

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**HİBRİT NANOBİYOMALZEMELER İÇEREN KEMİK DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİCLE ERDEN GÖNENMİŞ

DENİZLİ, EYLÜL - 2021

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



HİBRİT NANOBİYOMALZEMELER İÇEREN KEMİK DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİCLE ERDEN GÖNENMİŞ

DENİZLİ, EYLÜL - 2021

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi) tarafından 2019FEBE052 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

DİCLE ERDEN GÖNENMİŞ

ÖZET

**HİBRİT NANOBİYOMALZEMELER İÇEREN KEMİK DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİCLE ERDEN GÖNENMİŞ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. YUSUF ÖZCAN)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. CEM GÖK)
DENİZLİ, EYLÜL - 2021

Doğal kaynaklı malzemeler, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve biyoyumlulukları nedeniyle kemik doku mühendisliği alanında önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda öne çıkan doğal malzemelerden biri de diatomdur. Diatomlar, gözenekli silikon dioksit (silika) bazlı mikro kabuklardan oluşan tek hücreli ökaryotlardır. Silikon, kemik oluşumu, yenilenmesi ve esnekliği için kalsiyumun desteklenmesinde önemli bir rol oynar. Kemik dokularında kalsiyum gibi farklı minerallerin birikimini artırır. Ayrıca kolajen miktarını da artırarak esneklik sağlar. Dolayısıyla, silikon esaslı diatomlar kemik doku mühendisliği için önemli bir yer teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, dondurarak kurutma yöntemi ile diatom içermeyen ve diatom katkılı kitosan/hidroksiapatit (CS/HA) ve jelatin/kitosan/hidroksiapatit (Gel/CS/HA) üç boyutlu kemik doku iskeleleri üretilmiştir. İskelelerin mikro ve makro gözenekli yapıları SEM analizi ile incelenmiştir. Yüksek büyütme görüntüleme teknikleri ile diatomun morfolojisi ve nanogözenek yapısı araştırılmıştır. Bu analiz yöntemiyle CS/HA, CS/HA/Di, Gel/CS/HA, Gel/CS/HA/Di iskeleleri sırasıyla 160 µm, 130 µm, 270 µm, 170 µm gözeneklere sahip olduğu belirlenmiştir. CS/HA/Di, Gel/CS/HA/Di'deki diatomların yaklaşık 9-16 µm uzunluğunda ve 8-20 µm çapında bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, diatomların 260-330 nm arasında nano gözenek boyutlarına sahip olduğu da gözlenmiştir. Doku iskelelerini oluşturan malzemelerin kimyasal bağları ve fonksiyonel grupları FT-IR ile analiz edilmiştir. Hücre yapışmasını ve çoğalmasını destekleyen biyokompozit yapı iskelelerinin toksik olmayan doğasını incelemek için 3T3L1 hücre hattı kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Buna göre, SEM görüntüleri ile diatomsuz iskelelerde hücrelerin ağsı bir şekilde çoğaldığı, diatom içeren iskelelerde ise jelatinsiz olan BTS-2 iskelesinde hücrelerin iskeleyi bir örtü gibi sardığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında üretilen iskeleler, biyoyumluluk ve birbirine bağlı gözenek yapısı açısından kemik dokusu mühendisliği için temel gereksinimleri karşılama potansiyeline sahiptir.

**ANAHTAR KELİMELEER: DİATOM, KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ,
İSKELE, DONDURARAK KURUTMA**

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF BONE TISSUE SCAFFOLDS CONTAINING HYBRID NANOBIMATERIALS

MSC THESIS

DİCLE ERDEN GÖNENMİŞ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOMEDICAL ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. YUSUF ÖZCAN)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. CEM GÖK)

DENİZLİ, SEPTEMBER 2021

Naturally sourced materials have an important place in the field of bone tissue engineering due to their biodegradability and biocompatibility. One of the natural materials that has come to the fore in recent years is diatom. Diatoms are single-celled eukaryotes composed of porous silicon dioxide (silica)-based microshells. Silicon plays an important role in supporting calcium for bone formation, regeneration and flexibility. It increases the deposition of different minerals such as calcium in bone tissues. It also provides flexibility by increasing the amount of collagen. For this purpose, silicon-based diatoms constitute an important place for bone tissue engineering.

In this study, diatom-free and diatom-doped chitosan/hydroxyapatite (CS/HA) and gelatin/chitosan/hydroxyapatite (Gel/CS/HA) three-dimensional bone tissue scaffolds were produced by freeze-drying method. Micro and macroporous structures of the scaffolds were investigated by SEM analysis. In addition, the morphology and nanopore structure of the diatom were investigated with high-magnification images. Accordingly, CS/HA, CS/HA/Di, Gel/CS/HA, Gel/CS/HA/Di scaffolds were determined to have 160 μm , 130 μm , 270 μm , 170 μm pores, respectively. Diatoms in CS/HA/Di, Gel/CS/HA/Di were determined to have a structure of approximately 9-16 μm in length and 8-20 μm in diameter. It was also observed that diatoms have nanopore sizes between 260-330 nm. The chemical bonds and functional groups of the materials forming the tissue scaffolds were analyzed by FT-IR. Cell culture studies were performed using the 3T3L1 cell line to examine the non-toxic nature of biocomposite scaffolds that promote cell attachment and proliferation. Accordingly, with SEM images, it was observed that cells in diatom-free scaffolds proliferated in a reticulate manner, while in diatom-containing scaffolds, the BTS-2 scaffold, which was gelatinless, covered the scaffold like a cover.

The scaffolds produced in the light of these studies have the potential to meet the basic requirements for bone tissue engineering in terms of biocompatibility and interconnected pore structure.

**KEYWORDS: DIATOM, BONE TISSUE ENGINEERING, SCAFFOLD,
FREZE-DRYING**

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	4
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1 Kemik Doku	11
2.1.1 Kemik Dokunun Yapısı ve Özellikler	11
2.1.2 Kemiğin Hücre Dışı Matriksi	12
2.1.3 Hücre Dışı Matriks'in Mineralizasyonu	13
2.1.4 Kemik Hücreleri	14
2.1.5 Kemiğin Yeniden Şekillenme Süreci.....	14
2.2 Kemik Doku Mühendisliği	15
2.2.1 Kemik Doku İskeleleri ve Genel Özellikleri	19
2.2.1.1 Biyoyumluluk.....	19
2.2.1.2 Gözeneklilik	19
2.2.1.3 Biyobozunurluk/Biyoemilebilirlik	20
2.2.1.4 Mekanik Özellikler.....	20
2.2.2 Kemik Doku İskelesi Yapımında Kullanılan Biyomalzemeler ...	21
2.2.2.1 Polimerler	22
2.2.2.2 Seramikler	22
2.2.2.3 Kompozitler.....	23
2.2.3 Kemik Doku İskelesi İmalatında Kullanılan Yöntemler	24
2.3 Hidrojeller	26
2.3.1 Doğal Hidrojeller	26
2.3.2 Sentetik Hidrojeller	26
2.4 Hidroksiapatit	27
2.4.1 Hidroksiapatitin Yapısı	28
2.4.2 Biyolojik Apatit	30
2.4.3 Sentetik Apatit	32
2.4.4 Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri.....	32
2.4.4.1 Islak Yöntem	33
2.4.4.1.1 Çöktürme Yöntemi	33
2.4.4.1.2 Sol-jel Yöntemi.....	33
2.4.4.1.3 Hidrotermal Yöntem	34
2.4.4.1.4 Mikrodalga Yöntemi.....	34
2.4.4.1.5 Sonokimyasal Yöntem	34
2.4.4.2 Doğal Kaynaklardan Hidroksiapatit Sentezi	36

2.4.4.2.1	Omurgalı Kemiklerinden Hidroksiapatit Sentezi	36
2.4.4.2.2	Yumurta Kabuklarından Hidroksiapatit Sentezi.....	37
2.4.4.2.3	Bitkisel Kaynaklardan Hidroksiapatit Sentezi.....	38
2.5	Kitosan.....	38
2.5.1	Kitosanın Fizikokimyasal Özellikleri	40
2.5.2	Kitosanın Biyolojik Özellikleri.....	41
2.5.3	Kitosan bazlı nanokompozitler	42
2.6	Jelatin.....	43
2.6.1	Jelatinin Özellikleri.....	44
2.6.2	Jelatinin Kullanım Alanları.....	45
2.7	Diatom	47
2.7.1	Diatom Biosilika Kaynakları	49
2.7.2	Diatom Biosilikanın Ayrılması ve Saflaştırılması	50
2.7.3	Diatom Biosilikanın Biyomedikal Uygulamadaki Biyouyumluluğu	51
3. YÖNTEM	54
3.1	Materyaller	54
3.2	İskelelerin Hazırlanması.....	54
3.2.1	Tez Deneyle Öncesi İlk Yapılan Deneme Çalışmaları.....	54
3.2.2	Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Deneyle	57
3.3	Karakterizasyon Çalışmaları	60
3.3.1	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	61
3.3.1.1	SEM'in Bileşenleri ve Çalışma Sistemi.....	62
3.3.1.2	SEM için Numune Hazırlama ve Kullanılan Cihaz ile Malzemeler.....	64
3.3.2	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR).....	65
3.3.2.1	FT-IR ve Doku Mühendisliği için Görüntüleme Uygulamaları68	
3.4	Hücre Kültür Çalışmaları	69
3.4.1	Hücre Hattının Hazırlanması ve Bakımı.....	69
3.4.2	Doku İskelelerine Hücre Ekimi	70
3.4.3	Morfolojik Analiz	71
3.4.4	Sitotoksosite Çalışmaları	71
3.5	İstatiksel Analiz	72
4. BULGULAR	73
4.1	SEM Analizi	73
4.2	FT-IR Analizi	74
4.3	Hücre Kültür Çalışmalarının Sonuçları.....	75
4.4	Sitotoksosite Çalışmaları Sonuçları	77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
6. KAYNAKLAR	81
7. ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kemiğin hiyerarşik yapısı. Makro ölçekli düzenleme, hem kortikal hem de trabeküler kemiği içerir..	11
Şekil 2.2: Kemik ve bileşenlerinin doğal hücre dışı matrisinin (ECM) şematik bir temsili.....	12
Şekil 2.3: Tez çalışmasını özet görseli	18
Şekil 2.4: Stokiyometrik HA'nın altıgen kristal yapısı, burada a düzlemi Ca bölgesi (pozitif yük) ve c düzlemi PO_4^{3-} bölgesidir (negatif yük).29	
Şekil 2.5: İnsan kemiğinin hiyerarşik yapısı ve insan kemiğinin kollajen fibrilleri boyunca doğal HA kristallerinin düzenlenmesi (ek küçük görsel: stokiyometrik hidroksiapatitin kristal yapısı).....	30
Şekil 2.6: HA'nın çeşitli ıslak yöntem sentezlerinin bir özeti.....	35
Şekil 2.7: Doğal kaynaklardan HA sentezi.....	38
Şekil 2.8: Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan	39
Şekil 2.9: Kitosan bazlı nanokompozitler.....	43
Şekil 2.10: Jelatinin uygulama alanları.....	46
Şekil2.11: Diatomların morfolojik çeşitliliği.....	48
Şekil 3.1: Kitosan/jelatin ve kitosan/jelatin köpüğü gözenekli yapıları.	55
Şekil 3.2: Kitosan/jelatin gözenekli yapıları.....	56
Şekil 3.3: Kitosan/jelatin ve kitosan/jelatin/diatom gözenekli yapıları..	57
Şekil 3.4: Biyonanokompoit hidrojelere kaşık ile basma-çekme denemesi. ...	58
Şekil 3.5: Malzemelerin liyofilizatör tüplerindeki görüntüleri.....	59
Şekil 3.6: Dondurarak kurutma sonrası oluşan kemik doku iskeleleri.....	60
Şekil 3.7: Taramalı elektron mikroskobu (SEM).	61
Şekil 3.8: SEM temel bileşenleri.	62
Şekil 3.9: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	66
Şekil 3.10: Modern FT-IR araçlarında kullanılan bir Michelson interferometresinin şemaları.....	67
Şekil 3.11: 3T3L1 hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü.....	69
Şekil 3.12: Doku iskelelerine hücre ekimi.....	70
Şekil 3.13: İletken hale getirmek için doku iskelelerinin altın-palladyum ile kaplanması.....	71
Şekil 4.1: Diatom içermeyen BTS-1 (a) 250x, b) 500x, c) 1000x) ve BTS-3 (d) 250x, e) 500x, f)1000x) iskelerinin morfolojik görüntüleri	72
Şekil 4.2: Diatom içeren BTS-2 (a) 250x, b) 2500x, c) 10000x) ve BTS-4 (d) 250x, e) 2500x, f) 10000x) iskelelerine ait morfolojik görüntüleri	74
Şekil 4.3: Biyokompozit yapı iskelelerinin FT-IR grafiği.....	75
Şekil 4.4: 8 günlük hücre kültürünün ardından diatom içermeyen BTS-1, BTS-3 ve diatom içeren BTS-2, BTS-4 doku iskelelerinin SEM görüntüleri	76
Şekil 4.5: Değişik konsantrasyonlardaki doku iskelelerinin 3T3-L1 hücre canlılığına etkisi.	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kemik rejenerasyonu için kullanılan bir doku mühendisliği iskelesinin arzu edilen özellikleri.....	21
Tablo 2.2: 3-D yapı iskelelerinin yaygın olarak kullanılan bazı geleneksel üretim tekniklerinin özeti.. ..	25
Tablo 2.3: Erişkin-insan kalsifiye dokularının ve katkısız sentetik HA'nın inorganik fazlarının bileşim parametreleri.	31
Tablo 2.4: HA'nın ıslak yöntem sentezi.. ..	35
Tablo 3.1: Biyo-kompozit iskeleler ve içerikleri.. ..	58
Tablo 4.1: 3T3-L1 hücre hattı ile yapılan etkili dozların verileri.....	77

SEMBOL LİSTESİ

HA	:	Hidroksiapatit
CS	:	Kitosan
Gel	:	Jelatin
Di	:	Diatom
BTS	:	Kemik doku iskelesi (bone tissue scaffold)
ECM	:	Hücre dışı matriks (extra cellular matrix)
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	:	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
BMP	:	Kemik morfogenetik proteinleri
NCP	:	Kolajen olmayan proteinler
BSP	:	Kemik sialoproteini
OPN	:	Osteopontin
PPi	:	İnorganik pirofosfat
PLA	:	Poli (laktik asit)
PGA	:	Poli (glikolik asit)
PCL	:	Polikaprolakton
PVA	:	Poli (vinil alkol)
PEG	:	Poli (etilen glikol)
PMMA	:	Poli (metil metakrilat)
CaP	:	Kalsiyum fosfat
Ca²⁺	:	Kalsiyum iyonu
PO₄³⁻	:	Fosfat iyonu
Ag⁺	:	Gümüş iyonu
Cl⁻	:	Klor iyonu
F⁻	:	Flor iyonu
Mg²⁺	:	Magnezyum iyonu
Sr²⁺	:	Stransiyum iyonu
Zn²⁺	:	Çinko iyonu
Ba²⁺	:	Baryum iyonu
Cd²⁺	:	Kadmiyum iyonu
Na⁺	:	Sodyum iyonu
Al³⁺	:	Alüminyum iyonu
K⁺	:	Potasyum iyonu
SiO₄³⁻	:	Silisyum oksit
TCP	:	Trikalsiyumfosfat
CaO	:	Kalsiyum oksit
β-TCP	:	Beta trikalsiyum fosfat
HCA	:	Hidroksi karbonat apatit
AgNP	:	Gümüş nano partiküller
AuNP	:	Altın nano partiküller
MNP	:	Manyetik nano partiküller
CNP	:	Karbon nano tüp
PHEMA	:	Poli (2-hidroksi metakrilat)
HDMS	:	Hekzametildisilazan
DD	:	Deasetillenme derecesi
n	:	Nano

ÖNSÖZ

Lisans tez döneminden bu yana birlikte çalıştığım, engin bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her konuda rehberliğini paylaşan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN'a çok teşekkür ederim. Yine tecrübeleri ve engin bilgileriyle bana katkıda bulunarak yol gösteren saygıdeğer, ikinci danışmanım Prof. Dr. Cem GÖK'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez boyunca laboratuvar imkanlarını bize açan Prof. Dr. Gürkan SEMİZ, Prof. Dr. Şevki ARSLAN ve Dr. Öğr. Gör. Özden Özgür ACAR' teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarda alanındaki bilgisiyle yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Duygu TAKANOĞLU BULUT'a, Doğukan MUTLU'ya ve Hajarat Abilo ALFA'ya teşekkür ederim. Deneysel çalışmalar sırasında ihtiyaç duyulan kimyasal konusunda karşılıksız yardımda bulunan Fahrettin YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca her konuda bana destek olan değerli eşim Mesut GÖNENMİŞ'e, aileme, yakın dostlarıma ve çok yoğun bir tempoda çalışırken stresli ruh halimi nötrlememe yardım eden canım kedilerim ile papağanıma varlıkları için teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Çok sayıda insan kaza, travma, yaralanma, tümörler veya kemikle ilgili hastalıklardan kaynaklanan kemik kusurlarından muzdariptir (Murugan 2004). Kemik dokusu, vücudun yumuşak dokularını ve organlarını korumakla görevli gözenekli ve canlı bir dokudur. Kan üretimi ve mineral rezervi olarak işlev görür (Preethi Soundarya ve diğ. 2018). Bilindiği gibi biyolojik olarak üretilen kemik formları kendi kendini iyileştirme özelliklerine sahiptir. Ayrıca büyük kemik defektleri kendiliğinden iyileşmez ve tedavi için cerrahi müdahale gerektirir (Hollister ve diğ. 2002). Klinik olarak kullanılan kemik greftleri, kökenlerine göre biyolojik ve sentetik olmak üzere iki ana türe ayrılabilir. Biyolojik greftlerin dezavantajları arasında bağışıklık reddi ve biyouyumluluk sorunları olabilir (Flanagan 2006). Bu sorunları çözmek için her geçen gün uygun sentetik malzemeler araştırılmaktadır. Disiplinlerarası bilimleri içeren sentetik greftlerin üretimine yönelik çalışan kemik dokusu mühendisliği, bu amaca ulaşılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Chen 2008; Karp ve Langer 2007).

Kemik doku mühendisliği, kemik hasarlarını onarmak veya hasarlı dokuyu yeniden yapılandırmak için kemik doku iskelelerini, hücrelerini ve büyüme faktörlerini tek başına veya birlikte kullanarak biyolojik sistemlerdeki dokuları en iyi şekilde simüle etmeyi amaçlar (Ratner ve diğ. 2013). Bunu yaparken, hücre dışı matriksi taklit edebilen biyouyumlu polimerler kullanır ve insan vücudundaki hasarlı veya işlevsiz doku iskelelerini yenilemeye veya onarmaya çalışır (Griffith ve Naughton 2002). Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelelerinin en önemli özelliği osteoindüktif ve/veya osteokondüktif olmalarıdır. Ayrıca, osteoindüktif doku iskeleleri, osteoprogenitör hücrelerin iskeleye bağlanmasına, iskeleye göç etmesine, farklılaşmasına ve nihayetinde yeni kemik oluşturmaya izin verir. Osteokondüktif doku iskeleleri, kemiğin kılcal yapısının oluşumunu destekleyerek kemiğin 3 boyutlu yapısının oluşmasını ve hücreleri ana dokudan malzemeye yönlendirerek kemik hücrelerinin çoğalmasını sağlar (Wei ve Ma 2004; Albrektsson ve Johansson 2001; Burg ve diğ. 2000). Bu özelliklerin dışında kullanılacak doku iskelelerinin biyouyumlu, gözenekli ve biyobozunur olması ve aynı

zamanda vücuda implante edildiğinde mekanik strese maruz kalacağı için yeterli mekanik dayanıma sahip olması gerekir.

Hidrojeller, doğal 3 boyutlu doku iskelesi özelliği gösteren doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanabilir. Doğal hidrojeller, sentetik hidrojeller ile karşılaştırıldığı zaman, daha yüksek oranda biyouyumluluğa ve uygun seviyede biyobozunurluğa sahip olabilirler (Ahmed 2015; Bedian ve diğ. 2017; Catoira 2019). Çeşitli malzemelerden elde edilen hidrojeller, doku mühendisliği alanında bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Son araştırmalar, biyolojik materyallerden oluşturulan hidrojellere odaklanıldığını göstermektedir. Bu hidrojeller kolajen, jelatin gibi protein yapılı polimerlerden ve/veya kitosan, aljinat gibi polisakarit polimerlerinden hazırlanabilir (Francis 2018; Jabbari 2016). Ayrıca doku iskelesini oluşturmak üzere hazırlanan kompozit hidrojel yapısında biyoaktif yapıya sahip biyo-seramik hidroksiapatit ve diatom da kullanılabilir (Wang ve Li 2005).

Diatomlar, sulu ortamlarda yaşayan ve biyosilika oluşumunun en büyük kaynağı olan tek hücreli ökaryotik organizmalardır. Çok çeşitli şekillerdeki diatomlar, yüksek mekanik stabiliteye sahip simetrik olarak dağılmış nano/mikro gözeneklere sahip amorf bir silika kabuğu oluşturur (Dalgic ve diğ. 2019; Dimas ve Buehler 2012). Diatom, ucuz maliyetli ve sınırsız kaynaya sahip biyojenik silika kaynağıdır. Eşsiz gözenekliliği ve morfolojisi sayesinde ilaç dağıtım sistemlerinde, biyo-sabitlenme ajanlarında, moleküler katalizde ve fotonik uygulamalarda kullanım için önerilmiştir (Le ve diğ. 2016; Goedon ve diğ. 2009; Aw ve diğ. 2012; Dolatabadi ve de le Guardia 2011; Losic ve diğ. 2009). Silikon, kemik oluşumu, rejenerasyonu ve mineralizasyonunda önemli bir rol oynadığı için, ucuz bir silika kaynağı olan diatomun kemik dokusu mühendisliğinde umut verici bir doğal kaynak olacağı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, son yıllarda bu amaca yönelik çok sınırlı sayıda çalışma ile karşılaşarak bu görüşün desteklendiğini görmekteyiz (Dalgic ve diğ. 2019; Le ve diğ. 2016). Hidroksiapatit, zirkonya, cam seramik, tri-kalsiyum fosfat gibi inorganik materyallere ek olarak, kemik rejenerasyon çalışmalarında mineralizasyonu desteklemek için amorf silika partiküllerinin kullanımı önerilmiştir (Le ve diğ. 2016; tautzenberger ve diğ. 2012; Zhang ve diğ. 2011). Ek olarak silika, kemik rejenerasyonu için ostekondüktivite artırmak için hidroksiapatit ile başarıyla kullanılmıştır (Xu ve diğ. 2011; Gibson ve diğ. 1999).

HA, doğal kemiğe benzer bileşenlere ve yapıya sahiptir. Bunun yanında biyoyumluluk, ostekondüktivite ve uygun biyobozunurluk özelliği gösterirler. Ayrıca vücut sıvılarında kalsiyum iyonlarını emme ve biriktirme işlevine sahip olmakla birlikte polimer bazlı kompozitlerde kemik yenilenmesini destekleyebilir (Hu ve diğ. 2014; Roh ve diğ. 2016). HA'nın anjiyogenez, yara iyileşmesi, ECM (Extra Cellular Matrix) organizasyonu ve inflamasyon gibi biyolojik süreçlerde rol oynadığına dair kanıtlar vardır (Pankajakshan ve Agrawal 2010). HA türevleri, kemik ve deri dokusu rejenerasyonu, kondrosit büyümesi, biyoyumluluk ve anti enflamasyon özellikleri nedeniyle damar hastalıklarını tedavi etmek için iskele malzemeleri olarak başarıyla kullanılmaktadır (Burdick ve Prestwich 2011). Bununla birlikte, doku mühendisliği uygulamalarında tek başına kullanımı, biyolojik olarak parçalanamayan, zayıf mekanik özellikleri ve işleme güçlükleri nedeniyle sınırlıdır (Mitra ve diğ. 2013). Bu nedenle hidroksiapatit kompozit polimer hidrojellere dahil edilerek kullanılmaktadır.

Kitosan, kabuklu deniz ürünleri, böcekler ve mantarlardan üretilen kitinin deasetilasyonu ile hazırlanan, dünyada en bol bulunan ikinci biyo-polisakkarittir. Oluşan hidrojelin mekanik ve fiziksel özellikleri, kitosanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir (Hagesaether ve diğ. 2009). Kitosan şu anda doku mühendisliğinde büyük ilgi gören bir malzemedir (Li 2012). Kompozit hidrojellerde kullanılan kitosanın avantajları şunlardır: düşük maliyetli, antibakteriyel, biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu, biyoaktif ve sterilize edilmesi kolay. Tüm bu özellikler, deasetilasyon seviyesi değiştirilerek kontrol edilebilir (Huang ve diğ. 2005). Dezavantajları ise şunlardır: pH ve sıcaklık gibi parametrelerden kolayca etkilenirler. Aynı zamanda zayıf mekanik özellikler gösterir (Vieira ve diğ. 2017). Bu nedenle hidrojel oluştururken hidroksiapatit, kalsiyum fosfat, jelatin, aljinat gibi diğer malzemelerle birleştirilmesi gerekir (Kim ve diğ. 2018).

Jelatin, minimum immünojenisite ve kayda değer bozunabilirlik gibi özellikleri sayesinde ve düşük maliyetli yapısıyla doku mühendisliği için en iyi seçeneklerden biri haline gelen doğal bir vasküler polimerdir. Bu polimer, kolajenin üçlü sarmal yapısının denatüre (protein yapısının bozulması) edilmesiyle elde edilir, İki farklı işlemde üretilen iki tip jelatin vardır. Bunlar: asitlerle işlenen tip-1 jelatin (pH 1-3) ve alkali çözeltilerle işlenen tip-2 jelatin, tip-1 iskele yapımı için en çok tercih edilendir. Jelatin ayrıca bir vasküler doku rejenerasyonu tekniği olarak hücre

tutunmasını arttırmak için bir kaplama maddesi olarak kullanılmıştır (Nair ve Thottappillil 2015). Jelatin, jel oluşturma, kıvamlaştırma, emülsifiye etme ve köpürme özellikleri sunar. Mekanik olarak ise supramoleküler yapıya bağlıdır (Kozlov ve Burdygina 1983).

Bu çalışmanın amacı, kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için iskele yapımında kullanılan diatomun, silikon donör materyalleri olarak potansiyelini araştırmaktır. Bu çalışmada, kitosan/hidroksiapatit ve jelatin/kitosan/hidroksiapatit hidrojenlerine ek olarak, bu hidrojenlerin diatom katkılı formları hazırlanmıştır. Her bir malzemenin en iyi özelliklerinden yararlanmak için oluşturulan bu dört farklı biyokompozit hidrojenin sıvı kısmı, dondurarak kurutma yöntemi ile tamamen çıkarılmış ve sonuç olarak gözenekli, 3 boyutlu iskeleler oluşturulmuştur. Bu kombinasyonlarda ilk kez üretilen biyokompozit iskelelere hücre kültürü çalışmaları uygulanarak SEM ve FT-IR analizleri yapılmıştır.

Geliştirilen diatomsuz kitosan/hidroksiapatit (Cs/HA), jelatin/kitosan/hidroksiapatit (Gel/Cs/HA) ve diatom katkılı kitosan/hidroksiapatit/diatom (Cs/HA/Di), jelatin/kitosan/hidroksiapatit/diatom (Gel/Cs/HA/Di) kompozit doku iskelelerinin osteojenik potansiyeli, 3T3L1 fibroblastik hücre hattı ile incelenmiş, bu iskelelerin kemik doku oluşumu için ideal gözenekliliğe sahip olup olmadığına dair morfolojik analizleri yapılmış ve sonuçlar tüm malzemeler için karşılaştırılmıştır. Konuya ilişkin literatür bilgileri, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar ile bunların değerlendirilmesi ilerleyen bölümlerde sunulmuştur.

1.1 Literatür Özeti

Nano hidroksiapatitin (HA) çok çeşitli tıbbi uygulamalara sahip olmasına rağmen, partikül mobilizasyonu ve yavaş emilebilir doğası, özellikle periodontal ve alveolar büyütme gibi belirli uygulamalarda kullanımını sınırlar. Kullanımını arttırmak için, düşük sıcaklıkta ıslak kimyasal yöntem kullanarak doğal bir polisakkarit olan kitosan ile HA kompozit kemik macunu hazırlanmıştır. Hazırlanan kompozitler çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle analiz edilmiş ve nano HA kristalitlerinin kitosan makromolekülleri ile iyi bir şekilde bozulmamış olduğunu

ortaya koymuştur. FT-IR sonuçları, kompozit pastada nano HA'nın karakteristik piklerine ek olarak hidroksil ve amid gruplarının varlığını göstermektedir (Murugan ve Ramakrishna, 2004).

In vitro ve *in vivo*, iyi tasarlanmış üç boyutlu bir iskele doku oluşumunu yönlendirmek için kullanılan temel araçlardan biridir. Kemik son derece dinamik ve bütünleştirici bir dokudur ve bu nedenle kemik büyümesi ve rejenerasyonunu yönlendirmede kritik bir rol oynayan oldukça gözenekli bir yapı iskelesi tasarlamak için kemik dokusu mühendisliğine çok büyük çabalar harcanmıştır. Kitosan, kolajen, jelatin, ipek vb. gibi biyomoleküllerin yardımıyla kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için yüksek oranda birbirine bağlı, gözenekli yapı iskelesi üretmek için çok sayıda teknik geliştirilmiştir (Preethi Soundarya ve diğ., 2018).

Kemik doku mühendisliği iskeleleri, yenilenen dokuyu şekillendirmeli, geçici mekanik destek sağlamalı ve doku yenilenmesini hızlandırmalıdır. Bu gereksinimler, çatışan tasarım hedeflerine neden olur. Örneğin, artan geçici mekanik işlev, yoğun bir yapı iskelesi gerektirirken, gelişmiş hücre/gen iletimi, gözenekli bir yapı iskelesi gerektirir. Çatışan tasarım gereksinimlerini karşılamak için iskele mikro yapısını, iskele malzemesini tasarlayabilen ve doku mikro yapısını yeniden oluşturabilen görüntü tabanlı bir homojenleştirme optimizasyon yaklaşımına gerek duyulmaktadır. İskele mikro yapısı ve etkili sertlik arasındaki ilişkileri hesaplamak için homojenizasyon teorisi kullanılmıştır. İskele tasarımı, trabeküler kemik özelliklerine uygun yapıda olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Hollister ve diğ., 2002).

Doku mühendisliği çalışmalarından biri olarak yapılan bir kalp kapakçığına dair verimli tasarım stratejileri geliştirmek için, kapak yapısı ve hücresel fonksiyonun *in vivo* ve *in vitro* modelleri kapsamlı karakterizasyon gerektirir. Kollajen ve glikozaminoglikanlar, kalp kapakçığı yapısına benzersiz fonksiyonel özellikler sağlar. Çalışmada, mitral kapak dokusunun oluşturulması için biyomalzemeler olarak tip I kolajen-glikozaminoglikan hidrojelleri araştırıldı. Kolajen jellerinin, mitral kapak dokusuna benzeyen doku yapılarının *in vitro* sentezi için matriksler olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Daha gözenekli bir modelle sonuçlanan kitosan eklenmesinin, kültürlenmiş kapak hücrelerinin biyoaktivitesini ve doku yeniden şekillenmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Flanagan ve diğ., 2006).

Dünya çapında milyonlarca hasta, biyomateryallerdeki teknolojik yeniliklerden yararlanmışır. Ancak yaşam beklentisi artmaya devam ederken, organ yetmezliği ve travmatik yaralanmalar hastaneleri doldurmaya ve yaşam kalitesini düşürmeye devam etmektedir. Modern teknolojinin artan erişilebilirliği ile birlikte hastalık ve doku rejenerasyonunu anlamadaki ilerlemeler, biyomateryallerin benzeri görülmemiş şekillerde kullanımı için yeni fırsatlar yaratmıştır. Malzemeler artık belirli hücreleri hedeflemek, dış uyaranlara yanıt olarak şekil değiştirmek ve doku rejenerasyonu talimatı vermek için hızla oluşturulabilmekte ve seçilebilmektedir (Karp ve Langer, 2007).

Doku mühendisliği, dokuları ve organları restore etmek, korumak veya geliştirmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, bu alanın potansiyel etkisi çok daha geniştir. Gelecekte, tasarlanmış dokular organ değiştirme ihtiyacını azaltabilir ve hastaları iyileştirebilecek yeni ilaçların geliştirimelerini büyük ölçüde hızlandırabilir ve organ nakli ihtiyacını tamamen ortadan kaldırabilir (Griffith ve Naughton, 2002).

Doğal kemiğin mineral bileşenini ve mikro yapısını daha iyi taklit etmek için yüksek gözenekliliğe ve iyi kontrol edilen gözenek mimarilerine sahip yeni nano-hidroksiapatit/polimer kompozit yapı iskeleleri hazırlandı. Kompozit iskelelerin morfolojileri, mekanik özellikleri ve protein adsorpsiyon kapasiteleri araştırılmışır. Yüksek gözeneklilik (%90 ve üzeri) kolayca elde edilmiş ve gözenek boyutu, değişen faz ayırma parametreleriyle ayarlanmıştır. Nano hidroksiapatit partikülleri, yapı iskelelerinin gözenek duvarlarında dağılmış ve polimere çok iyi bir şekilde bağlanmışır. HA'nın piyasaya sürülmesi, mekanik özellikleri büyük ölçüde arttırmış ve protein adsorpsiyon kapasitesini geliştirmiştir. Bir dioksan/su karışımı solvent sisteminde, nano hidroksiapatit ile birleştirilmiş poli (L-laktik asit) yapı iskeleleri, lifli bir morfoloji geliştirmiş ve bu da protein adsorpsiyonunu lifli olmayan yapı iskelelerine göre üç kat arttırmıştır. Sonuçlar, yeni geliştirimelen nano hidroksiapatit/polimer kompozit yapı iskelelerinin, kemik dokusu mühendisliğinde hücre bağlanması ve göçü için mükemmel bir 3D substrat olarak hizmet edebileceğini göstermiştir (Wei ve Ma, 2004).

Osteoindüksiyon, osteogenezin indüklendiği sürecidir. Her türlü kemik iyileşme sürecinde düzenli olarak görülen bir olgudur. Osteoindüksiyon, olgunlaşmamış hücrelerin toplanması ve bu hücrelerin preosteoblastlara dönüşmesi için uyarılması

anlamına gelir. Kırık gibi bir kemik iyileşmesi durumunda, kemik iyileşmesinin çoğu osteoindüksiyona bağlıdır. Osteokondüksiyon, kemiğin bir yüzeyde büyümesi anlamına gelir. Bu fenomen, kemik implantları durumunda düzenli olarak görülür. Bakır, gümüş ve kemik çimentosu gibi düşük biyouyumlulukta implant materyalleri çok az osteokondüksiyon gösterir veya hiç göstermez. Osseointegrasyon (canlı kemik dokusu ile fonksiyondaki titanyum implant malzemesi arasında, 100 büyütmede ışık mikroskopunda gözlenen direkt temastır), doğrudan kemik-implant temasıyla elde edilen bir implantın stabil ankrajıdır. Kraniyofasiyal implantolojide, bu ankraj modu, yüksek başarı oranlarının bildirildiği tek ankraj şeklidir. Vücudun diğer bölgelerinde osseointegrasyon mümkündür, ancak büyük artroplastilerin ankrajı için önemi tartışılmaktadır. Gözenekli bir protezde kemik büyümesi, osseointegrasyonun göstergesi olabilir veya olmayabilir (Albrektsson ve diğ., 2001).

Doğal hidrojel, daha yüksek su emme kapasiteleri, uzun hizmet ömürleri ve çok çeşitli ham kimyasal kaynakları nedeniyle yavaş yavaş sentetik türlerin yerini almıştır. Bu konudaki literatürün, özellikle bilimsel araştırma alanlarında genişlediği görülmüştür. Bununla birlikte, hidrojel ürünleri ile mühendislik bakış açısından ilgilenen bir dizi yayın ve teknik rapor, bu büyüyen çok disiplinli araştırma alanını kapsayan teknolojik yönleri gözden geçirmek için incelenmiştir. Çalışma, hidrojel üretimi için benimsenen teknolojileri, süreç tasarımı uygulamaları, blok diyagramlar ve hazırlama sürecinin optimize edilmiş koşullarını içermektedir (Ahmed, 2015).

Çok amaçlı uygulamalar için yeni, etkili ve son derece güvenilir malzeme tabanlı yeni yapıların geliştirilmesi, insan sağlığı ile ilgili birçok hastalığın üstesinden gelmek için temel bir talep haline gelmiştir. Biyo-tabanlı malzemeler çeşitli tamamlayıcı işlevlere sahiptir; benzersiz kimyasal yapı, biyoaktivite, toksik olmama, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, geri dönüştürülebilirlik gibi özellikleri ile modern dünyanın malzeme sektöründe iyi bir konuma sahip olmuştur. Bu bağlamda, biyomalzemelerin kullanımı, disiplinler arası bilimsel araştırma alanındaki deneyler için geniş fırsatlar sunmaktadır. Petrol bazlı polimerlere olan küresel bağımlılığı ele almak amacıyla, araştırmacılar ilgilerini kozmetik, ilaç ve diğer biyoteknolojik veya biyomedikal uygulamalar dahil olmak üzere farklı endüstrilerde hedeflenen uygulamalar için biyolojik malzemelerin mühendisliğine yönlendirmektedirler. Çalışmada, büyük ölçüde biyoteknolojik gelişmeler ve doku

mühendisliği özellikle biyomalzemeler açısından gözden geçirilerek gelecekteki gelişmelerin yönleri öngörülmüştür (Bedian ve diğ., 2017).

Hidrojellerin rejeneratif potansiyelini artırmak için çok sayıda hücre dışı matriks tabanlı yaklaşımlar araştırılmıştır. Bu çabalar, matriks benzeri hidrojeller, matris benzeri moleküller içeren hidrojeller, hücresizleştirilmiş matriks içeren hidrojeller, hücresizleştirilmiş matristen türetilen hidrojeller ve yeniden implante edilebilir matriks hidrojeller olarak hücresizleştirilmiş dokuların geliştirilmesini içerir (Jabbari, 2016).

HA tozları, yüksek sıcaklıkta kalsifiye edilmeden 37°C'de yapay vücut sıvısında (SBF) doğrudan sentezlenmiştir. Bu tozların, çökelmeleri sırasında SBF çözeltilerinden kaynaklanan eser miktarda CO_3^{2-} , Cl^- , Na^+ ve K^+ safsızlıklarını içerdiği bulunmuştur. Sentezlenen HA tozlarının karakterizasyonları, XRD, FT-IR ve Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçlar, SBF yolu ile sentezlenen HA'nın yapı ve bileşim olarak insan kemiğine daha yakın olabileceğini göstermiştir (Wang ve Li, 2005).

Doku mühendisliği, mikroorganizmalar tarafından üretilen çok çeşitli malzemelerden yararlanabilir. Doğal kökenli malzemeler genellikle iyi biyoyumluluğa, mikroorganizmalar tarafından sürdürülebilir üretim ile biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahiptir. Bir fitoplankton olan diatom, uygun maliyetli bir üretim süreciyle elde edilebilecek amorf bir silika kabuk üretir. Silikon kemik rejenerasyonunu geliştirdiğinden, diatom kabukları, kemik dokusu mühendisliği için umut vericidir. Biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen biyopolimerler doku mühendisliği yapıları üretmek için diatom kabukları ile birleştirilebilir (Dalgic ve diğ., 2019).

Diatomlar, özellikle tek ve basit bir yapı bloğu olan silikaya dayalı olarak farklı stres gerinim tepkilerine sahip bölgeler oluşturmak için belirli geometrik konfigürasyonlarda nano ölçekli gözeneklilik sergiler. Burada, mineralize yapılardan esinlenen silika bazlı nanokompozitlerin mekanik ve deformasyon mekanizmalarına odaklanılmaktadır. Silika nanoyapıların hiyerarşik düzenlemelerinin numunelerdeki stres ve gerinim transferini önemli ölçüde değiştirdiği bulunmuştur (Dimas ve Buehler, 2012).

Diatom mikropartikülleri ve nanopartikülleri, alkali koşullar altında saflaştırılmış diatomların parçalanmasıyla üretilmiştir. Saflaştırılmış diatomitlerin yüzey kimyasal bileşimi üzerindeki etkisi, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile değerlendirilmiştir. Diatom nanopartikülleri ayrıca geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile morfoloji ve boyut dağılımı açısından karakterize edilirken, diatom mikropartiküllerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. Diatom partiküllerinin yüzey alanı ve mikro gözenekliliği, nitrojen fizyosorpsiyon yöntemleri ile değerlendirilmiştir (Le ve diğ., 2016).

Diatomlar, tek hücreli ökaryotik mikroalgler, hemen hemen her su habitatında bulunur ve on ila yüzlerce mikrometre boyutundaki silikon-dioksit (silika) bazlı hücre duvarları, biyoalgılama ve ilaç salınımında kullanılacak en ilginç özellikleridir. İletim, moleküler ayırma, moleküler biyoloji, biyomimetik, frustül oluşumu, elektronik, fotonik, optik ve yapısal malzemelerde kullanılabilir (Dolatabadi ve de la Guardia, 2011).

Silikon, çeşitli formlarıyla elektronik, optik ve yapısal malzemelerde yaygın olarak kullanılır. Silisyum ve silika kullanımları üzerine yapılan araştırmalar, on yıllardır yoğun bir şekilde devam etmekte ve bu elementle yenilikçi çalışmalar için daha ne kadar çeşitlilik kaldığı sorusunu gündeme getirmektedir. Şekil değişimi özellikle iyi incelenmiştir. Burada, diatom frustülleri, diatomların gözenekli silika kabukları, mikroskobik, tek hücreli alglerin ortaya koyduğu ilkeleri gözden geçirilmiştir. Frustüller nanometre ölçeğinde ayrıntılara sahiptir ve eşsiz frustül morfolojileri on milyonlarca yıllık evrimsel seçilim yoluyla ortaya çıkmıştır (Losic ve diğ., 2009).

Doğal yapı malzemeleri genellikle, nano ölçekten makro ölçeye uzanan karakteristik boyutlara sahip, karmaşık hiyerarşik mimarilerde düzenlenmiş sert ve yumuşak fazlar içerirler. Ortaya çıkan malzemeler hafiftir ve genellikle benzersiz güç ve tokluk kombinasyonları sergiler, ancak sentetik olarak taklit edilmesinin zor olduğu kanıtlanmıştır. Burada, bir dizi doğal yapısal malzemenin ortak tasarım motifleri gözden geçirilmiş ve doğal muadillerinin yapısal ve mekanik özelliklerini taklit eden sentetik yapıların tasarımı ve üretimi ile ilgili zorlukları tartışılmıştır (Wegst ve diğ., 2014).

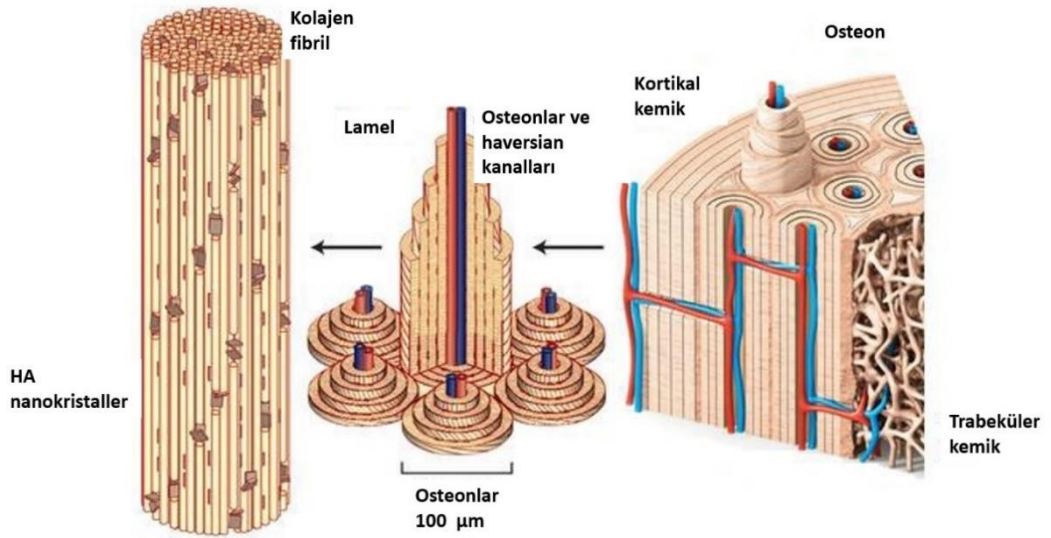
Fizyolojik kemik yeniden şekillenmesi, kemik rezorpsiyonu ve oluşumundan sorumlu oldukça koordineli bir süreçtir ve hasarlı kemiği onarmak ve mineral homeostazını sürdürmek için gereklidir. Kemiğin yeniden şekillenmesi için gerekli olan geleneksel kemik hücrelerine (osteoklastlar, osteoblastlar ve osteositler) ek olarak, birkaç bağışıklık hücresi de kemik iyileşme sürecinde rol oynar. Bu çalışma, ortaya çıkan osteoimmünoloji verileri ışığında geleneksel kemik biyolojisi dogmasını ana hatlarıyla çizerek fizyolojik kemik yeniden şekillenmesini tartışmaktadır. Kemiğin yeniden şekillenmesinin hücresel ve moleküler mekanizmaları ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Bunlar aktivasyon, emilim, geri dönüş, oluşum ve sonlandırma olarak sıralanabilir (Raggatt ve Partridge, 2010).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Doku

2.1.1 Kemik Dokunun Yapısı ve Özellikler

Kemik, hiyerarşik olarak organize edilmiş bir yapıdan oluşan karmaşık bir dokudur (Şekil 2.1) (Wegst ve diğ. 2014). Nanoyapı seviyesinde kemik, en yaygın olanı hidroksiapatit (HA) olan kalsiyum fosfat mineralleri ile serpiştirilmiş kolajen lifleri matrisinden oluşur. Bu mineralize kollajen lifleri, lameller olarak bilinen düzlemsel düzenlemelere dönüşebilir. Kolajen lifler, çatlakların oluşmasını önlemek için her bir lamelde aynı yönde ve bitişik lamellerde zıt yönlerde ilerler. Lameller daha sonra osteon olarak bilinen bir yapıyı oluşturmak için merkezi (Haversian) bir kanalın etrafına eşmerkezli katmanlar halinde sarılabilir.



Şekil 2.1: Kemik hiyerarşik yapısı. Makro ölçekli düzenleme hem kortikal hem de trabeküler kemiği içerir (Jae-Young ve diğ. 1998).

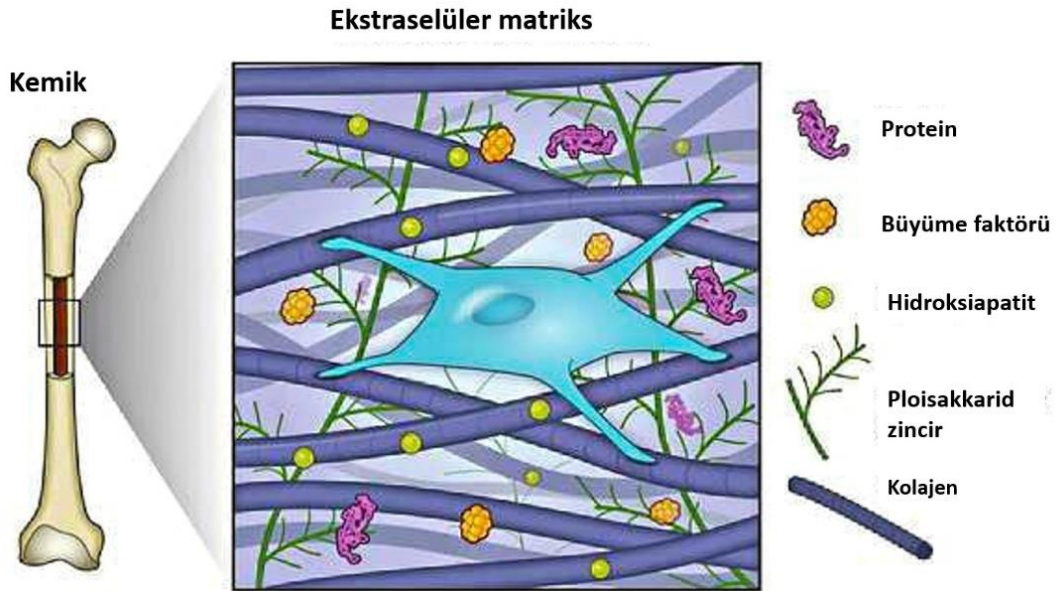
Makro yapısal düzeyde, iki ana kemik türü vardır: kortikal ve trabeküler. Mevcut kemiğin türü, gözeneklilik derecesi ile belirlenebilir. Kortikal kemik, hücreler ve kan damarları için az sayıda boşluk bulunduran yoğun yapıdadır, trabeküler kemik

ise birçok büyük gözenek içerir. Değişen gözeneklilik dereceleri, kemiğin mekanik özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir (Jae-Young ve diğ. 1998).

Kemik içindeki materyal yapılar, çeşitli düzenlemeleri, mekanik destek, iç organların korunması ve kan hücresi üretimi gibi birçok farklı işlevi yerine getirmek için uyum içinde çalışabilir (Jae-Young ve diğ. 1998). Kemik ayrıca çeşitli mineraller, proteinler ve büyüme faktörleri için bir depolama kabı olarak görev almanın yanı sıra mineral iyon homeostazının korunmasında da rol oynar.

2.1.2 Kemiğin Hücre Dışı Matrisi

Şekil 2.2, kemiğin nano ölçekli hücre dışı matrisinin (ekstraselüler matris) (ECM) şematik bir temsilini göstermektedir. Bu kompozit malzeme esas olarak, liflerin içinde ve arasında bulunan, $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ formüllü hidroksiapatit (HA) kristalleri ile tip I kolajenden oluşur (Gaharwar ve diğ. 2016). Kolajen lifleri kemiğe esneklik ve elastiklik kazandırırken, mineral bileşen ise mekanik sertlik ve yük taşıma mukavemeti sağlar. Bu özellikler birleştiğinde kemiğin gerilme davranışına yol açar.



Şekil 2.2: Kemik ve bileşenlerinin doğal hücre dışı matrisinin (ECM) şematik bir temsili (Gaharwar ve diğ. 2016).

ECM'nin, kemik hücrelerinin bağlanması için bir iskele görevi görerek yapısal doku desteğinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, son

yıllarda ECM'nin hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde daha dinamik bir rol oynadığı da kabul edilmiştir. ECM, osteokalsin ve osteopontin, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), polisakkaritler ve sitokinler gibi büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli kollajen olmayan proteinler (NCP'ler) için bir rezervuar görevi görür. Bu makromoleküllerin, hücre-matris etkileşimlerini desteklemede ve hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmede birçok farklı rol oynadıkları bilinmektedir.

2.1.3 Hücre Dışı Matris'in Mineralizasyonu

Kemik sialoprotein (BSP) ve osteopontin (OPN) gibi kollajen olmayan proteinlerin (NCP'ler) ana işlevlerinden biri, kemik hücre dışı matris içindeki mineralin düzenli birikimini sağlamaktır. Bu proteinler, glutamik asit ve aspartik asit gibi amino asitlerin bolluğundan dolayı kalsiyum iyonlarına yüksek afiniteye sahiptir. Bu nedenle, hidroksiapatitin Ca^{2+} iyonlarına bağlanarak, BSP'nin HA çekirdeklenmesini ve büyümesini teşvik ettiği düşünülürken, OPN mineral büyümesini inhibe eder ve böylece mineral birikintilerinin boyutunu ve yönünü kontrol etmeye yardımcı olur (Clarke 2008). Mineralizasyonun kontrolünün, BSP ve OPN gibi proteinlerin fosforilasyon derecesi ile yakından ilişkili olduğu gözlenmiştir (George ve Veis 2008; Salih ve diğ. 2002). Bu nedenle, HA bağlanmasından ve mineral büyümesinden sorumlu olan proteinin yüklü asidik grupları arasında sinerjik bir aktivitenin var olduğu ileri sürülmektedir. Ek olarak, kollajen olmayan proteinlerin kalsiyum iyonlarına bağlanması, fosforun enzimatik salınımı ile birleştiğinde, mineral oluşumunu arttırmak amacıyla kalsiyum ve fosfat iyonları için bir rezervuar görevi görebilecekleri anlamına gelir.

Hücre dışı matrisin olgunlaşması, alkalın fosfatazın ekspresyonu ile de ilişkilidir (Whyte 1994). Alkalın fosfatazın rolü tam olarak anlaşılmasa da, mineralizasyon inhibitörü olan inorganik pirofosfatı (PPi) hidrolize ettiğine inanılmaktadır (Harmey ve diğ. 2004). Bu şekilde, alkalın fosfataz, mineralizasyonun ilerlemesine izin veren optimal hücre dışı PPi konsantrasyonunu oluşturabilir. Bu nedenle, kolajen olmayan proteinler, mineralleşmeyi teşvik etmek ve ayrıca düzenli

mineral birikimini düzenlemek ve böylece ektopik kalsifikasyonu önlemek için birlikte çalışabilir.

2.1.4 Kemik Hücreleri

Kemiğe nüfuz eden ve onu hizalayan birkaç özel hücre vardır ve bunlar üç ana kategoriye ayrılabilir (Clarke 2008). Osteoblastlar, organik hücre dışı matriksin sentezi ve salgılanmasıyla yeni kemik oluşumundan sorumludur. Sonunda matriks içine gömülebilirler ve osteositlere dönüşebilirler.

Osteositler, terminal olarak farklılaşmış osteoblastları temsil eder. Bu hücreler, hücreler arası yapışmayı desteklemek ve kemik sıvısındaki mineral değişimini düzenlemek için birkaç matriks proteini eksprese eder. Osteositler, doku içindeki diğer hücrelerle bağlantı kurabilir ve osteoblastların ve osteoklastların aktivitesini düzenlemek için hücre-hücre iletişimi sağlar.

Son olarak, osteoklastlar, hücre dışı matriksin bileşenlerini parçalayarak eski kemiğin rezorpsiyonundan (emilim) sorumludur. Bu, kemiğin bakımı, onarımı ve yeniden şekillendirilmesi için çok önemlidir.

2.1.5 Kemiğin Yeniden Şekillenme Süreci

Diğer malzemelerden farklı olarak, kemik mekanik yük ve deformasyondaki değişikliklere uyum sağlamak için yaşam boyunca sürekli bir dönüşüme uğrar. Kemiğin yeniden şekillenmesi süreci ayrıca mikro hasarlı dokunun onarımı ve rejenerasyonu için bir mekanizma sağlar ve hücre dışı sıvıda kalsiyum ve fosfor iyonlarının dengesini korur.

Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında, kemik oluşumu, kemik rezorpsiyonuna sıkıca bağlıdır ve bu ilişkiyi sürdürmek için osteoblastlar ve osteoklastlar arasında doğrudan ilişki vardır (Raggatt ve Partridge 2010). Mikro kırıkların oluşumuna yol açan kemik matriksinin hasar görmesi, genellikle kusurun yeri ve boyutunun güçlü bir göstergesi olan osteosit apoptozuna neden olur.

Osteoblastlar, osteositler tarafından üretilen sinyallere yanıt verir ve pre-osteoklastları yeniden şekillenme bölgesine gönderir. Bu öncü hücreler daha sonra çok çekirdekli osteoklastlara farklılaşır. Aktif bir emilim bölgesinde, osteoklastlar, kemik yüzeyi ile temas halinde olan, kırışık sınır olarak bilinen özel bir hücre zarı oluşturur (Crockett ve diğ. 2011). Kırışık sınır, kemik matriksinin çıkarılmasını kolaylaştırır ve aktif olarak kemiği emen bir osteoklastın morfolojik bir özelliğidir. Osteoklastlar, kırışık sınırın altındaki boşluğun asitleştirilmesiyle kemiği emer ve böylece kemik mineralinin çözünmesini sağlar. Daha sonra işlemi tamamlamak için kollajen matrisinin ve ECM proteinlerinin enzimatik bozulması meydana gelir (Raggatt ve Partridge 2010). Kemik erimesini takiben, osteoblastlar, hücre dışı matrisin yanı sıra birçok kollajen olmayan proteinin sentezi ve salgılanmasıyla kemik oluşumu sürecini başlatabilir (Hadjikadıs ve Androulakis 2006). Son olarak, hidroksiapatit mineralizasyon işlemi sırasında biriktirilir. Eşit miktarda rezorbe edilen kemik değiştirildiğinde, yeniden yapılanma döngüsü sona erer.

Kemik tadilatı, bir dizi hormon ve büyüme faktörü tarafından dikkatle düzenlenir. Örneğin, kemik oluşumundaki kusurlarla ilişkili hastalık çalışmaları, (BMP) ile lokal kemik oluşumu kontrolünün kritik önemini göstermiştir (Crockett ve diğ. 2011). BMP, kemik oluşumunun güçlü bir uyarıcısı olarak hareket edebilir ve genellikle klinik olarak kemik yenilenmesini desteklemek için kullanılır. Ek olarak, östrojen, osteoklast oluşumunu önleyerek ve bu hücrelerin ömrünü kısaltarak ve ayrıca osteoblast proliferasyonunu uyararak yeni kemiğin büyümesini teşvik edebilir (Hadjikadıs ve Androulakis 2006).

2.2 Kemik Doku Mühendisliği

Bir doku mühendisliği iskelesinin birincil amacı, kritik boyuttaki defektlerde meydana gelmeyen kemiğin doğal iyileşme sürecini teşvik etmek için mühendislik ilkelerini kullanmaktır. Sentetik bir kemik iskelesi, doğal doku entegrasyonuna izin vermek için biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir olmalı ve doğal kemiğin çok boyutlu hiyerarşik yapısını taklit etmelidir. Fiziksel ve kimyasal olarak biyomimetik olmanın yanı sıra, ideal bir iskele, biyoaktif molekülleri (örneğin, hücre dışı matriks üretimini ve doku entegrasyonunu hızlandırmak için BMP'ler, TGF- β 'ler

vb.) veya ilaçları (örneğin, sepsis veya kanser nüksü gibi istenmeyen biyolojik yanıtı önlemek için antibiyotikler, sisplatin vb.) geçici ve uzamsal olarak kontrollü bir şekilde ayrıştırma yeteneğine sahiptir. Seramikler, metaller, polimerler ve kompozitler dahil olmak üzere çeşitli biyomalzemeler, kemik iskele malzemeleri olarak potansiyelleri açısından araştırılmıştır. Bununla birlikte, ayarlanabilir fizyokimyasal özellikleri, biyoyumlulukları ve kontrol edilebilir biyobozunabilirlikleri nedeniyle polimerler, kemik dokusu mühendisliğinde ana malzeme olarak ortaya çıkmıştır (Porter ve diğ. 2009).

Birleşme olmayan veya kritik boyutlu defekt senaryolarında, kemik defektini doldurmak için ikame bir malzeme kullanılmalıdır. Kritik boyuttaki kemik defektlerinin mevcut altın standart tedavisi **otojen** kemik greftidir. Bu tedavide, konakçı kemik başka bir bölgeden (tipik olarak pelvis veya krsta iliak) çıkarılır ve defekti doldurmak için kullanılır. Bununla birlikte, otojen kemik greftlemede komplikasyon oranı %30 kadar yüksektir ve donör saha morbiditesi, ağrı, parestezi, uzun süreli hastanede yatış ve rehabilitasyon, artmış derin enfeksiyon riski, hematoma, inflamasyon kısıtlı kullanılabilirliği içerebilir (Silber ve diğ. 2003). Hastalar ve cerrahlar için başka bir makul seçenek, **allogreft** adı verilen diğer insanlardan (tipik olarak kadavralar) alınan kemik dokusunun kullanılmasıdır. Allogreftler canlı veya sterilize edilmiş cansız kaynaklardan türetilebilir. Birçok ortopedik allogreft prosedürü FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylıdır ve yıllardır kullanılmaktadır. Hem otogreft hem de allogreft prosedürlerinde başarı, donör (alan veya hasta) ve konak dokudaki fiziksel ve biyolojik benzerliğe atfedilir. Bununla birlikte, ortopedik allogreftler, donörden alıcıya enfeksiyon (%13'e varan insidans oranı) ve hastalık bulaşması ve konakçı bağışıklık tepkileri riskleri taşır (Hou ve diğ. 2005). Son çare olarak, kemik onarımı veya değiştirilmesi gereken hastalar için, insan olmayan bir dokudan **ksenogreft** veya diğer adıyla doku aşılması da düşünülebilir. Çeşitli hücre, doku ve organların ksenotransplantasyonundaki erken başarı, bu gelişen teknolojinin kabul edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, 20 yılı aşkın araştırma ve küresel klinik denemelerden sonra, kemik ksenogreftlerinin gerçek ve algılanan hastalık veya virüs bulaşma riski, enfeksiyon, sterilizasyonla ilişkili toksisite, immünojenisite ve son olarak konak reddi nedeniyle transplantasyon için uygun olmadığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Yang ve Sykes 2007).

Kemikteki kritik boyutlu kusurlar için altın standart tedavi olarak otojen süngerimsi kemik greftlerinin kullanımını çevreleyen yukarıda bahsedilen ve diğerlerinin de dahil olduğu endişeler, son yıllarda çok çeşitli karmaşık sentetik (doku mühendisliği) kemik iskelelerinin geliştirilmesini motive etmiştir. Sentetik kemik iskeleleri kullanmanın avantajları arasında şunlar yer alır: hastalık bulaşma riskinin ortadan kaldırılması, daha az cerrahi prosedür, azaltılmış enfeksiyon veya immünojenisite riski ve sentetik iskele malzemelerinin bol miktarda bulunması. Bu bölüm, kemik dokusu mühendisliğindeki temel ilkeleri ve kemiğin karmaşık fizyokimyasal özelliklerini taklit eden sentetik bir yapı iskelesinin geliştirilmesini çevreleyen tasarım zorluklarını gözden geçirmektedir.

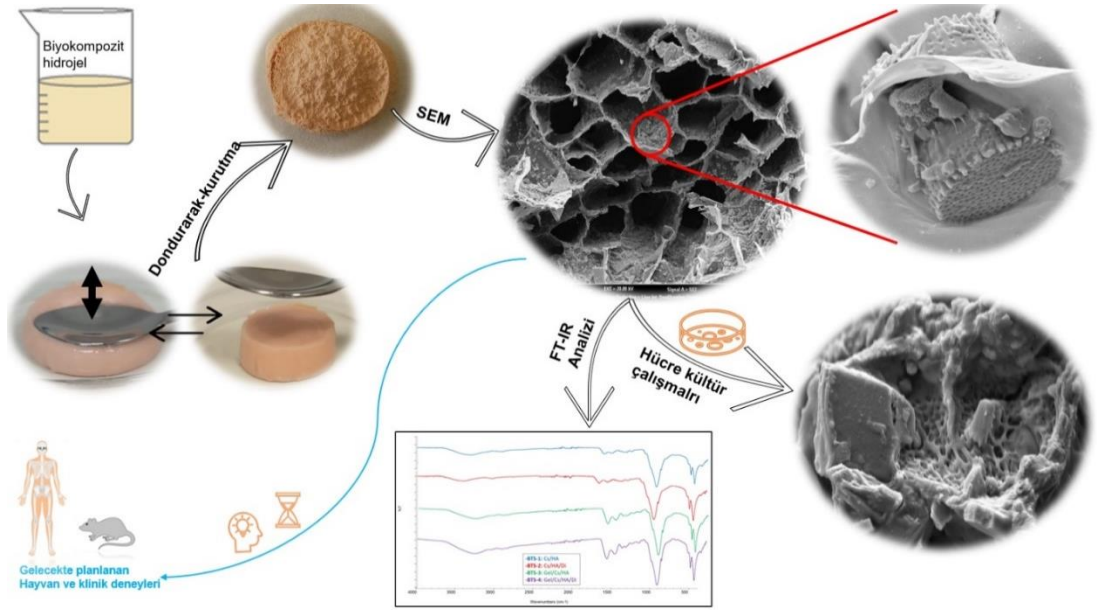
Doku mühendisliğinin arkasındaki temel kavram, vücudun doku hasarına verdiği doğal biyolojik tepkiyi mühendislik ilkeleriyle birlikte kullanmaktır. Doku mühendisliğinde hücre sinyalizasyonunun ve müteakip işlevselliğin rolü daha net bir şekilde ortaya çıktıkça, doku mühendisleri çok işlevli biyoaktif yapı iskeleleri geliştiriyorlar. İdeal sentetik yapı iskeleleri, doğal doku bütünleşirken ve sırasıyla istenen ve istenmeyen fizyolojik tepkileri aktif olarak teşvik ederken veya önlerken, biyolojik olarak parçalanırken bir fizyokimyasal biyomimetik ortam sunabilmelidir (Kretlow ve Mikos 2007). Bu biyomimetik gereksinimleri özel olarak ele almak için sentetik bir kemik iskelesi şunları yapmalıdır:

- 1) Etkilenen bölgeye geçici mekanik destek sağlamak,
- 2) Osteoid birikimi için bir substrat görevi görmek,
- 3) Vaskülarizasyona ve kemik büyümesine izin veren gözenekli bir mimari içermek,
- 4) İskele içine kemik hücresi göçünü teşvik etmek,
- 5) Kemiksiz, sentetik yapı iskelesinde (osteoidüksiyon) osteojenik farklılaşmayı desteklemek ve teşvik etmek,
- 6) İskele-konak doku entegrasyonuna (osseointegrasyon) yönelik hücrel aktiviteyi arttırmak,
- 7) Gelişmekte olan kemiğe yük transferini kolaylaştırmak için kontrollü bir şekilde bozunmak,

- 8) Toksik olmayan bozunma ürünleri üretmek,
- 9) Aktif bir kronik inflamatuvar yanıtı teşvik etmemek,
- 10) Biyoaktivite kaybı olmadan sterilizasyon yapabilmek,
- 11) İyileşmeyi hızlandırmak ve patolojiyi önlemek için biyoaktif molekülleri veya ilaçları kontrollü bir şekilde iletmek.

Hücre transplantasyonu, hücresiz yapı iskeleleri, gen tedavisi, kök hücre tedavisi ve büyüme faktörü dağıtımı gibi çoklu kemik dokusu mühendisliği stratejileri, yukarıda sıralanan zorlu gereksinimleri karşılamak için uygulanmıştır (Logeart-Avramoglou ve diğ. 2005). Uygulamada, çoğu kemik dokusu mühendisliği yaklaşımı bu stratejilerin bir kombinasyonunu uygular. Bununla birlikte, en umut verici yaklaşım olarak iki temel doku mühendisliği stratejisi ortaya çıkmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların özeti şeklinde verilen görsel Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3: Tez çalışmasının özet görseli.

2.2.1 Kemik Doku İskeleleri ve Genel Özellikleri

Kemik doku iskeleleri, üç boyutlu mikroyapı olan ECM'yi taklit edecek şekilde tasarlanan yapılardır. Üretilen yapılar içerisinde, uygun hücreler canlılığını devam ettirebilmeli, etkileşim halinde olabilmeli ve kendi ECM'sini üretebilmelidir. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılacak ideal bir doku iskelesinde olması gereken başlıca özellikler sırası ile verilmiştir:

2.2.1.1 Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, "bir materyalin fibrotik olmayan yara iyileşmesini, rekonstrüksiyonunu ve doku entegrasyonunu lokal olarak tetikleme ve yönlendirme yeteneği" olarak tanımlanabilir. İdeal bir iskele osteokondüktif ve osteoindüktif olmalıdır. Osteokondüktif özellikler, kemik hücrelerinin, yapı iskelesinin yüzeyine ve iç yapısına yapışmasına, çoğalmasına ve hücre dışı matriks oluşturmaya izin vererek yeni oluşan kemik için bir rehberlik sağlar. Bu süreç, doğal doku üzerinde toksik olmadan normal hücrel aktiviteyi destekler. Osteoindüktivite, progenitor hücrelerin alımı, uyarılması ve biyomoleküler sinyal yoluyla kemik oluşumunu indükler (Ratner 2011).

2.2.1.2 Gözeneklilik

Daha yüksek gözenekliliğin osteogenezi artırması beklendiğinden, daha yüksek derecede vasküler infiltrasyon ve gözeneklilik yüzdesi ile daha hızlı kemik dokusu içe büyüme veya apozisyon oranı vardır. Makro gözeneklerin (>100 µm) hücre göçünü desteklediğine ve kemik büyümesini ve osseointegrasyonunu arttırdığına inanılırken, mikro gözeneklerin (<5 µm) daha yüksek kemik indükleyici protein adsorpsiyonuna katkıda bulunduğu üzerine daha geniş yüzey alanı fikri desteklenir. İskeleler için ayrılmaz ve temel bir özellik, özellikle uzun vadeli doku arayüzü bakımında yeni kemiğin büyümesini etkileyen birbirine bağlı gözenekliliktir. Hücre canlılığı için temel besinlerin ve oksijenin başarılı bir şekilde difüzyonu için gözenek boyutu en az 100 µm çapında ve gelişmiş osteogenez için en az >300 µm olmalıdır, bu değerlerin vaskülarizasyonu ve kan damarı yayılmasını desteklemek için

yeterli olduğu rapor edilmiştir. Kemik büyüme paterninin iskele mimarisine göre değiştigi bildirilmektedir. Bu, rastgele gözenek boyutuna sahip iskelelerin içinde sürekli kemik oluşturma modelinin gözlendiğini gösterirken, aynı boyutta gözeneklere sahip ancak katı duvarlara sahip iskeleler, iskele boyunca süresiz kemik adacıklarının oluşumuna yol açmıştır (Simon ve diğ. 2003). Gözeneklilik, yapı iskelelerinin mekanik özelliklerini azaltsa ve tekrarlanabilir üretim için karmaşıklığı artırsa da çalışmalar hem mikro hem de makro gözenekliliği içeren çok ölçekli gözenekli yapı iskelelerinin, yalnızca makro gözenekli yapı iskelelerinden daha iyi performans gösterebileceğini ortaya koymuştur (Bose ve diğ. 2011).

2.2.1.3 Biyobozunurluk/Biyomilebilirlik

İdeal bir iskele, doku rejenerasyon işleminde bir miktar mekanik bütünlüğü korurken, yeni doku oluşumuyla orantılı bir oranda *in-vivo* olarak bozunabilmelidir. Bu gereksinimler, etkili bir iskele tasarımı için 4F (fonksiyon, fiksasyon, formasyon, form) alt yapısını oluşturur. Bir iskele, onarımda (fonksiyon) kemiğin mekanik özelliklerini korurken ve mevcut kemiğe ve komşu yumuşak dokuya entegrasyon (fiksasyon) ve bağlanma kabiliyetine izin verirken, aynı zamanda osteokondüktif bir ortam oluşumu (formasyon) sağlarken, kusurun 3D biçimine (form) uymalıdır (O’Keefe ve Mao 2011).

2.2.1.4 Mekanik Özellikler

İdeal kemik ikame yapı iskelelerinin mekanik özellikleri ve mimarisi, uygun yük aktarımı önemli olduğundan, güçlendirmeleri amaçlanan doğal dokuların özelliklerini yakından taklit etmelidir. Uygun olmayan sertlik ve malzeme mukavemeti, doğal kemik dokusunun sonuç olarak rezorpsiyonu ile sonuçlanabilir ve bu, fonksiyonel kaynama onarımının birkaç yıl sürebileceği kemik onarımının ilerlemesini ciddi şekilde engelleyebilmektedir (Liu ve diğ. 2012).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında başarılı kemik onarımının gerçekleşmesi için iskelenin Tablo 2.1’deki gibi özetlenen belirli özelliklere sahip olması gerekir.

Tablo 2.1: Kemik rejenerasyonu için kullanılan bir doku mühendisliği iskelesinin arzu edilen özellikleri (Dey ve diğ. 2016; Agrawal ve Ray 2001).

İstenen özellikler	Sağladığı yararlar
Biyoyumluluk	İmmünojenik yanıt vermeme; Toksik olmamalıdır.
Osteokondüktivite	Hücrelerin bağlanmasına ve çoğalmasına izin vererek kemik büyümesini destekleyen; Hücrelerin yapı yoluyla göçünü destekler.
Osteoindüktivite	Kök hücrelerin olgun osteoblastlara farklılaşmasını indükler.
Gözeneklilik	Hücre büyümesi ve besinlerin ve atıkların taşınması için son derece birbirine bağlı gözenekli ağ; İdeal gözeneklilik = %90; Hücre ekimi için yüzey alanını artırılmalı.
Biyobozunurluk	Yeni kemik oluştuğunda uygun oranda bozunur; Bozunma ürünleri toksik olmamalıdır.
Mekanik özellikler	Vücut tarafından uygulanan kuvvetlere dayanabilme; Çevreleyen dokuya benzer mekanik özellikler.

2.2.2 Kemik Doku İskelesi Yapımında Kullanılan Biyomalzemeler

Geçtiğimiz yıllarda kemik dokusu mühendisliği için artan sayıda yeni yapı iskelesi imal etmek için farklı malzemeler kullanılmış ve farklı imalat yöntemleri uygulanmıştır (Jahan ve Tabrizian 2016). Polimer ve seramik kompozitleri, kemik mimarisini taklit etme yeteneklerinden dolayı araştırılan en popüler kompozit sınıftır ve bu alanda giderek artan sayıda yayın bulunmaktadır. Doku mühendisliği için biyomalzemeler olarak uygulanacak materyalleri seçme kriterleri materyal kimyasına, moleküler ağırlığa, çözünürlüğe, hidrofiliğe/hidrofobliğe, yüzey enerjisine, bozunmaya, yapıya ve erozyon mekanizmasına dayanmaktadır.

2.2.2.1 Polimerler

Doğal ve sentetik polimerler, çok yönlü özelliklerinden dolayı doku mühendisliği için yapı iskeleleri olarak geniş çapta araştırılmıştır. Doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumluluk ile karakterize edilir, bu da hücrelerin yapılar içine yapışmasını ve göç etmesini sağlar. Kemik dokusu mühendisliğinde en yaygın olarak kullanılan doğal polimerler arasında kolajen, aljinat, fibrin, hyaluronik asit, ipek, gellan zankı ve kitosan bulunur. Doğal polimerlerin ana avantajı, mekanik olarak zayıf olmalarına rağmen doku büyümesini ve yeniden şekillenmeyi destekleme yetenekleridir. Sentetik polimerler, belirli uygulamalar için mikro (bileşim, mimari ve bağlama grupları) ve makro ölçekli (gözeneklilik, sertlik ve elastikiyet) özelliklerini uyarlama yeteneğinin avantajına sahiptir. Poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve polikaprolakton (PCL), Poli (vinil alkol) (PVA), polietilen glikol (PEG) ve poli (metil metakrilat) (PMMA) gibi sentetik polimerler, diğerleri arasında kemik dokusu mühendisliğinde yaygın olarak kullanılır. Polimerlerin bazıları doğal fizyolojik yol ile bozunabilir, ancak bazıları için bozunma mekanizması, olumsuz doku tepkilerine sahip olabilen lokal asidik bir ortam (örneğin PLA veya PGA) ile sonuçlanır (Liu ve diğ. 2013; Bose ve diğ. 2012).

Polimerlerin sınırlamaları, doğal polimerler için immünojenisite ile ilgili endişelerin yanı sıra işleme ve saflaştırmadaki zorlukları içerir. Ayrıca, klinikte sonuçların öngörülebilirliğini azaltan malzemelerde partiden partiye değişkenlik potansiyeli de mevcuttur ve son olarak doğal polimerler kemik dokusunun mekanik özelliklerini tam eşitleme yeteneğine sahip değildir. Sentetik polimerlerin sınırlamaları, özellikle ECM-bağlama alanlarına sahip doğal olarak türetilmiş polimerlere kıyasla, pozitif biyomateryal-konak etkileşimlerini kısıtlayan biyoaktivite eksikliğini içerir (Shrivats ve diğ. 2014).

2.2.2.2 Seramikler

Kalsiyum fosfat (CaP) ve biyoaktif camlar gibi inorganik malzemelerin iyi bir biyouyumluluğa sahip olduğu bilinmektedir. Sert ve bazı durumlarda yumuşak doku ile bağ oluştururlar. CaP'ler, kemiğin önemli bir bileşeni olduklarından, kemik dokusu mühendisliği için yapı iskeleleri olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Araştırmaların çoğu, yeni kemik oluşumunu başarılı bir şekilde desteklediği tespit edilen hidroksiapatit (HA), beta trikalsiyum fosfat (β -TCP) veya bifazik kalsiyum fosfat (BCP) olarak bilinen HA ve β -TCP karışımı üzerine odaklanmıştır. İnorganik malzemeler mekanik özellikler ve emilme hızları açısından farklılık gösterir. Kalsiyum sülfatın 4 ila 12 hafta arasında en hızlı rezorpsiyona sahip olduğu rapor edilirken, hidroksiapatitin yavaş rezorpsiyona sahip olduğu ve implantasyondan 10 yıl sonra radyografik olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir. Karakteristik faza bağlı olarak kalsiyum fosfatlar, yaklaşık 6 ay ila 10 yıl arasında değişebilen yavaş ila hızlı emilim sergilerken, TCP rezorpsiyonu 6 ila 18 ay arasında gerçekleşir (Fillingham ve Jacobs 2016).

Son zamanlarda β -TCP yapısına çinko ve stronsiyum gibi katkı maddelerinin eklenmesi, tip I kolajen gen ekspresyonunda ve anjiyogenez, osteoblast proliferasyonu, farklılaşma ve morfogenezi pozitif olarak dizenleyen hücre dışı sinyal regüle kinazlar (ERK) salgısında bir artış göstermiştir. β -TCP yapısına katkı maddelerinin eklenmesinin ayrıca çözünme hızlarının, yoğunlaştırma davranışının, mekanik mukavemetin ve biyoyumluluğun kontrolüne izin verdiği bulunmuştur. Fizyolojik koşullara yerleştirildiğinde yapı iskelesinin yüzeyinde bir hidroksi karbonat apatit (HCA) tabakası oluşturabilen biyoaktif camların birçok farklı bileşimi araştırılmıştır. Bu HCA tabakası, osteoblast aktivitesini önemli ölçüde arttırır ve *in vivo* olarak yeni kemik oluşumunu kolaylaştıran proteinleri ve büyüme faktörlerini adsorbe eder. Bu özellikler onları kemik dokusu mühendisliğinde oldukça arzu edilen bir materyal haline getirir. Bununla birlikte, seramikler kırılmalıkları ile sınırlıdır ve genellikle nispeten yüksek bir sıkıştırma modülü ile düşük kırılma tokluğuna sahiptir ve bazı durumlarda biyoyumlulukları ve biyolojik olarak bozunabilirlikleri genellikle yetersizdir (Banerjee ve diğ. 2010; Jones ve diğ. 2006).

2.2.2.3 Kompozitler

İskelelerin klinik başarisını arttırmak için mevcut stratejiler, tek tek malzeme bileşenlerinin arzu edilen özelliklerini birleştiren kompozitlerin ve hibrit yapı iskelelerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Kompozitlerin özellikleri ihtiyaca ve uygulama yöntemine göre bileşenlerin hacim fraksiyonunun yanı sıra bileşim

içeriğinin kontrol edilmesiyle modüle edilebilir, bu işlem kemiğin özellikleriyle paralel mukavemete sahip iskelelerin elde edilmesini sağlar. Kompozitler, kemik doku mühendisliğinde incelenmek üzere partikül takviyeli, fiber takviyeli ve yapısal kompozitler olarak geniş bir şekilde kategorize edilebilir.

Kalsiyum fosfatlar ve hidroksiapatit gibi seramik dolgu maddeleri, *in vitro* ve *in vivo* biyoaktiviteyi teşvik etme kabiliyetine sahip gelişmiş mekanik özelliklere sahip hidrojel kompozitler oluşturmak için polimerlerle birleştirilebilir. Kontrollü gözenekliliğe sahip olacak şekilde uyarlanabilirler ve ilaç dağıtımı için ilaçlarla birleştirilebilirler. Nano parçacıklar çeşitli kaynaklardan (örneğin polimerler, mineraller, metaller ve yarı iletkenler) çeşitli şekillerde tasarlanarak kompozit yapılar oluşturmak için hidrojellere dahil edilmiştir. Organik kil nanoparçacıkları hidrojelleri güçlendirmek için kullanılmıştır, örneğin, organik ikameli kil nanoparçacıkları ile takviye edilmiş bir PVA hidrojelinin, yüksek su emiciliğini korurken, artan gerilme mukavemetine ve azalan mikrobiyal penetrasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Habraken ve diğ. 2007; Desai ve diğ. 2010).

Altın nano partiküllerin (AuNP) katıldığı kompozit hidrojellerde elektriksel iletkenlik açısından önemli bir artışın ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Gümüş nano partiküller (AgNP'ler) benzersiz antibakteriyel özelliklere sahiptir ve antibakteriyel yara örtüleri olarak kullanımları araştırılmıştır. Manyetik nanopartiküllerin (MNP'ler) hidrojellerle kaplanması, hidrofiliği ve biyouyumluluğu artırmanın yanı sıra spesifik olmayan protein absorpsiyonunu azalttığı belirlenmiştir. Karbon nanotüpler (CNT'ler) ve grafen gibi karbon bazlı nanopartiküller (CBN'ler), mekanik mukavemet, elektrik, termal ve optik iletkenlik gibi mükemmel çoklu fonksiyonlara sahiptir. Yüksek mukavemetli malzemeler, nano ölçekli elektronik devreler, sensörler ve aktüatörler gibi çeşitli uygulamalar için ve ayrıca biyomedikal uygulamalar için hidrojelin yapısını güçlendirmek için araştırılmıştır (Kumar ve Mohammad 2011; Cha ve diğ. 2013; Meenach ve diğ. 2010).

2.2.3 Kemik Doku İskelesi İmalatında Kullanılan Yöntemler

İskelelerin imalatında çeşitli yöntemler kullanılmış olup, birincil gereklilik, seçilen tekniklerin imalat süreçlerinde tutarlılığı ve tekrarlanabilir sonuçları sağlaması

ve aynı zamanda malzeme özelliklerinin ve istenen iskele tasarım gereksinimlerinin olumsuz etkilenmemesidir. İskelelerin imalatı, Tablo 2.2’de sunulan çeşitli işleme tekniklerine göre gruplandırılabilir.

Tablo 2.2: 3-D yapı iskelelerinin yaygın olarak kullanılan bazı geleneksel üretim tekniklerinin özeti, (Salgado ve diğ. 2004; Pham ve diğ. 2006) ‘den uyarlanmıştır.

Üretim metodu	Açıklama
Dondurarak kurutma (liyofilizasyon)	Daha önce bir kalıba dökülen homojen bir polimer çözeltisinin sıcaklığı düştüğünde meydana gelen, termal olarak indüklenen bir faz ayrımına dayanır. Fazla ayrılmış sistem stabilize edildikten sonra, solvent açısından zengin faz, polimerik köpüğü geride bırakarak vakum süblimasyon yoluyla çıkarılır. Bu metodoloji, doğal ve sentetik kökenli yapı iskeleleri geliştirmek için kullanılmıştır.
Elektroçirgeme	Nanometre ölçeğinde dokunmamış liflerden oluşan doku iskelelerinin üretimine dayar. Kısaca, polimer uygun bir çözücü içinde çözülür, bir şırıngaya yüklenir ve daha sonra bir metal kapiler yoluyla dışarı atılır. Kılcal damara yüksek voltaj (10-20 kV) uygulanarak polimer yüklenir ve bir toplama plakasına doğru fırlatılır. Lifler bir araya geldikçe, solvent buharlaşarak dokunmamış gözenekli bir yapı iskelesi bırakır.
Solvent döküm	Bir polimer çözeltisinde kalibre edilmiş mineral (örn., sodyum klorür, sodyum tartrat ve sodyum sitrat) veya organik (örn. sakaroz) partiküllerin dağıtılmasından oluşur. Bu dispersiyon daha sonra gözenekli yapı iskeleleri üretmek için ya döküm yoluyla ya da dondurarak kurutma ile işlenir.
Hızlı prototipleme	Bilgisayar destekli tasarım (CAD) sistemleri, bilgisayar tabanlı tıbbi görüntüleme, sayısallaştırıcılar ve diğer veri oluşturucular tarafından oluşturulan verileri kullanarak son derece karmaşık üç boyutlu fiziksel nesnelere üretebilen bilgisayarlı bir üretim tekniğidir.
Fiber bağlama	Değişken gözenek boyutuna sahip 3 boyutlu desenler halinde dokunmuş veya örülmüş tek tek liflerden oluşur. Başlıca avantajı, hücre bağlanması ve besinlerin hızlı difüzyonu için geniş yüzey alanıdır.
Yüksek basınçlı dayalı yöntemler	Polimer disklerin yüksek basınçlı CO ₂ 'ye maruz kalmaları yoluyla CO ₂ doygunluğuna dayanmaktadır. Daha sonra CO ₂ gaz basıncının ortam düzeyine düşürülmesiyle termodinamik bir kararsızlık yaratılır, bu da çözünmüş CO ₂ 'nin çekirdeklenmesine ve genişlemesine neden olarak makro gözenekler oluşturur.

2.3 Hidrojeller

Hidrojeller, doğal hücrenel mikro ortamın özelliklerini yakalayabilen, yüksek su içeriğine sahip çapraz bağlı polimerlerdir. Ayarlanabilir kimyasal ve fiziksel özelliklerinin bir sonucu olarak hidrojeller, yara iyileşmesi, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır. Hücre dışı matrisin özelliklerini taklit etme yetenekleri, hidrojellerin kemik dokusu iskeleleri olarak kullanımında önemli ölçüde dikkat çekmiştir (Hunt ve diğ. 2014).

2.3.1 Doğal Hidrojeller

Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan doğal malzemeler genellikle polisakkaritler, proteinler, kolajen, kitosan ve hyaluronik asit olup ECM bileşenleri şeklini alırlar. Doğal biyoyumlulukları ve biyoaktiviteleri, doğal hidrojelleri doku mühendisliğinde kullanım için ilk mantıklı seçim haline getirir. Ayrıca, mevcut birçok endojen faktör nedeniyle yapışma, çoğalma ve farklılaşma dahil birçok hücrenel işlevi de desteklerler. Ancak, doğal polimerlerin mekaniğini ayarlamak zor olabilir ve her zaman kontaminasyon ve her bir üretimde değişkenlik riski vardır. Bu nedenle, çoğu araştırma sentetik polimerik hidrojellere odaklanmıştır (Bhattacharai ve diğ. 2010; Xu ve diğ. 2012; Tibbitt ve Anseth 2009).

2.3.2 Sentetik Hidrojeller

Poli (etilen glikol) (PEG), poli (vinil alkol) (PVA) veya poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) gibi tamamen sentetik polimer malzemelerden oluşan hidrojeller, doku mühendisliği uygulamaları için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Sentetik hidrojeller yüksek oranda tekrarlanabilirdir ve mekanik özelliklerinin hassas ayarına izin verir (Martens ve diğ. 2002).

Genellikle yumuşak doku uygulamalarında kullanılmasına rağmen, hidrojel aracılı kemik rejenerasyonu alanında şu anda önemli araştırmalar yapılmaktadır. Hücre yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını yönlendirirken ve ECM'nin aktivitesini teşvik ederken mekanik destek sağlayabilen biyoaktif özellikteki hidrojel

iskelesi gereklidir. Hidroksiapatitin (HA) polimerik hidrojellere dahil edilmesinin, mekanik mukavemetlerini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Kompozit ayrıca mükemmel osteoblast hücre yapışma özellikleri göstermiştir (Li ve diğ. 2013).

Ayrıca Song ve arkadaşları, PVA/kollajen/HA'nın “kemik benzeri” bir bileşimini geliştirmişler ve osteoblastların malzemeye tepkisini test etmişlerdir. Bu kompozit malzemenin, tek tek bileşenlerle karşılaştırıldığında mekanik özellikleri önemli ölçüde iyileştirdiğini bulmuşlardır. Sünek kolajenin ayrıca HA'nın zayıf kırılma tokluğunu arttırdığını ve ayrıca, PVA kompozitlerinin, *in vitro* hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırdığını gözlemlemişlerdir (Song ve diğ. 2012).

2.4 Hidroksiapatit

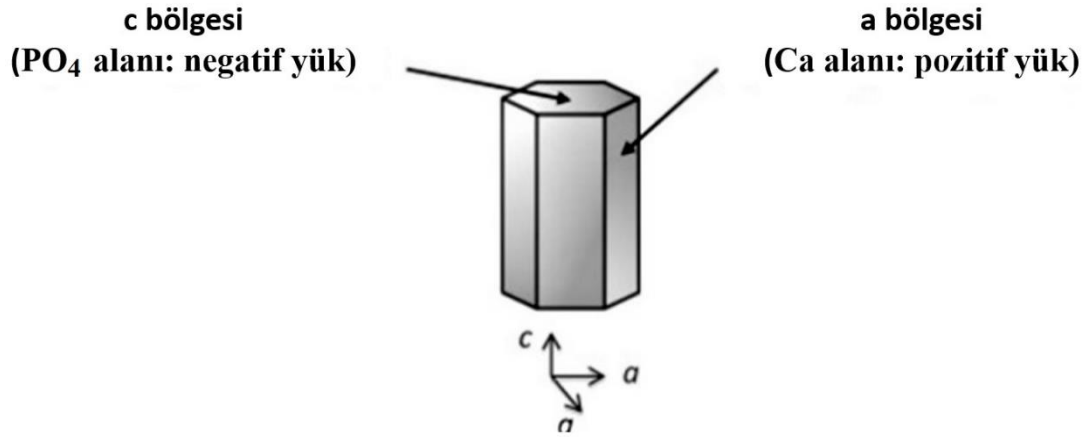
Kalsiyum fosfat ailesinin üyeleri arasında olan hidroksiapatit (HA), biyoyumluluğu, osteoindüktivitesi ve toksik olmaması nedeniyle özellikle dental ve ortopedik alanlar olmak üzere biyomedikal uygulamalarda kullanılan en güçlü biyoseramiklerden biri olarak kabul edilir (Nikpour ve diğ. 2012). Doğal kemiğin mineral fazına benzeyen yapısal ve kimyasal bileşimi nedeniyle, HA, hızlı kemik rejenerasyonunu destekleyebilir ve ara bağ dokularına ihtiyaç duymadan konak dokuyla doğrudan bağ kurabilir (Turnbull ve diğ. 2018). Ayrıca HA, biyolojik sıvılarda çözüldükten sonra Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarının kaynağı olarak görev yapar, böylece osteogenez, hücre proliferasyonu ve kemik metabolizması gibi hücresel tepkilere aracılık etmede rol oynar (Sepantafar ve diğ. 2018). Her geçen gün, araştırmacılar, Cl^- , F^- , Ag^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} ve Zn^{2+} gibi farklı anyon ve katyonları birleştirerek sentetik HA'nın biyolojik performansını (hücresel aktivite, biyoaktivite ve antimikrobiyal özellikler) arttırmaya çalışmıştır (Iqbal ve diğ. 2013). Şimdiye kadar, sentetik HA, periodontal rekonstrüksiyon, ortopedik ve alveolar büyütme için yapay kemik ikamesi, doku iskelesi üretmek için bir biyomateryal (Mohan ve diğ. 2018) ya da metalik implantlar için biyoyumlu bir kaplama olarak veya kemikle ilişkili hastalığı tedavi etmek için kemoterapötiklerin bir ilaç aracı ve antibiyotik olarak (Yi ve diğ. 2016) uygulanmıştır.

Uygulamaya bağılı olarak, genellikle HA'nın fizikokimyasal özelliklerini uyarılama ihtiyacı vardır. Bunun nedeni, HA'nın partikül boyutu, Ca/P molar oranı, gözeneklilik, faz bileşimi ve yüzey alanı gibi özelliklerinin biyolojik ve adsorpsiyon verimliliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olmasıdır. Örneğin, daha yüksek yüzey alanına ve daha küçük partikül boyutuna sahip nanokristal HA, adsorban ve biyomalzeme olarak daha iyi hücre uyumluluğu sunabilir (Nasiri-Tabrizi ve diğ. 2014). Günümüzde kullanılan endüstriyel sentetik HA'nın çoğu, pahalı reaktif dereceli kimyasallar gerektiren yöntemlerden üretilirken aynı zamanda doğal biyo-kaynaklardan da elde edilebilir (Boutinguiza ve diğ. 2012). Son yıllarda, domuz kemiği, tavuk kemiği, sığır kemiği, balık kemiği, yumurta kabuğu, midye kabuğu, balık pulu, istiridye kabuğu, salyangoz kabuğu gibi gıda endüstrisinden üretilen çeşitli biyo-atıklar HA oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu biyo-atıkların HA'ya dönüştürülmesi, yalnızca çevresel zararı azaltmak adına bir atık yönetim stratejisi olarak değil, aynı zamanda HA üretim maliyetini azaltmak için ekonomik olarak da arzu edilmektedir.

2.4.1 Hidroksiapatitin Yapısı

Genel olarak, stokiyometrik HA $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ 'nin kristal yapısı, Ca^{2+} kationlarının iki olası bölgede, yani Ca (I) ve Ca (II) bölgelerinde bulunabileceği ve aralarında serpiştirilmiş Ca^{2+} iyonları tarafından bir arada tutulan kompakt bir fosfat (PO_4^{3-}) tetrahedra topluluğunu içerir. Ca (I) bölgesinde, Ca^{2+} iyonları, c-eksenine paralel sütunlu bir düzlemde altı PO_4^{3-} tetrahedraya ait dokuz oksijen tarafından koordine edilir. Ca (II) bölgesindeki Ca^{2+} iyonları, alternatif eşkenar üçgenler oluşturan ve c-ekseni boyunca kademeli olarak sıralanan yedi oksijen atomu (altısı PO_4^{3-} tetrahedraya ve biri hidroksit iyonuna OH^-) tarafından koordine edilir. Kristal kafesteki Ca (II) üçgeninin boyutu, kolon eksenine boyunca OH^- anyonunun hareketliliğini sağlar (Fihri ve diğ. 2017). Tipik olarak, Ca/P molar oranı 1.67 olan sitokiyometrik HA, altıgen kristal sistemine aittir ve iki ana kristal düzlemi gösterir: şekil 2.4'deki a-düzlemi ve c-düzlemi. a-düzlemlerinin esas olarak Ca^{2+} iyonlarından oluştuğu ve dolayısıyla pozitif yüklü olduğu, buna karşılık c-düzlemlerinin PO_4^{3-} iyonlarınca zengin olduğu için negatif yüklü olduğu belirtilmektedir. Sonuçta, HA

yüzeyleri, biyomoleküllere karşı anizotropik adsorpsiyon özellikler gösterir (Okada ve Matsumoto 2015).



Şekil 2.4: Stokiyometrik HA'nın altıgen kristal yapısı, burada a-düzlemi Ca bölgesi (pozitif yük) ve c-düzlemi PO_4^{3-} bölgesidir (negatif yük) (Okada ve Matsumoto 2015).

HA, kristal kafesinde çok sayıda anyonik ve katyonik ikamenin ortaya çıkmasına izin verir, bu da stokiyometrik olmayan HA'nın varlığına yol açar ve Ca eksikliği ($\text{Ca/P} < 1,67$) veya Ca bakımından zengin ($\text{Ca/P} > 1,67$) HA oluşturur. Aslına bakılırsa, doğal yapıdaki HA'nın kristal kafesi çoklu ikameli Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , K^+ , Na^+ , F^- ve CO_3^{2-} gibi eser miktarda elementlerle ilişkilendirildiğinden, doğası gereği stokiyometrik değildir. Bu nedenle, bu genel formülle ifade edilebilir: $(\text{Ca},\text{M})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{Z})_2$. Burada; M, kafesteki Ca^{2+} iyonlarının yerini alabilen tek değerli (Na^+ , K^+ iyonları) veya iki değerli (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} iyonları) katyonlarını; Y, PO_4^{3-} iyonlarının yerini alabilen CO_3^{2-} gibi anyonik elementleri; Z, OH bölgesi yerine tek değerli (F^- , Cl^- iyonları) veya iki değerli (CO_3^{2-} iyonları) anyonları temsil eder (Baino 2018).

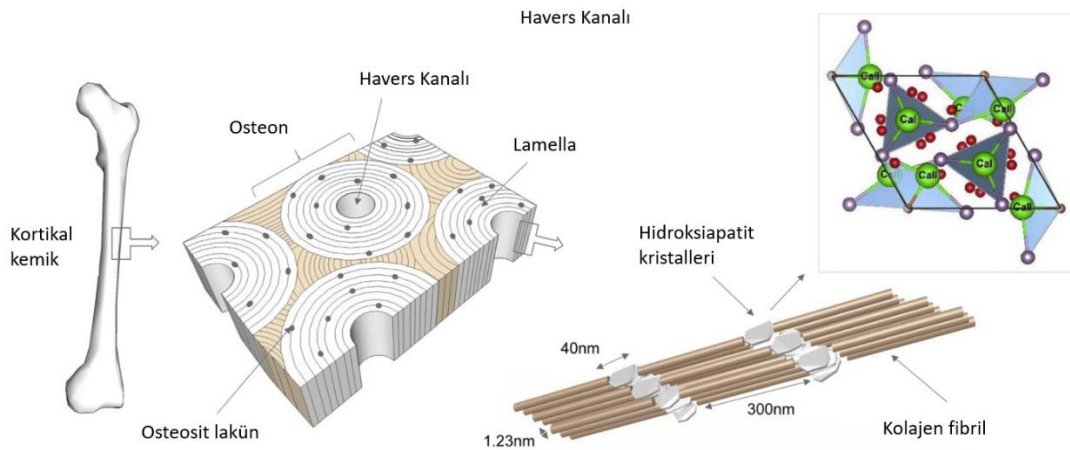
Genellikle biyolojik apatitdeki CO_3^{2-} içeriği yaşa göre değişir ve yapısı ağırlıkça %2 ila %8 arasında değişir (Wong ve diğ. 2016). HA'nın yapısı gereği CO_3^{2-} iyonu, apatit kafesinde iki olası anyonik bölgeyi ikame edebilir ve barındırabilir: A tipi karbonatlı HA oluşturmak için OH^- konumunda ve B tipi karbonatlı HA oluşturmak için PO_4^{3-} konumunda (Liu ve diğ. 2013). CO_3^{2-} iyonlarının hem OH^- hem de PO_4^{3-} pozisyonlarındaki eşzamanlı ikamesi, AB tipi karbonatlı HA olarak adlandırılır (Ezekeil ve diğ. 2018). İyon değiştirme durumu, HA'nın çözünürlüğünü ve biyoaktivitesini, ortaya çıkan kristal değişikliklerini (örneğin, kafes parametrelerinin

değiştirilmesi, yük dengesizliği, boşluk oluşumu ve kristallik) etkileyerek ve biyomedikal uygulamalardaki kullanımını etkileyecek biyolojik aktivitede büyük değişikliklere yol açabilir (Farzadi ve diğ. 2014).

2.4.2 Biyolojik Apatit

Biyolojik apatit, omurgalıların sert dokularındaki biyomineral bileşenidir. Düşük kristalliliğe ve küçük kristal boyutlarına sahip stokiometrik olmayan karbonatlı HA'dan oluşur. İnsan sert dokuları, örneğin; dentin, mine ve kemik hem inorganik hem de organik maddeler içeren biyokompozit malzemelerdir. İnorganik kısım eser miktarda farklı iyonlarla harmanlanmış biyolojik hidroksiapatitten oluşur. Organik faz esas olarak kolajen, osteopontin, fibronektin, osteokalsin ve kemik sialoproteini gibi kolajen olmayan proteinlerin küçük bir kısmından oluşur.

Kemiğin esnekliği kollajen tarafından sağlanırken, sertlik kollajen ağına mineral eklenerek korunur. Bundan dolayı, mineral içeriği kemikten çıkarıldığında, doku da bağlar ve tendonlar gibi çok esnek olacaktır. Tersine, organik içerik çıkarıldığında ise, kemik çok düşük gerilme mukavemetine sahip kırılğan bir malzeme olacaktır (Yılmaz ve diğ. 2019). İnsan kemiğinin hiyerarşik yapısı ve kemiğin kollajen fibrilleri boyunca HA kristallerinin düzenlenmesi Şekil 2.5'de verilmiştir. Kristaller hem kolajen fibrilleri arasındaki boşluklarda hem de yüzeyde bulunabilir.



Şekil 2.5: İnsan kemiğinin hiyerarşik yapısı ve insan kemiğinin kollajen fibrilleri boyunca doğal HA kristallerinin düzenlenmesi (ek küçük görsel: stokiometrik hidroksiapatitin kristal yapısı) (Yılmaz ve diğ. 2019).

Kemiğe sertlik sağlamanın yanı sıra, kemiğin yaş ağırlığının yaklaşık %65-70'ine katkıda bulunan inorganik matris, bir iyon rezervuarı görevi görür. Toplam vücut kalsiyumunun yaklaşık %99'u, fosforun yaklaşık %85'i ve vücudun sodyum ve magnezyumunun %40 ila 60'ı kemiklerde depolanır (Yılmaz ve diğ. 2019).

Biyolojik HA, diğer iyonların varlığından dolayı stokiometrik olmayan ve zayıf kristalli bir malzemedir. İnsan sert dokularının inorganik fazlarının ve katkısız sentetik HA'nın bileşimleri Tablo 2.3'de verilmiştir. Yüksek oranda kristalize sentetik HA, kemik rejenerasyonundan daha yavaş oranlarda emilir. Bundan dolayı, yeniden kemik oluşum hızı dikkate alındığında amorf yapıda veya zayıf kristalli HA seramikler tercih edilir (Ambrosio ve diğ. 2001).

Tablo 2.3: Erişkin-insan kalsifiye dokularının ve katkısız sentetik HA'nın inorganik fazlarının bileşim parametreleri (Dorozhkin ve Epple 2002).

Kompozisyon	Mine	Dentin	Kemik	HA
Kalsiyum [ağırlıkça %]	36,5	35,1	34,8	39,6
Fosfor [ağırlıkça %]	17,7	16,9	15,2	18,5
Ca/P (molar oran)	1,63	1,61	1,71	1,67
Sodyum [ağırlıkça %]	0,5	0,6	0,9	-
Magnezyum [ağırlıkça %]	0,44	1,23	0,72	-
Potasyum [ağırlıkça %]	0,08	0,05	0,03	-
Karbonat [ağırlıkça %]	3,5	5,6	7,4	-
Florür [ağırlıkça %]	0,01	0,06	0,03	-
Klorür [ağırlıkça %]	0,30	0,01	0,13	-
Toplam inorganik [ağırlıkça %]	97	70	65	100
Toplam organik [ağırlıkça %]	1,5	20	25	-
a-ekseni [Å]	9,441	9,421	9,41	9,430
c-ekseni [Å]	6,880	6,887	6,89	6,891

2.4.3 Sentetik Apatit

Kemik mineralinin kimyasal üretimi olan sentetik HA, $M_{10}(XO_4)_6Y_2$ genel formülüne sahip inorganik kristalli bileşiklerden biridir. M genellikle Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} gibi iki değerlikli bir katyondur, ancak Na^+ , K^+ ve Al^{3+} gibi tek değerli ve üç değerlikli katyonlar da buraya dahil edilebilir; XO_4 genellikle PO_4^{3-} ve AsO_4^{3-} 'dir, ayrıca, SiO_4^{3-} , CO_3^{2-} ve SO_4^{2-} olası ikamelerdir; Y tek değerli bir anyondur: OH^- , F^- , Cl^- , Br^- (Boanini ve diğ. 2010). Buna dayanarak, bilim adamları, çeşitli iyonların HA'nın yapısına farklı amaçlarla katkılanması ve ortak katkılanması üzerine çalışmışlardır.

HA'nın kristal yapısı P ve Ca iyonlarının stokiometrik bileşimidir, birim hücre boyutları $a=b=9.42\text{Å}$ ve $c=6.88\text{Å}$ olan altıgen bir yapıya sahiptir (Şekil 2.5'deki ek küçük görsel). HA yapısının çerçevesi esas olarak iki bölgeye dağılmış on adet Ca^{2+} atomundan oluşur, birim hücredeki on Ca^{2+} iyonundan dört tanesi Ca (I) bölgesinde, diğer altısı ise birim hücrenin köşelerinde OH^- gruplarıyla çevrili Ca (II) bölgesinde bulunur.

2.4.4 Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri

HA, kimyasal öncüler ve doğal kaynaklar kullanılarak kuru yöntemler, ıslak yöntemler ve yüksek sıcaklık yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle sentezlenebilir (Sedat-Shojai ve diğ. 2013). Sentez işlemi boyunca kullanılan koşullara bağlı olarak farklı kristallik, boyut, morfoloji ve saflıkta HA ortaya çıkar. Bu nedenle, HA'nın özellikleri mekanik gücü, biyouyumluluğu ve biyolojik özellikleri önemli ölçüde etkiler (Sathiyavimal ve diğ. 2020). Çalışma parametrelerini uygun şekilde düzenleyerek, kişiye özel HA nanoparçacıklarını sentezlemek mümkündür. Aşağıda HA sentez yöntemi ana hatlarıyla belirtilmiş olsa da ayrıntıları verilen ıslak yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4.4.1 Islak Yöntem

Islak yöntemler çökeltme yöntemi, sol-jel yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga yöntemi ve sonokimyasal yöntem olarak sınıflandırılır. Tüm bu yöntemlerin başlıca özellikleri aşağıdaki bölümde detaylandırılmıştır.

2.4.4.1.1 Çöktürme Yöntemi

Çöktürme yöntemi, HA sentezinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, öncülerin (spesifik molar oran) damla damla kontrollü bir şekilde kademeli olarak ve belirli süre boyunca sürekli karıştırılmasını içerir. Alkali pH, asit/baz ilavesiyle ve oda sıcaklığından orta dereceli yüksek sıcaklığa kadar korunmalıdır. Reaksiyon karışımını belirli bir süre (yaşlandırma) beklettikten sonra, elde edilen çökelti, reaksiyona girmeyen bileşenleri çıkarmak için suyla yıkama yapılarak santrifüjleme ile ayrılmalıdır. Ardından, çökelti, kurutulmuş HA nanoparçacıkları elde etmek için belirli bir sürede ve sıcaklıkta fırında kurutulur. Daha sonra toz haline getirilmiş HA'yı elde etmek için ezilir. HA'nın yapısı ve özellikleri, Ca/P oranına, sıcaklığa, pH'a, öncülerin damla damla eklenmesine ve ilave spesifik dağıtıcılara bağlıdır. Bu yöntemin başlıca avantajları, düşük maliyetli olması, düşük reaksiyon sıcaklığına ihtiyaç duyması, işlem kolaylığı sağlaması ve yüksek saflıkta ürün elde edilmesi olarak sayılabilir. Dezavantajları, düzgün olmayan parçacıkların oluşumu ve aglomerasyondur. Sıcaklık, pH, süresi, ön maddelerin yavaş eklenmesi, spesifik dağıtıcılar ve çoklu yıkamalar gibi işlem parametrelerinin hassas kontrolü genel olarak saflığı iyileştirir (Mohd Pu'ad ve diğ. 2020).

2.4.4.1.2 Sol-jel Yöntemi

Sol-jel yöntemi, yüksek tekrarlanabilirlik, saflık ve tanımlanmış morfoloji ile basit işleme koşullarında HA ve kompozitlerini hazırlamak için güçlü bir yöntemdir. Bu, diğer geleneksel işlemlere kıyasla ılıman ortam altında fosfat ve kalsiyum öncülerinin bir mineralizasyon yöntemidir. Jel oluşumu ve HA'nın büyüme hızı, pH'a ve sıcaklığa, işlem sırasında kullanılan çözücü tipine, kullanılan öncüllere bağlıdır. Bu

parametrelerin kontrol edilememesindeki yanlışlıklar, işlem sırasında kalsiyum içeren safsızlıkların oluşmasına neden olur (Fihri ve diğ. 2017).

2.4.4.1.3 Hidrotermal Yöntem

Yaygın olarak kullanılan bir başka prosedür, ortam koşullarından daha yüksek bir sıcaklık ve basınçta fosfat ve kalsiyum öncüleri arasındaki kimyasal reaksiyonları içeren hidrotermal yöntemdir. Bu yöntem, HA'nın yapısını değiştiren/destekleyen birkaç organik çözücü, dağıtıcı, yüzey aktif madde, kalıp vb. varlığında veya yokluğunda ilerler. Reaksiyonlar bir otoklav veya bir basınçlı kap içinde meydana gelir. Genellikle bu yöntem, çökeltme ve sol-jel yöntemleri gibi diğer geleneksel yöntemlerle birleştirilir. Hidrotermal yöntemin yüksek oranda kristal ve stokiometrik HA üretebileceği bildirilmiştir (Zhang ve Zhang 2011). HA'nın kristallliği, gözenekliliği ve morfolojisi reaksiyon kabının basıncını ve sıcaklığını uygun şekilde kontrol ederek değiştirilebilir (Fihri ve diğ. 2017).

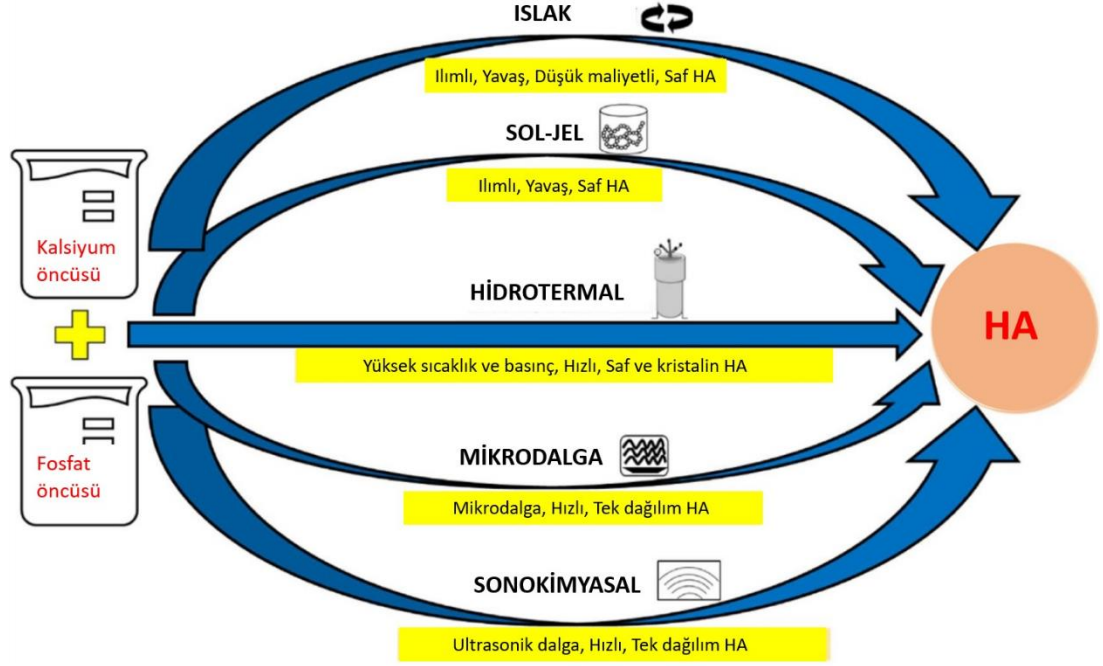
2.4.4.1.4 Mikrodalga Yöntemi

HA'nın geleneksel sentez yöntemlerinin yüksek sıcaklık, yüksek maliyet ve basınç gibi birkaç dezavantajı vardır. Mikrodalga ışımaları hızlı bir ısıtma kaynağı olarak hizmet eder ve kısa sürede tekdağılımlı HA nanoparçacıklarını sentezleyebilir. Ayrıca, mikrodalga yöntemleri enerji açısından oldukça verimlidir. Bu yöntem aynı zamanda HA'yı hızla sentezlemek ve üretkenliği artırmak için geleneksel yöntemlerle (mikrodalga-çökeltme, mikrodalga-sol-jel, mikrodalga-hidrotermal, mikrodalga-yanma, vb.) entegre edilmiştir (Kalita ve Verma 2010).

2.4.4.1.5 Sonokimyasal Yöntem

Bu yöntem, HA sentezi için ultrasonik radyasyon kullanan çok hızlı ve enerji açısından oldukça verimlidir. Ultrasonik dalgalara maruz kalma süresindeki artışın, tekdağılımlı parçacık boyutu sahip küçük, çubuk benzeri HA nanopartikülleri ürettiği bildirilmektedir. Ayrıca ultrasonik dalgalarda sentez sırasında faz geçişini tetikler.

Örneğin, 20 kHz'lik uzun süreli ultrasonik radyasyon, kalsine kireçtaşı ve H₃PO₄'ten HA sentezlerken monetitten HA fazına faz geçişini indüklemiştir (Klinkaewnarong ve Utara 2018). Sonikasyon süresinin yanı sıra, ultrasonik güç de HA morfolojisinde önemli bir rol oynar (Deng ve diğ. 2019). Önemli özellikleriyle birlikte verilen ıslak sentez yönteminin bir özeti Şekil 2.6'da gösterilmektedir. Ayrıca, Tablo 2.4, HA'nın birkaç ıslak yöntem sentezini listelemektedir.



Şekil 2.6: HA'nın çeşitli ıslak yöntem sentezlerinin bir özeti (Varadavenkatesan ve diğ. 2021).

Tablo 2.4: Hidroksiapatitin ıslak yöntem sentezi (Varadavenkatesan ve diğ. 2021).

Sentez Yöntemi	Öncüler	Morfoloji ve Boyut
Islak	Ca(OH) ₂ ve H ₃ PO ₄	Küre & 0,2 – 0,3 µm
Islak	Ca(NO ₃) ₂ ve amonyum fosfat	Çubuk ve 20–100 nm
Sol-jel	Ca(NO ₃) ₂ ve amonyum fosfat	Çubuk ve 10–60 nm
Hidrotermal	Ca(NO ₃) ₂ ve amonyum fosfat	Küre ve 1,7 µm
Hidrotermal	Ca(NO ₃) ₂ ve amonyum fosfat	Çubuk ve 10–16 nm
Mikrodalga	CaCO ₃ ve Na ₂ HPO ₄	Küre ve 3–10 µm
Mikrodalga	Ca(NO ₃) ₂ ve H ₃ PO ₄	-- & 10–16 nm
Sonokimyasal	Kireçtaşı ve H ₃ PO ₄	İğne & 7,4 nm

2.4.4.2 Doğal Kaynaklardan Hidroksiapatit Sentezi

Yukarıda bahsedilen ıslak yöntemler, HA nanoparçacıklarının hazırlanması için hem fosfat hem de kalsiyum öncülerini gerektirir. Çoğunlukla, safsızlık oluşumunu azaltmak için öncüllerin saf formu tercih edilir. Bununla birlikte, yumurta kabukları, su canlılarının kabukları, çeşitli hayvan/balık/kuş kemikleri, az sayıda su bitkisi ve bazı endüstriyel atıklar gibi doğal olarak bulunan biyo-kaynaklar, kalsiyum öncüsü kaynağı olarak kullanılabilir. Doğal olarak oluşan kaynakların ikamesi sadece maliyeti düşürmekle kalmaz, aynı zamanda atıkların arıtılması ve değerli bileşiklerin geri kazanılması için oldukça yarar sağlar. Ek olarak, doğal kaynaklardan elde edilen HA, insan kemiğinin özelliklerini taklit eder ve dolayısıyla biyolojik olarak uyumlu ve biyoaktiftir (Akram ve diğ. 2013). Bu nedenle, doğal kaynaklardan elde edilen HA, ortopedik ve diş implantları gibi biyomedikal uygulamalarda önemli bir rol oynar.

2.4.4.2.1 Omurgalı Kemiklerinden Hidroksiapatit Sentezi

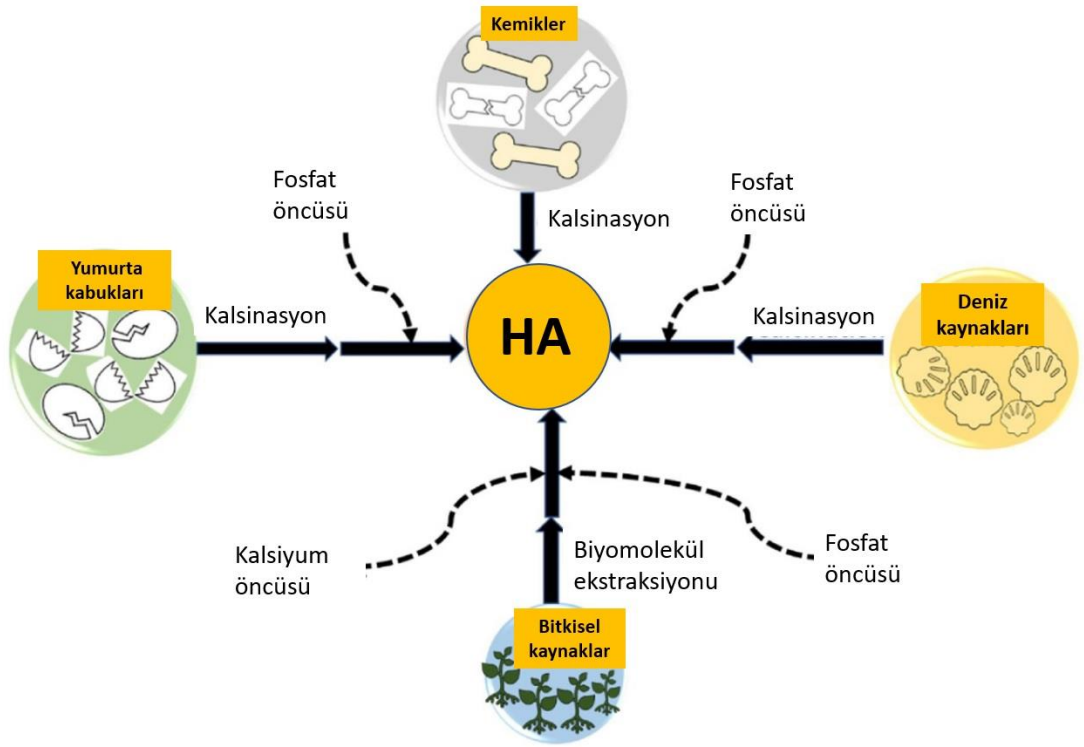
HA üretimi için doğal kaynak olarak deve, at, inek, domuz gibi hayvanlardan elde edilen memeli kemikleri kullanılmaktadır. Özellikle, insan kemiği apatitine fizikokimyasal benzerliği nedeniyle sığır kemikleri daha çok tercih edilmektedir. Genel olarak, sığır kemiklerinden HA üretimindeki ilk adım, belirli bir süre boyunca yağ proteinlerini, kiri, kemik iliğini ve yumuşak dokuları uzaklaştırmak için kesme, yıkama ve kaynar su ile temizlemeyi içeren ön işlemdir. Bazen yapışkan bileşenleri çıkarmak için aseton, kloroform, yüzey aktif maddeler ve alkali çözeltiler gibi organik çözücüler kullanılır. İkinci adım, organik bileşikleri tamamen ortadan kaldırmak ve tanımlanmış bir yapısal HA sentezlemek için temizlenmiş kemiklerin çok yüksek sıcaklıktaki fırınlarda kalsinasyonudur (Sun ve diğ. 2017).

HA'nın özellikleri, sentez sırasında kullanılan kalsinasyon sıcaklığına ve süresine bağlıdır. Genel olarak, kalsinasyon sıcaklığındaki artış, daha az gözenekli saf, yüksek kristalli HA verir. Literatüre göre, sığır kemiklerinde bulunan organik kısımların tamamen uzaklaştırılması için 700°C'nin üzerindeki kalsinasyon sıcaklığı tercih edilmektedir (Khoove diğ. 2015).

Balık tüketimindeki artış, önemli miktarda kalsiyum, fosfat, karbonat kaynağı olan balık kemikleri ve pulları gibi önemli miktarda atık üretir (Mohd Pa'ud ve diğ. 2019). Bu atıklardan HA'nın hazırlanması, sentez sürecinin genel maliyetini düşürür ve üretilen katı atıkları azaltır. Sığır kemiği ön işlemindeki aşamaya benzer şekilde, balık kemikleri ve pulları, içlerinde bulunan et ve kalıntıları gidermek için ön işlemden geçirilir. Daha sonra ön işlem görmüş balık kılıcı kalsinasyona tabi tutulur. Son zamanlarda, farklı sıcaklıklarda (200–1200°C) kalsinasyon yoluyla HA çıkarmak için *Lates calkarifer* kemikleri kullanılmıştır (Pal ve diğ. 2017). 800°C'den daha yüksek sıcaklıkların, karbonat ve kolajen gibi herhangi bir safsızlık olmadan oldukça saf HA ürettiğini göstermişlerdir. Ön işlem, eti yok etmek için kaynar suda temizlenmeyi, ardından 24 saat boyunca 80°C'de bir fırında kemiklerin temizlenmesini kapsar. Elde edilen HA'nın, sentetik HA'ya yakın bir stokiometrik Ca/P orana sahip olduğu görülmüştür.

2.4.4.2.2 Yumurta Kabuklarından Hidroksiapatit Sentezi

Yumurta kabukları HA sentezi sırasında kalsiyum ikamesi olarak kullanılabilen kalsiyum karbonattan ($\approx 94\%$) oluşur (Kumar ve diğ. 2012). Temel adımlar, yumurta kabuklarının temizlenmesini, CaO oluşturmak için ham kabukların kalsinasyonunu ve CaO'nun Ca (OH)₂'ye dönüştürülmesinin ardından trikalsiyum fosfat (TCP) üretmek için Ca(OH)₂ ve uygun fosfor öncüsü arasında bir reaksiyonu içerir. Sonunda, TCP ve CaO arasındaki reaksiyon HA nanoparçacıkları verir. Yumurta kabuğu dışında, deniz tarağı kabuğu, midye kabuğu, istiridye kabuğu, yengeç kabuğu ve salyangoz kabuğu gibi diğer kalsiyum açısından zengin çeşitli doğal kaynaklardan HA sentezinin bir özeti Şekil 2.7'de gösterilmektedir (Varadavenkatesan ve diğ. 2021).



Şekil 2.7: Doğal kaynaklardan HA sentezi (Varadavenkatesan ve diğ. 2021)

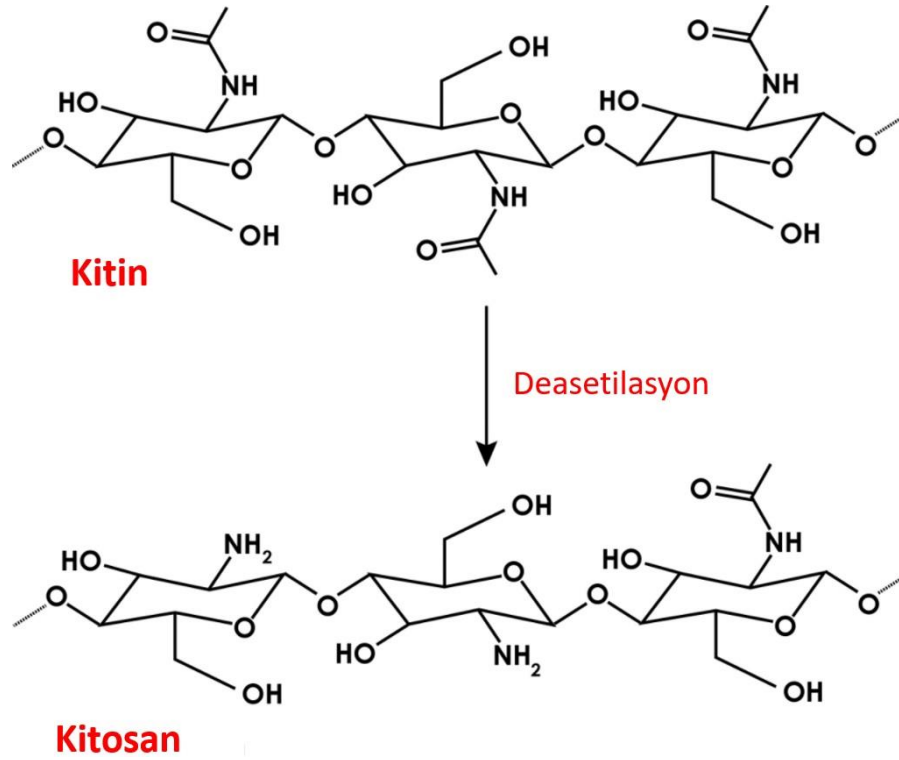
2.4.4.2.3 Bitkisel Kaynaklardan Hidroksiapatit Sentezi

Yukarıda özetlenen doğal kaynaklar, HA sentezi için öncüllerin yerine geçme rolü oynar. Bunun aksine, bitki kaynaklarının çeşitli kısımları öncülerin yerine geçmez, ancak bitki özütlerinde bulunan çeşitli biyomoleküller HA boyutunu etkiler. Pektin gibi çeşitli bitki kaynaklarından elde edilen biyomoleküller, HA'nın morfolojisini, kristal yapısını, boyutunu kontrol etme konusunda yardımcı olabilir (Gopi ve diğ. 2015). Örneğin, muz kabuğundan elde edilen pektin, düşük kristalli, saf, küresel (35-55 nm) ve düzgün dağılmış HA nanoparçacıklarının oluşumuna yardımcı olmuştur (Gopi ve diğ. 2015).

2.5 Kitosan

Kitin, (β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin), doğada en bol bulunan doğal bir polimerdir. Karideslerin, böceklerin, yengeçlerin kütiküllerinin ve mantarların hücre duvarlarının dış iskelelerinde bulunabilir (Younes ve Rinaudo 2015). Biyomedikal

uygulamalar için kitin, kimyasal veya enzimatik hidroliz yoluyla deasetillenmiş türeği olan kitosan'a dönüştürülür (El Knidri ve diğ. 2020) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan (Jayakumar ve diğ. 2010).

Deasetilasyon derecesi yükseldikçe (tipik olarak %85'in üzerinde), kitinin içindeki asetil gruplarının amin gruplarına dönüşmesi o kadar yüksek olur, haliyle kitosan kalitesi de o kadar yüksek olur. Pek çok polisakkaritten farklı olarak kitosan, bulundurduğu amino grupları nedeniyle pozitif yüklü bir biyopolimerdir. Kitosanın modifikasyonu; çapraz bağlama, aşılama, kompleksleştirme ve fonksiyonel gruplar yardımıyla polimerler ile harmanlama gibi farklı fiziksel veya kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilebilir (Jouyandeh ve diğ. 2018). Ayrıca kitosan, poli anyonlarla güçlü elektrostatik etkileşimler yoluyla bir polielektrolit kompleks oluşturulabilir veya trifosfat anyonları üzerinde fosfat grupları gibi negatif yüklü gruplarla nanoparçacıkların oluşumunda görev alabilir.

Kitosanın polimer zincirleri arasında, güçlü moleküller arası hidrojen bağları bulunur ve bu özelliğinden dolayı suda neredeyse çözünmeyen katı amorf bir biyopolimer özelliği gösterir (Lizardi-Mendoza ve diğ. 2016). Bu polisakkarit, amino gruplarının protonasyonunun özelliği olarak pH'ın 6 seviyelerinin altında olduğu zaman sulu çözeltide çözülebilir. Ayrıca, kitosan bir çeşit kimyasal modifikasyonlarla

yapısına karboksimetil grubunun bağlanması ile katyonik yapısını korurken bazik çözeltilerdeki çözünürlüğünü belirgin şekilde artırır (Alves ve Mano 2008).

2.5.1 Kitosanın Fizikokimyasal Özellikleri

Kitosan, viskozite, farklı araçlarda çözünürlük, film oluşturma, şelasyon, polielektrolit davranış gibi çok çeşitli farklı özellikleri ile bilinir. Kitosanın dallanmamış ve lineer formunun mükemmel bir viskoziteye sahip olduğu bulunmuştur; kitosanın viskozitesi, deasetilasyon seviyesi değiştirilerek kontrol edilebilir. Kitosanın yapısı, fizikokimyasal özelliklerini etkilediği için büyük önem taşımaktadır. Kitosanın ayırt edici özelliği, düşük kristalli bölge içeriği ve yüksek derecede deasetilasyonur. Bu özellik, örneğin eczacılık ve biyoteknoloji gibi çeşitli pratik uygulamalar için onu cazip bir aday haline getirir. Kitosanın fizikokimyasal özellikleri, kristallik, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi (DD), bozunma yöntemleri gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Ghosh ve Ali 2011). Çeşitli moleküler ağırlığa göre, ticari olarak temin edilebilen kitosan, yüksek moleküler ağırlıklı kitosan ve düşük moleküler ağırlıklı kitosan olarak derecelendirilebilir. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan, DD > %75 ile 190 ila 375 kDa arasında değişirken, düşük moleküler ağırlıklı kitosan, DD < %75 ile 20 ila 190 kDa arasında değişir. Kitosanın bozunma hızının, DD ile ters orantılı olduğu, asetil gruplarının düzenine ve dağılımına da bağlı olduğu keşfedilmiştir. Daha yüksek DD, daha düşük bir bozulma oranı gösterirken, daha düşük DD, daha hızlı bir bozulma oranı gösterir (Dash ve diğ. 2011). Kitosan üç reaktif duruştan oluşur; her glikozidik bölgede bir amino grubu ve iki hidroksil grubu bulunur. Amino grubu, pH'a duyarlı olduğu için kitosanın katyonik doğasından ve çeşitli fizikokimyasal özelliklerinin düzenlenmesinden sorumludur. Öte yandan, amino grubu pH 6'dan daha yüksek bir seviyede protonsız hale gelir ve kitosan çözünmez özellik kazanır (Kumirska ve diğ. 2011). Ayrıca çözünürlüğü, deasetilasyon yöntemlerine, zincir boyunca asetil gruplarının konumlandırılmasına ve iyonik güce bağlıdır. Asidik bir pH'da kitosan, birkaç metal iyonu için şelasyon özellikleri gösterme yeteneğine sahiptir. Şelasyon, serbest amino gruplarında (pH, nötr seviyelerine yakın) veya protonlanmış amino gruplarında (asidik çözeltiler) elektrostatik çekim ile gerçekleşir.

2.5.2 Kitosanın Biyolojik Özellikleri

Çeşitli çalışmalar kitosan'ın toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olduğunu göstermiştir. Kitosan ve türevleri, anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-mantar, anti-bakteriyel, hemostatik ve analjezik gibi elverişli biyolojik özellikler sergiler (Bagheri-Khoulenjani ve diğ. 2009).

Birçok çalışma, kitosanın, bakterilerin hücre duvarında bulunan negatif yüklü lipitler ve proteinler arasındaki etkileşime giren katyonik doğası nedeniyle çeşitli hastalıklara neden olan bakteriler üzerinde olağanüstü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kitosanın hücre zarına difüzyonu, zarın geçirgenliğinin genişlemesine ve bozulmasını destekler, bu da sonuçta sitoplazmik sızıntısına ve bakteriyel hücre ölümüne neden olur. Yapılan çeşitli *in vitro* deneylerde, kitosanın antibakteriyel özelliğinin DNA bağlanma kapasitesinden kaynaklanabileceği incelenmiştir. Kitosanın bakteri çekirdeği ile temas ettiğinde DNA ile birleşerek mRNA sentezini engellediği belirtilmiştir (Elsabee ve Abdou 2013; Kong ve diğ. 2010).

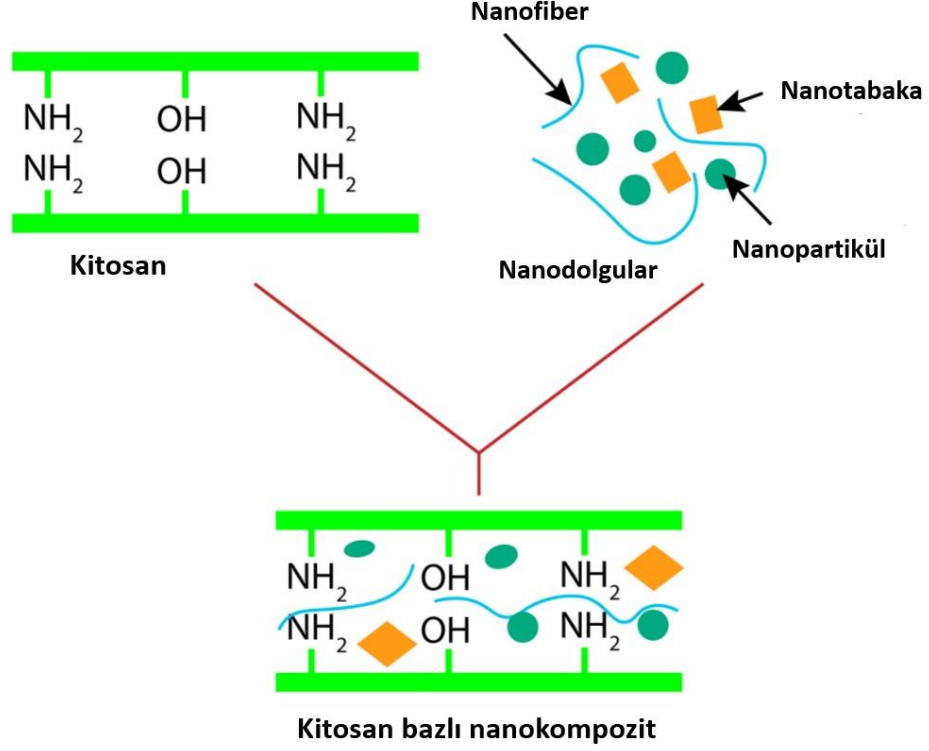
Kitosanın mantar önleyici özelliği, hücre zarının negatif yüklü fosfolipitleri ile yaptığı elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Hücre zarı bozulduğunda, kitosan hücreye nüfuz edebilir ve DNA/RNA sentezini engelleyerek hücre ölümüne neden olabilir. DD ve moleküler ağırlık, kitosanın mantar önleyici özelliklerini düzenlemede önemli rol oynar. Genellikle, DD yükseldikçe ve moleküler ağırlık küçüldükçe kitosanın mantar önleyici etkisi artar (Verlee ve diğ. 2017).

Kitosan ayrıca, eritrosit birikimini hızlandırarak hemostatik bir etki gösterir (Singh ve diğ. 2017). Kitosan üzerindeki pozitif yük, eritrosit yapışmasını, trombosit yapışmasını ve aktivasyonunu, fibrinojen adsorpsiyonunu destekler. Kitosanın hemostatik özelliği, polikatyonik içeriğinden ve spesifik olmayan plazma membranına bağlanmasından kaynaklanmaktadır (Wang ve diğ. 2019). Yapılan *in vitro* çalışmalar, kitosanın analjezik etkisinin, yaralanma bölgesindeki inflamatuvar mediatörlerin konsantrasyonunu azaltmak olduğunu göstermiştir. Ayrıca ağrıyı kontrol etmek için iltihaplanma bölgesinden salınan proton iyonlarını da emer (Okamoto 2002).

2.5.3 Kitosan bazlı nanokompozitler

Kitosan, biyolojik çok yönlülüğü, polikationik doğası ve olağanüstü fizikokimyasal özellikleri nedeniyle yıllar içinde araştırmacılar tarafında ilgi çekici olmuştur. Kitosan bazlı biyonanokompozitler, doku mühendisliği ve ilaç dağıtım sistemleri, yara ve yanıkların pansuman tedavilerinde biyomateryaller olarak kullanılmaktadır. Biyoyumluluğu, toksik olmaması ve çok yönlülüğü, çeşitli endüstriyel sektörlerde kullanımlarını teşvik etmiştir. Kitosan, gıda endüstrisinde de uygulama alanı bularak ve antimikrobiyal ambalaj malzemeleri için umut vadeden bir aday haline de gelmiştir. Kitosan moleküllerindeki hidrofobik kısımlar (N-asetillenmiş kalıntılar) ve hidrofilik kısımlar (d-glukozamin) onun emülsiyon sistemleri oluşturmasını sağlar. Bu nedenle gıda endüstrisinde emülgatör olarak kullanılır. Ayrıca, biyonanokompozitler, nanofillerlerin yüzey işlevselliği ve doğası nedeniyle üstün bariyer ve mekanik özellikleri, daha fazla şeffaflık gibi üstün özellikler gösterebilir. Bu durumda, ilgili nanokompozitlerin daha yüksek yüzey alanının yanı sıra daha yüksek en-boy oranına ortam yaratan nano ölçekli dağılım sorumludur. Kitosan içeren bu nano boyutlu biyonanokompozitler, normal nanokompozitlere göre daha sağlam ve kararlı biyonanokompozit matris malzemeleri sergiler. Ayrıca, kitosan bazlı biyonanokompozitler olağanüstü mekanik özelliklere sahip biyoyumlu ve biyoaktif matrikslere benzemektedir (Pillai ve Ray 2012).

Ayrıca biyonanokompozitler, nano boyutlu inorganik dolgu maddelerinin kontrollü koşullar altında biyopolimerik matrikse eklenmesiyle yapılan en uygun hibrit ürünler olarak belirlenmiştir. Kitosan bazlı biyonanokompozitlerin oluşumu Şekil 2.9'de gösterilmektedir. "Biyo" ön eki, biyolojik olarak parçalanabilir ve çevre dostu olduğunu ifade etmek için kullanılır. Kitosan doğal bir biyopolimer olmasıyla ayrıca, doğaya zarar veren sentetik plastik polimerlere karşı çekici bir alternatif haline gelmiştir. En popüler biyopolimer matrisler polinükleik asitler, polisakkaritler, proteinler ve alifatik polyesterler ile nano dolgu maddeleridir. Nanodolgu maddesi olarak genellikle nanotüp-hidroksiapatit, kil nanoparçacıkları, metal nanoparçacıkları ve nanolifler kullanılmaktadır (Kumari ve diğ. 2016).



Şekil 2.9: Kitosan bazlı nanokompozitler (Azmana ve diğ. 2021).

2.6 Jelatin

Kolajenden proteinin hidrolitik bozunması yoluyla oluşan doğal bir polimer olan jelatin, kendine özgü amino asit yapısı ile çeşitli tıbbi faydalar sağlar (Kumosa ve diğ. 2018). Jelatin genellikle granül, tablet veya toz halindedir ve bazen kullanımdan önce suda çözülebilir. Jelatin, araştırmacılar tarafından hücre kültürü için üç boyutlu bir matris ve doku mühendisliği için yapı iskelelerinin bir bileşeni olarak geniş çapta araştırılmaktadır (Zhang ve diğ. 2014). Jelatin, beslenme açısından bazı gıdalarda yüksek protein içeriğine sahiptir ve yağ ile karbonhidratın yerini alabilir. Jelatin protein matrisi kaynağı olarak kolajen, insanlarda ve hayvanlarda en doğal olarak bulunan proteindir. Kolajen, vücudun herhangi bir yerinde bulunur, ancak kemik, cilt, tendonlar ve bağlar en bol olanlarıdır (Bou-Ghariosve diğ. 2020). Genellikle, jelatinin kolajenden sentezi, gıda üretiminde ünlü bir jelleştirici madde olarak bilinen tatsız ve renksiz bir madde üretmek için bir kaynatma durumu veya bir hidroliz reaksiyonu (bazen enzimatik destekli) gerektirir (Deshmukh ve diğ. 2017). Jelatin, yüksek protein ve düşük enerji ile yağ ve kolesterol içermez, ayrıca faydalı koruyucu kolloidler ortaya çıkarır. Genel olarak, ön işlemine göre kolajenden iki farklı tipte jelatin üretilebilir.

Tip A jelatin, pH 6 ila pH 9'da bir izoelektrik nokta olan ve en yaygın olarak domuz derisinde bulunan daha az kovalent çapraz bağlı kolajen için kullanılan bir alkalın muamele jelatinidir. Tip B jelatin, pH 5'te izoelektrik bir nokta olan ve sığır derilerinde bulunan daha karmaşık kolajene uygulanabilen bir asidik muamele jelatinidir (Lv ve diğ. 2019).

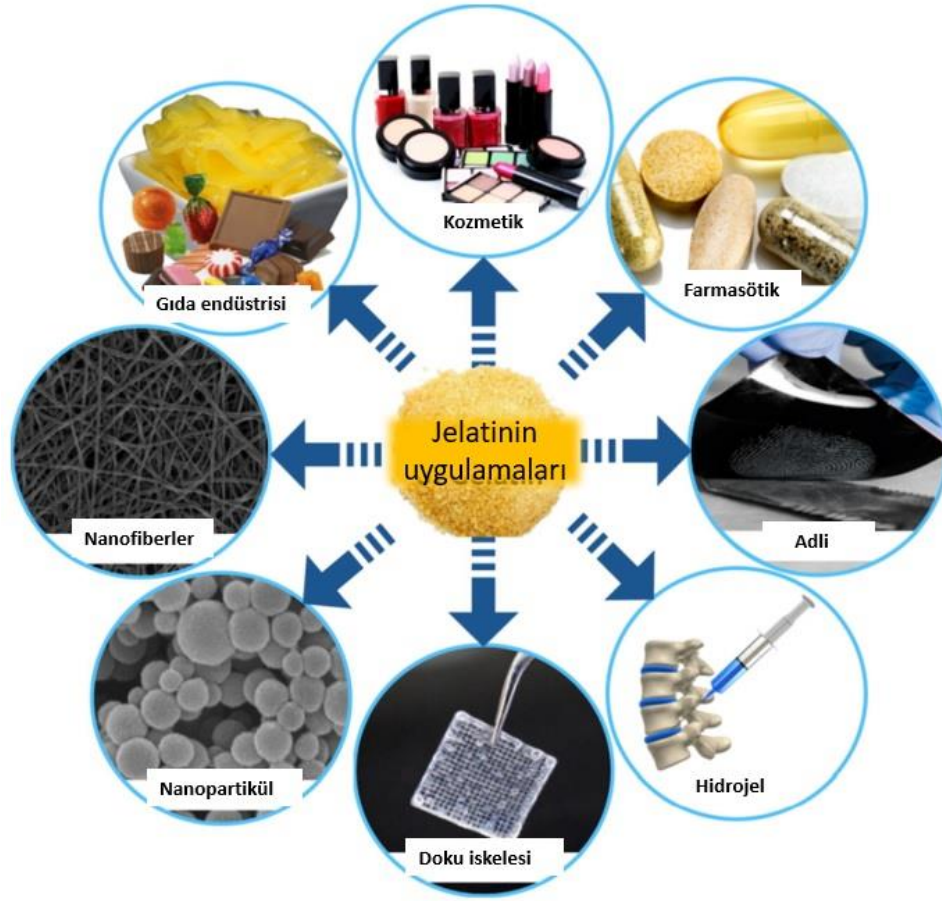
2.6.1 Jelatinin Özellikleri

Kimyasal olarak jelatin, yaklaşık 18 çeşit amino asitten oluşur. Bunların %57'si ana bileşikler olan prolin, glisin ve hidroksiprolindir, geri kalan yaklaşık %43'ü ise alanin, arginin, glutamik asit ve aspartik asit gibi diğer seçkin amino asit aileleridir. Jelatin, %50,5 karbon, %25,2 oksijen, %6,8 hidrojen ve %17 azottan oluşurken, hidrofilik karakterde çift ve tek katlanmamış zincirlerin kompleksine sahiptir (Sultana ve diğ. 2018). Ayrıca jelatinin kimyasal yapısı, β -zincirleri (kovalent olarak çapraz bağlı iki α -zinciri), α -zincirleri (bir polimer/tek zincir) ve γ -zincirleri (kovalent olarak çapraz bağlı üç α -zinciri) gibi farklı polipeptit zincirlerinden oluşur. Sırasıyla, yaklaşık 180×10^3 , 90×10^3 ve 300×10^3 g/mol'lük bir molar ağırlığa sahiptir. Jelatin için, işlem sürecinde ısı artışları yapıyı kolloidlere çözecek, ancak 35 ila 40°C'nin altındaki sıcaklıkta jelatinimsi hale gelecektir. Bununla birlikte, sulu jelatin çözeltisi uzun süre kaynatılırsa, gerçekleşecek olan ayrışmalar neticesinde özellikler değişecek ve soğutmadan sonra tekrar oluşmayacaktır. Ayrıca jelatinin jel kuvveti ve viskozitesi moleküler kütle dağılımı ile değişirken elektrolit durumu, pH ve sıcaklığa göre değişir. Jelatinin viskozitesinin konsantrasyon ile arttırmak için jelatin 4°C'nin altında tutulmalıdır. Fiziksel jelatin ağı, hidrojene bağlı olan bağlantı bölgeleri tarafından bir arada tutulur (Mishra ve diğ. 2017). Fiziksel jelatin jeller, termal tersinir reaksiyonları yüzünden fizyolojik sıcaklık ve üzerinde stabil özellik gösteremez. Bu durum doku mühendisliği veya ilaç dağıtımı için kullanımı sınırlayacaktır (Bello 2020). Bu nedenle, bu sorunu çözmek adına ve jelatin jelleri stabilize etmek için enzimatik ya da kimyasal çapraz bağlama prosedürleri revaçtadır. Jelatin içindeki amino asit dizisi, jelatine has özellikler veren ayırt edici bir dizidir. Tendon, kemik ve deri gibi hayvan dokularından yapılan kolajenin hidrolizi, amino asit üretiminin önemli bir kısmıdır. Uygun görülen kimyasal reaksiyon içeren ön işlem, jelatin sentezi için yeterli kolajen çözünürlüğü ve şişme sağlamak amacıyla kovalent olmayan bağları bozacaktır.

Hidrojen ve hidrofobik bağların yok edilmesi, üçlü sarmal yapıyı kırma, zincirleri çözme ve ardından moleküllerin daha küçük parçalara ayrılmasını sağlamaya yatkındır (Sockalingam ve diğ. 2016). Bunların sonucu olarak, hidrojeni ve üçlü sarmal formunu stabil durumda tutan kovalent bağları, kolajeni çözünür jelatine dönüştürmek için jelatinin dönüştürülmesinden kaynaklanan sarmal bir forma ayırarak mümkündür (Hosseini ve diğ. 2015). Genel hatıyla anlatılmak istenirse, jel kuvveti, yüksek dağılılabirlik, afinite, düşük viskozite özellikleri, dağılma kararlılığı ve su tutma gibi üstün fiziksel özelliklere sahiptir. Ayrıca jelatin bir çeşit köpürtücü ve koyulaştırıcıdır, bu nedenle emülgatör olarak kullanımı geniş yer kaplar (Wonganu 2020).

2.6.2 Jelatinin Kullanım Alanları

Genel olarak jelatin uygulamaları Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Tıp sektöründe jelatin, nanolifler, farmasötik katkı maddeleri, hidrojel, nanomikrosfer kaplar ve hücre nakli taşıyıcıları alanlarında kullanılır. Mikro/nano partikülleri aracılığıyla farklı ilaçların kapsüllenmesinde de kullanılmaktadır (Ma ve diğ. 2016). İlaç ve tıp sektöründe enjeksiyonla ilaç dağıtım mikroküreleri, intravenöz infüzyonlar ve implantlar için bir matris olarak kullanılmaktadır. Ayrıca jelatinin oral tüketimi kemik sağlığını ve eklemi iyileştirebileceği öne sürülmektedir (Gomez-Guillen ve diğ. 2011). Jelatin, hemostaz (kanamayı önleme) konusunda tıp alanında oldukça önem teşkil eder. Trombin ve jelatin kanama olan bölgede pıhtı görevi görebilir. Şişen jelatin partikülleri, kan akışını sınırlayarak kanamalı bölgenin çevresinde mekanik olarak kararlılığı olan bir matris oluşturmak adına bir fibrin pıhtısı için bir alan sağlayabilir (Liu ve diğ. 2015). Ayrıca, Zeng ve diğerleri (Zeng ve diğ. 2015) derin yaralanmalarda hücreleri yara dokusunun derin kısımlarına taşıyan derin yara tedavi sürecinde hücre tedavisini iyileştirmek için enjekte edilebilir jelatin mikrokriyojeller geliştirdiler. Bu yöntem, bölgesel hedefli ve en az yan etkilere sahip derin bir yara tabakasına enjekte etmek için bir mikro şırınga iğnesi kullanılmaktadır.



Şekil 2.10: Jelatinin uygulama alanları (Mishra ve diğ. 2017).

Soğuk sularla yaşam süren balıklardan elde edilen jelatin, bünyesinde düşük prolin, amino asitler ve hidroksprolin barındırır. Balıktan elde edilen jelatinin kalitesi balığın fonksiyonel özelliklerine ve saflığına bağlıdır. Balık jelatininin osteotropik bir işlevi vardır. Osteoporoz, genellikle yatalak olma ve engelli olma riski taşıyan kişileri etkileyen bir hastalıktır (Blakely ve Johnson 2019). Buna göre, balıktan elde edilen jelatin, osteoporoz hastalarına alternatif faydalar sağlamak adına kemik iliği yoğunluğunu artırabilen doku yenilenmesini indükler. Ilık su balıklarından ekstrakte edilen jelatin ise, domuz jelatinini ile benzer özellikler göstermektedir. Bu arada, su ile muamelede mekanik mukavemet kolayca zayıflayabilir ve jelatinin sınırlı hidrofilik kullanımına neden olabilir. Bu sorunu çözmek için sıvı yağlar, katı yağlar, mumlar gibi hidrofobik yapılar, su bariyeri özelliklerini desteklemek için kullanılmaktadır (Mishra ve diğ. 2017).

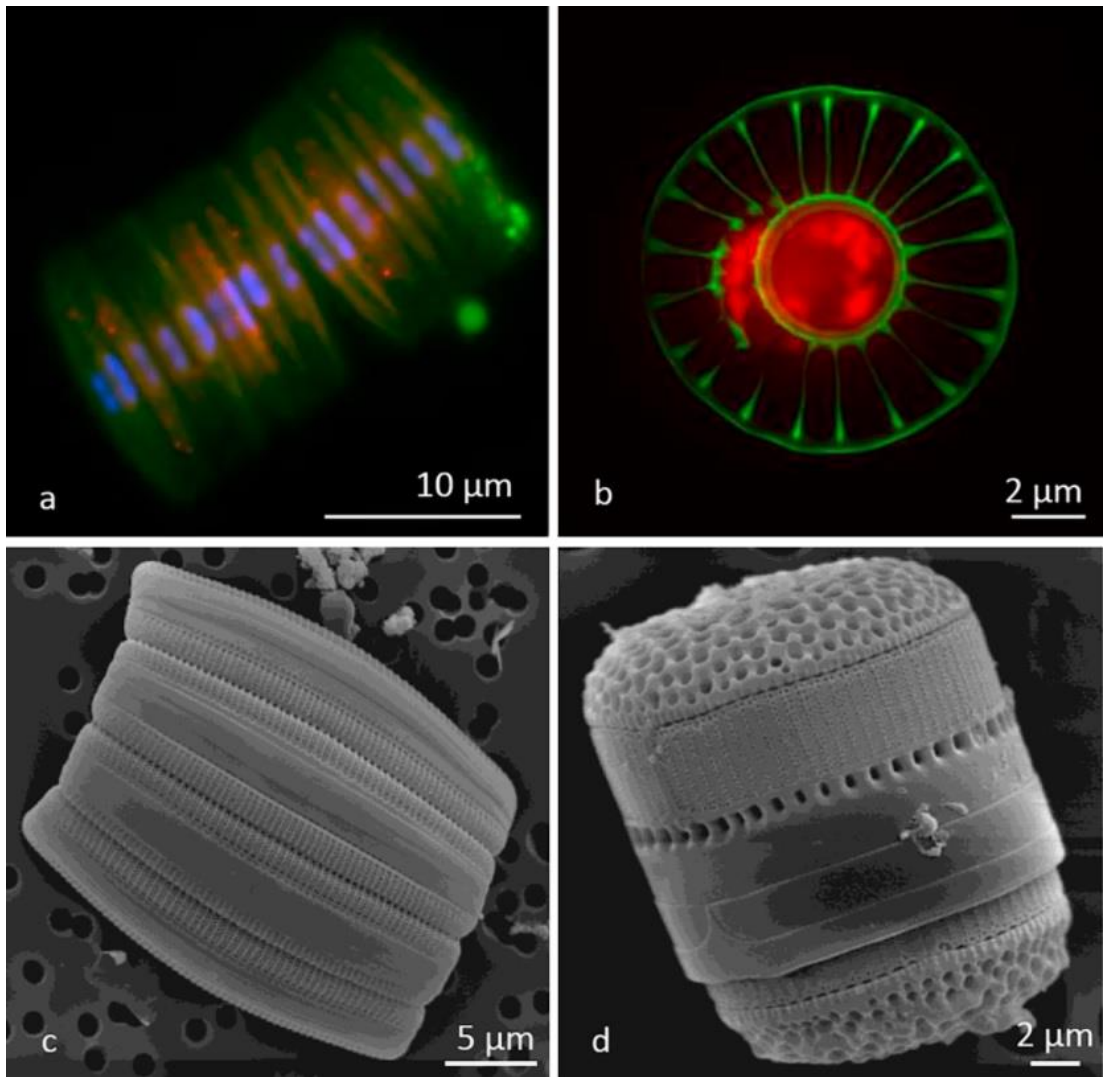
2.7 Diatom

Diatomlar, tatlı ve deniz suları ve nemli toprak dahil olmak üzere neredeyse tüm su habitatlarında bulunan Stramenopile soyunun oldukça çeşitli tek hücreli ökaryotlarıdır. Diatomlar 185 milyon yıl öncesi tarihlere kadar uzanırlar, Kretase dönemi sonlarındaki kitlesel yok oluştan nispeten de olsa zarar görmeden kurtulabilmişler ve Cenozoik dönemi sırasında büyük bir çeşitlenme geçirmişler ve bu da onların okyanuslardaki ana fitoplankton gruplarından biri haline gelmelerine yol açmıştır (Kooistra ve Medlin 1996; Lazarus ve diğ. 2014). Yaklaşık 1 milyar yıl önce bir heterotrofik ökaryotik konağın fotosentetik ökaryotik hücreleri evcilleştirdiği seri ikincil endosimbiyozdan türediği düşünülmektedir (Keeling 2010).

Diatomlar da zorunlu fotosentetiktir. Tahminlere göre, okyanustaki birincil üretimin yaklaşık %40'ına ve küresel karbon fiksasyonunun %20'sine katkıda bulunmaktadır (Field ve diğ. 1998). Bu nedenle, deniz gıda ağlarında organik karbon sağlayan ve aynı zamanda küresel karbon döngüsüne katkıda bulunan çok önemli bir yapıdır. Diatomlar ayrıca, deniz seviyesine göre bile değişen, früstül olarak bilinen özenli şekilleri olan, amorf silikadan oluşan hücre duvarlarına sahiptir (Huysman ve diğ. 2010). Diatomlar, karbon dönüşümüne ciddi katkıda bulunur ve jeolojik zaman ölçeklerinde küresel karbon döngüsünden karbonu çıkaran ve nihayetinde petrol ve fosil yakıt rezervlerinin oluşumuna oldukça katkıda bulunan son derece önemli varlıklardır. Ayrıca, silisyumun diatomlardan mineralizasyonu silika biyojeokimyasal döngüsünün önemli bir parçasıdır (Treguer ve De La Rocha 2013). Fosilleşmiş früstüller, jeologlar için değerli paleo gözlem kaynağıdır (Danil De Namor ve diğ. 2012).

Diatom früstülleri, geleneksel diatom taksonomisinin temeli olan ve onları iki sraya ayıran çok çeşitli morfolojiler gösterir (Şekil 2.11): radyal simetriye sahip **centric (sentrik)** (merkezli) diatomlar ve ince elipslerle uzanan **pennate (pinnat)** (iki taraflı simetrik) diatomlardır. Sentrik diatomlar ayrıca kutup merkezli (*Mediophyceae*) ve radyal merkezli (*Coscinodiscophyceae*) olarak ikiye ayrılır. Pinnat diatomlar valfte hareketi kolaylaştıran bir rafenin (diatom kabuğunda bulunan uzunluğuna çizgi, yarı) varlığına ve yokluğuna göre rafid (*Bacillariophyceae*) ve arafid (*Fragilariophyceae*) olarak ikiye ayrılır.

Şekil 2.11’de görüldüğü üzere, diatomların morfolojik çeşitliliği, farklı mikroskopi teknikleriyle ortaya konmuştur. Epifloresan mikroskopi ile gözlemlenen pinnat diatom zinciri (sol üstte) ve bireysel sentrik diatom (sağ üstte). Sağ üstteki resim, yüzdürmeyi kolaylaştırabilen veya yaşam alanlarından koruma sağlayabilen ayrıntılı bir tel benzeri hücre dışı yapı ile karakterize edilen bir açık okyanus cinsi olan *Planktoniella*'ya aittir. Alttaki iki görsel, bir pinnat diatomun (*Fragilariopsis doliolus*) (sol altta) ve bir sentrik diatomun (*Thalassiosira*) (sağ altta) nanoyapılı silisli frustüllerinin taramalı elektron mikrograflarını göstermektedir. Ölçek çubukları belirtilmiştir (Tirichine ve diğ. 2017).



Şekil 2.11: Diatomların morfolojik çeşitliliği.

Diatomlar ayrıca biyoyakıtların, terapötiklerin ve biyopolimerlerin üretimi de dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için ilgi çekicidir (Tanaka ve diğ. 2015). Çoklu doymamış yağ asitleri, polisakkaritler, karotenoidler, vitaminler, steroller (Raposo ve

diğ. 2013), ayrıca aşular ve bunların adjuvanları (Nazmi ve diğ. 2016) gibi çeşitli molekülleri üretmek için moleküler kaynaklar olarak gittikçe daha çok ilgi çekici hale gelmektedir. Günümüzde diatomlardan elde edilen malzemeler, oje, diş macunu, yüzme havuzları ve çeşmeler için filtreler, biyoyakıt, yapı malzemeleri ve organik haşere kontrolü için diyatumlu toprak gibi çok sayıda ürün sağlamaktadır. Diatomların evrimsel, ekolojik ve biyoteknolojik yönleri bilim dünyasında oldukça dikkat toplamış özellikle genomik tarafından sağlanan bilgide somut ilerlemelere yol açan yayınlanmış makalelerde önemli bir artışa yol açmıştır (Tanaka ve diğ. 2015).

2.7.1 Diatom Biyosilika Kaynakları

Diatomdan ayrıştırılan silika, ya fosil diatomlardan ya da mevcutta hala yaşam süren diatomlardan elde edilebilir. Diatom büyümesi için gereken enerji, led bazlı (düşük enerjili) yapay ışık veya güneş ışığı ile sürdürülür. Ayrıca, fosfatlar, silikatlar, nitratlar, vitaminler ve bazı eser elementler gibi alg büyümesi için gerekli besinler nispeten ucuz bir fiyata satın alınabilir ve/veya hatta atık sulardan elde edilebilir. Hem yapay aydınlatma maliyetlerinden hem de güneş ışığının mevsimsel değişkenliğinden kurtulmak için, bu durumda organik substratlar sağlanacak olsa da, hücreler heterotrofik olarak da büyütülebilir (Pahl ve diğ. 2010). Bununla birlikte, karanlık ortamda yalnızca sınırlı sayıda tür büyüyüp gelişebilir (Chen ve Chen 2006). Biyosilika, hücre suyunun giderilmesinden (kültürün tamamının santrifüjlenmesi veya filtrasyonu ile) sonra elde edilir, ardından genellikle güçlü asitler ve yüksek sıcaklıklarla yapılan reaksiyonlara dayanan bir saflaştırma aşaması gelir. Diatomların kamçılı olmaması nedeniyle sınırlı hareketliliği ve yüksek silikon miktarının varlığından dolayı ağır hücre duvarının olması yüzünden diatomların kendiliğinden diplere doğru batmasını arttırır bu durumda hasat hacmini ve dolayısıyla maliyetleri sınırlar böylece biyokütle toplama maliyetini de arttırır.

Diatomlar genel olarak hızlı büyüme özellikleri ve yüksek lipit ve biyokütle üretkenlik özellikleri gösterirler, bu da büyüme koşullarının ayarlanmasıyla daha da geliştirilebilir ve diatomları toplu kültür için umut vadeden ilgi çekici bir adaylar haline getirir (D'Ippolito ve diğ. 2015). En bol bulunan biyosilika kaynağı, kolayca ezilerek ince bir toz haline getirilerek pazarlanabilir bir ürün, yani diyatumlu toprak

haline getirilebilen diatomittir. Diatomit, genellikle bentik (kıyıdan itibaren okyanusun en derin alanına kadar olan okyanus tabanı) ortamlarda bulunan ölü diatom hücrelerinin frustüllerinden yapılır. Bentik ortamlarda doğal olarak bulunan fosil diatom frustüllerin toplanması maliyet bakımından daha uygundur ve biyosilikanın endüstriyel üretimi için umut verici bir başlangıç sağlar. Bununla birlikte, diatomitin bileşimi değişkendir ve saflık oranı genellikle yaşayan kültürden türetilen frustüllerinkinden daha düşüktür. Bu saflık özelliklerinin bolluğu ve kalitesi çevre ve yaşlanma koşullarına göre değişiklik gösterir (Uthappa ve diğ. 2018). Genel itibariyle kil minerallerinin ve silikonun %80-90'ından oluşan diatomit, inşaat malzemelerinin mukavemetini arttırmak için, tarımsal gübre ve kirleticilerde kullanılan sorbent için, plastik ve boyalarda dolgu maddesi yapmak için vb. farklı uygulamalarda hammadde olarak kullanılır. Ek olarak, safsızlıkları filtrelemek için filtrelerde, temizlik ve cilalama ürünlerinde ise aşındırıcı bir madde olarak kullanılır.

2.7.2 Diatom Biosilikanın Ayrılması ve Saflaştırılması

Doğal olarak bulunan diatom mikropartiküllerinde, volkanik gaz, kil, karasal partiküller ve organik maddeler gibi safsızlıklar mevcuttur. Bu safsızlıklar yerel çevre ve yaşlanma koşullarından kaynaklanmaktadır. Bunu engellemek adına uygulamalardan önce izole edilmiş silika mikro kabuk formunda saf diatom elde etmek için bu safsızlıkların mevcut diatomlardan uzaklaştırılması önem teşkil etmektedir (Aw ve diğ. 2012).

Diatomların ayrılması ve saflaştırılmasına dair yöntemler arasında, diatomların toz haline getirilmesi ve piranha çözeltisi tedavisi en yaygın olarak kullanılan saflaştırma işlemidir. Piranha çözeltisinin tercih edilmesi, organik tabakaları çıkarmak için güçlü bir oksitleyici ajan olarak hareket ettiği ve diatomların yüzeyindeki hidroksil gruplarını arttırdığı ve buna bağlı olarak yüzey modifikasyonlarını kolaylaştırmasıdır. Bu uygulama uygun maliyetli, basit ve hızlı arıtma, çevre dostu (solvent kullanılmaz) gibi pek çok üstün özellikler sunar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile, toksik metal iyonlarının sudan uzaklaştırılmasında daha iyi sonuçlar ortaya çıkaran ayırma ve saflaştırma avantajları konusunda diatomları için bu teknik rapor edilmiştir (Patil ve diğ. 2017).

2.7.3 Diatom Biosilikanın Biyomedikal Uygulamalarındaki Biyouyumluluğu

Diatom kaynaklı biyosilika, bir bakıma, ilaç taşıyıcısı olma potansiyeli ve kemik dokusu rejenerasyonu için bir iskele olma potansiyeli ile oldukça yararlı olan bir malzeme haline gelmektedir. Son birkaç yılda biyomedikal uygulamalarda (ilaç salınımı, kemik doku rejenerasyonu) fosil ya da canlı diatomdan türetilen silikanın etkinliği, çeşitli araştırma grupları tarafından ilginç bulunmuş ve araştırılmıştır (Dalgic ve diğ. 2019). Biyosilika bazlı işlemler, yapay yapılara dayalı işlemlere nazaran düşük maliyetli ve çevre dostu alternatifler haline gelebilir. Sentetik malzemelerin üretimi, belirli ve zorlu süreçleri gerektirirken, biyosilika, doğal ve basit şekilde karmaşık yapı oluşumunu tetikleme avantajına sahiptir. Örneğin, optik sensörlerin geliştirilmesinde diatom kaynaklı biyosilikanın kullanılması, enerji maliyetinin uygun bir şekilde kontrol edilmesini ve manipüle edilmesini sağladığından, gelecekte sentetik kristallerin kullanılmasından daha çekici hale gelebilir (Kong ve diğ. 2016). Biyobazlı silika, çevresel açıdan daha yararlı ve sürdürülebilir hızlı yöntemlerle (çözücü içermeyen prosedürler) sentezlenebilir. Böylece tehlikeli kimyasalların kullanımından kaçınılır ve bu kimyasalların atmosfere yoğunlaşma oranlarının iyi bir şekilde kontrol edilmesini sağlar (Albert ve diğ. 2017).

Diatom kaynaklı biyosilika, biyolojik sistemlerle yüksek uyumluluk açısından diğer gözenekli malzemelere kıyasla farklı birçok avantaj sunar (Tramontano ve diğ. 2020). Çeşitli tümör hücreleri üzerinde biyouyumluluk testleri gerçekleştirilmiştir ve bazı önemli örnekler aşağıda rapor edilmiştir.

Hücreler üzerindeki kısa süreli (6-24 saat) zararlı etkileri tespit etmeyi amaçlayan ATP tabanlı bir ışıltama deneyi; diatomit partiküllerinin bu üç kolon kanseri hücre hattında çok düşük toksisiteye sahip olduğunu gösterdi: Caco-2, HT-29 ve HCT-116 (Zhang ve diğ. 2013). Amino ile modifiye edilmiş diatomit nano parçacıklarının insan akciğer epidermoid karsinom hücreleri (H1355) üzerindeki etkisi; MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) tahlili ile değerlendirilmiştir. Diatom partiküllerinin farklı konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca test edilmiş ve sonuçlar yukarıda belirtilen tümör hücrelerine karşı çok düşük sitotoksik etki göstermiştir. Bu durum, işlevselleştirilen diatomit parçacıklarını, gen

ekspresyonunu susturarak insan akciğer epidermoid karsinom hücreleri (H1355) içerisinde küçük enterferans yapan ribonükleik asidi (SiRNA) taşımak için faydalı taşıyıcılar haline getirmiştir (Rea ve diğ. 2014). Biyoyumluluk, normal insan dermal fibroblastları (NDHS) ve Saos-2 osteoblastları gibi kemik hücreleri üzerinde, Thalassiosira weissflogii frustüllerinin 3-merkaptopropil-trimetoksisilan (MPTMS) ile işlevselleştirilmesiyle değerlendirilmiştir. Merkaptokaplı biyosilika, her iki hücre hattının büyümesini, tek başına hücre kültürü hücrelerden bile daha fazla başarılı bir şekilde uyarmıştır (Cicco ve diğ. 2016).

Diatom kaynaklı silikaların biyoyumluluğu, küçük enterferans yapan RNA (siRNA) ile antiapoptotik faktör B hücreli lenfoma/lösemi 2'yi (Bcl2) hedeflemeyi amaçlayan çalışmalarda da değerlendirilmiştir. Silika parçacıklarının amino grupları, tümörle ilişkili genlerin ekspresyonunu aşağı regüle etmek için siRNA ile kompleksleştirilmiştir. Hedef hat A20 murin lenfomasıydı ve aşağıdaki üç farklı metodoloji uygulanarak işlevselleştirilmiş frustüller ve kontroller (tedavi edilmemiş hücreler gibi) arasında sitotoksiklik durumunda hiçbir fark gözlenmemiştir (Martucci ve diğ. 2016).

Yukarıda literatürden verilen bilgiler ile sunulan sitotoksikite analizlerinin çoğu kısa zaman aralıklarında ortaya konmuştur. Daha uzun maruz kalma sürelerinin (21 gün) etkisi, insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) ve sentezlenmiş (yüksek sıcaklıkta kaynaşmış gibi) diatomlara maruz bırakılan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Biyoyumluluk, Calcein-AM boyası ile canlılık deneyleri yoluyla test edilmiş ve çıkan veriler doğal silikonun toksik olmadığını doğrulamıştır. Bu, kaynaşmış diatom frustüllerinin sentetik kemik grefti uygulamaları için uygun bir alternatif olabileceğini düşündürmüştür (Amodo ve diğ. 2020). Silika bazlı cihazların uzun süreli maruziyetinin biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini öngörmek için Terracciano ve arkadaşları diatomit parçacıklarının model organizma *Hydra vulgaris* üzerindeki *in vivo* etkisini araştırmıştır. İşlem görmemiş numuneler ve çıplak frustüllere ve hücreye nüfuz eden peptit [(aminooks)asetil]-Lys-(Arg)9 (hücre sel alımı arttırmak için) ile modifiye edilmiş diatom nanoparçacıklarına maruz kalan hayvanlar 14 gün boyunca izlenmiş ve herhangi bir zararlı etki gözlenmemiştir. Büyüme oranları ve apoptoz tüm koşullarda gözlenmiştir (Sardo ve diğ. 2021).

Özellikle ilaç yükleme ve kemik rejenerasyonu için iskele olarak somut biyomedikal uygulamalar alanında, biyosilikanın toksisitesinin olmadığını kesin olarak tespit etmek için canlı organizmalar üzerinde daha fazla araştırma yapılması zorunludur (Sardo ve diğ. 2021).

3. YÖNTEM

3.1 Materyaller

Kitosan (medium molecular weight) Sigma-Aldrich (product of Iceland)'den satın alındı. Hidroksiapatit (nanopowder), jelatin (from calf skin) ve diatom (suitable for most filtrations) Sigma-Aldrich (product of USA)'den satın alındı. Kitosanı çözmek için kullanılan asetik asit (Glacia, %100 Anhydrous), ISOLAB chemicals (Wertheim, Germany)'den temin edildi. Hidrojellerin çapraz bağlanmasında kullanılan glutraldehit, Merck (USA)'den temin edildi. Hücre kültür çalışmalarında besiyeri olarak kullanılan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma-Aldrich (USA) ve HMDS (Hekzametildisilazan), BRB (product of Netheraland)'den satın alındı. 3T3-L1 hücre hattı Avrupa Onaylı Hücre Kültürleri Koleksiyonu (ECACC)'ndan temin edildi. Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflık düzeyindedir.

3.2 İskelelerin Hazırlanması

3.2.1 Tez Deneyleri Öncesi İlk Yapılan Deneme Çalışmaları

2018 yüksek lisans programımın başlamasıyla ilk kez çalışılacak olan doku mühendisliği alanında yeterli literatür taramaları neticesinde konuya dair taslak niteliğinde bazı deneyler yapılmıştır. Tez deneylerine geçmeden önce bu taslak deneyleri paylaşarak başlangıç ve ilerleme süreci bir nebze de olsa ifade edilmektedir. Aşağıda sırası ile ilk deneme çalışmalarına dair görseller açıklamaları ile verilmiştir.

Deneme 1: kitosan+jelatin ve kitosan+jelatin köpüğü

%1,5'lük kitosan çözeltisi distile suda (%1 asetik asit içeren) çözülmüştür. %10'lük jelatin çözeltisi 1500 rpm'lik devirde karıştırılarak jel ve köpük olarak iki fazlı form oluşturulmuştur. Kitosan:jelatin = 1:1 oranında ve kitosan:jelatin köpüğü=1:1oranında karıştırılmıştır. Kitosan jelatin karışımı çapraz bağlama işlemi

için gluteraldehit ile temas ettiğinde gluteraldehit miktarı fazla geldiği için çok ani katılaşma gerçekleşmiş ve şekil bütünlüğü sağlanamamıştır. Ancak yine de gözlem amaçlı dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Şekil 3.1’de görüldüğü üzere oldukça sert ve gözenekli bir ürün ortaya çıkmıştır. Burada, jelatin hidrojeli içeren gözenekli yapının jelatin köpüğü içeren gözenekli yapıya göre daha sert yapıda olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1: Kitosan/jelatin ve kitosan/jelatin köpüğü gözenekli yapıları.

Deneme 2: kitosan+jelatin+hidroksiapatit

%1,5’luk kitosan çözeltisi distile suda (%1 asetik asit içeren) çözülmüştür. %2’lik jelatin çözeltisi distile suda çözülmüştür. Kitosan:jelatin = 1:1 ve kitosan:jelatin = 1:2 oranında iki farklı çözelti hazırlanmıştır ve bu çözeltilere 0,15 gr hidroksiapatit eklenerek homojen karışıma dek karıştırılmaya bırakılmıştır. Gluteraldehit ile çapraz bağlama yapılarak malzemeler dondurarak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Ancak Şekil 3.2’de görüldüğü üzere liyofilizasyon süresi yetersiz kaldığı için malzemeler cihazdan çıkarıldığında henüz iç kısımlardaki buzların uzaklaşmadığı gözlemlenmiştir. Buzlu bölgeler zamanla, normal koşullarda eriyerek, o bölgelerde içeri doğru çökme meydana getirmiştir.



Şekil 3.2: Kitosan/jelatin gözenekli yapıları.

Deneme 3: kitosan+jeatin+diatom+hidroksiapatit

%1'lik kitosan çözeltisi distile suda (%1 asetik asit) çözülmüştür. %10'luk jelatin çözeltisi distile suda çözülmüştür. Kitosan:jelatin = 1:1 oranında iki çözelti hazırlanmıştır. Karşılaştırma amaçlı çözeltilerden birine %2'lik diatom eklenmiştir. İki çözeltiliye de 0,15 gram hidroksiapatit eklendikten sonra homojen karışım elde edilene dek karıştırılmaya bırakılmıştır. Gluteraldehit ile çapraz bağlama yapıldıktan sonra Şekil 3.3'de görüldüğü gibi dondurarak kurutma işlemi sonrası gözenekli yapıların son hali görülmektedir. Çıkan malzeelerden diatom katkılı olan yapının daha gevrek sertlikte olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.3: Kitosan/jelatin ve kitosan/jelatin/diatom gözenekli yapıları.

3.2.2 Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Deneyler

Kitosan çözeltisi: Kitosan %3 (w/v), distile su içinde (%1 asetik asit içeren) 50°C'de 24 saat karıştırılarak hazırlandı.

Jelatin çözeltisi: Jelatin %10 (w/v) distile su içinde 5 saat 40°C'de karıştırılarak hazırlandı.

BTS terimi, Bone Tissue Scaffold (kemik doku iskelesi) 'un kısaltması olarak kodlanmıştır. Çalışmamızda dört farklı karışım BTS-1 (CS/HA), BTS-2 (CS/HA/Di), BTS-3 (Gel/CS/HA) ve BTS-4 (Gel/CS/HA/Di) olarak adlandırılmıştır. Bu dört karışımın hazırlanışı sırasıyla aşağıda verilmiştir.

BTS-1: 20 ml kitosan çözeltisine 2 g hidroksiapatit ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı.

BTS-2: 20 ml BTS-1 çözeltisine 0,1 g diatom ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı.

BTS-3: 10 ml kitosan ve 10 ml jelatin çözeltisi karıştırıldı ve bu çözeltiliye 2 gr hidroksiapatit ilave edilerek homojen olana kadar karıştırıldı.

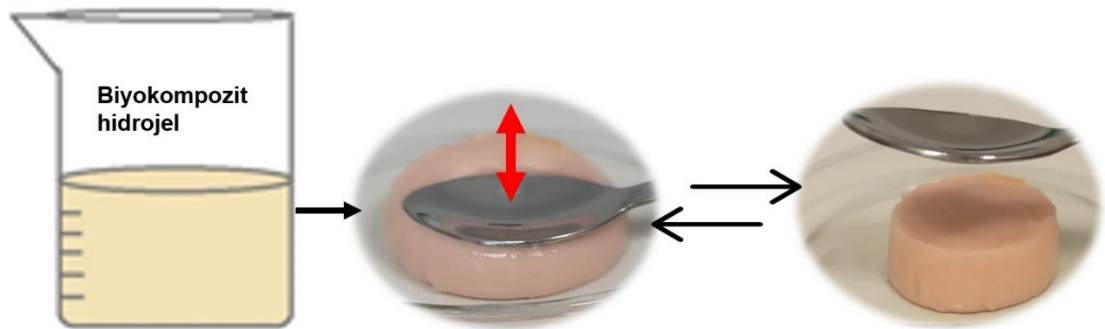
BTS-4: 20 ml BTS-3 çözeltisine 0,1 g diatom ilave edildi ve homojen olana kadar karıştırıldı.

Özet olarak, Tablo 3.1’de her bir kompozit iskelede bulunan malzemeler hakkında bilgi verilmektedir.

Tablo 3.1: Biyo-kompozit iskeleler ve içerikleri.

İskele kodu	Kitosan (CS)	Hidroksiapatit (HA)	Jelatin (Gel)	Diatom (Di)
BTS-1	✓	✓		
BTS-2	✓	✓		✓
BTS-3	✓	✓	✓	
BTS-4	✓	✓	✓	✓

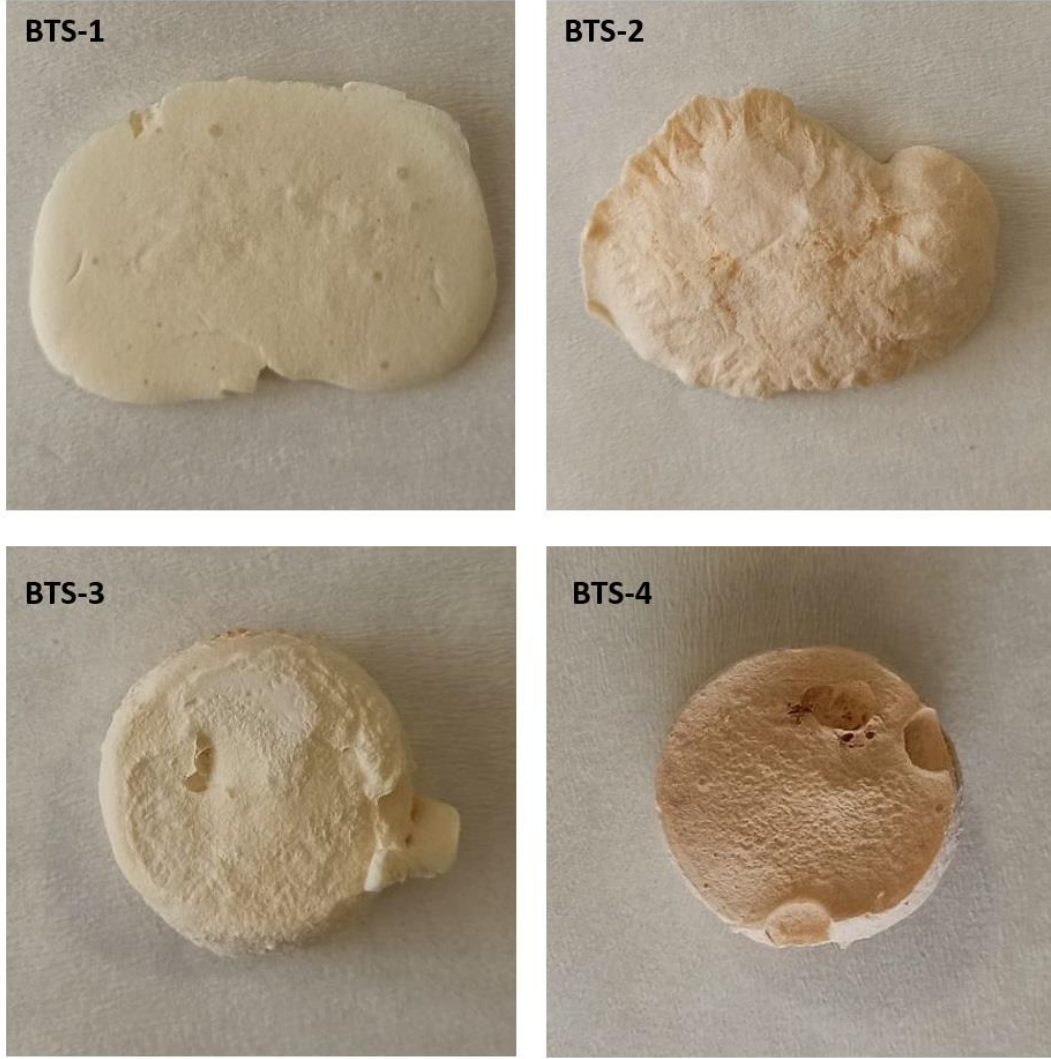
Şekil 3.4’de glutaraldehit ile çapraz bağlandıktan sonraki hidrojellerin elastikliğini gösteren kaşıkla basma-çekme denemesine dair bir görsel verilmiştir. Bu dört hidrojel, gece boyunca -20°C ’de tutuldu ve daha sonra 48 saat boyunca liyofilize edildi (dondurularak kurutuldu). Şekil 3.5’de malzemelerin liyofilizatör tüplerine koyulduğunun, şekil 3.6’da ise liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işleminden sonra oluşan iskelelerin görseli verilmektedir.



Şekil 3.4: Biyanokompozit hidrojellere kaşık ile basma-çekme denemesi.



Şekil 3.5: Malzemelerin liyofilizatör tüplerindeki görüntüleri



Şekil 3.6: Dondurarak kurutma sonrası oluşan kemik doku iskeleleri.

3.3 Karakterizasyon Çalışmaları

Hücre kültüründen önce ve sonra kompozit yapı iskelelerinin morfolojisini görüntülemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss Supra 40VP, Germany) kullanıldı. Biyokompozit doku iskelelerinin kimyasal bağları ve fonksiyonel grupları FT-IR (Thermo Scientific Nicolet iS50, Germany) kullanılarak $0,5 \text{ cm}^{-1}$ çözünürlükte ve $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ frekansta incelenmiştir.

3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeis Supra V40) (Görüntüler PAÜ İLTAM'da çekilmiştir), çok çeşitli interdisipliner çalışma alanlarında kullanılmaktadır. Malzeme boyutu açısından mikrometreden (μm) nanometreye (nm) kadar olan ölçeklerde inorganik ve organik maddelerin analizinin yapılmasında oldukça etkili bir yöntem olarak kullanılır. SEM, çok çeşitli malzemelerden çok hassas görüntüler elde edebilmek için 300.000x'den 1000000x'e kadar ulaşan yüksek büyütme avantajı sağlar. Genel malzeme bilimi için gelişmiş bir SEM cihazı Şekil 3.7'de gösterildiği gibi SEM ekipmanı aracılığıyla yapılır. SEM'de kullanılacak malzemeler genel olarak polimerler ile metalleri kapsayan organik ve katı inorganik malzemeleri içermektedir (Mohammed ve Abdullah 2018).



Şekil 3.7: Taramalı elektron mikroskobu (SEM).

3.3.1.1 SEM'in Bileşenleri ve Çalışma Sistemi

SEM aşağıdaki temel bileşenlerden oluşur (Şekil 3.8.):

- Yüksek enerjili elektronlar üretmek için bir kaynak, buna elektron tabancası denir
- Elektronları Şekil 5'teki gibi iki veya daha fazla elektromanyetik mercekten geçirmek için aşağıya doğru kolon.
- Sapma sistemi tarama bobinlerinden oluşur.
- Geri saçılan ve ikincil elektron için elektron dedektörü.
- Numune için bir bölme.
- Bilgisayar sistemi, taranan görüntüleri görüntülemek için görüntüleme ekranı ve elektron ışınını kontrol etmek için klavyeden oluşur.



Şekil 3.8: SEM temel bileşenleri.

SEM, gözle görünmeyen nano ve mikro dünyalarını gözler önüne seren bir araçtır. Işık mikroskobunun erişemediği ayrıntıları ve aşamadığı karmaşıklığı SEM ortaya çıkarılabilir. Bütün bunlar, iyi tanımlanmış olan aşağıdaki süreçle elde edilebilir (Friel ve Lyman 2006):

- Malzeme analizi, 100-30.000 elektron volt aralığında yüksek enerjili bir elektron demeti uygulanarak yapılır. Bu elektron emisyonunu sağlamak adına genellikle termal kaynak kullanılmaktadır.
- Tabancadan çıkan ışının boyutu net bir görüntü oluşturmak için çok büyüktür. Bu yüzden SEM, ışınları sıkıştırarak odaklanmış elektronu numuneye yönlendirmek için farklı özellikte merceklerle donatılmıştır. Genellikle, SEM'in ışın boyutunun 10 nm'den küçük olması, sonuncu mercekte toplanan elektronların numune ile etkileşimi için ve görüntü üretmede kullanılan sinyalleri oluşturmak için 1µm derinliğe nüfuz etmesinden kaynaklanır.
- Numunenin görüntüsü, elektron demetinin numunenin yüzeyinde dikdörtgen şekilde raster oluşturana dek ayrı konumlara doğru düz çizgiler şeklinde hareket etmesini sağlayan tarama bobinlerinin hareketleri yüzünden nokta nokta oluşturulur. Bu aşamalar gerekli büyütmeyle ilgili olarak gerçekleşir. Cihazı kullanan operatör daha yüksek büyütmeyle ilgili görüntü almak isterse, tarama bobinleri ışını daha küçük bir alana saptırmak için çalışır. Sonuncu mercekle numunenin yüzeyi arasında olan çalışma mesafesinin, modern SEM'de bunun otomatik ayarlama ile çözüldüğü büyütme üzerinde bir etkisi olduğunu belirtmekte fayda var.
- Elektron dedektörü, taranan numunedeki yayılan elektronları (sinyalleri) tespit etmektedir. Detektör olmazsa, numunenin yüzeyinde üretilen sinyaller, tek başına anlaşılmayan bir görüntü olarak ortaya çıkar. SEM görüntü elde edilmesinde hem ikincil elektronlar hem de geri saçılan elektronlar kullanılır. Eğer ki kollektör ekranına negatif voltaj uygulanırsa sadece geri saçılan elektronlar toplanır (Suri ve diğ. 2019).
- Bu sürecin ardından sinyaller görüntüleme ekranında görüntülenir ve operatör parlaklığı ve yoğunluğu değiştirerek en net görüntüyü elde etmeye çalışır. Numune içinde küçük detayların görüntülenmesi için 10.000x ve üstünde ötesinde büyütme yapılmalıdır.

- Tabancadan yayılan elektron voltajı modu ayrıntılar üzerinde etkin özelliğe sahiptir. Hızlanma voltajları 5 kV'dan düşük olduğunda taranan görüntü yüzey bilgisi açısından zengin olur. Buna karşılık, 15-30 kV arasında değişen yüksek hızlanma voltajları yüzeyin altına nüfuz eder böylece yüzeyden yansıyan sinyaller numunenin iç kısmı hakkında ayrıntılar sağlamış olur (Zhang ve Ulery 2018).
- SEM analizinde kısmen elde edilen üç boyutlu görüntü, numunenin, morfolojisine ilişkin boyut, şekil ve yüzey dokusu açısından görselleştirilmesine bağlıdır. Bu da ikincil elektronlar ve geri saçılan elektronlar sayısına bağlıdır. Bununla birlikte, numune yüzeyinin eğim açısı, yukarıda belirtilen sayıların artmasında ve dolayısıyla topografik kontrast üzerinde doğrudan etkilidir.

3.3.1.2 SEM için Numune Hazırlama ve Kullanılan Cihaz ile Malzemeler

SEM analizi öncesi numune hazırlığına dair bilgiler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Numune ebatı ile numune tutucusunun eşdeğer boyutlarda olması gerekir.
- İletken özelliğe sahip olmayan numuneler elektron ışınları tarafından taranırken şarjlanma yapmaya (yük birikmesi) yatkın olduğu için bu tür numuneler elektriksel olarak iletken bir malzeme ile kaplanmalıdır. Bu iletken malzemeler altın, palladyum ya da karbon olabilir.
- Analiz sırasında SEM içerisinde yüksek vakum olacağı için numunenin bu ortama dayanabilecek direnci olmalıdır. Numune kendi şeklini korumalı ve fazla miktarda gaz çıkarmama özelliği olmalıdır.
- Numune, numune tutucusuna sağlam şekilde yerleştirilmelidir. Böylelikle elektron ışınlarına maruz kaldığı zaman hareket etmemelidir.

Analizi kapsayan cihaz ve malzemeler aşağıda sıralanmıştır.

- Analizi yapılacak olan numune.
- İletken özelliğe sahip numune tutucu.
- İletken özelliğe sahip numune yapıştırma bandı.

- Numuneyi iletken hale getirme için altın, palladyum, karbon kaplama cihazı.
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ünitesi

3.3.2 Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

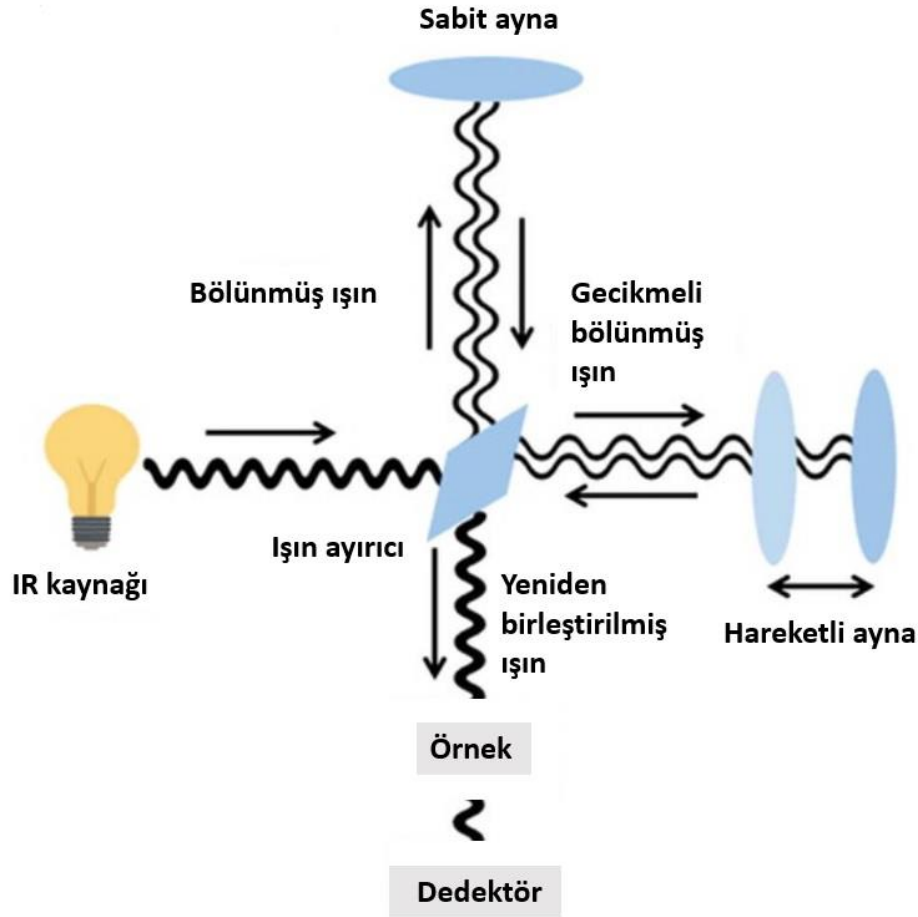
Analitik bir teknik olarak Mid-IR (MIR) spektroskopisi, fonksiyonel moleköl grupları içindeki dipol bağlarının IR radyasyonunun absorpsiyonunu ölçer (Chalmers ve Griffiths 2002; Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). IR radyasyonunun absorpsiyonu, bağlardaki elektronları daha yüksek bir titreşim durumuna uyararak (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004), moleköler bağların bükülme veya gerilme hareketlerine neden olur (Chalmers ve Griffiths 2002). Bir moleköl, hareketsiz veya uyarılmış durumlardayken belirli dalga boyunun absorpsiyonu ile değişikliğe uğrarsa IR radyasyonunu emer. N₂, H₂ ve O₂ gibi elementel iki atomlu gazlar dışında çoğu kimyasal bileşik bir dipol momente sahiptir ve karakteristik kızılötesi absorpsiyonlarıyla analiz edilebilir (Amand ve Tullin 1999).

Organik bileşikler için, karakteristik gerilme titreşimleri genellikle MIR bölgesinde, 4000 cm⁻¹ ile 1500 cm⁻¹ arasında, meydana gelir (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Bununla birlikte, 1500 cm⁻¹'in altında, genellikle bükülen titreşimler, molekölün veya molekölün büyük bir bölümünün karakteristik parmak izine neden olur ve bu nedenle tanımlama için yararlı yapısal bilgiler verebilir (Stuart 2005). Absorpsiyonun yoğunluğu, kantitatif amaçlar için IR spektroskopisini özellikle uygun hale getiren karışımları analiz ederken, saf bir bileşiğin veya belirli bir özelliğin veya fonksiyonel grubun konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Şekil 3.9.'da modern bir FT-IR (Thermo Scientific Nicolet iS50), (Görüntü PAÜ İLTAM'da çekilmiştir.) cihazına ait görsel verilmektedir.



Şekil 3.9: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR).

FT-IR cihazları, iki ışın arasındaki yol uzunluğundaki değişimin bir fonksiyonu olan, interferogram adı verilen bir sinyal vermek için iki IR ışını arasındaki girişimi kullanır (Stuart 2005). Bu, şekil 3.10'da görüldüğü gibi, genellikle bir Michelson interferometresi kullanılarak gerçekleştirilir. Bir Michelson interferometresinden üretilen sinyal daha sonra Fourier Dönüşüm algoritmaları kullanılarak sinyal oluşturan frekanslara ayrıştırılabilir (Stuart 2005). İlk olarak 1881'de (Michelson 1881, 1927) tanımlanan Michelson interferometresi, cıva arkı, tungsten veya küresel lamba gibi bir ışık kaynağından, yarı yansıtıcı bir ışın ayırıcıdan ve biri sabit diğeri hareketli iki dik aynadan oluşur (Stuart 2005; Albert ve ark. 2011). Girişim ölçerin ilk bölümünde, paralelleştirilmiş bir IR ışını, bir ışın ayırıcı tarafından eşit yoğunlukta bölünür (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Şekil 3.10'da bu bölünmüş ışınların daha sonra hem sabit hem de hareketli aynalar tarafından yeniden birleştikleri ve müdahale ettikleri ışın ayırıcıya geri yansıtıldığı görülmektedir (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Yeniden birleştirilen ışında yapıcı veya yıkıcı olabilen bu girişim, hareket eden aynanın yol uzunluğunda bir farklılık oluşturmasından kaynaklanır (Stuart 2005).



Şekil 3.10: Modern FT-IR araçlarında kullanılan bir Michelson interferometresinin şemaları (Valand ve diğ. 2019).

Michelson interferometre 1800'lerin sonlarında geliştirilmiş olmasına rağmen, 1970'lerde, yüksek çözünürlüklü IR verileri üzerinde Fourier dönüşümü gerçekleştirmek için hesaplama gücü çıkmazı aşıldığında (Albert ve diğ. 2011), yöntem devrim yarattı. Fourier dönüşümü, elde edilen yoğunluk-zaman interferogramlarını, yoğunluk-frekansın bir IR spektrumuna dönüştürür (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Bilgisayar devriminden önce, çoğu FT-IR aracının çözünürlüğü, dağıtıcı IR araçlarıyla karşılaştırılabilirdi (Albert ve diğ. 2011) ve bu nedenle çok daha pahalı oldukları için sıklıkla kullanılmadılar. Ancak, hesaplama gücünün çıkmazı aşıldığında, artan çözünürlük maliyetten daha ağır bastı ve FT-IR giderek daha fazla kullanılmaya başlandı. Şu anda, bir FT-IR cihazının çözünürlüğü, aynalar tarafından yansıtılan iki ışın arasındaki maksimum yol farkı ile sınırlıdır (Stuart 2005), Michelson interferometre kolları arasındaki yol uzunluğu farkı ile orantılıdır, böylece daha uzun bir mesafe çözünürlüğü artıracaktır (Gauglitz ve Vo-Dihn 2004). Daha doğrusu, modern FT-IR cihazlarıyla daha da yüksek çözünürlük elde etmek için sınırlayıcı

faktör, interferometredeki hareketli aynalar için optik ve hareket mekanizmalarının hassasiyetidir (Stuart 2005). Bu yüksek çözünürlük arzu edilir ve bu nedenle FT-IR, günümüzde gıda taşıması ve orijinalliğini incelemek ve araştırmak için sıklıkla tercih edilen yöntemdir (Valand ve diğerleri, 2019).

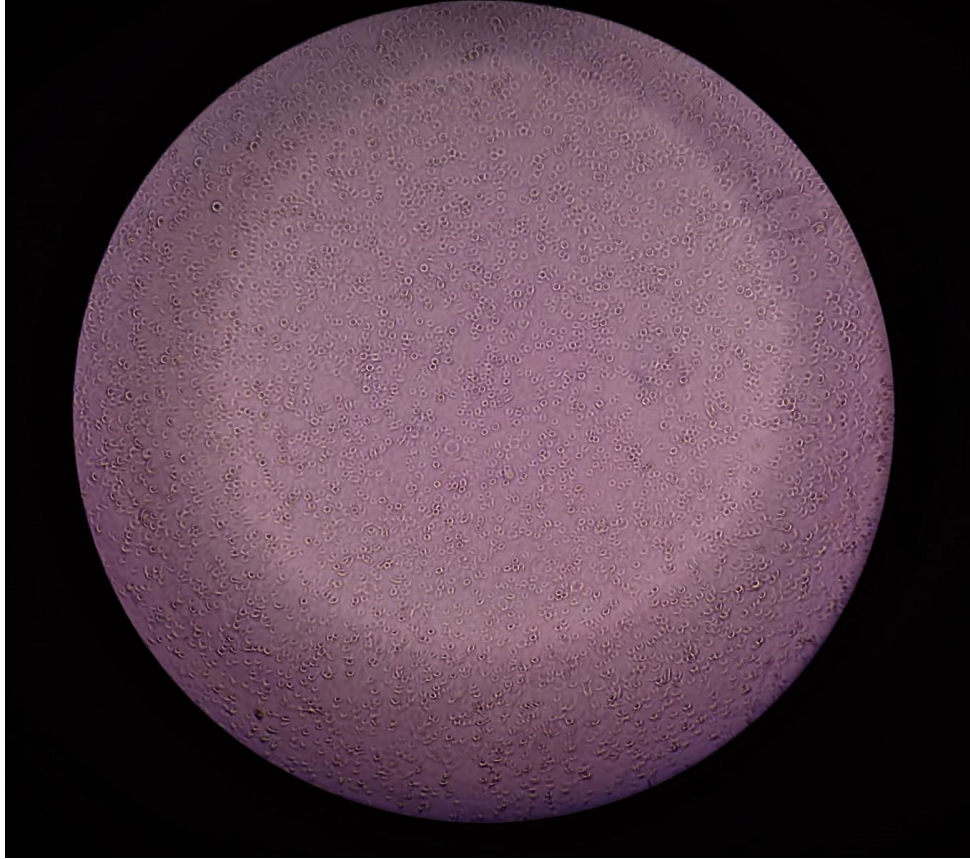
3.3.2.1 FT-IR ve Doku Mühendisliği için Görüntüleme Uygulamaları

Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), tasarlanmış doku kompozisyonunun değerlendirilmesi için potansiyel bir çözüm olarak öne çıkmaktadır. FT-IR mikroskopisi ve görüntüleme, doku ve diğer biyolojik sistemlerin bileşimini ve yapısını araştırmak için uzun yıllardır başarıyla uygulanmaktadır (Diem ve diğ. 2004). Bu yönteme özgü olan FT-IR analizi, tahribatsız, etiketsiz bir yaklaşım kullanarak zengin ve ayrıntılı bir bilgi yelpazesi sağlayabilir. Orta kızılötesi (MIR) ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) ve yakın kızılötesi (NIR) ($4000\text{--}12500\text{ cm}^{-1}$) aralığındaki titreşim spektroskopisi, fonksiyonel gruplar içindeki moleküler titreşimler hakkında özel bilgiler sağlayabilir. Bu durum spektrumlardaki bileşimle ilişkili olan karakteristik absorpsiyon bantlarıyla sonuçlanır. MIR aralığında, bantlar daha yoğun ve spesifiktir, oysa NIR'de tipik olarak daha zayıf, daha geniş ve örtüşen yapıdadır ve MIR spektrumlarında görülen temel titreşimlerin tonlarına ve kombinasyonlarına karşılık gelir (Querido ve diğ. 2017). MIR aralığındaki absorbanslar, titreşim frekansının moleküler türlere özgü olduğu ve tepe noktasının entegre absorbansının bir moleküler bileşenin konsantrasyonu ile ilgili olduğu temel moleküler titreşimlerden kaynaklanır. MIR ve NIR spektral analizi birlikte, dokuların bileşimi ve yapısı ile ilgili çeşitli kalitatif ve kantitatif bilgiler sağlar. Doku mühendisliği alanında, biyomalzemelerin ve yapı iskelelerinin ve ECM'nin karakterizasyonu için MIR spektroskopisi kullanılmıştır. Bu, eklem kıkırdağı, kemik, kalp, deri, kornea ve mesane için tasarlanmış yapıları içerir. Bununla birlikte, mühendislik doku yapılarında hücreler tarafından üretilen ECM'yi değerlendirmek için MIR'nin kullanılması ile eklem kıkırdağı ve kemik çalışmalarına odaklanılmıştır (Querido ve diğ. 2017).

3.4 HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

3.4.1 HÜCRE HATTININ HAZIRLANMASI VE BAKIMI

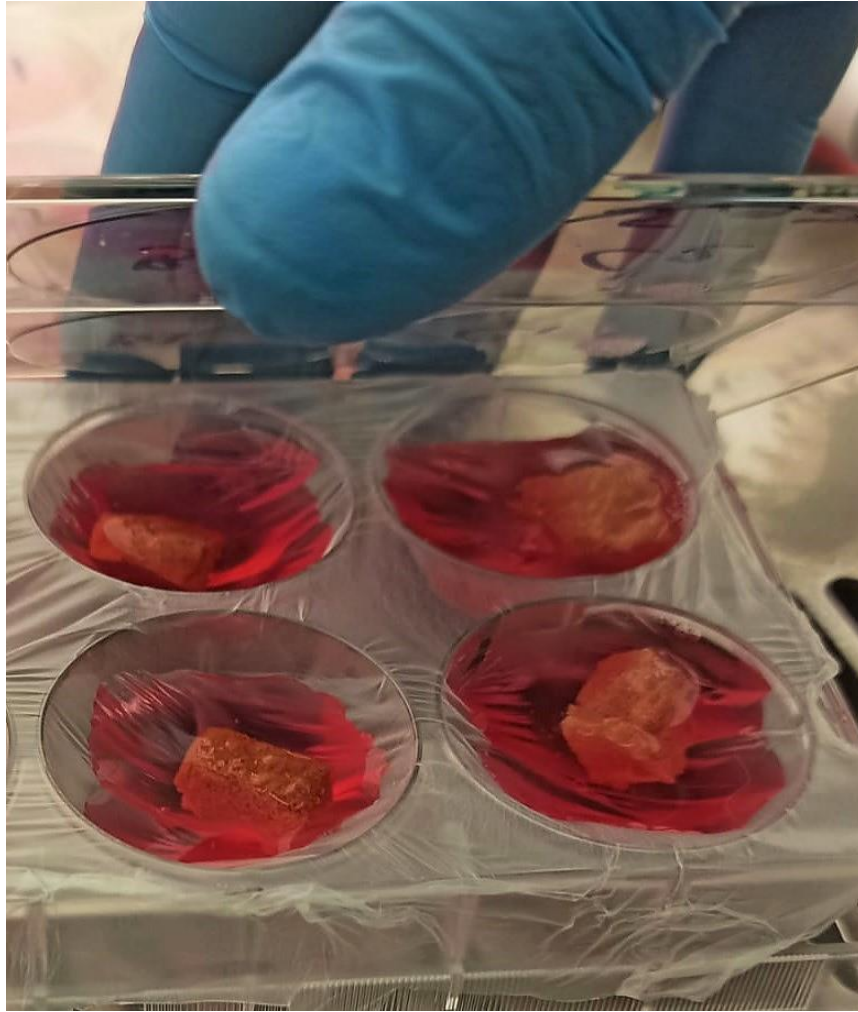
Hücre kültürü çalışmaları, 3T3L1 fare embriyonik fibroblastik hücre hattı (ECACC, UK) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri (DMEM; Sigma, Almanya) kullanılarak petri kaplarında kültürlenmiştir. Hücreler ekimden önce 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ ortamında inkübatörde (EC-160, Nüve, Türkiye) tutularak iki günde bir alt kültürlenmiştir. Şekil 3.11.'de stoktan çıkarılan 3T3L1 hücre hattının çoğaltılmasıyla elde edilen mikroskop görüntüsü verilmektedir.



Şekil 3.11: 3T3L1 hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü.

3.4.2 Doku İskelelerine Hücre Ekimi

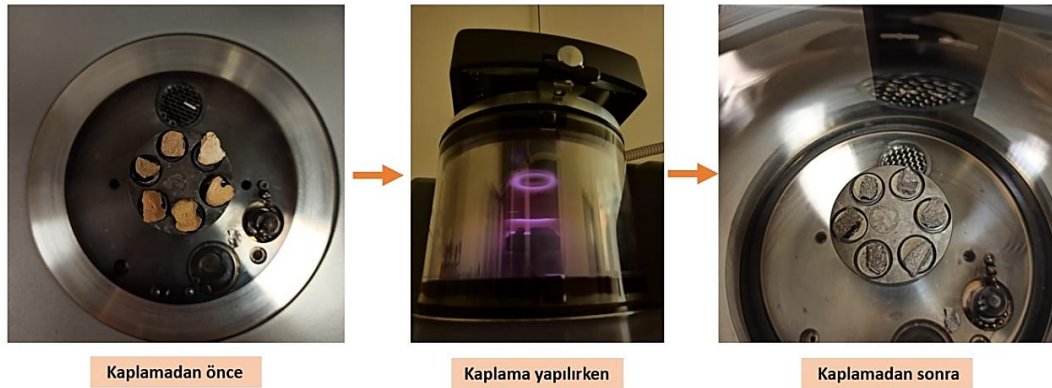
Hücre kültürü, oyuklu, steril kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminden önce kültür kaplarının tabanı parafilm ile kaplanmış ve alkol ile yıkanmıştır. Böylece hücre kültürü kabının alt kısmı hidrofobik hale getirilmiş ve hücrelerin doku iskelesinden kültür kabının yüzeyine göç etmesi engellenmiştir. Biyokompozit kemik doku iskeleleri ise %70 alkol ile yıkanarak ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra iskeleler ve kültür kapları UV ışık altında 45 dk sterilize edilmiştir. Hücre ekiminden önce, yapı iskeleleri kültür kaplarına yerleştirilmiş ve serum proteinleri ile etkileşime girmesi için 24 saat boyunca DMEM'de tutulmuştur (Gümüşderelioğlu ve diğ. 2020). Şekil 3.12'de görüldüğü gibi, 24 saatin sonunda yaklaşık 0,75 cm³ iskele içeren her ortama 1x10⁴ hücre ekilmiştir. 8 günlük hücre kültürü boyunca, kültür ortamı her 2-3 günde bir yenilenmiştir.



Şekil 3.12: Doku iskelelerine hücre ekimi.

3.4.3 Morfolojik Analiz

8 günlük hücre kültürünün sonunda doku iskelelerindeki kültür ortamı çıkarılmış ve yapı iskeleleri iki kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, doku iskelelerinin, karanlık ortamda, %2,5 (h/h) glutaraldehit çözeltisinde 30 dk bekletilmesiyle fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından iskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100 (h/h) etanol çözeltilerinde ikişer dk tutularak ve dehidrasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra iskeleler SEM öncesinde, 5 dk boyunca heksametildisilazan (HMDS; BRB, Hollanda) içinde tutulmuş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Gümüşderelioğlu ve diğ. 2020). Son olarak iskeleler, Şekil 3.13'de görüldüğü üzere SEM analizinde görüntü alabilmek için, SEM öncesinde altın-paladyum ile 400 sn kaplanarak iletken hale getirilmiştir.



Şekil 3.13: İletken hale getirmek için doku iskelelerinin altın-palladyum ile kaplanması.

3.4.4 Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite testleri, kemik doku iskelelerinin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları gerek uygulama kolaylığı gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak tercih edilir duruma gelmiştir.

BTS örneklerinin sitotoksik aktivitesi Fare Preadiposit (3T3-L1) hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla hücreler önce Tripan mavisi ile Thoma lamı

yardımıyla sayılmış ve 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir.

BTS örnekleri 1mg/ml olacak şekilde gece boyunca çalkalamalı inkübatörde DMEM besiyeri içerisinde inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir örneğin bekletildiği besiyerinin sitotoksik etkisini tespit etmek için altı farklı (5, 10, 25, 50, 100 ve 125 μ l) konsantrasyonu denenmiştir. Ayrıca, çalışmaya dair sonuçlar detaylı olarak bulgular konusu altında verilmiştir.

3.5 İstatiksel Analiz

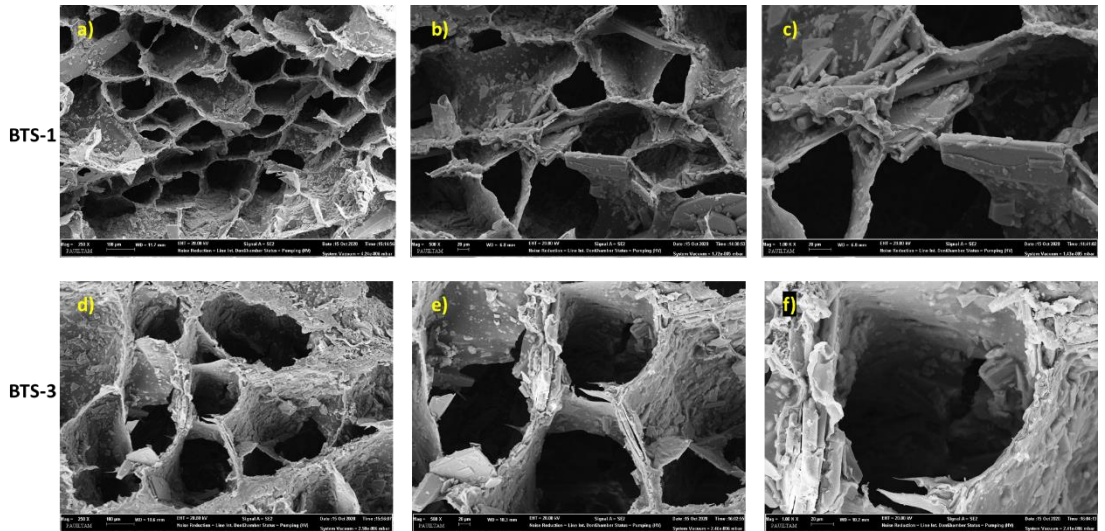
Tüm deneyler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler, çoklu karşılaştırma için Student t-testi (Minitab Yazılımı) kullanılarak yapıldı. Veriler, ortalama değerin (\pm SD*P<0,05) anlamlı kabul edildiği şekilde ifade edilir.

4. BULGULAR

4.1 SEM Analizi

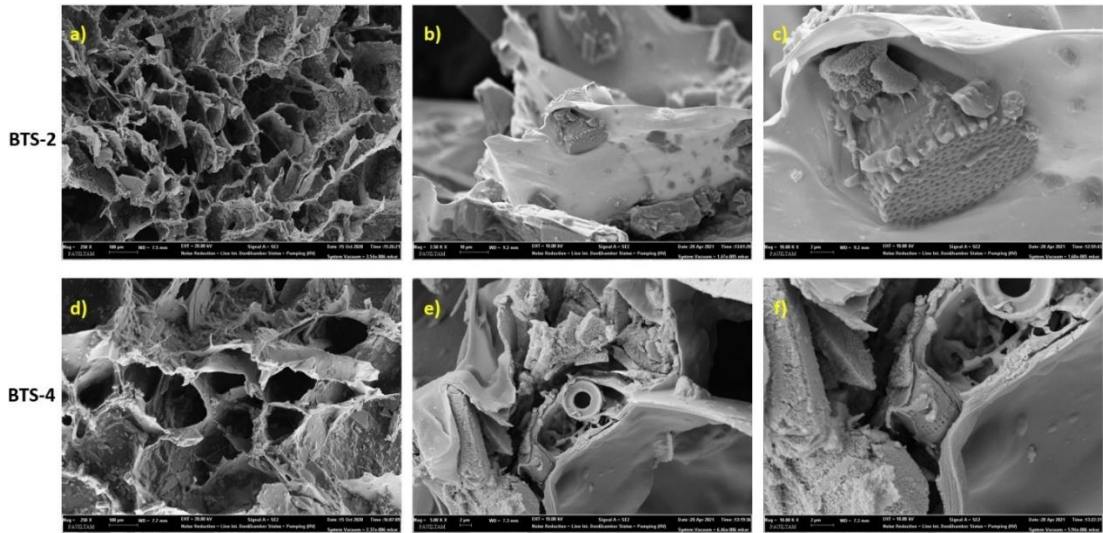
Üretilen doku iskelelerinin kesit morfolojileri SEM ile belirlendi. İskelelerin, içsel bağlantılara sahip oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu özellikler kemik doku mühendisliğinde önemli bir yere sahiptir. Hücre tutunmasında, yeni oluşan dokunun yapısal olarak desteklenmesinde, kemik ekstrasellüler matriks oluşumunda ve kan dolaşımı için yer sağlanmasında kritik rol oynar. Bu yapının oluşumu dondurarak kurutma yöntemi sayesinde gerçekleşmiştir. Dondurarak kurutma yöntemi, su buharı içeren havanın sıcaklığını düşürmek için bir soğutucu kullanır, böylece havayı solvent ile değiştirerek birbirine bağlı makro gözenekli yapı oluşturur.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, diatomsuz BTS-1 ve BTS-3 iskelelerinin SEM görüntüleri farklı büyütme oranlarında verilmiştir. Burada BTS-1 ve BTS-3 iskelelerinin sırasıyla yaklaşık 160 µm ve 270 µm makro gözeneklere sahip olduğu görülmektedir. BTS-3 iskelesinin BTS-1'den farklı olarak içerdiği jelatin nedeniyle daha büyük gözeneklere sahip olduğu SEM ile gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1: Diatom içermeyen BTS-1 (a) 250x, b) 500x, c) 1000x ve BTS-3 (d) 250x, e) 500x, f)1000x) iskelelerinin morfolojik görüntüleri.

Şekil 4.2'de diatom içeren BTS-2 ve BTS-4 iskelelerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri verilmiştir. Diatom içermeyen BTS-1 ve BTS-3 iskelelerinden farklı olarak, bu iskelelerin makro ve mikro gözeneklerin yanı sıra diatom kaynaklı nano gözeneklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. BTS-2 ve BTS-4 iskelelerinin makrodan nanoya farklı büyütmelerde gözeneklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Burada BTS-2 ve BTS-4 iskelelerinin sırasıyla yaklaşık 130 µm ve 170 µm makro gözeneklere sahip olduğu görülmektedir. BTS-4 iskelesinin BTS-2'den farklı olarak içerdiği jelatin nedeniyle daha büyük gözeneklere sahip olduğu SEM ile belirlenmiştir. Bu iskelelerde bulunan aynı tip diatomların yaklaşık 9-16 µm boyunda ve 8-20 µm çapında olduğu görülmüştür. Ayrıca bu diatomların düzenli aralıklarla 260-330 nm nano gözenek boyutlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir.

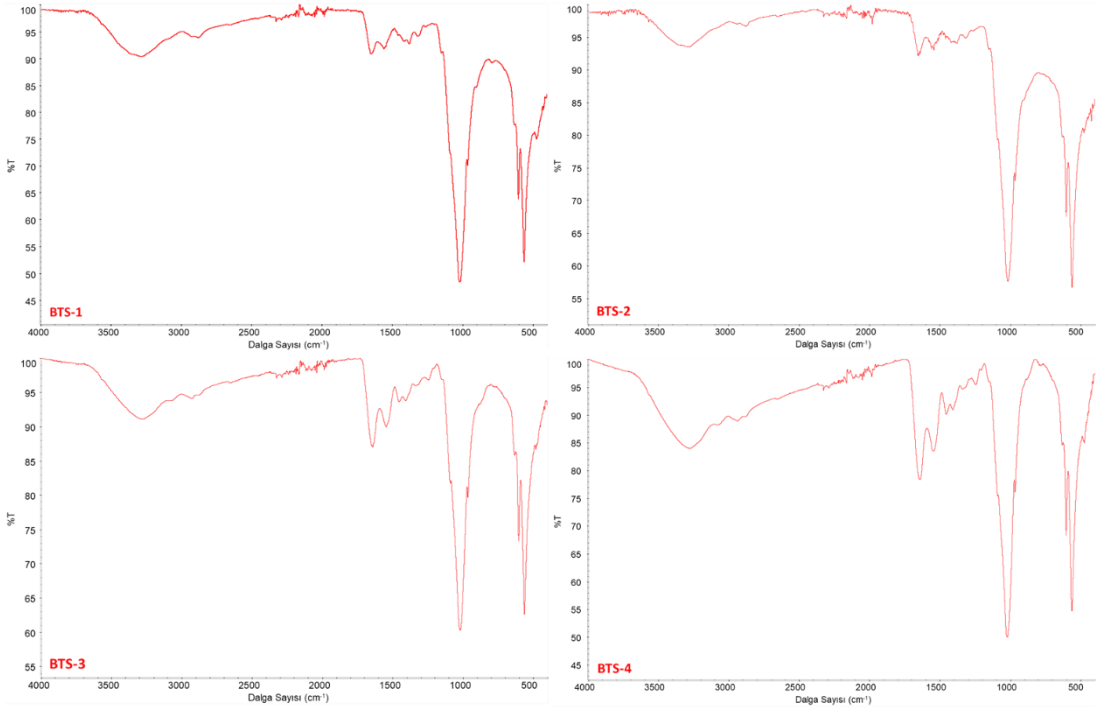


Şekil 4.2: Diatom içeren BTS-2 (a) 250x, b) 2500x, c) 10000x ve BTS-4 (d) 250x, e) 2500x, f) 10000x iskelelerine ait morfolojik görüntüleri.

4.2 FT-IR Analizi

Kemik doku iskelelerinin FT-IR sonuç grafiği Şekil 4.3'de verilmiştir. İskeleleri oluşturan yapıların FT-IR verileri şekilde ayrı ayrı görülmektedir. BTS-1, BTS-2, BTS-3 ve BTS-4 iskelelerindeki HA'nın OH gruplarının sırasıyla 3288, 3290, 3274, 3274 cm^{-1} seviyelerinde asimetrik gerilme bandında ve 1647, 1652, 1637, 1640 cm^{-1} seviyelerinde ise asimetrik eğilme bandında yer aldığı görülmüştür. HA'nın PO_4^{3-} gruplarının sırasıyla 559, 558, 559, 558 cm^{-1} seviyelerinde asimetrik gerilme bandında ve 1016, 1012, 1015, 1016 cm^{-1} seviyelerinde asimetrik eğilme bandında yer

aldığı belirlendi. Kitosanın 892-1152 cm^{-1} karakteristik pikleri, C-O-C asimetrik gerilme bandında bulundu. Ayrıca 1633 cm^{-1} seviyesinde C=O gerilmesi (amid I) ve 1537 cm^{-1} seviyesinde N-H eğilme (amid II) bandının olduğu gözlemlendi. Jelatine özgü 1630, 3324 cm^{-1} cm seviyeleri N-H gerilme (amid I) bandında, 1543 cm^{-1} cm seviyesi C-N gerilme ve N-H eğilme (amid II) bandında yer aldı. Diatomun 1076-1100 cm^{-1} aralığındaki pik, asimetrik Si-O-Si bağlarındaki titreşimleri gösterir ve 750-850 cm^{-1} aralığındaki pik, simetrik Si-O-Si bağlarındaki titreşimleri gösterir. 600 cm^{-1} seviyelerindeki pik, diatomun kristal yapısından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.3: Biyokompozit yapı iskelelerinin FT-IR grafiği.

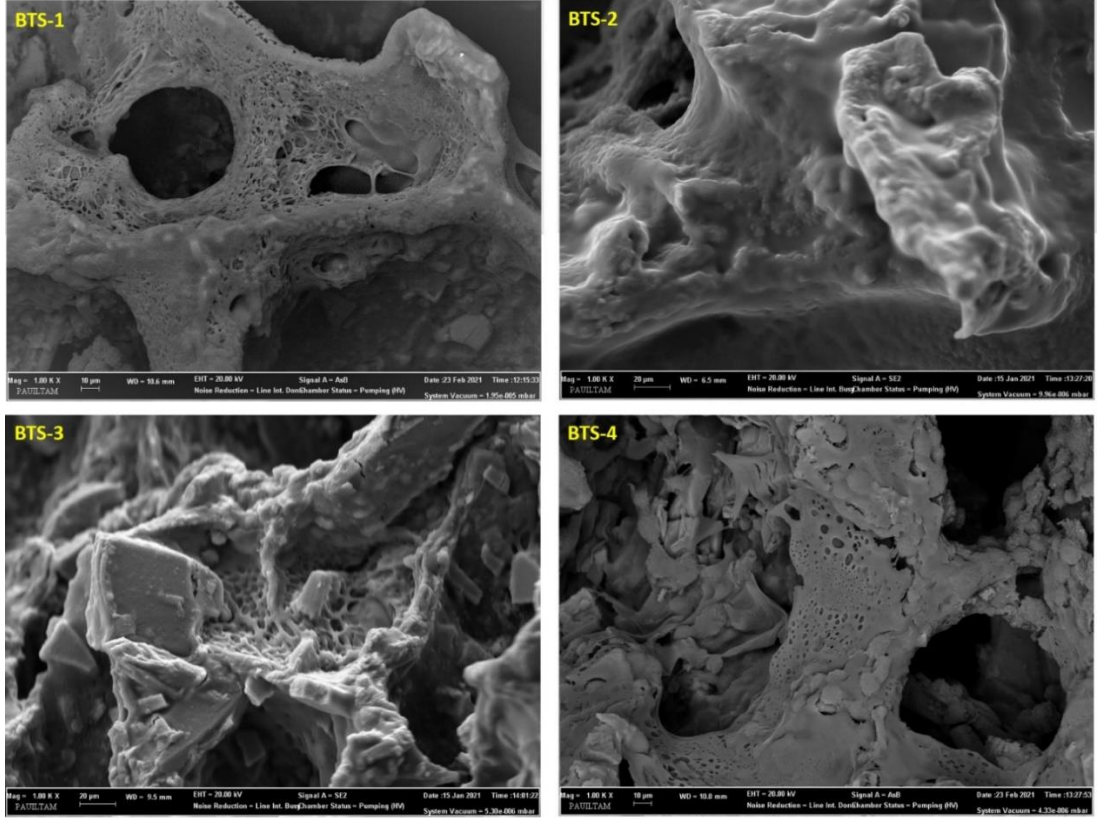
4.3 Hücre Kültür Çalışmalarının Sonuçları

Tez bünyesinde, üretilen dört farklı kemik doku iskelesine dair alınan SEM görüntüleri ile doku iskelelerinin iskele-hücre etkileşimleri ve biyouyumluluk bakımından uygun yapılar olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, sentezlenen doku iskeleleri kullanılarak 3T3L1 hücre hattı ile 8 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. 3T3L1 hücrelerinin hazırlanan iskeleler üzerindeki canlılığı, tutunması ve morfolojisi kültür

çalışmaları sonrasında yapılan SEM analiz ile araştırılmış ve diatom katkılı iskelelerin farklılaşma üzerindeki etkisi diğer iskelelerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

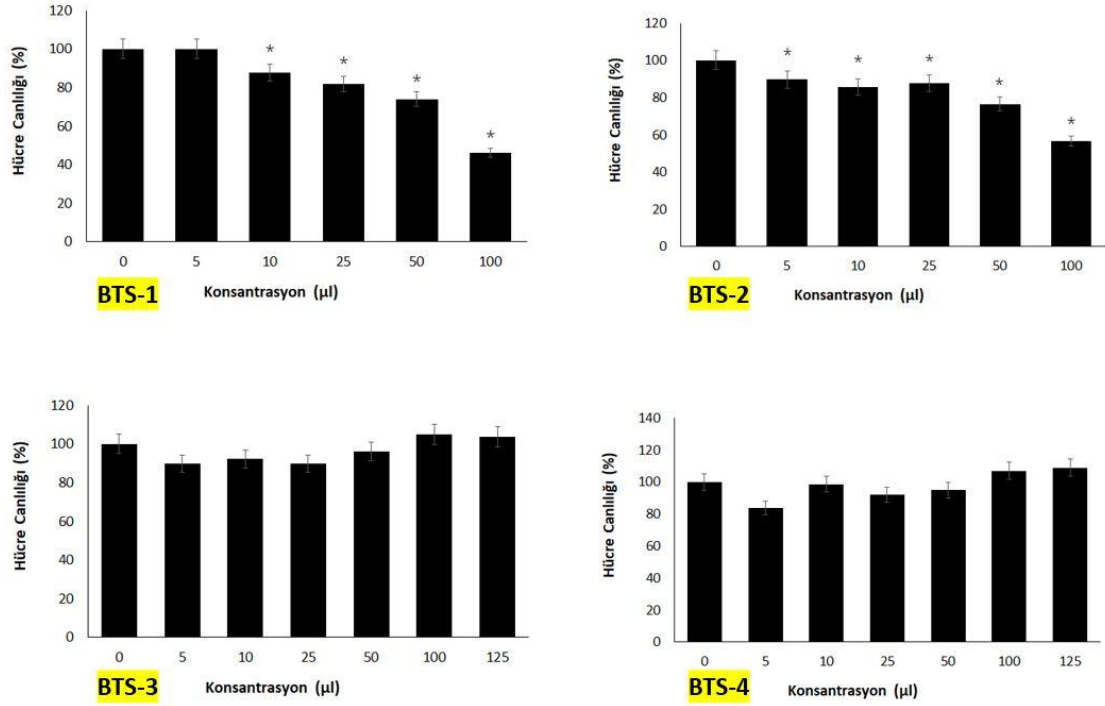
Üretilen doku iskeleleri üzerinde kültürlen 3T3L1 hücrelerinin 8. gününün morfolojisi Şekil 4.4'de verilmiştir. Hücrelerin yapı iskelesine bağlandığı, yayıldığı ve içsel olarak bağlantılı gözeneklere göç ettiği açıkça görülmüştür. Öncelikle, diatom içermeyen BTS-1 ve BTS-3 iskelelerine bakıldığında hücrelerin iskeleler ile oldukça ağsı bir ilişki kurarak çoğaldığı görülmüştür. Diatom içeren BTS-2 ve BTS-4 iskelelerine bakıldığında ise BTS-2 iskelesinde hücrelerin iskele üzerini bir örtü gibi örterek çoğaldığı görülürken, BTS-4'de ise yine hücreler iskeleler ile ağsı bir çoğalma ilişkisi göstermiştir. Bu durumun BTS-4'den farklı olarak BTS-2'nin jelatin içermeyişinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4: 8 günlük hücre kültürünün ardından diatom içermeyen BTS-1, BTS-3 ve diatom içeren BTS-2, BTS-4 doku iskelelerinin SEM görüntüleri.

4.4 Sitotoksosite Çalışmaları Sonuçları

Elde edilen çalışmalar sonucunda Şekil 4.5’de görüldüğü üzere MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolyum bromid) testi ile 3T3-L1 hücre hattı için etkili dozları (EC50 değerleri) bulunmuştur.



Şekil 4.5: Değişik konsantrasyonlardaki doku iskelelerinin 3T3-L1 hücre canlılığına etkisi.

İskelelerin değişik konsantrasyonlardaki hücre canlılığına etkisi Şekil 4.5 ve Tablo 4.1’den de görüleceği üzere BTS-1, BTS-2 iskelelerinin hangi doz seviyelerine kadar toksik etki göstermediği ve BTS-3, BTS-4’ün kullanılan doz seviyelerinde hiçbir toksik etki göstermediği ortaya koyulmuştur. (Sonuçlar iki farklı sitotoksosite deneyinin, triplike ölçümünün ortalama değerleridir. Kontrol değerleri 100% alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$)).

Tablo 4.1: 3T3-L1 hücre hattı ile yapılan etkili dozların verileri.

Örnek adı	EC50 Değeri (µl)
BTS-1	97,80
BTS-2	146,28
BTS-3	Toksik doz saptanmamıştır.
BTS-4	Toksik doz saptanmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Diatomun içerdiği silika kaynağı ile kemik sağlığı üzerindeki olumlu etkileri bilinmesine rağmen, kemik doku mühendisliği çalışmalarında diatom takviyeli yapı iskelelerinin üretimi ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarımızda, kitosan, hidroksiapatit, jelatin ve diatom kullanılarak farklı kombinasyonlarda (Tablo 3.1), dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiştir. Diatom içermeyen BTS-1 ve BTS-3 biyo-kompozit iskeleler ile diatom içeren BTS-2 ve BTS-4 biyo-kompozit iskelelerle karşılaştırılmıştır. İskelelerin SEM ile morfolojik gözlemine bakıldığında, diatom içeren iskelelerin makro gözeneklerinin diatomsuz iskelelere göre biraz daha küçük olduğu analiz sonuçlarından elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla diatomsuz ve diatomlu olarak 160 µm-270 µm, 130 µm-170 µm makro gözeneklere sahip olduğu görülmüştür. Görüntüleme analizinden elde edilen sonuçlar diatoma özgü spesifik nano gözeneklerin varlığını da ortaya koymuştur. BTS-2 ile BTS-4 biyo-kompozit iskelelerde bulunan aynı tip diatomların yaklaşık olarak 9-16 µm boyunda ve 8-20 µm çapında olduğu görülmüş olup diatomların düzenli aralıklarla 260-330 nm nano gözenek boyutlarına sahip olduğu gözlenmiştir. BTS-2 ile BTS-4 karşılaştırıldığında sırasıyla yaklaşık olarak 130 µm ve 170 µm makro gözeneklere sahip olduğu görülmüştür ki bu durum jelatin içeren yapı iskelelerinin makro gözeneklerinin daha büyük olduğunu göstermiştir. Aynı kıyaslama BTS-1 ve BTS-3 ile yapıldığında sırasıyla yaklaşık olarak 130 µm ve 170 µm makro gözeneklere sahip olduğunda jelatin içeren yapı iskelesinin daha büyük makro gözenekler içerdiğini söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz biyo-kompozit iskelelerin sahip olduğu gözenek boyutlarının analiz sonuçları literatür çalışmaları ile uyumluluk gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, daha sistematik bir şekilde tez kapsamında yaptığımız çalışmalara devam edilecektir.

Oluşturulan biyo-kompozit iskelelerde ki gözenekler hücre bağlanması, farklılaşması ve ECM oluşumunda kritik öneme sahiptir. İlâveten, diatom-spesifik ekstra nanogözeneklerin bu etkileri daha da destekleyeceği düşünülmüştür. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda, diatom içermeyen yapı iskelelerinde hücreler ağısı bir şekilde çoğalırken, diatom içeren yapı iskelelerinde jelatinsiz BTS-2 iskelesinde hücreler bir örtü gibi iskeleleri tamamen kaplarken jelatinli BTS-4 iskelesinde hücreler yine ağısı bir şekilde çoğalmıştır.

Biyokompozitlerin bağ yapılarındaki farklılıkları gözlemlemek için sık sık örneklerin FT-IR analizleri yapılmaktadır. FT-IR spektroskopisi, geliştirilen iskelelerin fonksiyonel ve kompozisyon analizi için kullanılmıştır. FT-IR analizinde doku iskelelerindeki yapısal bağların asimetric gerilme ve eğilme bantlarının hangi molekül bağ gruplarına ait olduğu sonucunu vermektedir. Dolayısıyla, Spesifik piklere bakıldığında -OH gruplarına, asimetric ve simetric -CH₂ gruplarına, -NH'nin gerilme titreşimlerine, C=O gerilmesi ve N-H eğilme bandlarına, yapıdaki hidrojen bağlı NH gruplarına, C-O-C gruplarının titreşimine ait birçok pik görülmektedir. Bunun yanında spektrumlarda diatomlara ait Si-O-Si pikleri de yer almaktadır. Sonuçlar silisyumlu yapıların polimerik kompozit yapısına başarıyla dahil edildiğini göstermiştir. FT-IR spektrumları incelendiğinde tüm bu karakteristik piklerin çitosan, hidroksiapatit, jelatin ve diatomite ait olduğu ve bu piklerin yoğunluğunun, biyokompozitlerdeki biyopolimer ve inorganik içeriği ile arttığı görülmektedir. FT-IR analizleri ile birlikte diğer karakterizasyon teknikleri sonucunda biyokompozit yapı iskelelerinin başarıyla sentezlendiği ve elde edilen malzemelerin kompleks bir yapıya sahip olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada diatomsuz yapı iskelelerinin biyoyumlu ve ideal gözeneklere sahip olduğunu bilerek bu iskelelere diatomlar eklenmiştir ve yapılan karşılaştırmalara göre diatom katkılı iskelelerin biyoyumlu ve ideal gözeneklere sahip olduğu gözlenmiştir. Hücre kültürü sonuçlarından görüldüğü gibi, diatom katkılı ve diatomsuz yapı iskeleleri hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklemiştir. Buna göre diatomun biyoaktif özelliğinin hücre yapışmasını ve çoğalmasını daha fazla desteklediği düşünülmektedir. Sonuç olarak, hücreler iskelelere yapışarak çoğaldıkça, iskelelerin yüksek oranda biyoyumlu olduğu belirlenmiştir.

Yapılan sitotoksisite çalışmalarının sonucunda BTS-1 ve BTS-2 iskelelerinin 100 µl doz seviyesine kadar 3T3-L1 hücrelerinde toksik etki yaratmadığı ve BTS-3 ile BTS-4 iskelelerinin uygulanan doz seviyelerinin hiçbirinde 3T3-L1 hücreleri üzerinde toksik etki yaratmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durumun BTS-3 ve BTS-4 iskelelerinin BTS-1 ve BTS-2 iskelelerinden farklı olarak jelatin içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak üretilen iskelelerin hangi doz seviyelerine kadar kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Diatom, kemik doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelelerinin osteoindüktif özelliklerini geliştirmek için benzersiz nano gözenekler ile biyoaktif silika kaynağı olarak kullanılabilir. Geliştirilen biyokompozit iskeleler, kemik dokusu mühendisliği için umut verici bir potansiyele sahiptir.

Öneriler

Hem içerik bakımından daha önce yapılmamış hem de diatomun etkilerinin kemik doku iskelelerindeki etkilerinin incelenmesin açısından oldukça verimli olan bu çalışmada yapılan 8 günlük hücre kültür çalışmalarının farklı periyotlarda da yapılmasının faydalı olacağı düşünölmektedir. Ayrıca sayısız çeşidi olan ve farklı özelliklere de sahip diatomlar var olduğu için benzer çalışmaların farklı diatom türlerinde de yapılması kemik doku mühendisliği alanına önemli katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Agrawal, C. M. and Ray, R. B., “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”, *J. Biomed. Mater.*, 55(2), 141–150, (2001).

Ahmed, E. M., “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review”, *J. Adv. Res.*, 6(2), 105–121, (2015).

Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W. A. W. and Hussain, R., “Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources”, *J. Mater. Sci.*, 49(4), 1461–1475, (2013).

Albert, S., Keppler Albert, K. and Quack M., *Handbook of high-resolution spectroscopy*, 2: John Wiley & Sons, (2011).

Albert, K., Huang, X. C. and Hsu, H. Y., “Bio-templated silica composites for next-generation biomedical applications”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 249, 272-289, (2017).

Albrektsson, T. and Johansson, C., “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration”, *Eur. Spine J.*, 10, 96-101, (2011).

Alshemary, A. Z., Akram, M., Taha, A., Tezcaner, A., Evis, Z. and Hussain, R., “Physico-chemical and biological properties of hydroxyapatite extracted from chicken beaks”, *Mater. Lett.*, 215, 169–172, (2018).

Alves, N. M. and Mano, J. F., “Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 43(5), 401–414, (2008).

Amand, L. E. and Tullin, C. J., “The Theory Behind FTIR analysis”, *Dep. of Energy.*, 502, 1–15, (1999).

Ambrosio, A. M. A., Sahota, J. S., Khan, Y. and Laurencin, C. T., “A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 58(3), 295–301, (2001).

Amoda, A., Borkiewicz, L., Rivero-Müller, A. and Alam, P., “Sintered nanoporous biosilica diatom frustules as high efficiency cell-growth and bone-mineralisation platforms”, *Mater. Today Commun.*, 24, (2020).

Aw, M. S., Simovic, S., Yu, Y., Addai Mensah, J. and Losic, D., “Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications”, *Powder Technol.*, 223, 52–58, (2012).

- Azmana, M., Mahmood, S., Hilles, A. R., Rahman, A., Azmir Bin Arifin, M. and Ahmed, S., “A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 185, 832-848, (2021).
- Bagheri Khoulenjani, S., Taghizadeh, S. M. and Mirzadeh, H., “An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation”, *Carbohydr. Polym.*, 78(4), 773–778, (2009).
- Baino, F., “Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine”, *Ceramics*, 44(13), 14953–14966, (2018).
- Banerjee, S. S., Tarafder, S., Davies, N. M., Bandyopadhyay, A. and Bose, S., “Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics”, *Acta Biomater.*, 6(10), 4167–4174, (2010).
- Bedian, L., Villalba Rodríguez, A. M., Hernández Vargas, G., Parra-Saldivar, R. and Iqbal, H. M. N., “Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications–A review”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 98, 837–846, (2017).
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H. and Lee, S. H., “Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 26(2), 164-180, (2020).
- Bhattacharai, N., Gunn, J. and Zhang, M., “Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62(1), 83–99, (2010).
- Blakely, K. K. and Johnson, C., “New Osteoporosis Treatment Means New Bone Formation”, *Nurs. Women's Health*, 24(1), 52-57, (2019).
- Boanini, E., Gazzano, M. and Bigi, A., “Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature”, *Acta Biomater.*, 6(6), 1882–1894, (2010).
- Bose, S., Roy, M. and Bandyopadhyay, A., “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds”, *Trends Biotechnol.*, 30(10), 546–554, (2012).
- Bose, S., Tarafder, S., Banerjee, S. S., Davies, N. M. and Bandyopadhyay, A., “Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO₂ doped β -TCP”, *Bone*, 48(6), 1282–1290, (2011).
- Bou Gharios, G., Abraham, D. and de Crombrugge, B., “Type I collagen structure, synthesis, and regulation”, *Principles of Bone Biology*, 295–337, (2020).

- Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A. and León, B., “Biological hydroxyapatite obtained from fish bones”, *Mater. Sci. Eng. C*, 32(3), 478–486, (2012).
- Burdick, J. A. and Prestwich, G. D., “Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications”, *J. Adv. Mater.*, 23(12), 41–56, (2011).
- Burg, K. J. L., Porter, S. and Kellam, J. F., “Biomaterial developments for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 21, 2347-2359, (2000).
- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M. and Boccafroschi, F., “Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 30, 115-125, (2019).
- Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R. and Khademhosseini, A., “Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering”, *ACS Nano*, 7(4), 2891–2897, (2013).
- Chalmers, J. M. and Griffiths, P. R., Handbook of vibrational spectroscopy. Theory and instrumentation, 1, J. Am. Chem. Society. Vol. 1. Chichester (UK): J. Wiley & Sons. (2002).
- Chen, Q. Z., Bismarck, A., Hansen, U., Junaid, S., Tran, M. Q., Harding, S. E. and Boccaccini, A. R., “Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue”, *Biomaterials*, 29(1), 47–57, (2008).
- Chen, G. Q. and Chen, F., “Growing Phototrophic Cells without Light”, *Biotechnol. Lett.*, 28(9), 607–616, (2006).
- Cicco, S., Vona, D., Gristina, R., Sardella, E., Ragni, R., Lo Presti, M. and Farinola, G., “Biosilica from Living Diatoms: Investigations on Biocompatibility of Bare and Chemically Modified *Thalassiosira weissflogii* Silica Shells”, *Bioengineering*, 3(4), 35, (2016).
- Clarke, B., “Normal Bone Anatomy and Physiology”, *Clin J Am Soc Nephrol.*, 3, 131–139, (2008).
- Crockett, J. C., Rogers, M. J., Coxon, F. P., Hocking, L. J. and Helfrich, M. H., “Bone remodelling at a glance”, *J. Cell Sci.*, 124(7), 991–998, (2011).
- D’ Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F., Adelfi, M., Botte, P. And Fontana, A., “Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production”, *Biotechnol. Biofuels*, 8(1), 28, (2015).
- Dalgic, A. D., Atila, D., Karatas, A., Tezcaner, A. and Keskin, D., “Diatom shell incorporated PHBV/PCL-pullulan co-electrospun scaffold for bone tissue engineering”, *Mater Sci Eng C*, 100, 735–746, (2019).

Danil de Namor, A. F., El Gamouz, A., Frangie, S., Martinez, V., Valiente, L. and Webb, O. A., “Turning the volume down on heavy metals using tuned diatomite. A review of diatomite and modified diatomite for the extraction of heavy metals from water”, *J. Hazard. Mater.*, 241-242, 14–31, (2012).

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. and Chiellini, E., “Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications”, *Prog. Polym. Sci.*, 36(8), 981–1014, (2011).

Deng, S., Lin, Z., Tang, H., Ullah, S. and Bi, Y., “Rapid synthesis of hydroxyapatite nanoparticles via a novel approach in the dual-frequency ultrasonic system for specific biomedical application”, *J. Mater. Res.*, 34(16), 2796 - 2806, (2019).

Desai, P. N., Yuan, Q. and Yang, H., “Synthesis and Characterization of Photocurable Polyamidoamine Dendrimer Hydrogels as a Versatile Platform for Tissue Engineering and Drug Delivery”, *Biomacromolecules*, 11(3), 666–673, (2010).

Deshmukh, K., Basheer Ahamed, M., Deshmukh, R. R., Khadheer Pasha, S. K., Bhagat, P. R. and Chidambaram, K., “Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering”, *Biopolymer Composites in Electronics*, 27–128, (2017).

Dey, R. E., Zhong, X., Youle, P. J., Wang, Q. G., Wimpenny, I., Downes, S. And Budd, P. M., “Synthesis and Characterization of Poly(vinylphosphonic acid-co-acrylic acid) Copolymers for Application in Bone Tissue Scaffolds”, *Macromolecules*, 49(7), 2656–2662, (2016).

Diem, M., Romeo, M., Boydston-White, S., Miljković, M. and Matthäus, C., “A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004)”, *The Analyst*, 129(10), 880–885, (2004).

Dimas, L. S. and Buehler, M. J., “Influence of geometry on mechanical properties of bio-inspired silica-based hierarchical materials”, *Bioinspir. Biomim.*, 7(3), (2012).

Hadjidakis, D. J. and Androulakis, I. I., “Bone Remodeling”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1092, 385–396, (2006).

Dolatabadi, J. E. N. and de la Guardia, M., “Applications of diatoms and silica nanotechnology in biosensing, drug and gene delivery, and formation of complex metal nanostructures”, *Trends Analyt. Chem.*, 30(9), 1538–1548, (2011).

Dorozhkin, S. V. and Epple, M., “Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates”, *Angewandte Chemie International Edition*, 41(17), 3130–3146, (2002).

Harmey, D., Hesse, L., Narisawa, S., Johnson, K. A., Terkeltaub, R. and Millán, J. L., “Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders”, *Am. J. Clin. Pathol.*, 164(4), 0–1209, (2004).

El Knidri, H., Laajeb, A. and Lahsini, A., “Chitin and chitosan: chemistry, solubility, fiber formation, and their potential applications. Handbook of Chitin and Chitosan”, 35–57, (2020).

Elsabee, M. Z. and Abdou, E. S., “Chitosan based edible films and coatings: A review”, *Mater. Sci. Eng. C*, 33(4), 1819–1841, (2013).

Ezekiel, I., Kasim, S. R., Ismail, Y. M. B. and Noor, A. F. M., “Nanoemulsion synthesis of carbonated hydroxyapatite nanopowders: Effect of variant CO₃²⁻/PO₄³⁻ molar ratios on phase, morphology, and bioactivity”, *Ceramics International*, 44(11), 13082–13089, (2018).

Farzadi, A., Bakhshi, F., Solati Hashjin, M., Asadi Eydivand, M. and abu Osman, N. A., “Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization”, *Ceramics International*, 40(4), 6021–6029, (2014).

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. And Falkowski, P., “Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components”, *Science*, 281(5374), 237–240, (1998).

Fihri, A., Len, C., Varma, R. S. and Solhy, A., “Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis”, *Coord. Chem. Rev.*, 347, 48–76, (2017).

Fillingham, Y. and Jacobs, J., “Bone grafts and their substitutes”, *Bone Jt. J.*, 98-B(1_Supple_A), 6–9, (2016).

Flanagan, T. C., Wilkins, B., Black, A., Jockenhoevel, S., Smith, T. J. and Pandit, A. S., “A collagen-glycosaminoglycan co-culture model for heart valve tissue engineering applications”, *Biomaterials*, 27(10), 2233–2246, (2006).

Francis, L., Greco, K. V., Boccaccini, A. R., Roether, J. J., English, N. R., Huang, H. and Ansari, T., “Development of a novel hybrid bioactive hydrogel for future clinical applications”, *J. Biomater. Appl.*, 33(3), 447–465, (2018).

Friel, J. J. and Lyman, C. E., “Tutorial Review: X-ray Mapping in Electron-Beam Instruments”, *Microsc. Microanal. Microstruct.*, 12(01), 2–25, (2006).

- Gaharwar, A. K., Arpanaei, A., Andresen, T. L. and DolatshahiPirouz, A., “3D Biomaterial Microarrays for Regenerative Medicine: Current State-of-the-Art, Emerging Directions and Future Trends”, *J. Adv. Mater.*, 28(4), 771–781, (2016).
- Gauglitz, G. and Vo-Dihn, T., “Handbook of spectroscopy”, *J. Am. Chem. Soc.*, 26,28, 8859–8860, (2004).
- George, A. and Veis, A., “Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition”, *Chem. Rev.*, 108(11), 4670–4693, (2008).
- Ghosh, A. and Ali, M. A., “Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids”, *J. Mater. Sci.*, 47(3), 1196–1204, (2011).
- Gibson, I. R., Best, S. M. and Bonfield, W., “Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44(4), 422-428, (1999).
- Gómez Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. and Montero, M. P., “Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review”, *Food Hydrocoll.*, 25(8), 1813–1827, (2011).
- Gopi, D., Kanimozhi, K. and Kavitha, L., “Opuntia ficus indica peel derived pectin mediated hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, spectral characterization, biological and antimicrobial activities”, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 141, 135–143, (2015).
- Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M. A., Nagy, S. S. and Sterrenburg, F. A. S., “The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology”, *Trends Biotechno*, 27(2), 116–127, (2009).
- Griffith, L. G. and Naughton, G., “Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities”, *Science*, 295, 1009-1014, (2002).
- Gümüşderelioğlu, M., Sunal, E., Demirtaş, T. T., Kiremitci, A. S., “Chitosan-based double-faced barrier membrane coated with functional nanostructures and loaded with BMP-6”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 31(1), (2020).
- Habraken, W. J. E. M., Wolke, J. G. C. And Jansen, J. A., “Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59(4-5), 234–248, (2007).
- Hagesaether, E., Hiorth, M. and Sande, S. A., “Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71, 325–331, (2009).

- Hollister, S. J., Maddox, R. D. and Taboas, J. M., “Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints”, *Biomater.*, 23, 4095–4103, (2002).
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. and Farahmandghavi, F., “Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles”, *Food Hydrocoll.*, 44, 172–182, (2015).
- Hou, C. H., Yang, R. S. and Hou, S. M., “Hospital-based allogenic bone bank—10-year experience”, *J. Hosp. Infect.*, 59(1), 41–45, (2005).
- Hu, X., Shen, H., Yang, F., Liang, X., Wang, S. and Wu, D., “Modified composite microspheres of hydroxyapatite and poly(lactide-co-glycolide) as an injectable scaffold”, *Appl. Surf. Sci.*, 292, 764–772, (2014).
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. and Madihally, S. V., “In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering”, *Biomaterials*, 26(36), 7616–7627, (2005).
- Hunt, J. A., Chen, R., van Veen, T. and Bryan, N., “Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine”, *J. Mater. Chem. B*, 2(33), 5319–5338, (2014).
- Huysman, M. J., Martens, C., Vandepoele, K., Gillard, J., Rayko, E., Heijde, M. and Vyverman, W., “Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling”, *Genome Biology*, 11(2), R17, (2010).
- Iqbal, N., Abdul Kadir, M. R., Nik Malek, N. A. N., Mahmood, N. H. B., Murali, M. R. and Kamarul, T., “Characterization and antibacterial properties of stable silver substituted hydroxyapatite nanoparticles synthesized through surfactant assisted microwave process”, *Mater. Res. Bull.*, 48(9), 3172–3177, (2013).
- Jabbari, E., Leijten, J., Xu, Q. and Khademhosseini, A., “The matrix reloaded: the evolution of regenerative hydrogels”, *Materials Today*, 19(4), 190–196, (2016).
- Jae Young, R., Kuhn-Spearing, L. and Zioupos, P., “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone”, *Med. Eng. Phys.*, 20(2), 92–102, (1998).
- Jahan, K. and Tabrizian, M., “Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects”, *Biomater. Sci.*, 4(1), 25–39, (2016).
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., Tokura, S., Tamura, H. and Selvamurugan, N., “Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications”, *Prog. Mater. Sci.*, 55(7), 675–709, (2010).

Jones, J. R., Ehrenfried, L. M. and Hench, L. L., “Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 27(7), 964–973, (2006).

Jouyandeh, M., Paran, S. M. R., Shabaniyan, M., Ghiyasi, S., Vahabi, H., Badawi, M. and Saeb, M. R. “Curing behavior of epoxy/Fe₃O₄ nanocomposites: A comparison between the effects of bare Fe₃O₄, Fe₃O₄/SiO₂/chitosan and Fe₃O₄/SiO₂/chitosan/imide/phenylalanine-modified nanofillers”, *Prog. Org. Coat.*, 123, 10–19, (2018).

Kalita, S. J. and Verma, S., “Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization”, *Mater. Sci. Eng. C*, 30(2), 295–303, (2010).

Karp, J. M. and Langer, R., “Development and therapeutic applications of advanced biomaterials”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(5), 454–459, (2007).

Keeling, P. J., “The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids”, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 365(1541), 729–748, (2010).

Khoo, W., Nor, F. M., Ardhyanta, H. and Kurniawan, D., “Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures”, *Procedia Manuf.*, 2, 196–201, (2015).

Kim, S. H., Yeon, Y. K., Lee, J. M., Chao, J. R., Lee, Y. J., Seo, Y. B., Sultan, Md. T., Lee, O. J., Lee, J. S., Yoon, S., Hong, I. S., Khang, G., Lee, S. J., Yoo, J. J. And Park, C. H., “Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing”, *Nat. Commun.*, 9, 1620, (2018).

Klinkaewnarong, J. and Utara, S., “Ultrasonic-assisted conversion of limestone into needle-like hydroxyapatite nanoparticles”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 46, 18–25, (2018).

Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. and Park, H. J., “Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review”, *Int. J. Food Microbiol.*, 144(1), 51–63, (2010).

Kong, X., Squire, K., Li, E., LeDuff, P., Rorrer, G. L., Tang, S. and Wang, A. X., “Chemical and Biological Sensing Using Diatom Photonic Crystal Biosilica With In-Situ Growth Plasmonic Nanoparticles”, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 15(8), 828–834, (2016).

Kooistra, W. H. C. F. and Medlin, L. K., “Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta)”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 6(3), 391–407, (1996).

Kozlov, P. V. and Burdygina, G. I., “The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification”, *Polymer*, 24(6), 651–666, (1983).

- Kretlow, J. D. and Mikos, A. G., “Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Tissue Engineering*, 13(5), 927–938, (2007).
- Kumar, C. S. S. R. and Mohammad, F., “Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63(9), 789–808, (2011).
- Kumar, G. S., Thamizhavel, A. and Giriya, E. K., “Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications”, *Mater. Lett.*, 76, 198–200, (2012).
- Kumari, S., Singh, R. P., Chavan, N. N. and Annamalai, P. K., “Chitosan-based bionanocomposites for biomedical application”, *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 7(4), 219–227, (2016).
- Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thöming, J. and Stepnowski, P., “Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation”, *Polymers*, 3(4), 1875–1901, (2011).
- Kumosa, L. S., Zetterberg, V. and Schouenborg, J., “Gelatin promotes rapid restoration of the blood brain barrier after acute brain injury”, *Acta Biomater.*, 65, 137–149, (2018).
- Lazarus, D., Barron, J., Renaudie, J., Diver, P. and Türke, A., “Cenozoic Planktonic Marine Diatom Diversity and Correlation to Climate Change”, *PloS one*, 9(1), e84857, (2014).
- Le, T. D. H., Bonani, W., Speranza, G., Sglavo, V., Ceccato, R., Maniglio, D. and Migliaresi, C., “Processing and characterization of diatom nanoparticles and microparticles as potential source of silicon for bone tissue engineering”, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 59, 471–479, (2016).
- Li, X., Zhang, L. and Yin, X., “Microstructure and mechanical properties of three porous Si₃N₄ ceramics fabricated by different techniques”, *Mater Sci Eng A*, 549, 43–49, (2012).
- Li, Z., Su, Y., Xie, B., Wang, H., Wen, T., He, C. And Wang, D., “A tough hydrogel–hydroxyapatite bone-like composite fabricated in situ by the electrophoresis approach”, *J. Mater. Chem. B*, 1(12), 1755, (2013).
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P. and Regenstein, J. M., “Collagen and Gelatin”, *Annu Rev Food Sci Technol*, 6(1), 527–557, (2015).
- Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J. P., Chen, Z. and Pan, H., “Insight into Biological Apatite: Physicochemical Properties and Preparation Approaches”, *Biomed Res. Int.*, 1–13, (2013).

- Liu, Y., Chan, J. K. Y. and Teoh, S. H., “Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems”, *J Tissue Eng Regen Med*, 9(2), 85–105, (2012).
- Liu, Y., Lim, J. and Teoh, S. H “Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering”, *Biotechnol. Adv.*, 31(5), 688–705, (2013).
- Lizardi Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M. and Goycoolea Valencia, F. M., “Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan”, *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 3–31, (2016).
- Logeart Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H., “Engineering bone: challenges and obstacles”, *J Cell Mol Med*, 9(1), 72–84, (2005).
- Losic, D., Mitchell, J. G. and Voelcker, N. H., “Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials”, *Adv Mater*, 21(29), 2947–2958, (2009).
- Lv, L. C., Huang, Q.Y., Ding, W., Xiao, X. H., Zhang, H. Y. and Xiong, L. X., “Fish gelatin: The novel potential applications”, *J. Funct. Foods*, 63, 103581, (2019).
- Ma, K., Huang, D., Cai, J., Cai, X., Gong, L., Huang, P. And Jiang, T., “Surface functionalization with strontium-containing nanocomposite coatings via EPD”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 97–106, (2016).
- Martens, P., Holland, T. and Anseth, K. S., “Synthesis and characterization of degradable hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers”, *Polymer*, 43(23), 6093–6100, (2002).
- Martucci, N., Migliaccio, N., Ruggiero, I., Albano, F., Cali, G., Romano, S. and Lamberti, A., “Nanoparticle-based strategy for personalized B-cell lymphoma therapy”, *Int J Nanomedicine*, 11, 6089–6101, (2016).
- Meenach, S. A., Hilt, J. Z. and Anderson, K. W., “Poly (ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy”, *Acta Biomater.*, 6(3), 1039–1046, (2010).
- Mishra, M., Arukha, A. P., Bashir, T., Yadav, D. and Prasad, G. B. K. S., “All New Faces of Diatoms: Potential Source of Nanomaterials and Beyond”, *Front. Microbiol.*, 8,1239, (2017).

Mitra, J., Tripathi, G., Sharma, A. and Basu, B., “Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response”, *RSC Adv.*, 3, 11073-11094, (2013).

Mohammed, A. and Abdullah, A., “Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review”, *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics – HERVEX*, 1454–8003, (2018).

Mohan, N., Palangadan, R., Fernandez, F. B. and Varma, H., “Preparation of hydroxyapatite porous scaffold from a “coral-like” synthetic inorganic precursor for use as a bone substitute and a drug delivery vehicle”, *Mater. Sci. Eng. C*, 92, 329–337, (2018).

Mohd Pu’ad, N. A. S., Abdul Haq, R. H., Mohd Noh, H., Abdullah, H. Z., Idris, M. I. and Lee, T. C., “Synthesis method of hydroxyapatite: A review”, *Mater. Today: Proc.*, 233-239, (2020).

Mohd Pu’ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I. and Lee, T. C., “Syntheses of hydroxyapatite from natural sources”, *Heliyon*, 5(5), e01588, (2019).

Murugan, R. and Ramakrishna, S., “Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite”, *Biomaterials*, 25(17), 3829–3835, (2004).

Nair, P. and Thottappillil, N., “Scaffolds in vascular regeneration: current status”, *Vasc Health Risk Manag*, 79, (2015).

Nasiri Tabrizi, B., Fahami, A. and Ebrahimi Kahrizsangi, R., “A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone”, *J Ind Eng Chem*, 20(1), 245–258, (2014).

Nazmi, A., Hauck, R., Davis, A., Hildebrand, M., Corbeil, L. B. and Gallardo, R. A., “Diatoms and diatomaceous earth as novel poultry vaccine adjuvants”, *Poult.*, 96(2), 288–294, (2016).

Nikpour, M. R., Rabiee, S. M. and Jahanshahi, M., “Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications”, *Compos. B. Eng.*, 43(4), 1881–1886, (2012).

O’Keefe, R. J. and Mao, J., “Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic—An Overview”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 17(6), 389–392, (2011).

Okada, M. and Matsumoto, T., “Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications”, *Jpn Dent Sci Rev*, 51(4), 85–95, (2015).

Okamoto, Y., “Analgesic effects of chitin and chitosan”, *Carbohydr. Polym.*, 49(3), 249–252, (2002).

Pahl, S. L., Lewis, D. M., Chen, F. and King, K. D., “Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): Effect of some environmental factors”, *J. Biosci. Bioeng.*, 109(3), 235–239, (2010).

Pal, A., Paul, S., Choudhury, A. R., Balla, V. K., Das, M. and Sinha, A., “Synthesis of hydroxyapatite from *Lates calcarifer* fish bone for biomedical applications”, *Mater. Lett.*, 203, 89–92, (2017).

Pankajakshan, D. and Agrawal, D. K., “Scaffolds in tissue engineering of blood vessels”, *Can. J. Physiol.*, 88(9), 855–873, (2010).

Patil, P., Madhuprasad, Bhat, M. P., Gatti, M. G., Kabiri, S., Altalhi, T. and Kurkuri, M., “Chemodosimeter functionalized diatomaceous earth particles for visual detection and removal of trace mercury ions from water”, *Chem. Eng. Sci.*, 327, 725–733, (2017).

Pham, Q. P., Sharma, U. and Mikos, A. G., “Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review”, *Tissue Eng.*, 12(5), 1197–1211, (2006).

Pillai, S. K. and Ray, S. S., “CHAPTER 2. Chitosan-based Nanocomposites”, *RSC Green Chemistry*, 33–68 (2012).

Porter, J. R., Ruckh, T. T. and Popat, K. C., “Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies”, *Biotechnol. Prog.*, NA–NA., 25(6), (2009).

Preethi Soundarya, S., Haritha Menon, A., Viji Chandran, S. and Selvamurugan, N., “Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 119, 1228–1239, (2018).

Querido, W., Falcon, J. M., Kandel, S. and Pleshko, N., “Vibrational spectroscopy and imaging: applications for tissue engineering”, *The Analyst*, 142(21), 4005–4017, (2017).

Raggatt, L. J. and Partridge, N. C., “Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling”, *J. Biol. Chem.*, 285(33), 25103–25108, (2010).

- Raposo, M., de Morais, R. and Bernardo de Morais, A., “Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae”, *Mar. Drugs*, 11(12), 233–252, (2013).
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., “An introduction to materials in medicine”, *Biomaterials science 3rd edn, Elsevier Science*, (2013).
- Ratner, B. D., “The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century”, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 4(5), 523–527, (2011).
- Rea, I., Martucci, N. M., De Stefano, L., Ruggiero, I., Terracciano, M., Dardano, P. and Lamberti, A., “Diatomite biosilica nanocarriers for siRNA transport inside cancer cells”, *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1840(12), 3393–3403, (2014).
- Roh, H. S., Jung, S. C., Kook, M. S. and Kim, B. H., “In vitro study of 3D PLGA/n-HAp/ β -TCP composite scaffolds with etched oxygen plasma surface modification in bone tissue engineering”, *Appl. Surf. Sci.*, 388, 321–330, (2016).
- Sadat Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah Khoshdargi, E. and Jamshidi, A., “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures”, *Acta Biomater.*, 9(8), 7591–7621, (2013).
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P. and Reis, R. L., “Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends”, *Macromol. Biosci.*, 4(8), 743–765, (2004).
- Salih, E., Wang, J., Mah, J. and Fluckiger, R., “Natural variation in the extent of phosphorylation of bone phosphoproteins as a function of in vivo new bone formation induced by demineralized bone matrix in soft tissue and bony environments”, *Biochem. J.*, 364(2), 465–474, (2002).
- Sardo, A., Orefice, I., Balzano, S., Berra, L. and Romano, G., “Mini-Review: Potential of Diatom-Derived Silica for Biomedical Applications”, *Appl.*, 11(10), 4533, (2021).
- Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., LewisOscar, F., Selvaraj, R., Brindhadevi, K. and Pugazhendhi, A., “Natural organic and inorganic–hydroxyapatite biopolymer composite for biomedical applications”, *Prog. Org. Coat.*, 147, 105858, (2020).
- Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., Shanmugavel, M., Manikandan, E., Nguyen-Tri, P., Brindhadevi, K. and Pugazhendhi, A., “Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite from fish bones: Photocatalytic degradation of industrial dyes (crystal violet and Congo red)”, *Prog. Org. Coat.*, 148, 105890, (2020).

- Sepantafar, M., Mohammadi, H., Maheronnaghsh, R., Tayebi, L. and Baharvand, H., “Single phased silicate-containing calcium phosphate bioceramics: Promising biomaterials for periodontal repair”, *Ceram.*, 44(10), 11003–11012, (2018).
- Shrivats, A. R., McDermott, M. C. and Hollinger, J. O., “Bone tissue engineering: state of the union”, *Drug Discov*, 19(6), 781–786, (2014).
- Silber, J. S., Anderson, D. G., Daffner, S. D., Brislin, B. T., Leland, J. M., Hilibrand, A. S. And Albert, T. J., “Donor Site Morbidity After Anterior Iliac Crest Bone Harvest for Single-Level Anterior Cervical Discectomy and Fusion”, *Spine J.*, 28(2), 134–139, (2003).
- Simon, J. L., Roy, T. D., Parsons, J. R., Rekow, E. D., Thompson, V. P., Kemnitzer, J. and Ricci, J. L., “Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 66A(2), 275–282, (2003).
- Singh, R., Shitiz, K. and Singh, A., “Chitin and chitosan: biopolymers for wound management”, *Int. Wound J.*, 14(6), 1276–1289, (2017).
- Sockalingam, K., Nelson, H., Idris, M. I. and Abdullah, H. Z., “Effects of Pre-Treatment Durations on Properties of Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Skin Gelatin”, *Mater. Sci. Forum*, 840, 146–150, (2016).
- Song, W., Markel, D. C., Jin, X., Shi, T. and Ren, W., “Poly (vinyl alcohol)/collagen/hydroxyapatite hydrogel: Properties and in vitro cellular response”, *J Biomed Mater Res A*, 100(11), 3071–3079, (2012).
- Stuart, B., *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd., (2005).
- Sultana, S., Ali, M. E. and Ahamad, M. N. U., “Gelatin, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients”, *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods*, 215–239, (2018).
- Sun, R. X., Lv, Y., Niu, Y. R., Zhao, X. H., Cao, D. S., Tang, J. and Chen, K. Z., “Physicochemical and biological properties of bovine-derived porous hydroxyapatite/collagen composite and its hydroxyapatite powders”, *Ceram*, 43(18), 16792–16798, (2017).
- Suri, A., Pratt, A., Tear, S., Walker, C., Kincal, C., Kamber, U. and El-Gomati, M., “Analysis and detection of low-energy electrons in scanning electron microscopes using a Bessel box electron energy analyser”, *J Electron Spectros Relat Phenomena J*, 241, 146823, (2019).
- Tanaka, T., Maeda, Y., Veluchamy, A., Tanaka, M., Abida, H., Maréchal, E. and Fujibuchi, W., “Oil Accumulation by the Oleaginous Diatom *Fistulifera*

solarisas Revealed by the Genome and Transcriptome”, *Plant Cell Rep.*, 27(1), 162–176, (2015).

Tautzenberger, A., Kovtun, A. and Ignatius, A., “Nanoparticles and their potential for application in bone”, *Int J Nanomedicine*, 7, 4545–4557, (2012).

Terracciano, M., Shahbazi, M. A., Correia, A., Rea, I., Lamberti, A., De Stefano, L. and Santos, H. A., “Surface bioengineering of diatomite based nanovectors for efficient intracellular uptake and drug delivery”, *Nanoscale*, 7(47), 20063–20074, (2015).

Tibbitt, M. W. and Anseth, K. S., “Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture”, *Biotechnol. Bioeng.*, 103(4), 655–663, (2009). doi:10.1002/bit.22361

Tirichine, L., Rastogi, A. and Bowler, C., “Recent progress in diatom genomics and epigenomics”, *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 46–55, (2017).

Tramontano, C., Chianese, G., Terracciano, M., de Stefano, L. and Rea, I., “Nanostructured Biosilica of Diatoms: From Water World to Biomedical Applications”, *Appl. Sci.*, 10(19), 6811, (2020).

Tréguer, P. J. and De La Rocha, C. L., “The World Ocean Silica Cycle”, *Ann Rev Mar Sci*, 5(1), 477–501, (2013).

Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F. And Shu, W., “3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Bioactive Materials*, 3(3), 278–314, (2018).

Uthappa, U. T., Brahmkhatri, V., Sriram, G., Jung, H.-Y., Yu, J., Kurkuri, N. and Kurkuri, M. D., “Nature engineered diatom biosilica as drug delivery systems”, *Journal of Controlled Release*, 281, 70–83, (2018).

Valand, R., Tanna, S., Lawson, G. and Bengtström, L. “A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations”, *Food Addit Contam Part A*, 1–20, (2019).

Varadavenkatesan, T., Vinayagam, R., Pai, S., Kathirvel, B., Pugazhendhi, A. and Selvaraj, R., “Synthesis, biological and environmental applications of hydroxyapatite and its composites with organic and inorganic coatings”, *Progress in Organic Coatings*, 151, 106056, (2021).

Verlee, A., Mincke, S. and Stevens, C. V., “Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives”, *Carbohydr. Polym.*, 164, 268–283, (2017).

- Vieira, S., da Silva Morais, A., Silva Correia, J., Oliveira, J. M. and Reis, R. L., “Natural-Based Hydrogels: From Processing to Applications”, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, (2017).
- Wang, F., and Li, M. S., “A Biomimetic Method of Hydroxyapatite Powders Synthesized in Simulated Body Fluid”, *Key Eng Mater*, 297-300, 1371–1375, (2005).
- Wang, Y. V., Liu, C. C., Cherng, J. H., Lin, C. S., Chang, S. J., Hong, Z. J., Chiu, Y. K., Hsu, S. D. and Chang, H., “Biological Effects of Chitosan-Based Dressing on Hemostasis Mechanism”, *Polymers*, 11(11), 1906, (2019).
- Wegst, U. G. K., Bai, H., Saiz, E., Tomsia, A. P. and Ritchie, R. O., “Bioinspired structural materials”, *Nat. Mater.*, 14(1), 23–36, (2014).
- Wei, G. and Ma, P. X., “Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 25(19), 4749-4757, (2004).
- Whyte, M. P., “Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization”, *Endocrine Reviews*, 15(4), 439–461, (1994).
- Wong, W. Y. and Noor, A. F. M. “Synthesis and Sintering-wet Carbonation of Nano-sized Carbonated Hydroxyapatite”, *Procedia Chemistry*, 19, 98–105, (2016).
- Wonganu, B., “Application of Gelatin Derived from Waste Tilapia Scales to an Antibiotic Hydrogel Pad”, *E3S Web of Conferences*, 141, 03004, (2020).
- Xu, W., Ganz, C., Weber, U., Adam, M., Wolter, D., Frerich, B. and Gerber, T., “Evaluation of injectable silicaembedded nanohydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model”, *Int J Nanomedicine*, 6, 1543-1552, (2011).
- Xu, X., Jha, A. K., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C. and Jia, X., “Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks”, *Soft Matter*, 8(12), 3280, (2012).
- Yang, Y. G. and Sykes, M., “Xenotransplantation: current status and a perspective on the future”, *Nat. Rev. Immunol.*, 7(7), 519–531, (2007).
- Yi, Z., Wang, K., Tian, J., Shu, Y., Yang, J., Xiao, W. and Liao, X., “Hierarchical porous hydroxyapatite fibers with a hollow structure as drug delivery carriers”, *Ceram*, 42(16), 19079–19085, (2016).
- Yilmaz, B., Alshemary, A. Z. and Evis, Z., “Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications”, *Microchem. J.*, 144, 443–453, (2019).

- Younes, I. and Rinaudo, M., “Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications”, *Mar. Drugs*, 13(3), 1133–1174, (2015).
- Zeng, Y., Zhu, L., Han, Q., Liu, W., Mao, X., Li, Y. and Zhao, R. C., “Preformed gelatin microcryogels as injectable cell carriers for enhanced skin wound healing”, *Acta Biomater.*, 25, 291–303, (2015).
- Zhang, Y. F., Zheng, Y. F. and Qin, L., “A comprehensive biological evaluation of ceramic nanoparticles as wear debris”, *Nanomed. J.*, 7(6), 975–982, (2011).
- Zhang, H. and Zhang, M., “Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios”, *Mater. Chem. Phys.*, 126(3), 642–648, (2011).
- Zhang, H., Shahbazi, M. A., Mäkilä, E. M., da Silva, T. H., Reis, R. L., Salonen, J. J. and Santos, H. A., “Diatom silica microparticles for sustained release and permeation enhancement following oral delivery of prednisone and mesalamine”, *Biomaterials*, 34(36), 9210–9219, (2013).
- Zhang, R. and Ulery, B. D., “Synthetic Vaccine Characterization and Design”, *J. Bionanosci.*, 12(1), 1–11.
- Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R. and Kohn, J., “Biodegradable Polymers”, *Principles of Tissue Engineering*, 441–473, (2014).