmiştir **(Şekil 5.4)**. Bu veriler deselülerizasyon işlemini takiben HDM proteinlerinin çok büyük bir kısmının korunduğunu göstermektedir. Sonuçlar FT-IR sonuçları ile uyumludur.

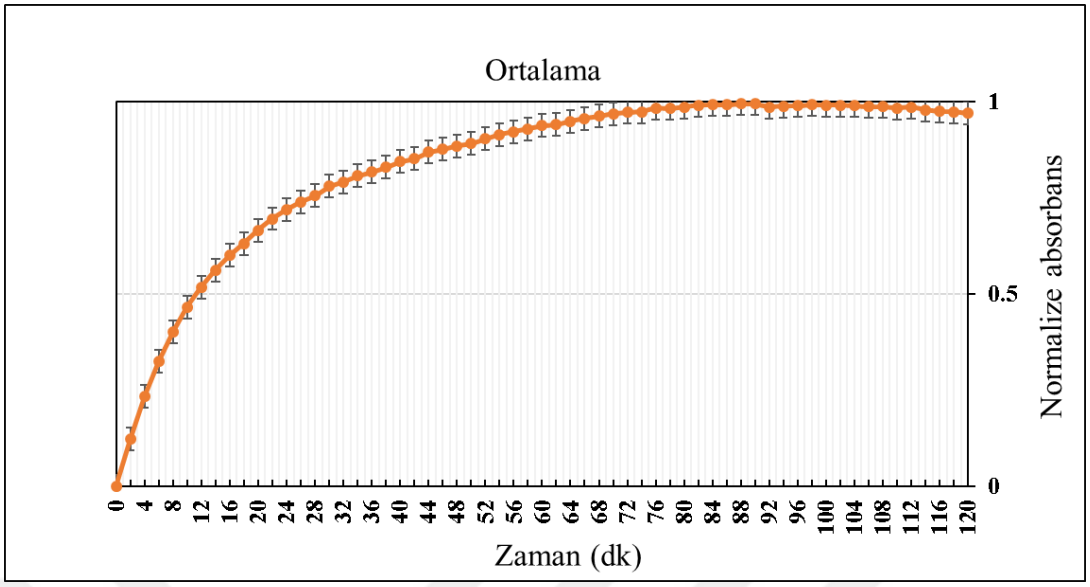


Şekil 5.4 Doğal tendon dokusunun ve deselülerize tendon dokusunun protein içerikleri

5.2 Jel Formunda Hücre Dışı Matriksin Karakterizasyon Bulguları

5.2.1 Türbidimetrik analiz bulguları

Elde edilen jel formunda hücre dışı matriksin pepsin ile sindirilmesiyle jelleşme zamanının belirlenmesi amacıyla 504 nm dalga boyunda ve 37ºC sıcaklıkta 2 saat boyunca her 2 dakikada bir ölçümler alınmış ve elde edilen veriler normalize edilip grafiğe aktarılmıştır **(Şekil 5.5)**. Bu grafik incelendiğinde ise 75-80 dakikaları arası absorbans değerinin platoya ulaştığı gözlenmiştir. Bu sonuç dtHDM jelinin mevcut koşullarda bu süre zarfında katılaştığı bilgisini vermektedir.

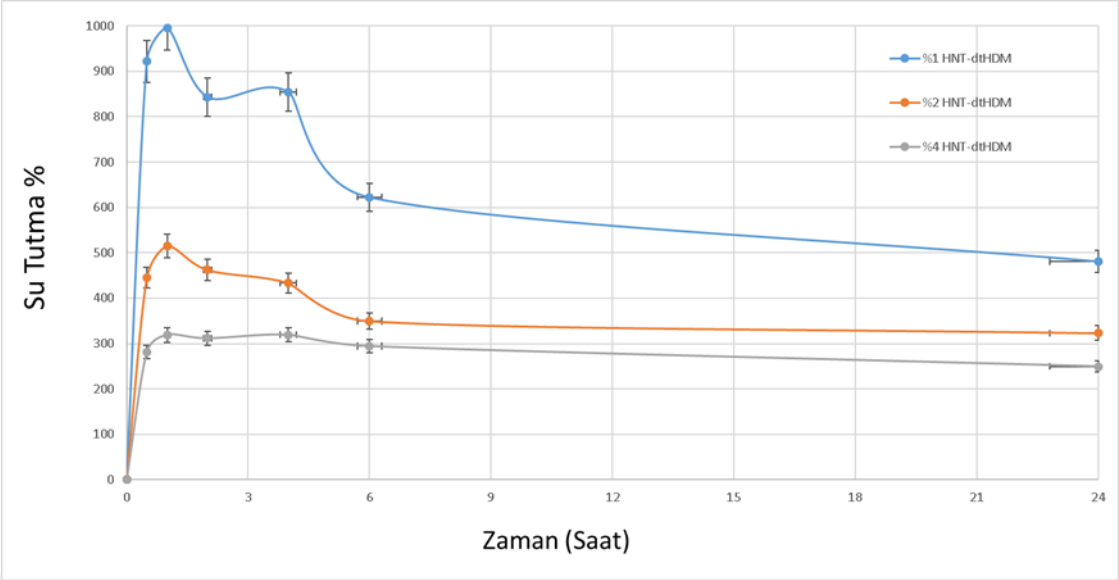


Şekil 5.5 dtHDM'nin 37℃ sıcaklıkta türbidimetrik jelleşme kinetiği grafiği

5.3 Kompozit İskelelerin Karakterizasyon Bulguları

5.3.1 Su tutma kapasitesi analizi bulguları

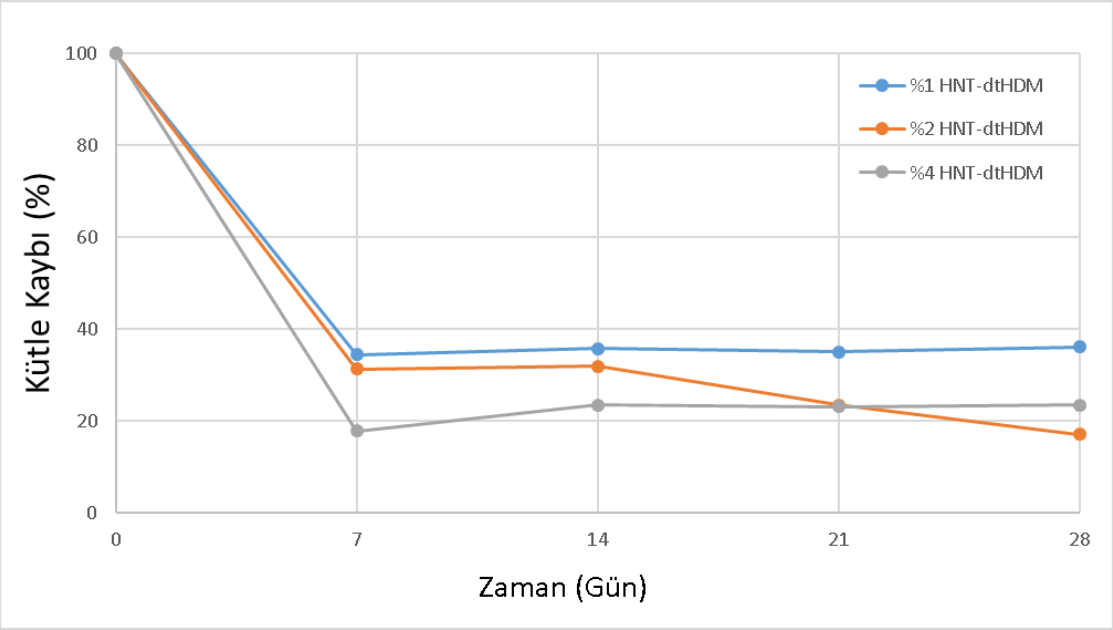
Bir malzemenin ne kadar su absorplayabileceğini gösteren su tutma kapasiteleri, kullanılan biyomalzemenin türüne ve yapısının özelliklerine göre farklılık göstermektedir. İyileşme sürecini hızlandırıp tedavi etkinliğini arttırarak iskelelerin vücutla uyumunu sağlama gibi faydaları olan su tutma kapasitesi, farklı oranlarda HNT ile katkılandırılmış kompozit iskelelerde fosfat tamponunda incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde iskelelerin farklı su tutma kapasitelerine sahip olduğu gözlenmiştir **(Şekil 5.6)**. İlk zaman aralığında tüm iskele yapılarının su tutma kapasitelerinde hızlı bir artış görülmüş ardından belli bir oranda azalma söz konusu olmuştur. Sonuç olarak kompozit iskelelerin hepsinin iyi bir su tutma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.6 Farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin su tutma kapasiteleri grafiği

5.3.2 Kütle kaybı analizi bulguları

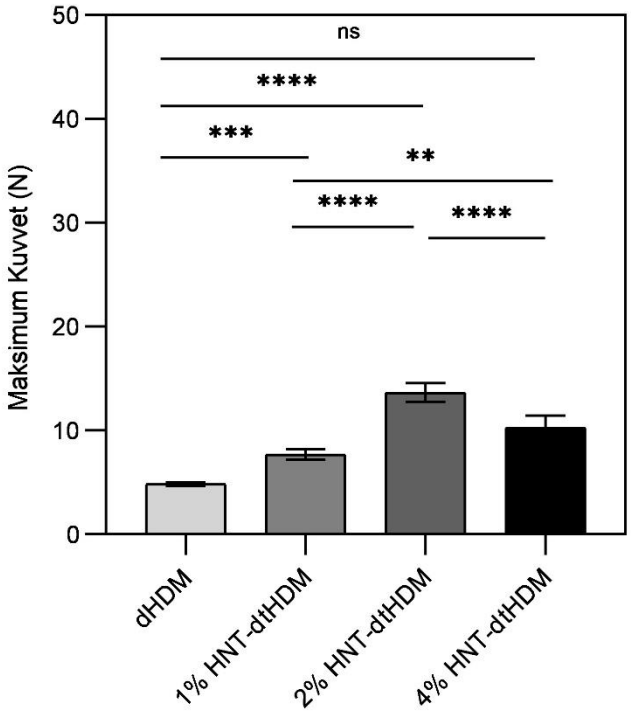
Kompozit iskeleler kütle kaybı bulgularını incelemek üzere 28 günlük süreçte 37ºC'de PBS (pH 7.4) içinde bekletilmiştir. Elde edilen verilerin grafiğe geçirilmiş ve **şekil 5.7**'de verilmiştir. Farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin kütle kayıp değerleri incelendiğinde %1 ve %4 oranda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin %2 oranındaki örneğe kıyasla daha az kütle kaybına uğradığı görülürken %2 oranındaki kompozit iskelenin 14. günden itibaren daha fazla kütle kaybına uğradığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde %1 ve %4 oranlarında HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin daha dayanıklı olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 5.7 Farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin kütle kaybı grafiği

5.3.3 Basma testi bulguları

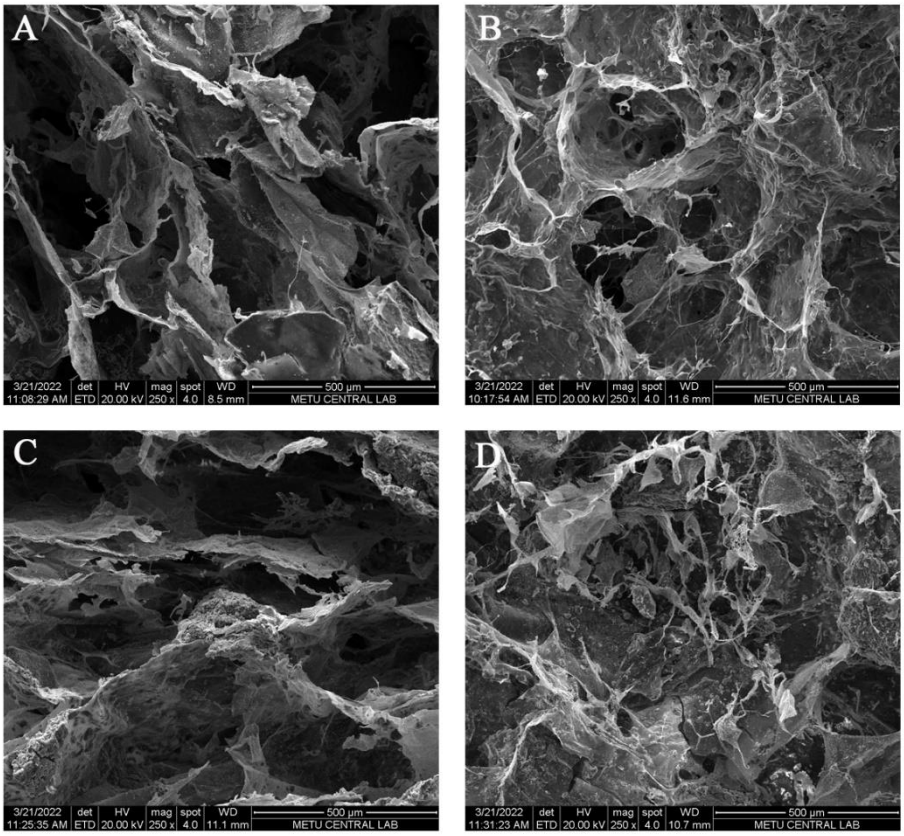
Kompozit iskelelerin mekanik dayanım testi sonucunda elde edilen bulgular **şekil 5.8**'de verilmiştir. Veriler incelendiğinde %1, %2 ve %4 HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin mekanik dayanımlarının dtHDM'ye kıyasla sırasıyla 1,5; 2,5 ve 2 kat arttığı belirlenmiştir.



Şekil 5.8 dtHDM ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin basma testi sonuçları

5.3.4 SEM analiz bulguları

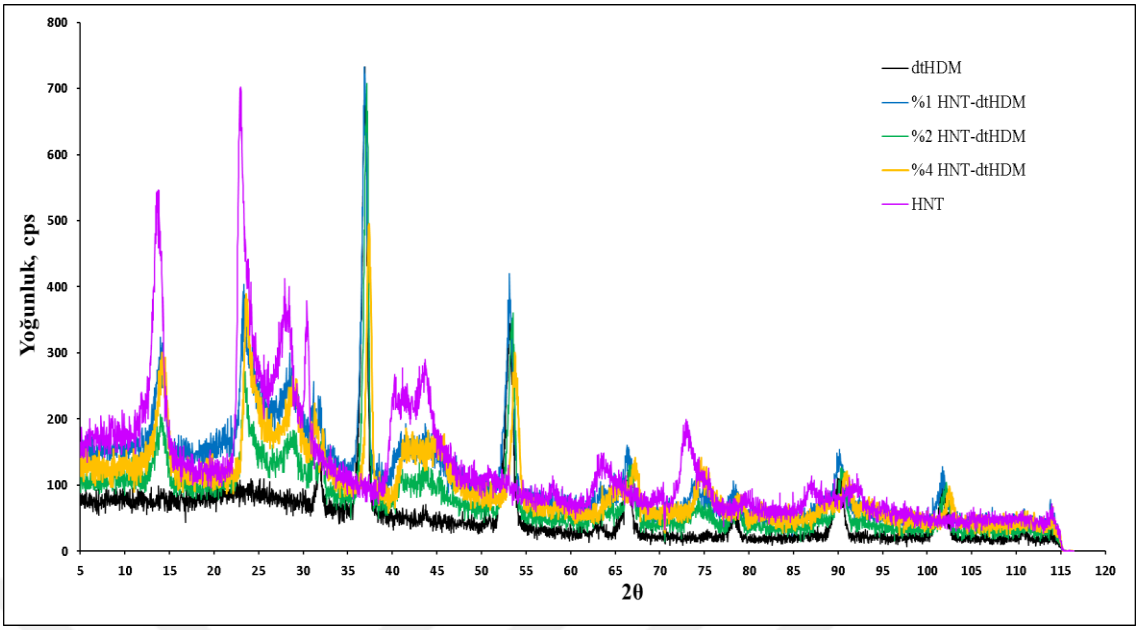
dtHDM ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan dtHDM'den dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan iskelelere ait SEM mikrografları **şekil 5.9**'da verilmiştir. SEM mikrografları, kompozit iskele örneklerinin birbirleriyle bağlantılı büyük gözenekler içeren bir yapıya sahip olduğunu ve HNT partiküllerinin artan katkılandırma oranına paralel olarak matriks içerisinde homojen şekilde dağıldığını ve bu partiküllerin gözenek duvarlarının pürüzlü olmasına yol açtığını göstermiştir. Bu yapılar, iskele yüzey alanında artış sağlayarak hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği için hücre kültürü çalışmaları için önemli bir avantajdır.



Şekil 5.9 A: dtHDM, B: %1 HNT-dtHDM, C: %2 HNT-dtHDM, D: %4 HNT-dtHDM

5.3.5 XRD analizi bulguları

Elde edilen kompozit iskele örneklerinin beklenen kristal yapıda olup olmadığını değerlendirmek amacıyla yapılan XRD analizinin grafiği **şekil 5.10**'da verilmiştir. Bu analiz doğrultusunda yapılan X-ışınları ölçümlerinde 2θ değerine karşılık gelen difraksiyon pikleri HNT için 14.16, 23, 29.10, 31.17, 43.70 ve 74.20 şeklindedir. Bununla beraber dtHDM için karşılık gelen pikler 31.98, 36.90, 53, 78.44, 90.36 ve 101.92 olmuştur. Elde edilen sonuçların Marco vd. (2014) yaptığı çalışmadan elde edilen bulgular ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Marco vd. 2014). Bununla birlikte %1, %2 ve %4 oranında HNT ile katkılandırılmış kompozit iskele örneklerine ait piklerin hem HNT hem de dtHDM'ye ait pikleri içerdiği görülmektedir. Böylece kompozit iskelelerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini anlaşılmaktadır.



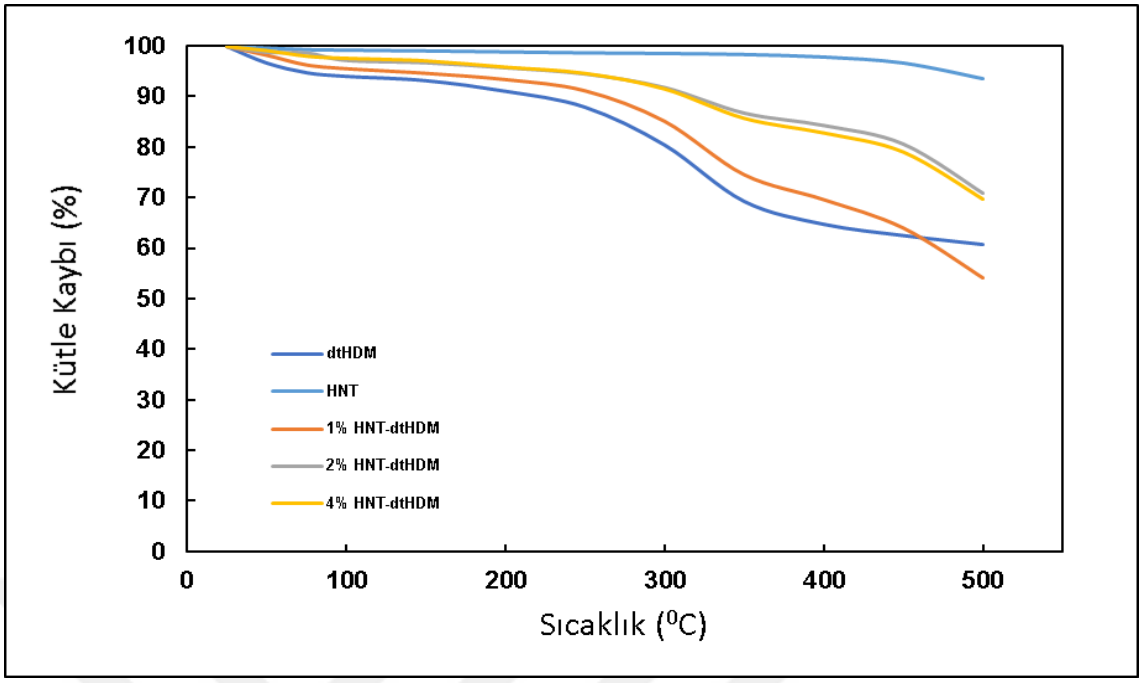
Şekil 5.10 Kompozit iskele örneklerinin XRD analizi grafiği

5.3.6 TGA bulguları

dtHDM ve bu yapıya farklı oranlarda HNT katkılandırılması ile geliştirilen kompozit iskelelerin TGA eğriler **şekil 5.11**'de ve sıcaklığa bağlı olarak değişen yüzde kütle kayıpları **çizelge 5.1**'de verilmiştir.

Hidrojellerin termogramlarında genellikle yapılarındaki su moleküllerinin kaybı, malzemenin parçalanması ve organik bileşenlerin yanması nedeniyle iki veya üç aşamalı kütle kayıpları meydana gelmektedir. dtHDM yapısının TGA verileri literatürle uyumludur (Vurat vd. 2023). 0-200 °C civarındaki ilk kütle kaybı, fiziksel olarak adsorbe edilen suyun buharlaşması nedeniyle meydana gelirken, ikinci kütle kaybı yapıdaki organik bileşiklerin ayrışmasına bağlı olarak 200-400 °C'de gözlenmiştir.

TGA grafikleri incelendiğinde %2 ve %4 oranında katkılandırılan örneklerin termal yıkım özelliklerinin birbirine benzer olduğu, %1 oranında katkılandırılan örneğin ise diğer iki örneğe göre daha fazla termal yıkıma uğradığı görülmüştür.



Şekil 5.11 dtHDM, HNT ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan iskelelerin TGA grafiği

Çizelge 5.1 dtHDM, HNT ve farklı oranlarda HNT ile katkılandırılan iskelelerin yapılarında sıcaklığa bağlı oluşan % kütle kayıpları

Sıcaklık (℃)	**200℃**	**350℃**	**500℃**
HNT	%1,1	%1,62	%6,5
dtHDM	%8,9	%30,7	%39,3
%1 dtHDM	%6,5	%25,5	%46
%2 dtHDM	%4,2	%13,2	%29
%4 dtHDM	%4,1	%14,2	%30

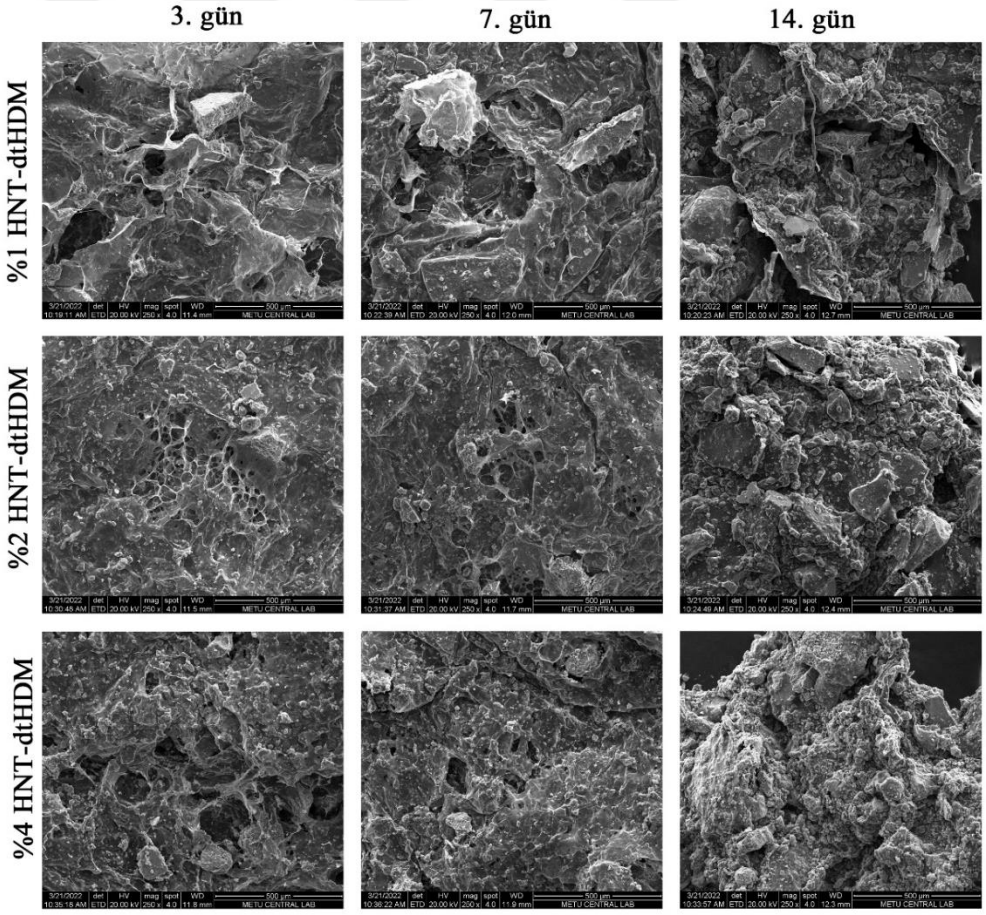
5.3.7 *In Vitro* biyoaktivite analiz bulguları

Vücut içerisine yerleştirildikten sonra vücut sıvıları ve çevre doku ile etkileşime girerek yeni doku oluşumunu destekleyen malzemeler biyoaktif malzemeler olarak adlandırılmaktadır. Doğal kemik dokuya benzer mineral içeriğe sahip apatit tabakasının oluşumunu destekleyen biyoaktif özelliklere sahip malzemelerin geliştirilmesi özellikle kemik doku mühendisliği çalışmaları için oldukça önemli bir parametredir (Barrère vd.

2008). Bu kapsamda üretilen kompozit iskelelerin apatit tabakası oluşturma kapasiteleri insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonuna sahip SBF kullanılarak belirlendi. Belirli zaman süresince yapay vücut sıvısında bekletilen kompozit doku iskelelerinin karakterizasyonu SEM ve FTIR analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

5.3.7.1 SEM analizi bulguları

SBF'de inkübe edilen HNT ile katkılandırılmış dtHDM'ler 3., 7. ve 14. günlerde SEM ile gözlemlendiğinde SBF'de kuluçka süresi arttıkça tüm kompozit iskele yüzeylerinde artan miktarda apatit birikimi tespit edilmiştir **(Şekil 5.12)**. Ek olarak, halloysit içeriğinin varlığının apatit birikimini ve biyoaktiviteyi arttırmada olumlu bir etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 5.12 Kompozit iskelelerin SBF içinde 3,7 ve 14 günlük inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri

5.3.7.2 FTIR analizi bulguları

28 gün boyunca SBF içinde inkübe edilen kompozit iskelelere 3., 7. ve 14. Günlerde FTIR analizi yapılmıştır **(Şekil 5.13-5.18)**. Böylece iskelelerin yapılarındaki moleküllerin ve meydana gelen değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. SBF ile muamele sonrası %1, %2 ve %4 oranında halloysit ile katkılandırılan örneklerin FTIR spektrumları incelendiğinde –OH bölgesi, -PO_4^{3-} bölgesi ve -CO_3^{2-} bölgesi gibi kompozitteki her bileşene ait parmak izi bölgesi pikleri görülmüştür. %1HNT-dtHDM FTIR analizinde 3631 ve 1647 cm^{-1} dalga boyundaki pikler O-H gerilim bandını; 1523 ve 902 cm^{-1} bandında gözlemlenen pikler $CO3^{2-}$; 1001 ve 642 cm^{-1} bandında bulunan pikler ise PO_4^{3-} varlığını göstermektedir **(Şekil 5.13)**.

%2 HNT-dtHDM FTIR spektrumunda, 3851, 3188 ve 1735 cm^{-1} dalga boyunda bulunan pikler O-H gerilim bandını; 1541 ve 914 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler CO_3^{2-} varlığını; 1037 ve 599 cm^{-1} arasında bulunan pikler ise PO_4^{3-} varlığını göstermektedir **(Şekil 5.14)**.

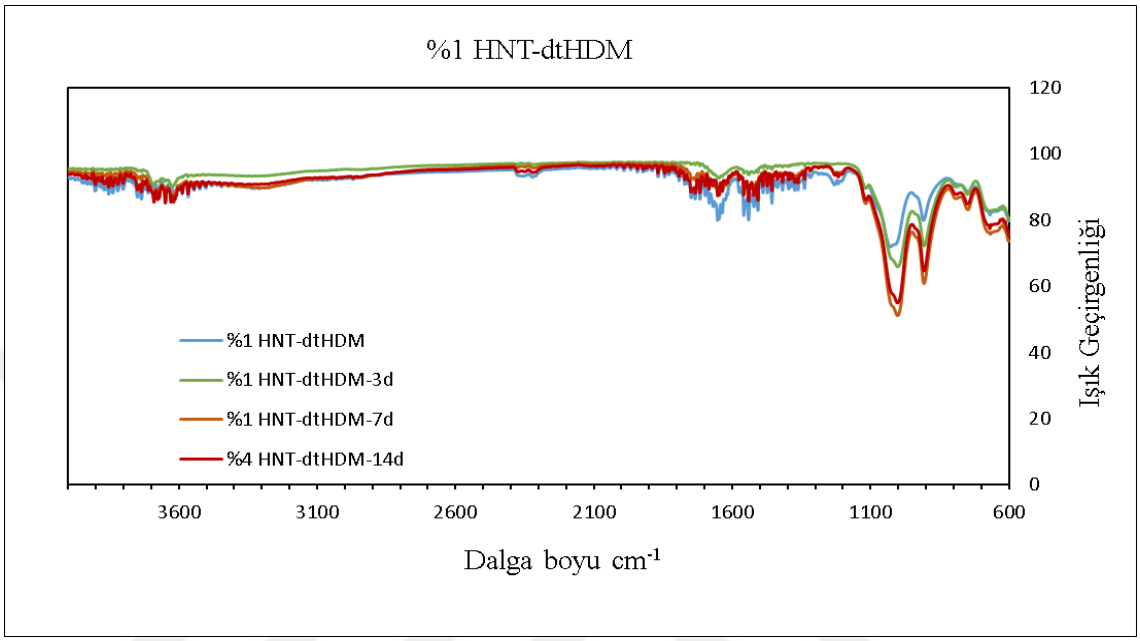
%4 HNT-dtHDM FTIR spektrumunda ise 3687 ve 1668 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler O-H gerilim bandını; 1556 ve 906 cm^{-1} dalga boyunda bulunan pikler CO_3^{2-} varlığını; 1006 ve 599 cm-1 dalga boyunda bulunan pikler ise PO_4^{3-} varlığını göstermektedir **(Şekil 5.15)**.

Böylece %1, %2 ve %4 HNT-dtHDM kompozit iskelelerinin SBF içinde mineralleşmesinin FTIR analizine yansıyan sonuçlarının Kokubo (2006) ve Demirkol (2013) gibi literatürdeki mevcut diğer çalışmalarla uyumlu olduğu belirlenmiştir (Kokubo 2006; Demirkol 2013).

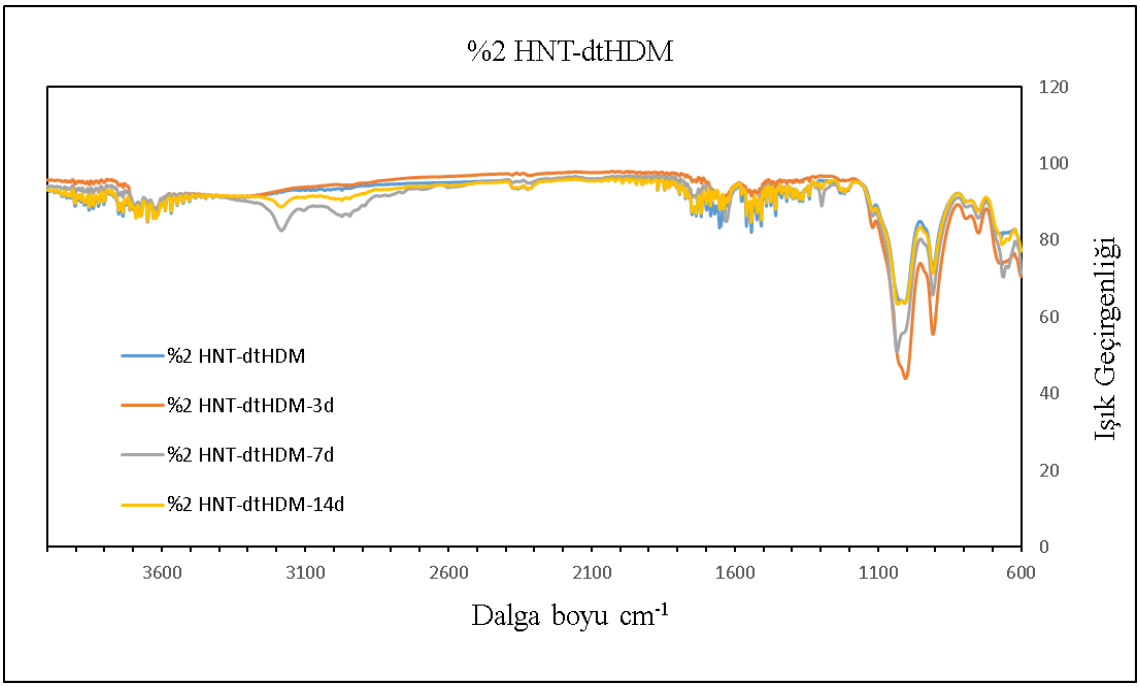
Ayrıca %1, %2 ve %4 HNT-dtHDM kompozit iskelelerin SBF inkübasyonunun 3. gününe ait **(Şekil 5.16)**, 7. gününe ait **(Şekil 5.17)** ve 14. gününe ait **(Şekil 5.18)** FTIR spektrumları incelendiğinde birbiri ile uyumlu oldukları görülmektedir.

Pik şiddetlerinde HNT içeriğinin artışı ile uyumlu bir artış söz konusudur. 1000-1700 cm^{-1} ve 3600-2700 cm^{-1} aralıklarında yer alan bölgeler incelendiğinde kompozit

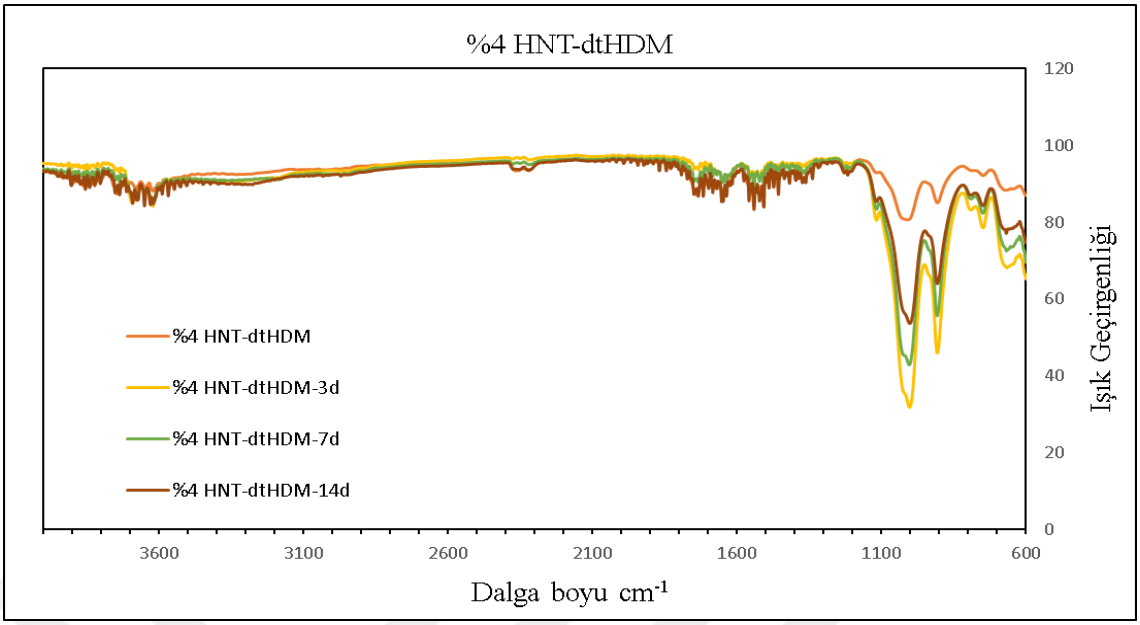
malzemelerde ortaya çıkan piklerin dtHDM yapısında da mevcut olduğu gözlenmiştir. 1000-430 cm^{-1} aralığında yer alan bölgelerde ise HNT'ye ait spesifik piklerin kompozit iskele yapılarında da olduğu belirlenmiştir.



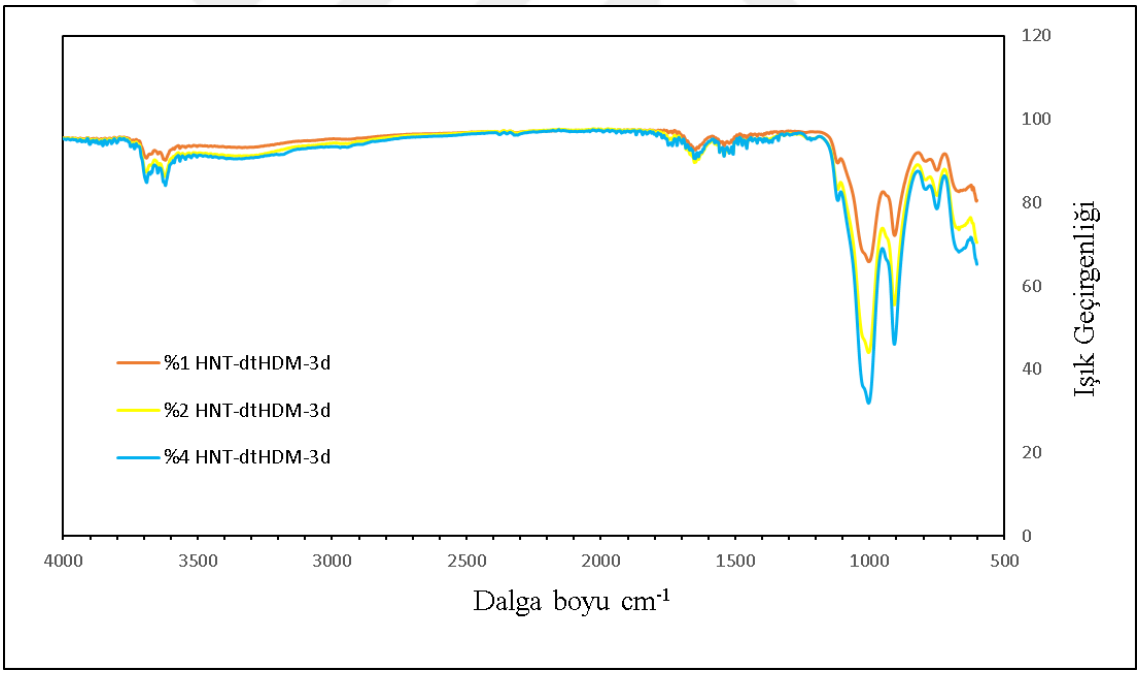
Şekil 5.13 %1 HNT-dtHDM'ye ait SBF öncesinde ve sonrasındaki FTIR spektrumları



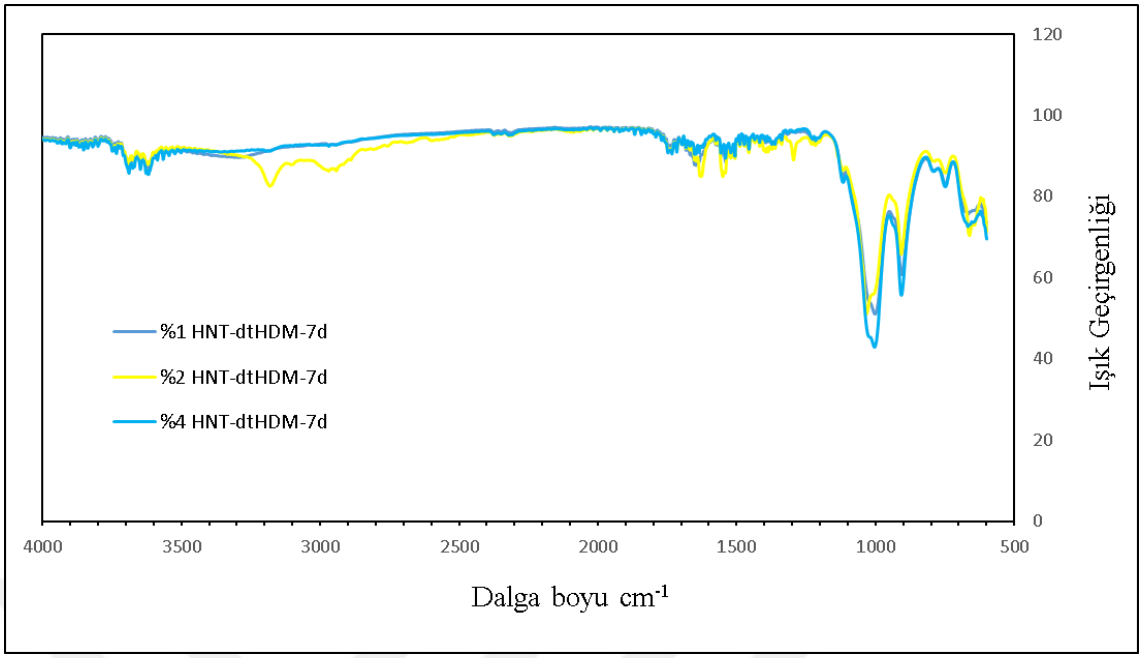
Şekil 5.14 %2 HNT-dtHDM'ye ait SBF öncesinde ve sonrasındaki FTIR spektrumları



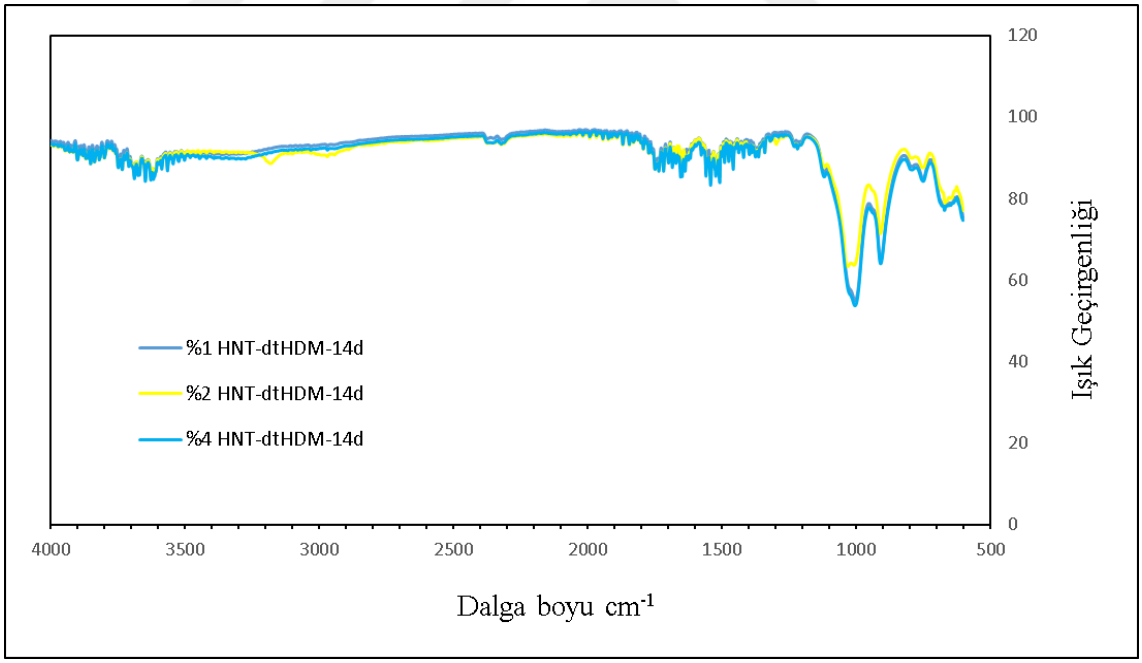
Şekil 5.15 %4 HNT-dtHDM'ye ait SBF öncesinde ve sonrasındaki FTIR spektrumları



Şekil 5.16 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 3. gün FTIR spekturumu



Şekil 5.17 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 7. gün FTIR spektrumu

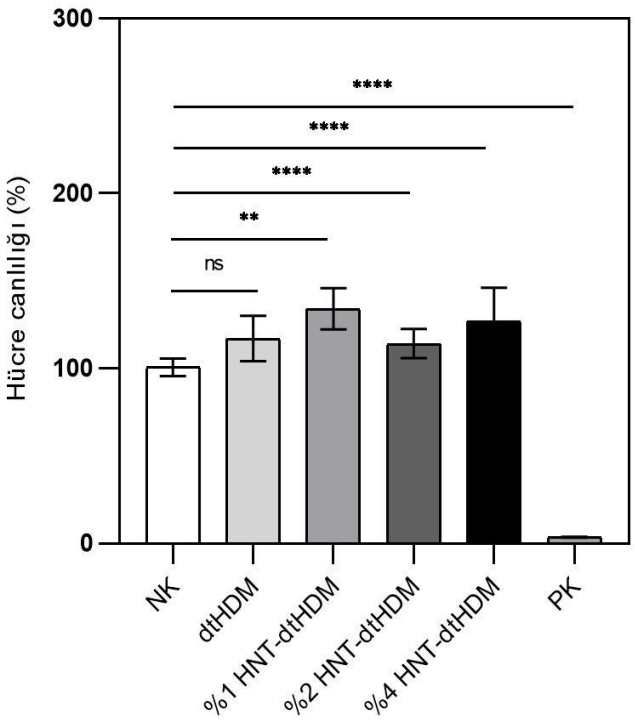


Şekil 5.18 Kompozit iskele örneklerinin SBF inkübasyonunun 14. gün FTIR spekturumu

5.3.8 Biyouyumluluk testleri bulguları

5.3.8.1 *In vitro* sitotoksisite testi bulguları

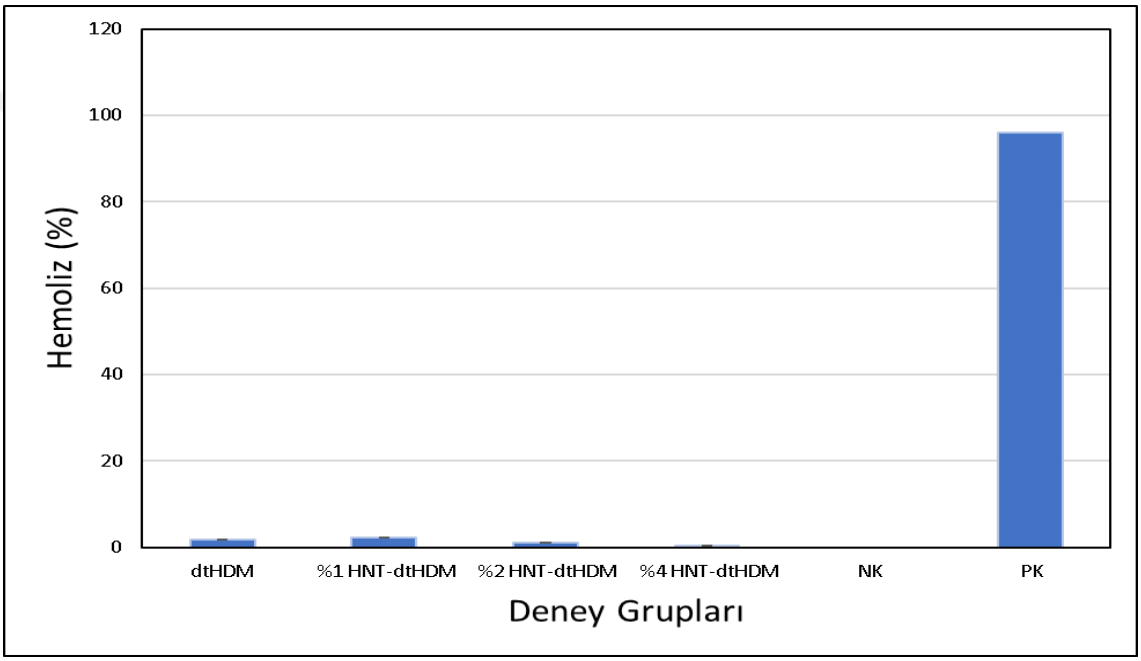
MTT reaktifi yöntemi ile incelenen in vitro sitotoksisite testinin sonuçları değerlendirildiğinde hücre canlılık oranları dtHDM, %1 HNT-dtHDM, %2 HNT-dtHDM ve %4 HNT-dtHDM için sırasıyla %118, %125, %115 ve %120 olarak bulunmuştur. Ayrıca yüzde hücre canlılığı negatif kontrol için %100, pozitif kontrol için %2 olarak belirlenmiştir **(Şekil 5.19)**. Elde edilen veriler geliştirilen kompozit iskelelerin ISO-EN-10993-5 standartı kapsamında sitotoksik bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir.



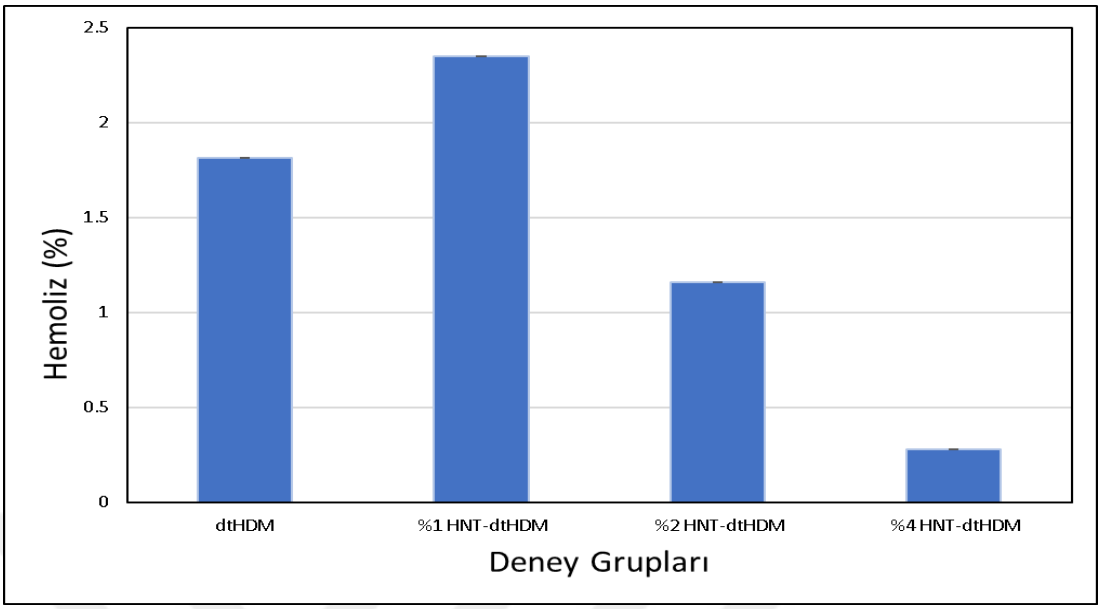
Şekil 5.19 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin % hücre canlılık oranları

5.3.8.2 Hemoliz testi bulguları

ISO 10993-4 standardına göre gerçekleştirilen in vitro testin sonucu **şekil 5.20-5.21**'de gösterilmiştir. Bulgular, geliştirilen tüm kompozit iskeleler için ölçülen hemoliz değerlerinin kabul edilebilir maksimum %5 değerinden düşük olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuç ISO 10993-4 standardına göre, kompozit iskelelerin ciddi bir hemolizi tetiklemeyeceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5.20 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin NK ve PK değerlerini içeren hemoliz yüzdeleri grafiği



Şekil 5.21 Hazırlanan kompozit iskele örneklerinin hemoliz grafiği

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vücudun korunmasını, desteğini ve hareketini sağlayıp aynı zamanda iskelet sisteminin yapıtaşı olan kemik, kemik iliği gibi kanın oluşumunu da sağlayan dokular için de bir üretim bölgesi olmaktadır. Doğal kompozit bir malzeme olan kemik dokusu sert ve mineralize bir dokudur. Ancak aynı zamanda çeşitli hücre tiplerini ve kan damarlarını barındıran canlı bir dokudur. Bu canlılık sayesinde bir miktar rejenerasyon yeteneğine sahip olsa da çeşitli yaralanmalarda, hastalıklarda veya doğuştan gelen eksiklikler nedeniyle hasar görmüş kemik dokusuna bu yetenek yeterli olmamakta ve dışarıdan tedavi desteği gerekli olabilmektedir. Bu konuda son yıllarda yapılan çalışmalar ile laboratuvar ortamında biyobozunur biyomalzemelerden geliştirilen iskeleler ile üç boyutlu yapay kemik dokusu elde etmeyi amaçlayan kemik doku mühendisliği uygulamaları önem kazanmıştır.

Hâlihazırda var olan kemik doku mühendisliği çalışmalarında insan vücudu ile uyum gösterecek, doğal biyobozunur kompozit biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda hedefe yönelik tedavilerde kullanılmak amacıyla laboratuvar ortamında deselülerize edilen dtHDM'nin doğal bir malzeme olan HNT ile katkılandırılmasıyla oluşan HNT-dtHDM kompozit doku iskeleleri geliştirilmiş ve çeşitli analizlerle karakterizasyonları yapılmıştır. Tüm bu çalışmalar neticesinde elde edilen kompozit biyomalzemenin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanımının uygunluğu değerlendirilmiştir.

Deselülerizasyon yöntemlerinde çok çeşitli kimyasal malzeme kullanılmaktadır. Bu kimyasallar ile muamele sonrasında doku içinde kalan olası yüksek konsantrasyonlardaki kalıntılar in vitro sitotoksisiteye neden olabilmektedir. Bu nedenle deselülerizasyon sürecinin tamamlanmasını ardından hücresel içeriğin çıkarılma derecesinin, deselülerize dokunun kimyasal kalıntılarından arınma derecesinin ve geri kalan HDM'nin bütünlük düzeyinin tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu değerlendirmelere ilave olarak iskele proteinlerinin varlığının tespiti için histokimyasal teknikler de kullanılabilmektedir (Sarvazyan 2020). Tez çalışmamızda yapılan değerlendirmeler kapsamında, DNA içeriği analizi sonuçları kontrol grubuna kıyasla DNA içeriğinin %83 oranında bertaraf edildiği

gösterirken Lowry protein analizi sonuçları, deselülerizasyon işleminin ardından doğal tendon dokusunun protein içeriğinin büyük ölçüde korunduğunu göstermiştir. Lowry protein analizinden elde edilen bulgular FTIR bulguları ile uyumludur. Bu veriler, deselülerizasyon işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini doğrularken, aynı zamanda literatürdeki çalışmalarla da uyum göstermektedir (Sarvazyan 2020; Ergun vd. 2022).

Hazırlanan iskelelerin *in vitro* biyoaktiviteleri iyonik derişimi kan plazması ile benzerlik taşıyan yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde inkübe edilmesi ile belirlendi. Yapılan bu değerlendirme kapsamında, %1, %2 ve %4 HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin 14 gün boyunca SBF ile inkübasyonu sonrasında yapılan FTIR analizinde 3687-1647 cm^{-1}'de O-H gerilim bandı, 1556-902 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler CO_3^{2-} varlığı ve 1037-599 cm^{-1}'deki pik PO_4^{3-} varlığının görülmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur (Demirkol 2013). Ayrıca SBF mineralizasyonunun 7. ve 14. günlerinde daha şiddetli olmakla birlikte yaklaşık aynı bölgelerde benzer piklerin oluştuğu gözlenmiştir. SBF içindeki inkübasyon zamanının arttıkça apatit oluşum miktarındaki artış literatürde yapılan çalışmalardaki FTIR analizi sonuçları ile desteklenmektedir (Taher Mohamed ve Emin 2024). Hidroksiapatit tabakanın oluşumunu değerlendirmek amacıyla SBF inkübasyonunun 3. 7. ve 14. günlerinde yapılan SEM analizinde inkübasyon süresinin artışı ile birlikte tüm kompozit iskele yüzeylerinde artan oranda apatit birikiminin olduğu tespit edildi. Bu bağlamda, FTIR ve SEM analizlerinden elde edilen veriler, birbirini tamamlayarak uyumlu ve destekleyici sonuçlar ortaya koymaktadır. Toksik bir bileşen içermediği sürece SBF içinde yüzeyinde apatit tabakası oluşturabilen malzemeler inkübasyon süresi ile orantılı olarak aktivite göstermektedir (Kokubo vd. 2006). Özellikle %4 HNT ile katkılandırılan kompozit iskelenin yüzeyinde karnabahar benzeri hidroksiapatit tabaka oluşumu net olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar HNT ile katkılandırılan kompozit iskelelerin biyoaktif olduğunu ve kemik benzeri apatit oluşumunu indüklediğini doğrulamaktadır.

Gözenek boyutu iskele içerisine sıvı ve oksijen akışında, hücrelerin tutunmasında, büyümesinde ve farklılaşmasında ve ayrıca kan damarı gelişimi ile mekanik dayanım için önemli bir parametredir. Kemik doku mühendisliği çalışmalarına yönelik olarak geliştirilen iskelelerin optimal gözenek boyutları hakkında farklı görüşler olmakla birlikte

iskelelerin boyutu 100 µm ile 900 µm arasında değişiklik gösterebilmektedir (Hutmacher vd. 2000). Standart hücre temelli iskele çalışmalarında 200 µm üstü gözenekler hücre tutunması ve çoğalması bakımından uygun bulunmaktadır. Ayrıca dağılımı ~ 150 µm'den büyük olan gözenekler mineralize kemik oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bu çalışmada SEM mikrograftlarından hazırlanan kompozit iskele örneklerinin boyutunun yaklaşık 100-500 µm aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda hazırlanan kompozit iskele örneklerinin kemik doku mühendisliğine yönelik çalışmaları için uygun olduğu görülmüştür.

Biyomalzemelerin su tutma kapasitesi, vücut sıvılarının absorpsiyonu, iskelelere tohumlanmış hücrelere besin maddelerin ve atık metabolitlerin difüzyonu açısından önem taşımaktadır. PBS içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilen kompozit iskelelerin ağırlıklarının kuru ağırlıklarına oranla artışları yüzde olarak hesaplanmış ve tüm örneklerin iyi bir su tutma kapasitelerinin olduğu belirlenmiştir. Veriler değerlendirildiğinde en fazla su tutma kapasitesine sahip kompozit iskelenin %1 HNT-dtHDM olduğu görülmüştür.

28 günlük inkübasyonun ardından yapılan kütle kaybı analizinde en stabil yapıların %1 ve %4 oranlarında HNT ile katkılandırılan kompozit iskeleler olduğu belirlenmiştir. %2 oranındaki örneğin diğer iki örnekten daha iyi değerde olması beklenirken 21. günden sonra daha fazla kütle kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Bunun çözelti değişim esnasında örneğin miktar kaybına uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sentezlenen kompozit iskele örneklerinin XRD verileri HNT ve dtHDM'ye karşılık gelen difraksiyon piklerini içerdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler kompozit iskelenin başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen difraksiyon piklerinin literatür çalışması ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Marco vd. 2014).

Her ne kadar *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar belirli bir sıcaklıkta gerçekleştirilsede, ısıl işlem süreci sırasındaki termal bozunma, yapının sitotoksisitesini ve biyouyumluluğunu değiştirebilen küçük moleküler parçaların oluşumuyla sonuçlanabilmektedir (Tiaw vd. 2007). Bu bağlamda malzemelerin termal stabilitesinin değerlendirilmesi önemlidir.

Kompozit malzemelerin yüksek sıcaklık altında termal yıkımlarının incelendiği termogravimetrik analizlerinde elde edilen % kütle kaybı verileri incelendiğinde %2 ve %4 oranlarında HNT ile katkılandırılan kompozit iskele örneklerinin %1 oranındaki örneğe kıyasla daha dayanıklı olduğu ve termal yıkım altında daha az kütle kaybına uğradığı belirlenmiştir. Kompozit iskele örneklerindeki katkılandırma miktarı ile dayanıklılık arasındaki görülen uyum literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Kong vd. 2005).

Sitotoksisite testi, hücrelerin büyümesinin, çoğalmasının ve morfolojik etkilerinin in vitro ortamda biyolojik olarak değerlendirilmesini sağlayan testlerdir. Literatürde doku mühendisliği iskeleleri pek çok sitotoksisite testine tabii tutulmuştur. Bunlardan biri de biyomalzemelerin besiyeri, serum fizyolojik veya PBS içerisinde ekstraksiyonu ile hücrelerin etkileştirilmesinin sağlanmasıdır (Liv vd. 2015). ISO 10993-5 standardına göre ise yapılan sitotoksisite testinin sonucunda %70'in altındaki hücre canlılık oranları analiz edilen malzemenin sitotoksik özellik taşıdığını ifade etmektedir. Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksisite analizleri sonucunda ise eşik değeri olarak kabul edilen %70 oranının çok üzerinde (%1 HNT-dtHDM için %125, %2 HNT-dtHDM için %115 ve %4 HNT-dtHDM için %120) bir hücre canlılığı tespit edilmiş ve böylece hazırlanan kompozit iskele örneklerinin sitotoksik etkilerinin bulunmadığı teyit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sitotoksisite analiz verilerinin literatürde yapılan çalışmalar ile örtüştüğü görülmektedir (Sawkinsvd 2013; Ergun vd. 2022; Koç Demir vd. 2024)

Elde edilen tüm veriler ile;

- Kompozit doku iskelelerin içsel bağlantılı ve gözenekli bir yapılara sahip olduğu,
- Sitotoksik ve hemolitik bir etkiye sahip olmadıkları,
- Katkılandırma oranının artışına bağlı olarak kompozit iskelelerin;
  - Gözenek boyutlarının bir miktar azaldığı ayrıca yüzey pürüzlüğünün arttığı,
  - Su tutma kapasitesinin azaldığı,
  - Termal özelliklerinin arttığı,
  - Biyoaktivelerinin arttığı,

tespit edilmiştir.

Bu bulgulara dayanarak, geliştirilen kompozit doku iskelelerinin KDM çalışmaları için potansiyel taşıdığı belirlenmiştir. Ancak *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile elde edilen bulguların olgunlaştırılması ve yapı iskelelerinin işlevselliğinin daha iyi değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Abhiram Y., Das A., Kumar Sharma K. 2021. Green composites for structural and non-structural applications: A review, materials today, 44(2021)2658-2664.

Akdoğan, G., Sarıtaş, S., Koç, T. 1999. Ortopedide Kullanılan Biyomalzemeler ve Özellikleri, BİYOMUT 99, 3. Biyomedikal Mühendisleri Ulusal Toplantısı, 27-29 Ekim Erciyes Üniversitesi, 72-81, Kayseri.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng. 40(5):363-408.

Annamalai R. T. et al. 2019. Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects. Biomaterials 208, 32–44.

Badylak, S.F., Freytes, D.O. and Gilbert, T.W. 2009. Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function. Acta Biomaterialia 5(1):1–13.

Barrère, F., Mahmood, T.A., Groot, K., Blitterswijk, C. A. 2008. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. Materials Science and Engineering R, 59, 38–71.

Baykan, E., Koç, A., Elcin, A.E. and Elcin, Y.M. 2014. Evaluation of a biomimetic poly(ε-caprolactone)/β-tricalcium phosphate multispiral scaffold for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies Citation: Biointerphases 9, 029011.

Bishop PJ, Hocknull SA, Clemente CJ, Hutchinson JR, Farke AA, Beck BR, Barrett RS, Lloyd DG. 2018. Cancellous bone and theropod dinosaur locomotion. Part I—an examination of cancellous bone architecture in the hindlimb bones of theropods. 5778.

Black, J. 1992. Biological Performance of Materials, 2nd Ed., M. Dekker, Inc., NewYork.

Blose, K. J., Krawiec, J. T., Weinbaum, J. S., & Vorp, D. A. (2014). Bioreactors for tissue engineering purposes. In Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation (pp. 177-185). Academic Press.

Bristow, C.M. 1979. A classification for sedimentary kaolinitic formations of economic importance. Acta Mineralogica Petrographica, 24; 19-25.

Cerroni, L., Filocamo, R., Fabbri, M., Piconi, C., Caropreso, S., and Condo, S. G. 2002. Biomolecular Engineering, 19: 119-124.

Chan, B. P. and K. W. Leong. 2008. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. European Spine Journal 17(SUPPL. 4).

Churchman, G.J. and Carr, R.M. 1972. Stability fields of hydration states of a halloysite. American Mineralogist, 57; 914-923

Churchman, G.J. and Carr, R.M. 1975. The definition and nomenclature of halloysites. Clays and Clay Minerals, 23; 382-388

Demirkol, N. 2013. Koyun hidroksiapatit esaslı kompozitlerin üretimi ve

karakterizasyonu. Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesii Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, 127, İstanbul.

Draget, K., et al. 2005. Alginate from Algae In Polysaccharides and Polyamides in The Food Industry. Polysaccharides and Polyamides in food industry 1: 143.

Durkut, S. 2019. Thermoresponsive poly (N-vinylcaprolactam)-g-galactosylated chitosan hydrogel: synthesis, characterization, and controlled release properties. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 68(17), 1034-1047.

Durkut, S., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. 2015. In vitro evaluation of encapsulated primary rat hepatocytes pre-and post-cryopreservation at− 80 C and in liquid nitrogen. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 43(1), 50-61.

Elçin YM. 2008. Tissue engineering (Doku mühendisliği). Turkiye Klinikleri Journal of Hematology Oncology-Special Topics, 1: 36-43

Emin, N., Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Ensititüsü, 2012. Yapay niş mikroçevrede doku gelişim modeli oluşturulması, Doktora Tezi.

Ercan H., Elçin A.E., Elçin Y.M. 2022. Assessment of dopamine-conjugated decellularized bovine tendon extracellular matrix as a bioadhesive. Materials Today Communucations. 31:103634.

Ercan, H. 2020. Biyotıp uygulamaları için biyoadhezif özellikle enjekte edilebilir polimer sistemlerin geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 103, Ankara.

Ergun C., Parmaksız M., Vurat M.T., Elçin A.E., Elçin Y.M. 2022. Decellularized liver ECM-based 3D scaffolds: Compositional, physical, chemical, rheological, thermal, mechanical, and in vitro biological evaluations. International Journal of Biological Macromolecules. 200,110-123.

Faulk D.M., Wildemann J.D., Badylak S.F. 2014. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. Journal of Clinical and Experimental Hepatology, 5(1), 69-80.

Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, and Valerie M. Weaver. 2010. The Extracellular Matrix at a Glance. Journal of Cell Science 123(24):4195–4200.

Freed, L. E., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R. J., Eagles, D. B., Lesnoy, D. C., Barlow, S. K., & Langer, R. 1994. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Bio/technology, 12(7), 689-693.

Gilbert, Thomas W., Tiffany L. Sellaro, and Stephen F. Badylak. 2006. Decellularization of Tissues and Organs. Biomaterials 27(19):3675–83.

Gilpin A., Yang Y. 2017. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. BioMed Research International, 1-13.

Grim, R.E. 1968. Clay Mineralogy, 2nd ed., McGraw-Hill, New York.

Gümüşderelioğlu, M. 2002. Yeni Ufuklara: Biyomalzemeler, TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi Eki, Ankara.

Heness, G.and Ben-Nissan, B., 2004. Innovative Bioceramics. Materials Forum, Vol.27,

104-114.

Hutmacher, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 21, 2529–2543.

Isch, J. A., S. A. Engum, C. A. Ruble, M. M. Davis, and J. L. Grosfeld. 2001. Patch Esophagoplasty Using Alloderm as a Tissue Scaffold. Journal of Pediatric Surgery 36(2):266–68.

Ismail, H., Pasbakhsh, P., Fauzi, A. and Bakar, A.A. 2008. Morphological, thermal and tensile properties of halloysite nanotubes filled ethylene propylene diene monomer (EPDM) nanocomposites. Polymer Testing, 27; 841–850.

John MJ., Thomas S., 2008. Biofibres and Biocomposites. Carbohydrate Polymers, 71(2008)343-364.

Joussein, E., Petit, S., Fialips, C.I., Vieillard, P. and Righi, D., 2006. Difference in the dehydration–rehydration behavior of halloysites: new evidence and interpretations. Clays and Clay Minerals,.54; 473–485.

Kahraman S.2008. Bir Simektit Mineralinin Kristalliği, Yüzey Alanı ve Gözenekliliği Üzerine Asit Aktivasyonunun Etkisi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 144, Ankara.

Kalkandelen, C. 2016. Hidroksiapatit esaslı biyoseramik malzemelerin karakterizasyonu. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, 115, İstanbul.

Kang H.R., Costa Fernandes C.J., Silva R.A., Constantino V.R.L., Koh I.H.J., Zambuzzi W.F. 2018. Mg-Al and Zn-Al Layered Double Hydroxides Promote Dynamic Expression of Marker Genes in Osteogenic Differentiation by Modulating Mitogen-Activated Protein Kinases. Advanced Healthcare Materials, 7, 1-12.

Kaufmann. 2019. Anatomy & Physiology. Open Oregon State, Oregon State University. 2110.

Kaur, G., Kumar, V., Baino, F., Mauro, J. C., Pickrell, G., Evans, I., & Bretcanu, O. 2019. Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges. Materials science and engineering: C, 104, 109895.

Kaushal, Sunjay, Gilad E. Amiel, Kristine J. Guleserian, Oz M. Shapira, Tjorvi Perry, Fraser W. Sutherland, Elena Rabkin, Adrian M. Moran, Frederick J. Schoen, Anthony Atala, Shay Soker, Joyce Bischoff, and John E. Mayer. 2001. Functional Small-Diameter Neovessels Created Using Endothelial Progenitor Cells Expanded Ex Vivo. Nature Medicine 7(9):1035–40.

Khong, T. T., Aarstad, O. A., Skjåk-Bræk, G., Draget, K. I., & Vårum, K. M. (2013). Gelling Concept Combining Chitosan and Alginate Proof of Principle. Biomacromolecules, 14(8), 2765-2771.

Kini U, Nandeesh BN, (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. Fogelman I. et al. eds. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. Springer Press. Berlin-Heidelberg p.30-55.

Koç Demir A., Elçin A.E, Elçin Y.M. 2024. Magnetic biocomposite scaffold based on

decellularized tendon ECM and MNP-deposited halloysite nanotubes: physicochemical, thermal, rheological, mechanical and in vitro biological evaluations. Biomedical Materials. 19, 035027.

Koç, A., Emin, N., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. 2008. In vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in a microgravity bioreactor. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 23(3), 244-261.

Kokubo, T., Takadama, H. 2006. How Useful is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?. Biomaterials, 27, 2907-2915.

Kong L., Gao Y., Cao W., Gong Y., Zhao N., Zhang X. 2005. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds .Journal of Biomedical Metarials 75, 249-499.

Kurczewska J., Pecyna P., Ratajczak M., Gajecka M., Schroeder G. 2017. Halloysite nanotubes as carriers of vancomycin in alginate-based wound dressing. Saudi Pharmaceutical Journal, 25, 911–920.

Langer, R., Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. Science, 260:920–926.

Lee, K. Y. and Mooney D. J. 2001. Hydrogels for tissue engineering. Chemical reviews 101(7): 1869-1880.

Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. 2003. Solid Freeform Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Engineering Replacement Tissues and Organs. Biomaterials, 24(13), 2363-2378.

Leor J., Amsalem Y., Cohen S. 2005. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. Pharmacology & Therapeutics, 105, 151-163.

Liu M., Zhang Y., Wu C., Xiong S., Zhou C. 2012. Chitosan/halloysite nanotubes bionanocomposites: Structure, mechanical properties and biocompatibility. International Journal of Biological Macromolecules, 51, 566-575.

Liu Y., Lim J., Teoh S. 2013. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. Biotecnology Advances (31), 688-705.

Lvov Y., Wang W., Zhang L., Fakhrullin R. 2016. Halloysite Clay Nanotubes for Loading and Sustained Release of Functional Compounds. Advanced Materials, 28, 1227-1250.

Marco C.D., Ferrarini F., Crespo J.S., Carli L. N., Bonetto L. R., Giovanela M.2014. Synthesis, Characterization and Application of a Ferromagnetic Composite in the Removal of Methyl Violet 2B Dye, Eurasia 2014 Waste Management Symposium, 28-30 Nisan 2014, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., and Langer, R. 1993b. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. Journal of Biomedical Materials Research, 27,183-189.

Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P. and Langer, R. 1993. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. Biomaterials, 14, 323-330.

Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., Vacanti, J.P., Langer, R. 1996. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(d,l-lactid-co-glycolic acid) without the use

of organic solvents. Biomaterials, 17: 1417-1422.

Nadeau, P.H., 1987. Relations between the mean area volume and thickness for dispersed particles of kaolinites and micaceous clays and their application to surface area and ion Exchange properties. Clay Minerals, 22; 351-356.

Narayanan, G., et al., 2019. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. Advanced Drug Delivery Reviews 107: 247-276.

Nizar M., Hamzah M.S.A., Razak S.I., Nayan N.H.M. 2018. Thermal Stability and Surface Wettability Studies of Polylactic Acid/Halloysite Nanotube Nanocomposite Scaffold for Tissue Engineering Studies. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 318, 012006.

Noyan, H. 2007. Sütunlanmış killerin hazırlanması ve bazı fizikokimyasal özeliklerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı,154, Ankara.

Park, J. and Lakes, R.S., 2007. Biomaterials An Introduction, Third Edition, Springer Science and Busines Media, LLC, New York.

Park, J. B. and Bronzinoi J. D., 2002. Biomaterials: Principles and applications, Bca Raton, CRC Press.

Park, J.B., and Kon Kim, Y. 2000. Metallic Biomaterials, in: Joseph D. Bronzino (Ed.), The Biomedical Engineering Handbook, 2nd ed., , Boca Raton, FL, CRC Press LLC.

Pina, S., Reis, R., & Oliveira, J. 2021. Ceramic biomaterials for tissue engineering. 1 November 2021

Poel, W.E. 1948. Preparation of Acellular Homogenates From Muscle Samples. Science 108(2806):390 LP – 391.

Püren Akgüner Z., Bal Öztürk A. 2021. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Dergisi, 27(7), 842-850.

Reinholz, G. G., Lu, L., Saris, D. B. F., Yaszemski, M. J., & O'driscoll, S. W. 2004. Animal models for cartilage reconstruction. Biomaterials, 25(9), 1511-1521.

Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., & Perry, C. C. 2007. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18(7), 1263-1277.

Saçak, M. 2015. Polimer Kimyası. Gazi Kitabevi,568, Ankara.

Sáenz, A., Rivera, E., Brostow, W., & Castaño, V. M. 1999. Ceramic biomaterials: an introductory overview. Journal of Materials Education, 21(5/6), 267-276.

Sarvazyan, N. 2020. Tissue Engineering: Principles, Protocols and Practical Exercises. Springer Nature, 154, Washington DC.

Sawkins, M. J., Bowen, W., Dhadda, P., Markides, H., Sidney, L. E., Taylor, A. J., White, L. J. 2013. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. Acta biomaterialia, 9(8), 7865-7873.

Schemitsch E. H. 2017. Size matters: defining critical in bone defect size. J. Orthop.

Trauma 31, 20–22.

Standring S. 2016. Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice. Forty-first edition. Elsevier press. p. 81-123.

Taher Mohamed S.A., Emin N. 2024. Effects of using collagen and aloe vera grafted fibroin scaffolds on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in SBF-enriched cell culture medium. Biomed. Mater. (19) 015011.

Thomson, RC., Shung, AK., Yaszemski. MJ., Mikos, AG. 2000. Polymer scaffold processing. Principles of Tissue Engineering. 251-262.

Tiaw KS, Teoh SH, Chen R, Hong MH. 2007. Processing methods of ultrathin poly(epsilon-caprolactone) films for tissue engineering applications. Biomacromolecules. 8(3):807-16

Topaloğlu U., Ketani M, Saruhan B. 2017. Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10(1):62-71.

Tunçay Ekin Ö. 2013. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. S. 4-7, Ankara.

Uygun, A. 1999. Anadolu'da karbonat kayaları içine yerleşmiş bazı halloysit yataklarının jeolojisi ve oluşumu. MTA Dergisi, 121; 141-151.

Vacanti, J. P., Langer, R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet, 354: 132-134.

Vurat M.T., Parmaksiz M., Elçin A.E., Elçin Y.M. 2023. Bioactive composite hydrogels as 3D mesenchymal stem cell encapsulation environment for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. J Biomed Mater Res A. 111(2):261-77.

Wong, J.Y., Bronzino, J.D. & Peterson, D.R. (Eds.). 2013. Biomaterials: Principles and practices (pp 2-1-2-16). CRC Press.

Yılgör Huri et al. 2010. Bone Tissue Engineering. Archive 19: 206

Yuan, P.; Tan, D., Annabi-Bergay, F.2015. Properties and applications of halloysite nanotubes: Recent research advances and future prospects. Appl. Clay Sci.112–113,75

Zhang, L., Wang, T. and Liu, P. 2008. Polyaniline-coated halloysite nanotubes via insitu chemical polymerization. Applied Surface Science, 255; 2091–2097.