T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIK YUMURTA KABUĞU PARÇACIKLARI İÇEREN HİDROJEL BİYOKOMPOZİT DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ

Zeynep AK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Temmuz, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIK YUMURTA KABUĞU PARÇACIKLARI İÇEREN HİDROJEL BİYOKOMPOZİT DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ

Zeynep AK tarafından hazırlanan tez çalışması 24.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adı Mehmet Murat ÖZMEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Yeliz BAŞARAN ELALMIŞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Esra SU, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Atık Yumurta Kabuğu Parçacıkları İçeren Hidrojel Biyokompozit Doku İskelesi Üretimi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zeynep AK

İmza

Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün TYL-2024-6139” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, ilgisini eksik etmeyen, çalışmaya teşvik eden, araştırma ruhu aşılayan ve her konuda çok büyük emeği olan danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN'e,

Tez süreci boyunca çalışmama destek olan ve laboratuvarlarında çalışma imkanı veren kıymetli hocalarım Doç. Dr. Ayça BAL ÖZTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Esra SU'ya, hücre deneylerinde yardımını esirgemeyen, değerli bilgilerini aktaran Burçin İZBUDAK'a,

Üniversitede yollarımızın kesişmesiyle dostluğumuzun başladığı, o andan itibaren her anı birlikte paylaştığımız, her koşulda birbirimize destek olduğumuz, iyi günde kötü günde ayrılmadığımız, bana her zaman güç veren ve hayatıma anlam katan çok sevdiğim biricik dostlarım Bilge TOPALOĞLU, Demet COŞKUN ve Sultan GÜLTEKİN'e,

Yüksek lisansın bana en güzel kazancı olan, tez sürecini onlar olmasa atlatamayacağım, birlikte öğrendiğimiz ve geliştiğimiz, iyi ki tanımış olduğum çok sevdiğim canım arkadaşlarım Sanem BULUT ve Başak AKIN'a,

Birlikte büyüdüğüm, artık kız kardeş gibi olduğumuz, her zaman her koşulda yanımda olan, çok sevdiğim canım dostlarım Sude BAŞMERGEN ve Gizem DUMAN'a,

Benim için her türlü zahmete giren, beni kendimden çok önemseyen, tez sürecimde yanımda olan ve destekleyen tüm aileme, ne olursa olsun arkamda duran canımdan çok sevdiğim annem Elif YÜCEL AK, babam Hünkar AK'a, anneannem Gülçin YÜCEL'e ve teyzem Halime YÜCEL'e,

Son olarak bu günleri görebilseydi benimle gurur duyacak olan, beni bilgiyle ve sevgiyle büyüten biricik dedem Prof. Dr. Tahsin YÜCEL'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne TYL-2024-6139 numaralı proje ile sağladığı destek için teşekkür ederim.

Zeynep AK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **vi**
SİMGE LİSTESİ **x**
KISALTMA LİSTESİ **xi**
ŞEKİL LİSTESİ **xii**
TABLO LİSTESİ **xiv**
ÖZET **xv**
ABSTRACT **17**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 4
2 GENEL BİLGİLER **5**
2.1 Kemik Dokusu 5
2.1.1 Kemik Yapısının Özellikleri 5
2.1.2 Kemik Hücreleri 7
2.1.3 Kemik Doku İyileşmesi 9
2.2 Kemik Doku Mühendisliği 9
2.2.1 Kemik Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Yöntemler 9
2.2.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri 10
2.3 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler 12
2.3.1 Biyoseramikler 12
2.3.2 Metaller 13
2.3.3 Biyopolimerler 14
2.3.4 Nişasta 18
2.4 Hidrojeller 21
2.4.1 Hidrojellerin Özellikleri 21
2.4.2 Hidrojellerin Türleri 22
2.4.3 Hidrojellerin Kullanım Alanları 22

2.4.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Hidrojeller 24
2.4.5 Sonradan Çapraz Bağlanma ile Sentezlenen Hidrojeller 25
2.5 Yumurta Kabuğu 27
2.5.1 Yumurta Kabuğu Özellikleri 27
2.5.2 Yumurta Kabuğu Kullanım Alanları 28
2.5.3 Yumurta Kabuğu Yüklü Hidrojeller 30
2.5.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Yumurta Kabuğunun Önemi 34
3 MATERYAL ve YÖNTEM 36
3.1 Materyaller 36
3.2 Yöntem 37
3.2.1 Yumurta Kabuklarının Hazırlanması 37
3.3 Karakterizasyon Yöntemleri 38
3.3.1 ATR- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi 38
3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi 38
3.3.3 Şişme Oranı 39
3.3.4 Şişme Kinetiği 40
3.3.5 Mekanik Testler 40
3.3.6 Biyomineralizasyon 40
3.3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları 41
3.3.8 Hücre Canlılığı Testi 41
3.3.9 Biyobozunma Testi 42
4 SONUÇ 43
4.1 FTIR Analiz Sonuçları 43
4.2 SEM Analiz Sonuçları 45
4.3 Denge Şişme Sonuçları 48
4.4 Şişme Kinetiği Sonuçları 50
4.5 Mekanik Test Sonuçları 50
4.6 Biyomineralizasyon Testi Sonuçları 54
4.7 Hücre Canlılığı Testi Sonuçları 57

4.8 Biyobozunma Testi Sonuçları 59
5. Genel Sonuçlar 61
KAYNAKÇA **64**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **74**

SİMGE LİSTESİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$m_{bağ}$	Bağıl kütle
m_{kuru}	Kuru hidrojel ağırlığı
$m_{şişmiş}$	Şişmiş hidrojel ağırlığı
m_t	t zamana ait hidrojelin ağırlığı
nm	Nanometre
q_w	Şişme oranı
W_d	Son kuru ağırlık
W_i	İlk kuru ağırlık

KISALTMA LİSTESİ

ALP	Alkalin fosfataz
BMP	Kemik morfolojik proteini
CaMKII	Kalmodulin bağımlı protein kinaz
CMC	Karboksimetil Selüloz
ECH	Epiklorohidrin
ECM	Ekstasellüler matriks
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ES	Yumurta kabuğu
FBS	Fetal Sığır Serumu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
HyA	Hiyalüronik asit
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
PBS	Fosfat tamponlu salin
PEGDE	Poli(etilen glikol) diglisidil eter
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SVS	Simüle vücut sıvısı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kemik yapısında bulunan Havers kanalı, osteonlar ve hücreler [19]..... 6

Şekil 2.2 Kortikal kemikte bulunan Havers kanalları, Volkmann kanalları ve osteon yapısı [17] 7

Şekil 2.3 Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı [52] 18

Şekil 2.4 Nişasta granülünün iç yapısındaki amiloz ve amilopektinin dağılımı [54] 19

Şekil 2.5 Büzülmüş ve şişmiş hidrojel [61] 22

Şekil 3.2 Nişasta hidrojel örneklerinin kaplanma aşamasında kullanılan Polaron SC7640 Sputter Coater 39

Şekil 3.3 Nişasta hidrojel örneklerinin iç yapısının incelenmesinde kullanılan Thermo Fisher Scientific Quattro S 39

Şekil 4.1 Nişasta ve PEGDE'nin çapraz bağlanma mekanizması 43

Şekil 4.2 Çeşitli miktarlarda parçacık içeren hidrojel biyokompozitler, nişasta, PEGDE ve yumurta kabuğunun FTIR spektraları 44

Şekil 4.3 Yumurta kabuğu parçacıklarının 20.000x büyütmede elde edilen SEM görüntüsü..... 45

Şekil 4.4 Yumurta kabuğu içeren nişasta hidrojellerinin ve kontrol örneğinin 500x büyütmede elde edilen SEM görüntüleri a) ES/0, b) ES/2.5, c) ES/5, d) ES/10..... 46

Şekil 4.5 Yumurta kabuğu parçacığı içeren nişasta örneklerinin ve kontrol örneğinin 3000x büyütmede elde edilen SEM görüntüleri a) ES/0, b) ES/2,5, c) ES/5, d) ES/10..... 47

Şekil 4.6 Yumurta kabuğu parçacığı içeren nişasta örneklerinin ve kontrol örneğinin gözenek boyutu dağılımı grafiği a) ES/0, b) ES/2,5, c) ES/5, d) ES/10 48

Şekil 4.7 Hidrojellerin yumurta kabuğu miktarına göre değişen şişme oranları ... 49

Şekil 4.8 Çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığı içeren hidrojel örneklerinin 1 dakika içerisinde hızlıca denge-şişme ağırlığına geldiğini gösteren şişme kinetiği grafiği..... 50

Şekil 4.9 a) Kuru hidrojel örneklerinin basma testi sonuçları, b) Şişmiş hidrojel örneklerinin basma testi sonuçları 51

Şekil 4.10 Yumurta kabuğu içeren kuru hidrojellerin a) akma gerilimi, b) kırılma gerilimi, c) kırılma gerinimi, d) Young modülü grafikleri 52

Şekil 4.11 Yumurta kabuğu içeren şişmiş hidrojellerin a) tokluk, b) kırılma gerilimi, c) kırılma gerinimi, d) Young modülü grafikleri 53

Şekil 4.12 Nişasta hidrojellerinin SEM-EDX analizi sonucu sonrası C, O, Na, Cl, Ca, P ağırlıkça yüzdeleri a) ES/0, b) ES/2,5 55

Şekil 4.13 Nişasta hidrojellerinin SEM-EDX analizi sonucu sonrası C, O, Na, Cl, Ca, P ağırlıkça yüzdeleri a) ES/5, b) ES/10 56

Şekil 4.14 MTT sonucunda %0, %2,5, %5, %10 ve kontrol grubunun oluşan görüntüleri 58

Şekil 4.15 Yapılan MTT testi sonucunda kontrol grubu, %0, %2,5, %5 ve %10 oranında parçacık içeren hidrojellerin hücre canlılığı yüzdesi 58

Şekil 4.16 Çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığı içeren hidrojel örneklerinin 7, 21 ve 28. günlerde ölçülen biyobozunma yüzdeleri ... 60

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan materyallerin listesi 36
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan ekipman listesi 36

ÖZET

Atık Yumurta Kabuğu Parçacıkları İçeren Hidrojel Biyokompozit Doku İskelesi Üretimi

Zeynep AK

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Kemik doku mühendisliğinde hidrojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi için osteoindüktif ajanlar içermesi ve yeterli mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Yüksek oranda kalsiyumdan oluşan yumurta kabuğu atıkları kemik doku mühendisliğinde osteoindüktif bir ajan olarak kullanılabilmektedir.

Bu tezde, nişasta hidrojelleri içerisinde çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacıkları içeren kemik doku iskeleleri üretilmiş, kontrol grubu olarak parçacık içermeyen hidrojellerle kıyaslama yapılmıştır. %2,5, %5 ve %10 oranında parçacık içeren gruplar sırasıyla ES/2.5, ES/5, ES/10; kontrol grubu ise ES/0 olarak adlandırılmıştır. Nişasta hidrojelleri buz kalıplama ile sonradan çapraz bağlanma yöntemleri ile elde edilmiştir ve çapraz bağlayıcı olarak yüksek biyouyumluluk gösteren polietilen glikol diglisidileter (PEGDE) kullanılmıştır. Nişasta hidrojellerinin özellikleri FTIR, SEM, şişme dengesi, şişme kinetiği, mekanik test, MTT, biyomineralizasyon ve biyobozunma analizleri ile incelenmiştir.

FTIR analizleri sonucunda, hidrojellerin başarılı bir şekilde çapraz bağlandığı belirlenmiştir. SEM görüntüleri, parçacık eklenmesiyle hidrojellerin gözenek

boyutlarının 1/3 oranında küçüldüğünü göstermiştir. Nişasta hidrojellerinin gözenek boyutları ES/0, ES/2.5, ES/5 ve ES/10 için sırasıyla, 168,37±25,45 µm, 136,24±18,71 µm, 124,52±18,99 µm, 117,62±24,52 µm olarak hesaplanmıştır. Parçacık miktarının artmasıyla şişme oranlarının %21,26 düştüğü görülmüştür. Hidrojellerin mekanik testleri sonucunda, ES/0 grubunun Young modülü 5,07±0,49 MPa ES/5 grubunda ise 14,14±0,12 MPa Young modülü sonucu elde edilmiş, parçacık içermeyen kontrol numunesine kıyasla mekanik dayanımın yaklaşık üç kat arttığı bulunmuştur. Mineral birikiminin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen SEM-EDX analizi sonucunda, ES/0'da mineral birikimi görülmezken ES/2.5, ES/5 ve ES/10 örnekleri %8,6±0,2 kalsiyum oranına ulaşmıştır. MTT analizinde ES/0'a kıyasla ES/10'da hücre canlılığı %10,9±0,6 oranında artmıştır. Biyobozunma testi sonucunda ES/0'in %12,24±0,89 oranında bozunduğu, ES/10'un ise %7,25±3,88 oranında bozunma gerçekleştirdiği bulunmuştur. Analizler sonucunda, yumurta kabuğu parçacıklarının hidrojelin mekanik dayanımını artırdığı ve biyomineralizasyonu desteklediği, böylece kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun hale getirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyokompozit, hidrojel, kemik doku mühendisliği, nişasta, yumurta kabuğu

ABSTRACT

Production of Hydrogel Biocomposite Tissue Scaffold Containing Waste Eggshell Particles

Zeynep AK

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

In bone tissue engineering, hydrogels should contain osteoinductive agents and have sufficient mechanical properties in order to be used as bone tissue scaffolds. Eggshell waste which is mostly made of calcium, can be used as an osteoinductive agent in bone tissue engineering.

In this study, starch hydrogels containing different amounts of eggshell particles were produced and compared with a control group without eggshell particles. Samples contained 0%, 2.5%, 5% and 10% eggshell particles were designated as ES/0, ES/2.5, ES/5 and ES/10, respectively. Starch hydrogels were obtained by ice molding and post cross-linking methods with polyethylene glycol diglycidylether (PEGDE) as the crosslinker due to its high biocompatibility. The properties of starch hydrogels were examined by FTIR, SEM, swelling equilibrium, swelling kinetics, mechanical testing, MTT, biomineralization and biodegradation analyses.

FTIR analyses confirmed successful cross-linking of the hydrogels. According to SEM results, the pore sizes of the starch hydrogels decreased by 1/3 and were found 168,37±25,45 μm, 136,24±18,71 μm, 124,52±18,99 μm, 117,62±24,52 μm for ES/0, ES/2.5, ES/5, and ES/10, respectively. Swelling results indicated that the swelling rate decreased 21.26% as the amount of particles increased. According to

the mechanical tests, while ES/0 had a Young modulus of 5066±489 kPa, ES/5 had a Young modulus of 14140±119 kPa. Thus, the mechanical strength was found to be almost twice as high compared to the control sample without eggshell particle. SEM-EDX analyses were conducted to examine mineral accumulation and no mineral accumulation was seen in ES/0, while ES/2.5, ES/5, and ES/10 had mineral layers as the ES/10 sample reached 8.6±0.2% of calcium ion accumulation. MTT analysis showed that, cell viability in ES/10 was 10.9±0.59% higher compared to ES/0. Biodegradation tests revealed that ES/0 degraded 12.24±0.89%, while ES/10 degraded 7.25±3.88%. As a result of the analyses, it can be deducted that eggshell particles enhance the mechanical strength of the hydrogel and support biomineralization, making it suitable for bone tissue engineering applications.

Keywords: Biocomposite, bone tissue engineering, eggshell, hydrogel, starch

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kemik dokusunun kendi kendini tamir edebilme özelliği bulunmaktadır. Kemik hasarı genellikle 2 cm'den büyük olduğunda ise iyileşmeyi destekleyici bir doku iskelesi gerekmektedir [1]. Otogreftler, allogreftler, sentetik greftler ve metal implantlar kemik doku tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Doku nakli, enfeksiyon riski bulundurmasıyla birlikte donör bölgede iyileşme sürecinde sorunlara yol açabilmektedir [2]. Metal implantlar fazlasıyla yüksek mekanik özellik gösterdiğinden gerilme kalkanı (stress shielding) etkisinin görülmesine neden olabilmektedir [3]. Aynı zamanda metal implantların doku ile etkileşime geçmesi yetersiz kalmaktadır.

Kemik doku mühendisliği; doku nakli ve metal implantların beraberinde getirdiği sıkıntıları ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Ekstrasellüler matriks (ECM) yerini tutabilecek ve hücrelerin tutunup çoğalabileceği bir doku iskelesi üretimi hedeflenmektedir [3]. Hidrojeller, üç boyutlu çapraz bağlı ve suda şişme özelliğine sahip polimer ağlarıdır [4]. Dokunun sağlıklı bir şekilde iyileşmesi için hücre tutunması, farklılaşması, besin ve oksijen akışını sağlayacak bir matris olması nedeniyle hidrojeller doku iskelesi olarak uygun özellikler taşımaktadır. Hidrojellerin kemik dokusuna uygun olarak kullanılabilmesi için ise gözenekli bir yapıda olması, osteoindüktif bir ajan ile desteklenmesi ve yeterli mekanik dayanıma sahip olması gerekmektedir [5].

Doğal bir polimer olan nişasta, biyouyumlu olmasının yanı sıra sık hidrojen bağlarından oluşması nedeniyle kendiliğinden sert bir yapı göstermektedir [6]. Bu sebeple nişastadan elde edilen hidrojeller kemik doku mühendisliği için uygun özellikler taşımaktadır. Nişasta çok fazla hidroksil grubuna sahip olduğundan kolaylıkla çapraz bağlanabilmektedir. Polietilen glikol diglisidil eter (PEGDE) düşük toksisite gösteren bir çapraz bağlayıcı olarak çeşitli biyomedikal çalışmalarda kullanılmaktadır. *Özmen ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin sentezinde çapraz bağlayıcı olarak PEGDE kullanıp, nişastanın PEGDE ile başarıyla çapraz bağlandığını göstermektedir [7].

Başka bir çalışmada *Yao ve ark.* biyomedikal uygulamalarda biyolojik kirlenmeyi (biofouling) azaltmak amacıyla zwitteriyonik, anyonik ve katyonik nişastayı PEGDE ile çapraz bağlayarak protein adsorpsiyonuna dirençli nişasta-PEGDE hidrojelleri elde etmiştir [8]. PEGDE ile çapraz bağlanan hidrojeller protein ve hücre adsorpsiyonunu yüksek ölçüde azaltmıştır.

Başlangıçta elde edilen polimer matrisi sonradan çapraz bağlanması sağlanabilmektedir. *Özmen ve ark.* gerçekleştirdiği bir çalışmada, kitosan polimerinin PEGDE çapraz bağlayıcısı kullanılarak buz kalıplama ardından sonradan çapraz bağlandığı bir çalışma bulunmaktadır [9]. Çalışmada elde edilen kitosan hidrojeli hiyerarşik gözenek yapısı ve potansiyel doku iskelesi özelliği göstermektedir. Kullanılan çapraz bağlayıcı miktarının değiştirilmesiyle hidrojelin mekanik özelliklerinin modifiye edilmesi sağlanabilmektedir.

Kemik hücreleri mineralize ve sert yüzeylere tutunma yatkınlığı göstermektedir. Bu şekilde dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-β) ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP) salgılayarak osteoblast kökenine sahip hücrelerin toplanmasını dolayısıyla iyileşme sürecini sağlamaktadır [5]. Bu nedenle kemik dokusu için üretilen hidrojellerin istenilen etkiyi göstermesi için osteoindüktif bir ajan ile biyokompozit haline getirilmesi gerekmektedir.

Her yıl tonlarca atık olarak ortaya çıkan yumurta kabukları düşük maliyetli olup çokça bulunmaktadır [10]. Yumurta kabuğu atıklarına, katma değeri yüksek alternatif kullanım alanlarının açılması çeşitli alanlarda sürdürülebilir çözümler sunmaktadır. Yumurta kabukları, atık su arıtımı ve gübre gibi alanlarla birlikte doku iskelelerinde de destekleyici bir madde olarak kullanılmaktadır [11, 12]. Yumurta kabukları doğal bir mineral kaynağı olup yüksek oranda kalsiyum karbonattan ($CaCO_3$) oluşmaktadır. Yüksek kalsiyumun varlığı, yumurta kabuğunu osteoindüktif bir ajan yapmakta ve kemik doku iskeleleri için önemli bir bileşen haline getirmektedir.

Yumurta kabuğu içeren hidrojel doku iskelelerinin mekanik özellikleri ve osteoindüktif özelliklerinin iyileştiği raporlanmıştır. *Camcı-Ünal ve ark.* çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığını jelatin metakrilat (GelMA) polimerine entegre ederek biyokompozit hidrojel doku iskeleleri üretmiştir [13]. Yapılan mekanik analizlerde, parçacık miktarının artmasıyla sıkıştırma/basma modülünün

arttığı görülmektedir. Osteoblastların farklılaşma belirteçlerinden biri olan alkalin fosfataz (ALP) enzimi analizi sonucunda ise parçacık içeren örneklerin ALP etkinliğinin arttığı açıklanmaktadır. *Bal-Öztürk ve ark.* çalışmasında ise GelMA, hyalüronik asit (HyA) ve kondroitin sülfat (CS) polimerleri ile çeşitli miktarlarda yumurta kabukları biyokompozit haline getirildiğinde aynı şekilde yumurta kabuğu miktarının artmasıyla sıkıştırma/basma modülünün arttığı görülmektedir [14]. Yapılan hücre canlılığı çalışma sonuçlarında hidrojellerin osteoblast hücreleri üzerinde toksik etkisi olmadığı görülmektedir. Biyomineralizasyon testi sonucunda parçacık içeren örneklerin üzerinde apatit yapısının oluştuğu, mineralize bir doku iskelesi elde edildiği açıklanmıştır. *Catelas ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada ise yumurta kabuklarını fosforik asitle muamele edip aljinat/kitosan biyokompozitinin içerisine entegre etmiştir [15]. Yumurta kabuğu parçacıklarının mekanik dayanımı arttırdığı ve daha yüksek hücre canlılığı sağladığı belirtilmiştir. Böylece, hem dayanımı arttırması hem hücre çoğalmasını desteklemesi nedeniyle yumurta kabuğu parçacığı yüklü kompozitlerin kemik doku iskelesi olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Literatürde yumurta kabuğunun doku iskelesi de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda etkinliği açıklanmıştır. Ancak nişasta ve yumurta kabuğu parçacıklarının birlikte kullanıldığı ve buz kalıplama/sonradan çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen bir hidrojel doku iskelesi literatürde bulunmamaktadır. Bu tezde ilk defa, yumurta kabuklarının nişasta hidrojeline yüklenmesiyle yeni ve işlevsel bir biyokompozit doku iskelesi elde edilmiştir. Nişasta düşük maliyetli ve doğada sıkça bulunan bir polimer olması nedeniyle biyokompozitin üretim maliyetini düşürmektedir. Sağlık alanında düşük maliyetli doku iskelelerinin üretilmesi, tedavinin daha geniş kitlelere ulaşması açısından önem taşımaktadır. Aynı zamanda atık yumurta kabukları ve çevre dostu bir polimer olan nişastanın değerlendirilmesi sürdürülebilir tedavi yöntemleri sağlamaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Kemik dokusu en çok nakledilen dokulardan bir tanesi olmasına rağmen, kemik tedavisinde enfeksiyon riski, dokunun reddedilmesi ve nakledilen dokunun yetersiz olması en büyük sorunlardandır. Doku nakli gerekliliğini ortadan kaldıran, sürdürülebilir malzemelerden elde edilen bir doku iskelesi gereklidir. Bu çalışmada,

kemik doku tedavilerinde kullanılmak üzere yeni bir hidrojel doku iskelesi üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere yumurta kabuğu parçacıkları ile osteoindüktif özellik ve mekanik dayanım kazandırılmış biyokompozit nişasta hidrojellerinin üretilmesi planlanmıştır. Elde edilen biyokompozit hidrojellerin denge şişme testleri, basma testleri ve osteoblastlar üzerinde hücre canlılığı testleri gerçekleştirilerek doku iskelesi potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Kemik dokusu iskelelerinin başarıyla iyileştirme sağlayabilmesi için yeterli mekanik özelliklerle birlikte osteoindüktif özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunların yanı sıra malzemelerin düşük maliyetli olması üretimi kolaylaştırmaktadır.

Doğal bir mineral kaynağı olan yumurta kabukları her yıl tonlarca atık olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek oranda kalsiyum karbonattan oluşan yumurta kabukları ucuz olması ve osteoindüktif özelliklere sahip olması nedeniyle doku iskelelerinde kullanılmak üzere destekleyici bir ajan olarak kullanılabilmektedir.

Doğada çokça bulunan nişasta ise ucuz, biyouyumlu ve kendiliğinden sert olduğundan kemik doku iskelesi için uygun bir polimer olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, yumurta kabuğu parçacıkları ve nişasta polimeri sonradan çapraz bağlanma yöntemiyle biyokompozit bir hidrojel haline getirilmiştir. Elde edilen hidrojelin gözenekliliği, osteoindüktivitesi ve mekanik dayanımının kemik dokusu üzerinde olumlu etkilerinin olacağı öngörülmüş ve potansiyel bir kemik doku iskelesi üretimi amaçlanmıştır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Dokusu

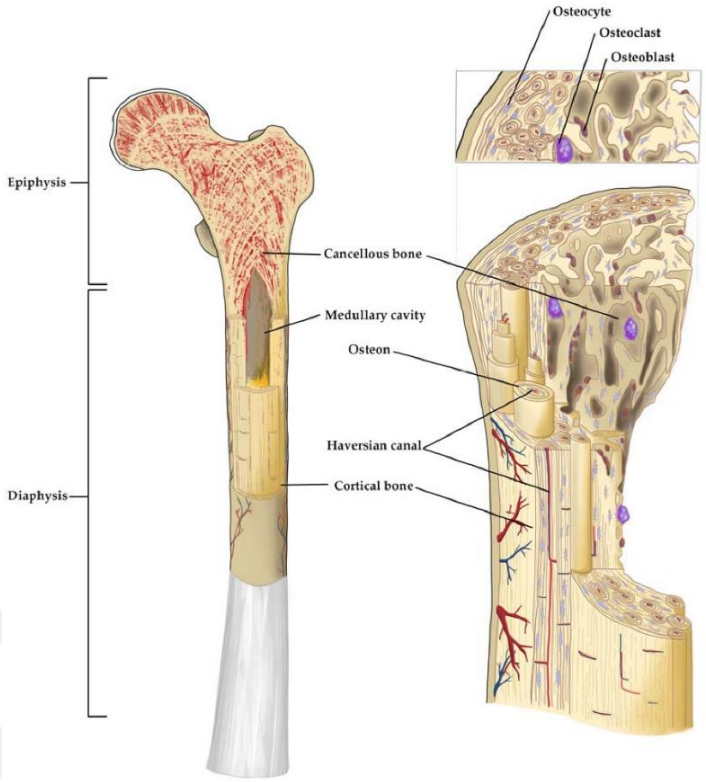
2.1.1 Kemik Yapısının Özellikleri

Kemik dokusu hücreler ve ekstrasellüler matriksten oluşan mineralize bir bağ dokudur [16]. Vücuda yapısal destek sağlama, hareket yetisi sağlama ve iç organları korumakla görevlidir.

Kemik hem organik hem de inorganik bölümlerden oluşmaktadır. Organik kısım kemiğin kuru ağırlığının %40'ını oluşturmaktadır. Yaklaşık %90 oranında olmak üzere tip 1 kolajenden ve az miktarda tip 3, 5, 10 ve 12 kolajenlerden oluşmaktadır [17]. Osteoblast hücrelerinin salgıladığı pro-kolajen molekülleri birleşerek kolajen fibril yapısını oluşturmaktadır. Kolajen fibrilleri de birleşerek kolajen liflerini oluşturmaktadır. Bununla birlikte proteoglikanlar, glikoproteinler, fosfolipitler, fosfoproteinler ve büyüme faktörlerini de içermektedir. Kemiğin inorganik kısmı ise hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) kristallerinden oluşmaktadır. Kemikler, vücuttaki kalsiyumun %99'unu, fosforun %85'ini ve %40-60 arasında olmak üzere sodyum ve magnezyum iyonlarını depolamaktadır [17]. Bu iyonlar kolajen fibrillerini çevreleyerek kemiğe sertlik kazandırmaktadır.

Kemik, epifiz ve diafiz olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır [18]. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi, kemiğin iki ucunda bulunan kısım epifiz olarak adlandırılmaktadır. Büyük oranda süngerimsi kemik, düşük oranda da kortikal kemikten oluşmaktadır. Diafiz, kemiğin iki ucunun arasında kalan orta kısım için kullanılmaktadır. Diafiz çoğunlukla kortikal kemikten meydana gelmektedir. Medullar kanal denen kemiğin ortasında bulunan boşluk, sarı kemik iliğini bulundurmaktadır [17].

Kortikal kemik sert, yoğun ve mineralize bir yapıda olup kemiklerin dış yüzeylerini kaplamaktadır [17]. Diafiz kısmında yoğunken epifiz kısmında daha ince bir yapıdadır. Düşük miktarda sahip olduğu mikroskobik gözenekler ile damarlar ve sinirlerin geçişini sağlamaktadır.



Şekil 2.1 Kemik yapısında bulunan Havers kanalı, osteonlar ve hücreler [19]

Süngerimsi kemik, epifiz bölgesinde bulunan yüksek oranda gözenekli kemik yapısıdır [20]. Kortikal kemiğe kıyasla düşük yoğunluğu nedeniyle daha az basınç dayanımı bulunmaktadır. Kırmızı kemik iliği, kan damarları ve bağ dokuyu bünyesinde bulundurmaktadır.

Kemiğin dışı periosteum, içi ise endosteum denilen bağdoku ile kaplıdır [18]. Periosteum kıkırdak haricinde tüm kemiği kaplar. Kas dokusu ile kortikal kemik arasında yer almaktadır. Periosteumun dış tabakası fibroblastlar, kolajen ve elastin fibriller, sinir ve damar yapılarından oluşmaktadır. İç tabakası ise kemik yüzeyiyle etkileşimde olup mezenkimal kök hücre bulundurmaktadır. Endosteum, kemiğin iç yüzeyini kaplayan bir dokudur. Yüzeyi osteoblast, osteoklast ve osteoprogenitör hücreler ile kaplıdır.

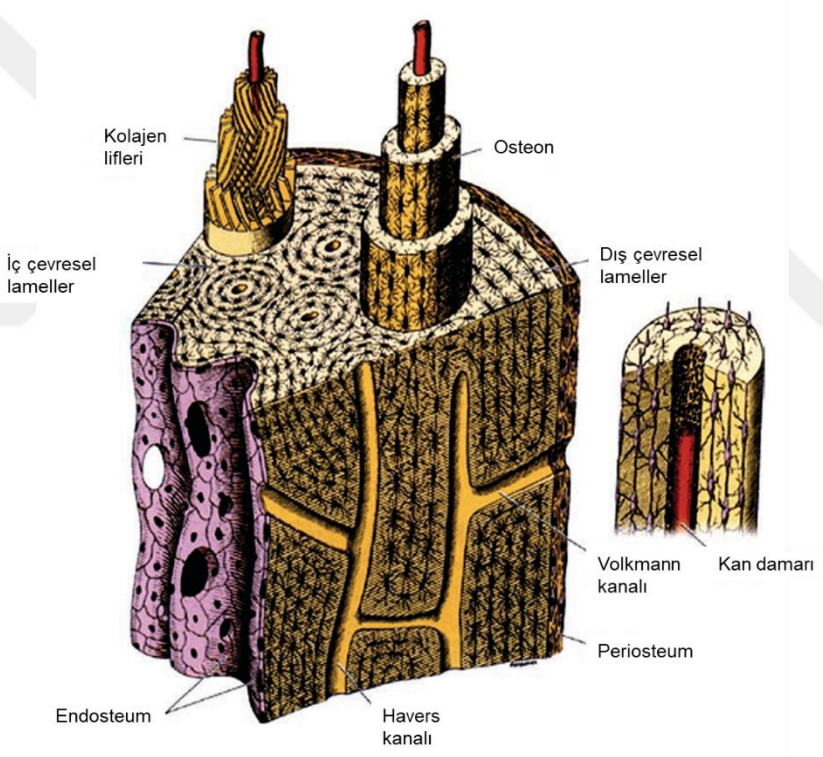
Kemik dokusu ise örgümsü ve lameller olmak üzere iki türdedir. Örgümsü kemik düzensiz kolajen fibrillerinden oluşur ve birey büyüdükçe lameller doku olarak olgunlaşır. Bu nedenle olgun ve sağlıklı bireylerde örgümsü kemik bulunmamaktadır.

Lameller doku ise düzenli ve sıkı kolajen fibrillerinden oluşmaktadır. Düzenli ve sıkı yapısı nedeniyle sert ve sağlam özellik göstermektedir. Süngerimsi kemikte

lameller düzensiz yapıdadır ve osteon bulunmaz [20]. Kortikal kemikte ise lameller doku osteonların çevresinde, osteonların aralarında ve kemiğin etrafında bulunmaktadır.

Osteonlar diafize paralel silindirik yapılardır, ortasında Havers kanalını bulundurmaktadır. Havers kanalı içerisinde kan damarları ve sinirler bulunmaktadır. Havers kanalları, Volkmann kanalı denilen kanallarla birbirilerine bağlanmaktadır.

Lamellerin arasında bulunan boşluklarda laküneler yer almaktadır ve içerisinde osteosit denilen olgun kemik hücrelerini bulundurmaktadır [20]. Kanalikuliler ise laküneleri birbirine bağlayan, besin sağlanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan kanallardır. Şekil 2.2'de kemiğin doku yapısı görülebilmektedir.



Şekil 2.2 Kortikal kemikte bulunan Havers kanalları, Volkmann kanalları ve osteon yapısı [17]

2.1.2 Kemik Hücreleri

2.1.2.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerden farklılaşmaktadır. Mezenkimal kök hücreler, uygun uyaran koşullar altında ilk olarak osteoblasta farklılaşmaya

programlı osteoprogenitör hücrelere farklılaşmaktadır. Osteoprogenitör hücreler uygun uyaran gelene kadar osteoblasta farklılaşmadan beklerler. Kemiğin kanallarında, endosteumda, periosteumda ve kemik iliğinde bulunmaktadırlar.

Osteoblastlar, kemik doku oluşumunu sağlayan hücrelerdir ve aktif kemik oluşumunun gerçekleştiği bölgelerde yer almaktadırlar [17]. Tip 1 kolajen ve glikozaminoglikanların salgılayarak olgunlaşmamış kemik doku olan osteoidin oluşmasını sağlamaktadır. Osteoblastlar aynı zamanda matriks veziküllleri salgılayarak kalsiyum ve fosfat birikimini gerçekleştirmektedir.

Osteoblastlar kolajen haricinde osteokalsin, osteopontin, kemik siyaloproteini ve osteonektin proteinlerini de salgılamaktadır. Bu proteinler osteoblastların belirteci olmalarıyla birlikte osteoblast farklılaşmasında görev almaktadırlar.

Kan hücrelerinin üretiminde görev almak üzere interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11) ve makrofaj koloni uyarıcı faktörler (MCSF) gibi çeşitli sitokin ve koloni uyarıcı faktörler salgılamaktadırlar.

Osteoblastlar aynı zamanda osteosit ve osteoklastlarla birlikte kemiğin dayanıklılığın korunmasında görev almaktadır [17]. Çeşitli mekanik uyaranlara yanıt vererek kemik şekli ve boyunda gerçekleşecek değişiklikleri sağlamaktadırlar.

2.1.2.2 Osteositler

Osteositler kemikte en çok bulunan ve yaşam süresi en uzun olan hücrelerdir [16]. Osteoblastlar kemik doku oluşumu ardından osteositlere dönüşebilmektedir. Osteositler kemikte lakünelerde yer almaktadır ve mineralize kemik matriksiyle çevrelenmişlerdir. Kanaliküli denilen kanallarla osteositlerin birbirleriyle iletişimi sağlanmaktadır [16]. Bu kanallar aynı zamanda osteositlerin salgıladığı proteinlerin diğer noktalara ulaştırılmasını sağlamaktadır.

Osteositler, kalsiyum dengesini sağlayarak kemiğin sert yapısının devamlılığını sağlamaktadırlar [20]. Aynı zamanda mekanik gerilimleri algılayarak uyaranları biyokimyasal sinyallere dönüştürmektedir [21]. Bu sinyaller kemik oluşumu ve kemik çözünmesini etkilemektedir.

2.1.2.3 Osteklastlar

Osteoklastlar makrofajlardan köken alan, çoklu çekirdeğe sahip kemik hücreleridir. Osteoklastlar kemik dokusunun emiliminden sorumludur. Howship lakünleri denilen boşluklar yaratıp kemiğin degradasyonunu gerçekleştirmektedirler. Osteoblastların devamlı kemik dokusu oluşturması ve osteoklastların devamlı kemik doku emilimi gerçekleştirmesi bir denge içindedir. Kemiğin sağlıklı ve güçlü kalabilmesi için hücreler beraber çalışmaktadır.

2.1.3 Kemik Doku İyileşmesi

Kemik dokusu hasar aldığında üç aşamalı bir süreç ile kendini tedavi etmektedir [22]. İlk aşama olan enflamasyonda, hasarlı bölgede bir hematoma yapısı oluşmaktadır. Hematoma IL-6, TGF-β, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerini salgılamaktadır [5]. Kemotaksis yoluyla fagositik hücreler hasarlı bölgeye çağrılmaktadır. İkinci aşama olan tamir aşamasında osteoblast hücreleri pıhtı yapısını çevrelemektedir. Aynı zamanda mezenkimal kök hücreler de hasarlı bölgeye göç ederek osteoblastlara farklılaşmaktadırlar [22]. Hasarlı bölge kararlı bir yapıda değilse mezenkimal hücreler kondrositlere farklılaşarak bir kemik kallus yapısı oluşturmaktadır. Bu kallus yapısı sonucunda ECM'nin mineralizasyonu gerçekleşmektedir. Üçüncü aşama olan yeniden modelleme aşamasında kallus miktarının düşmesi görülmektedir. Anjiyogenez süreci ilerlemeye devam eder ve lameller yapıda kemik oluşumu görülmektedir.

Ancak kemik dokusundaki hasar 2 cm'den büyük ise mezenkimal kök hücrelerin ve osteoblastların tutunabilmesi için bir doku iskelesi gerekmektedir [5]. Doku iskelesi bulunmaması durumunda kemik doku oluşumu yetersiz kalacaktır.

2.2 Kemik Doku Mühendisliği

2.2.1 Kemik Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Yöntemler

Kemik kendini tamir edemeyeceği bir hasar aldığında cerrahi müdahale gerekmektedir. Bunun için en çok tercih edilen yöntem doku naklidir [5]. Özellikle otogreftler, kemik doku oluşumunu destekleyici proteinleri içermektedir. Ancak dokunun eldesi için hasta üzerinde ikincil bir cerrahi işlem yapılması gerekmektedir. Donör bölgede hasar, enflamasyon ve enfeksiyon riskleri

bulunmaktadır [23]. Aynı zamanda alınan doku, hasarlı bölge için yetersiz kalabilmektedir. Allogreftler, otogreftlerden sonra en yaygın doku nakli yöntemidir. Ancak doku reddi ihtimali ve enfeksiyon riski bulunmaktadır.

Metal implantlar yüksek mekanik dayanıma sahip olmaları dolayısıyla kemik tedavilerinde sıkça kullanılmaktadır. Ancak doku ile etkileşime giremediklerinde enflamasyon, bununla birlikle gelen ağrı tedaviyi ve hastayı olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda metal implant, uygulanan gerilimin tümünü taşıdığından gerilme kalkanına (stress shielding) neden olarak kemik oluşumu ve sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir [24].

Kemik doku tedavisindeki eksiklikleri ve olumsuz yan etkileri azaltmak amacıyla alternatif tedavi yöntemleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Doğal ya da yapay polimerler kullanılarak kemik dokusuna uygun doku iskeleleri üretilmektedir [5].

2.2.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri

Kemik doku mühendisliği, geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı alanların önüne geçerek kemik dokusu için uygun doku iskeleleri üretmeyi amaçlamaktadır. Doku iskeleleri, ECM yerine geçerek hücrelerin tutunup çoğalabileceği bir destekleyici yapı olarak görev yapmaktadır.

Kemiğin sağlıklı bir şekilde iyileşebilmesi için bir kemik doku iskelesinin gerçek kemik dokuya benzerlik sağlaması gerekmektedir. Biyouyumluluk, gözeneklilik, yeterli mekanik özellikler ve biyobozunma özellikleri bir kemik doku iskelesinde dikkat edilmesi gereken özelliklerdendir.

2.2.2.1 Biyouyumluluk

Bir doku iskelesi üretilirken kullanılan malzemelerin doku üzerinde toksik etkiler göstermemesi gereklidir. Hücreler sağlıklı bir şekilde malzemeye tutunabilmeli, çoğalabilmeli ve farklılaşabilmelidir [25]. Hücresel etkinlik ve iletişim sağlıklı bir şekilde gerçekleşmeli ve bir yan etki göstermemelidir. Kullanılan malzemenin bozunma sürecinde ortaya çıkan ürünler de toksik etki göstermeden vücuttan atılabilmelidir. Aynı zamanda doku iskelesinde kullanılan malzemelerin bağışıklık tepkisine neden olmaması gerekmektedir.

Kullanılan malzemeye çeşitli ajanlar eklenerek hücresel etkinliği de arttırılabilmektedir. İskele çevre ve hücreler ile etkileşime girerek doku iyileşmesini

hızlandırabilmektedir. Kemik doku iskelelerinde hücresel etkinliği arttırmak için Ca^{2+} ya da büyüme faktörü içerikli kullanılmaktadır [1].

2.2.2.2 Gözeneklilik

Bir doku iskelesinde gözeneklilik hücre çoğalması, hücre tutunması, hücre göçü ve madde alışverişi için gereklidir [1]. Gözenekliliğin artması geçirgenliği olumlu etkilemekle birlikte yüksek oranda gözeneklilik mekanik özellikleri düşürebilmektedir [26].

Gözeneklerin boyutu besin alışverişi, damar oluşumu ve hücre göçü nedeniyle doku iskelelerinde önemli bir faktördür. Hücrelerin doku iskelesi içerisine göç edip tutunabilmesine olanak sağlamalıdır. Aynı zamanda besin ve oksijen geçişini sağlayacak boyutta olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, 100 µm ve üstü boyutlardaki gözeneklerin hücre göçü, besin geçirgenliği ve atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığı göstermektedir [27].

Kemik doku iskelesinde hiyerarşik gözeneklerin bulunması, aynı boyutta gözeneklere sahip doku iskelelerine kıyasla kemiğin kendi yapısına daha yakın olmasını sağlamaktadır ve mekanik açıdan çatlaklara daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır [27].

2.2.2.3 Mekanik Özellikler

Kemik doku iskelelerinin başarılı olabilmesi için yeterli mekanik dayanıma sahip olmaları gerekmektedir. Kemik normalde kendisine uygulanan yüke göre yanıt vererek kemik oluşumunu ve emilimini gerçekleştirmektedir [28]. Kemiğin yenilenme dengesinin korunması için doku iskelesinin mekanik özelliklerinin yeterli olması önem taşımaktadır.

Sağlıklı kemik dokunun normalde taşıdığı gerilim yüküne dayanabilecek ve kemik dokuyla yakın mekanik özelliklere sahip bir doku iskelesi üretilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde kullanılan doku iskelesi yüke dayanamayıp hasar alacaktır [1]. Aynı zamanda kemik dokudan daha sert ve daha dayanıklı bir malzeme kullanıldığında kemik dokunun oluşumu olumsuz etkilenmektedir. Malzeme gerilim yükünü tek başına karşılayacağından gerilim kalkanı etkisi gerçekleşecektir [1].

Osteositler, mekanik uyaranlarla karşılaştığında hormonlar ve büyüme faktörleri salgılayarak osteoblastların farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır [28]. Bu

nedenle kemik dokuya yakın mekanik özellikte bir doku iskelesi üretilmesi hücrelerin etkinliğini de olumlu yönde etkileyecektir.

2.2.2.4 Biyobozunurluk

Kemiğin iyileşme sürecinde kullanılan doku iskelesinin, kemik doku oluşumuyla orantılı olarak bozunması gerekmektedir. Doku iskelesi çok hızlı bir şekilde bozunursa doku iyileşmesi tamamlanamamaktadır [3]. Eğer bozunma çok yavaş olursa kemik dokusunun büyüyebilmesi için yer kalmayacağından iyileşmesi düzgün ilerleyememektedir. Bu nedenle doku iskelesinin bozunma hızı, kemik dokusunun oluşum hızına uygun ilerlemesi gerekmektedir.

2.3 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler

Geleneksel kemik doku tedavilerinin önüne geçmek için çeşitli biyomalzemelerle doku iskeleleri üretilmektedir. Doku iskeleleri bir ECM olarak görev alacağından, kullanılacak doku malzemesinin doğru seçimi önem taşımaktadır. Biyouyumluluk, biyobozunurluk ve mekanik özelliklerine göre malzemelerin seçilmesi gerekmektedir. Biyoseramikler, metaller ve biyopolimerler doku iskelesi olarak kullanılan malzemelerdendir.

2.3.1 Biyoseramikler

Biyoseramikler, kemik doku iskelesi olarak kullanılan inorganik biyomalzemelerdendir. Kristalin seramik, amorf cam ve yarı-kristalin cam seramikler olarak üçe ayrılmaktadır [1]. Mekanik dayanım sağlamaları ve gözenekli bir yapıya sahip olmaları nedeniyle hücre göçü, hücre çoğalması ve madde alışverişini kolaylaştırmaktadırlar [28]. Biyoseramiklerin doku ile etkileşime geçebilmesi için Ca^{2+}, Si^{4+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ag^{+} ve Li^{+} gibi biyoaktif iyonlar ve büyüme faktörleri kullanılmaktadır.

Kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat ve biyoaktif camlar en sık kullanılan biyoseramiklerdendir. Kalsiyum fosfat, kemiğin doğal yapısında bulunan hidroksiapatit yapısını taklit ettiğinden sıklıkla kullanılmaktadır. Hidroksiapatit, β-trikalsiyum fosfat en çok tercih edilen kalsiyum fosfat seramiklerindendir.

Ficai ve ark. çalışmasında balık kılçığı atıklarından hidroksiapatit elde ederek biyoseramik üretmişlerdir [30]. Sinterleme sıcaklıklarını değiştirerek biyoseramiğin özelliklerini gözlemlemişlerdir. Balık atıkları için alternatif bir alan

açmakla beraber biyouyumlu, gözenekli, kristalin ve mekanik olarak dayanıklı biyoseramikler elde etmişlerdir.

Hidroksiapatit toksik etki göstermeyen ve osteoindüktif özelliklere sahip bir yapıdır [31]. Kemiğin doğal yapısını taklit etmektedir. Hidroksiapatitin bozunmasıyla ortaya çıkan kalsiyum ve fosfat iyonları da osteoindüktif etki göstermektedir. Hidroksiapatitin hidroksil grupları aminoasit ve proteinlerle hidrojen bağları kurabilmektedir. Ancak hidroksiapatit yüksek kristaliniteye sahip olduğundan çok bozunma hızı oldukça düşüktür. Trikalsiyum fosfat ise, hidroksiapatite kıyasla daha hızlı bozunabilen bir malzemedir [31]. Kemik dokuyla direkt bağ kurabilme özelliğine sahiptir ve aynı şekilde bozunma ürünleri olan kalsiyum ve fosfat iyonları kemik oluşumunu desteklemektedir.

Biyoaktif cam, sıcaklık ile muamele edildiğinde yapısı amorftan kristaline dönüşür ve bu şekilde biyoaktif cam seramik yapısı elde edilmektedir [32]. Kristalin yapı, malzemeye mekanik dayanım sağlamaktadır. Biyoaktif camlar genellikle silisyum dioksitten (SiO_2) oluşmaktadır. Silikon dioksit yapıya kimyasal kararlılık sağlamaktadır.

Biyoseramikler biyouyumluluk ve biyoaktivite gösteren malzemeler olsalar da eksiklikleri bulunmaktadır. Kemik dokusu için yeterli dayanıklılığa sahip olmamakla birlikte kırılgan malzemelerdir [1]. Aynı zamanda hidroksiapatit gibi malzemeler düşük bozunma hızı gösterdiğinden kemik oluşumu süreci olumsuz etkilenebilmektedir.

2.3.2 Metaller

Titanyum, paslanmaz çelik, magnezyum ve titanyum alaşımları kemik doku tedavilerinde sıklıkla kullanılan metallerdendir [32]. Yüksek mekanik özellikleri nedeniyle tercih edilmektedirler.

Metal implantların yüksek mekanik özellikleri kemikten fazla olduğu için gerilim kalkanı etkisine de neden olabilmektedir. Aynı zamanda metal implantların doku ile etkileşimi yetersiz kalabilmektedir. Hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla yüzeyleri kalsiyum fosfat kristalleriyle kaplanabilmektedir [1].

Titanyum, biyobozunur özellikte olmadığından, tedavi sonrasında cerrahi işlemler ile çıkartılması gerekmektedir. Magnezyum ise titanyuma kıyasla çok daha hızlı bozunmaktadır. Magnezyumun hızla bozunması, implantın dayanıklılığını ve

bütünlüğünü etkilemektedir. Aynı zamanda hızla bozunmanın gerçekleşmesi yüksek miktarda hidrojen gazının ortaya çıkmasına neden olmaktadır [32]. Bu hidrojen gazı implantın etrafında baloncuklar oluşturarak dokunun bütünlüğünü bozmaktadır.

Metal implantlar yüksek mekanik özellikleri nedeniyle tercih edilseler de kemik dokusunu olumsuz yönde etkileyecek durumlara neden olabilmektedir.

2.3.3 Biyopolimerler

Doku iskelelerinin üretilmesi için sık kullanılan malzemelerden biri de biyopolimerlerdir. Çok yönlü olmaları nedeniyle çeşitli şekillerde ve yapılarda üretilebilmektedir. Sentetik biyopolimerler ve doğal biyopolimerler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Sentetik biyopolimerler, doğal biyopolimerlere kıyasla daha yüksek mekanik özelliklere ve termal dayanıklılığa sahiptir. Yapay biyopolimerlerin özellikleri çeşitli kimyasal modifikasyonlarla istenilen şekilde değiştirilebilmektedir. Polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kemik doku iskelelerinde en sık kullanılan yapay polimerlerdendir [1].

Doğal polimerler biyobozunurluk, biyouyumluluk ve ECM taklit edebilme özellikleri nedeniyle doku iskelelerinde sıklıkla kullanılmaktadır [31]. Kolajen, jelatin, hiyalüronik asit, kitosan, aljinat ve nişasta en çok tercih edilen doğal polimerlerdendir.

2.3.3.1 Polikaprolakton (PCL)

PCL yarı kristalin, biyouyumlu ve sert bir alifatik esterdir. Hücrelerin tutunabileceği biyoaktif özelliği bulunmamaktadır. Aynı zamanda çok yavaş hidrolitik bozunma göstermektedir. Sert bir polimer olması nedeniyle kemik doku iskeleleri için uygun özelliktedir. PCL'a biyoetkinlik kazandırmak için çeşitli ajanlarla desteklenmesi sağlanabilmektedir. *Santosh ve ark.* albümin nanopartiküllerinin içine resveratrol fenolik bileşiğini hapsederek PCL doku iskelesine yüklemiştir [33]. Doku iskelesi çözücü döküm (solvent casting) ve partikül liçi (particulate leaching) yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. PCL'nin mekanik dayanımı ve biyouyumluluğu ile resveratrolün osteoblast farklılaşmasını destekleyici özelliğiyle kemik doku iskelesi için uygun bir doku iskelesi elde edilmiştir. PCL'nin hidrofobik yapısının önüne geçilmesi için *Bakhshi ve ark.*

yaptığı çalışmada elektro-eğirme yöntemi kullanılarak PCL, karboksimetil kitosan ile kompozit haline getirilmiştir [34]. Karboksimetil kitosan ile kompozit haline getirilen PCL yapısında hidrofilik bölgeler elde edilmiş ve doku iskelesi olarak kullanıma daha uygun bir yapıya sahip olmuştur.

2.3.3.2 Polilaktik Asit (PLA)

PLA biyobozunur hidrofobik alifatik bir polyesterdir. Mısır, patates ve pirinç gibi besinlerin fermente edilmesiyle elde edilen bir laktik asittir [35]. Termoplastik bir polimer olması nedeniyle çeşitli şekillerde üretilebilmekte ve üç boyutlu basıcılarda kullanılabilmektedir. İşlenebilme kolaylığı, sert yapısı ve çevre dostu bir polimer olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [35]. Ancak kırılgan yapısı ve yavaş bozunma hızı nedeniyle dezavantajları da bulunmaktadır. *Karyagina ve ark.* yaptığı çalışmada çözücü döküm ve partikül liçi yöntemiyle hidroksiapatit içeren bir PLA biyokompoziti üretmiştir [36]. Hidroksiapatit parçacıklarının PLA doku iskelesinin hidrofilik ve mekanik özelliklerini arttırdığı açıklanmıştır. *Mighri ve ark.* çalışmasında PLA'yı kitosan polimerinin zincirlerine entegre etmiş ve sıkıştırma kalıplama yöntemiyle bir doku iskelesi elde etmişlerdir [37]. Osteoblast hücrelerinin PLA entegre edilen kitosan ve PLA biyokompozitinde daha çok çoğaldığını açıklamışlardır.

2.3.3.3 Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA; laktik asit ve glikolik asit olmak üzere iki monomerin polimerizasyonu ile elde edilmektedir [38]. Biyouyumluluk, modifiye edilebilir bozunurluk ve mekanik özelliklere sahiptir. Vücutta laktik asit ve glikolik aside bozunması nedeniyle bozunma ürünleri de toksik etkilere neden olmamaktadır. *Wang ve ark.* üç boyutlu yazıcı kullanarak gümüş nanopartikül (AgNP) yüklü PLGA biyokompoziti üretmişlerdir [38]. AgNP kullanarak PLGA polimerine antibakteriyel özellik kazandırılması hedeflenmiştir. Homojen bir karışım elde edilmiş ve bu şekilde AgNP'lerin yavaş salınımı sağlanmıştır. AgNP eklentisi ile PLGA'nın mekanik özelliklerinin arttığı açıklanmıştır. Doku iskelesi üzerinde hidroksiapatit yapısı oluşmuş ve doku iskelesinin biyoetkinliğini ortaya koymuştur. *Li ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada ise üç boyutlu yazıcı kullanarak hidroksiapatit yüklü PLGA doku iskelesi sentezlemiştir [39]. Hidroksiapatit mikroküreleri polivinil alkol (PVA) ile modifiye edilerek PLGA-hidroksiapatit mürekkebi elde edilmiştir.

Mikrokürelerin PLGA matriksine yüklenmesi işe hücre tutunması, hücre farklılaşmasını ve mekanik özelliklerini arttırmıştır.

2.3.3.4 Kolajen

Kolajen omurgalı canlılarda hücre tutunması, hücre göçü, hücre farklılaşması gibi olayları sağlayan yapısal bir proteindir [40]. Dokuda çokça bulunması nedeniyle çok sayıda hücre ile etkileşime girebilmektedir. Tip 1 kolajen osteoblastlar tarafından salgılanmakta ve kemik ECM'sinde bolca bulunmaktadır. Biyomineralizasyonda da büyük bir rolü olması nedeniyle kolajen osteoblastların etkinliğini arttırabilmektedir. Yapısında fonksiyonel grupların bulunması çeşitli büyüme faktörleri ya da terapötik ajanlarla bağlanabilmektedir [41]. Doku iskelelerinde kullanılmak için uygun bir polimer olsa da mekanik özellikleri açısından zayıf kalmaktadır. *Zhao ve ark.* karbon nanotüpleriyle desteklenmiş kolajen-hidroksiapatit hidrojelleri sentezlemiştir [42]. Nano-hidroksiapatit parçacıkları ve kolajen, kemik dokusunu taklit etmeleri ve doku iyileşmesini arttırmaları nedeniyle tercih edilmiştir. Karbon nanotüplerinin eklenmesi ile Young modülünün arttığı, sert bir malzeme edildiği aynı zamanda hücre canlılığının arttığı açıklanmıştır.

2.3.3.5 Jelatin

Jelatin, kolajenin hidrolize edilmesiyle elde edilen doğal bir polisakkarittir. Kolajenin yapısındaki hidrojen ve kovalent bağlarının kırılması nedeniyle jelatin düzensiz sarmal (random coil) yapısında sahiptir [43]. Yapısında bulunan RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) motifleriyle zengin olduğundan hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasında görev almaktadır [44]. Biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle doku iskelesi olarak sıklıkla tercih edilmektedir. 40°C'de çözünmektedir ve sıcaklığın düşmesiyle düzensiz sarmal yapısı üçlü sarmal yapısına dönüşmektedir. Bu şekilde bir hidrojel yapısı oluşmaktadır [43]. Termal bir kararlılığı olmaması, düşük mekanik özelliklere ve yüksek biyobozunurluğa sahip olması jelatinin dezavantajlarındandır [44]. *Chatzinikolaidou ve ark.* çalışmasında kitosan-jelatin biyokompozit hidrojelleri üretmiş, kemik dokusu üzerindeki etkisini incelemiştir [45]. Genipin ve glutaraldehit olmak üzere iki farklı çapraz bağlayıcıyı denemişlerdir. Doku iskeleleri liyofilizatör ile kurutulmuş ve gözenekli bir yapıya sahip olmuştur. Çapraz bağlayıcı farkı, gözenek boyutunda

farklılıklara neden olmuştur. Gözenekli kitosan-jelatin hidrojelleri osteoblast hücrelerinin çoğalmasını sağlamıştır.

2.3.3.6 Hiyalüronik Asit (HyA)

Hiyalüronik asit, insan vücudunda bulunan bir glikozaminoglikandır [46]. Bağ doku ve sinoviyal sıvı gibi çeşitli bölgelerde bulunmaktadır. HyA, ECM'in viskoelastik özelliğini ve fiziksel yapısını korumasını sağlar. CD44 hücre reseptörü ile etkileşebildiği için hücre hareketi ve farklılaşmasını etkilemektedir [46]. HyA düşük mekanik özelliklere sahip olduğundan çeşitli ajanlarla güçlendirilmesi gerekmektedir. *Borzacchiello ve ark.* enjekte edilebilir ve ısıya duyarlı; β-trikalsiyum fosfat, mısır püskülü özü ve nano-gümüş parçacıkları (AgNP) içeren hiyalüronik asit hidrojeli sentezlemişlerdir [47]. Oda sıcaklığında sıvı, vücut sıcaklığında jel özellikte olduğu belirtilmiştir. AgNP ile hiyalüronik asit polimerine antibakteriyel özellik kazandırılmıştır.

2.3.3.7 Kitosan

Kitin mantarlarda hücre duvarında, çeşitli böceklerin dış iskeletlerinde ve yengeç gibi kabuklu canlılarda bulunmaktadır. Kitinin deasetilasyonu ile kitosan elde edilmektedir. Yapısı, kemik dokusunda bulunan glikozaminoglikanlara benzemektedir [48]. Asidik ortamlarda ve lizozim varlığı nedeniyle insan vücuduna hızla bozunabilmektedir. Çeşitli polimerler ya da osteoindüktif ajanlarla desteklenerek biyokompozit doku iskeleleri üretilebilmektedir [48]. *Anuradha ve ark.* ısıya duyarlı bir kitosan hidrojeli sentezlemişlerdir [49]. Kitosan; gliserofosfat ve grafen oksit ile biyokompozit haline getirilmiştir. Gliserofosfat ve grafen oksit eklenmesiyle hidrojelin mekanik özellikleriyle osteindüktif özelliklerinin arttırılması hedeflenmiştir. Grafen oksit eklenmesiyle hidrojelin protein adsorpsiyonu ve şişme yetisinin arttığı gözlemlenmiştir.

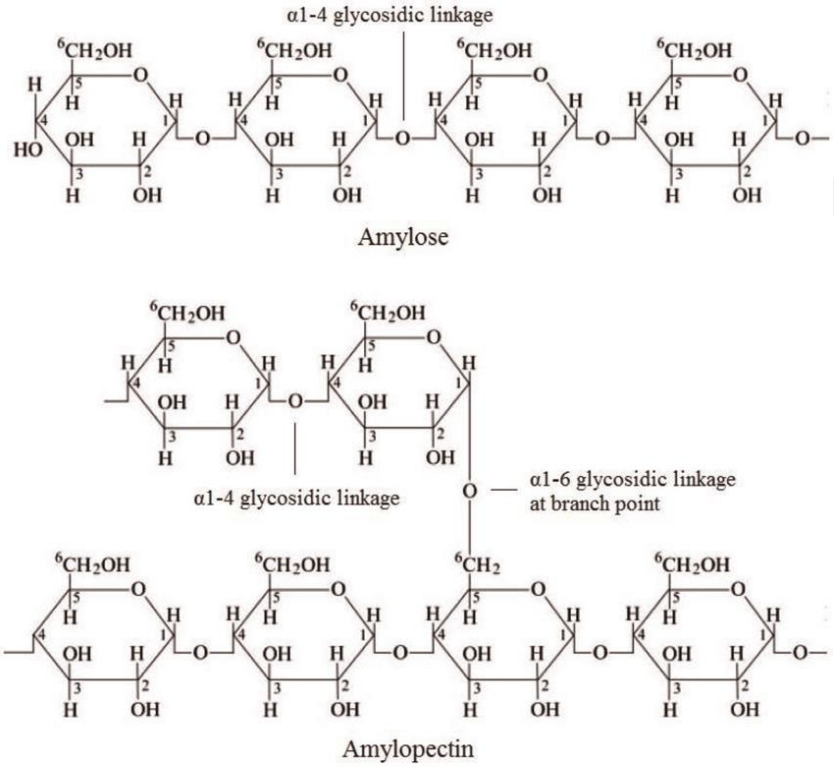
2.3.3.8 Aljinat

Aljinat kahverengi deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarittir. Mannuronik asit ve gluronik asit olmak üzere iki monosakkaritten oluşmaktadır [41]. Biyouyumluluk, kolay modifikasyon, düşük toksisite gibi özellikler aljinatı doku mühendisliğinde sıkça kullanılan bir polimer yapmaktadır. *Averous ve ark*. yaptığı bir çalışmada "click kimyası" yöntemi ile Mg-hidroksiapatit parçacıkları ve aljinatı biyokompozit haline getirmiştir [50]. Mg-HA parçacıklarının kemik doku

oluşumunu arttıracağı belirlenmiştir. Mg-HA parçacıklarının aljinatın gözenekli yapısına entegre olduğu ve hücre tutunmasını arttırdığı görülmüştür.

2.3.4 Nişasta

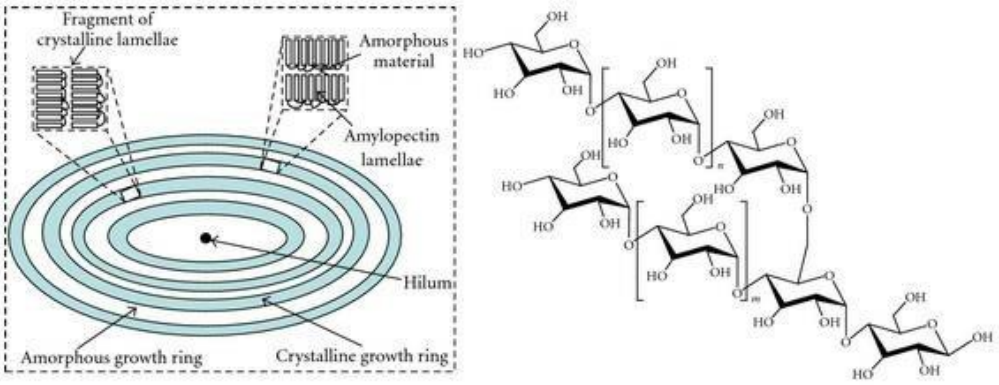
Nişasta, bitkilerdeki ana karbonhidrat deposudur. Yarı-kristalin ve çözünmeyen granüller olarak bitkilerin dokularında bulunmaktadır. Nişasta granülleri amiloz ve amilopektin olmak üzere iki polimerden oluşmaktadır. Genellikle %20-30 oranında amiloz ve %70-80 oranında amilopektin bulunmaktadır. Amiloz ve amilopektinin yapıları Şekil 2.3'te görülmektedir. Amiloz düşük moleküler ağırlığa sahip α-1,4 glikozidik bağları ile bağlı lineer bir polimerdir [51]. Amilopektin ise amiloza kıyasla daha yüksek moleküler ağırlığa sahiptir. Amilopektin ana zinciri α-1,4 glikozidik bağları ile bağlıyken dallanma noktalarında α-1,6 glikozidik bağları bulunmaktadır. Amiloz ve amilopektin polimerleri birbirlerine sıkı hidrojen bağları ile bağlı bulunmaktadır.



Şekil 2.3 Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı [52]

Nişastanın kaynağına göre amiloz ve amilopektin oranları değişebilmektedir. Amiloz ve amilopektinin sıkı hidrojen bağları ile bir araya gelmesiyle 1-100 µm boyutlarında granüller oluşmaktadır. Şekil 2.4'te nişasta granülünün iç yapısı görülmektedir. Granülün merkezinde "hilium" denilen bir nokta bulunmaktadır

[53]. Hiliumu çevreleyen "konsantrik büyüme halkaları" yer almaktadır. Bu konsantrik büyüme halkaları yaklaşık 120-400 µm kalınlığına sahiptir. Granülün büyüme halkaları 20-50 nm boyutlarındaki bloketlerden oluşmaktadır [53]. Bloketler içerisinde hem amilopektin hem de amiloz zincirleri bulundurmaktadır.



Şekil 2.4 Nişasta granülünün iç yapısındaki amiloz ve amilopektinin dağılımı [54]

Nişasta, suda çözünmeyen bir polimerdir. Alkalin çözeltiler ya da yüksek sıcaklıklarda çözünmesi sağlanabilmektedir. Nişasta su içerisinde 70°C'nin üzerinde bir sıcaklıkta çözdürüldüğünde jelatinizasyon görülmektedir[55]. Granüller suyu absorbe ederek şişmekte, amorf bölgelerin suyu absorblaması nedeniyle kristalin yapı bozulmaktadır. Çözelti ısıtılmaya devam ettiğinde hidrojen bağları kırılarak amiloz ve amilopektinin ayrılmasına neden olmaktadır. Nişasta-su çözeltisinin sıcaklığı düştüğünde ise retrogradasyon gerçekleşmektedir. Nişastanın zincirleri tekrardan bir araya gelerek tekrardan düzenli bir yapı oluşturmaktadır.

2.3.4.1 Nişastanın Biyomedikal Alanlarda Kullanımı

Nişasta, ucuz ve doğada çokça bulunan, biyobozunur ve toksik özellik göstermeyen bir polisakkarittir. İçerdiği sıkı hidrojen bağları kendiliğinden sert bir yapıda olmasını sağlasa da çeşitli ajanlar ya da polimerler kullanılarak mekanik özellikleri geliştirilebilmektedir. Bu nedenle ilaç salınımı, doku iskeleleri ve yara örtüleri gibi çeşitli biyomedikal alanlarda kullanımı sıklıkla görülebilmektedir.

Özmen ve ark. çalışmasında PEGDE ile çapraz bağlanmış nişasta nanojelleri üretmiştir [7]. Nişasta çapraz bağlanarak mekanik özelliklerinin arttırılması ve sıcaklık, nem gibi dış faktörlerden etkilenmesinin azalması sağlanmıştır. Nanojellerin içerisine vankomisin yüklenerek oral mukozit tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. 80-110 nm boyutlarında nanojeller elde edilmiştir. *S.*

aureus, S. pyogenes, ve *S. mutans* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiği gösterilmiştir. Bu çalışma, nişastadan elde edilen nanojellerin başarılı bir şekilde ilaç salımda kullanılabildiğini göstermiştir.

Ahmad ve ark. çalışmasında farklı miktarlarda zerdeçal içeren glutaraldehit ile çapraz bağlanmış PVA/nişasta hidrojel yara örtüleri üretmiştir [56]. PVA, nişastanın mekanik özelliklerinin arttırılması için kullanılmıştır. Zerdeçal içeren hidrojelin şişme özelliğinin, zerdeçalın sağladığı hidroksil gruplarıyla arttırdığı, hidrojelin *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür. PVA destekli nişastanın yara örtüsü olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Yu ve ark. çalışmasında aljinat ve nişasta polimerleri kullanarak kas dokusu için bir doku iskelesi üretmiştir [57]. Nişasta ve aljinat çözdürülerek $CaCl_2$/etanol çözeltisinde çapraz bağlanmış, ardından dondurarak jelleştirme (freeze-gelation) yöntemi kullanılmıştır. Nişasta miktarının doku iskelesine olan etkisi incelenmiştir. En yüksek miktarda nişastanın bulunduğu doku iskelesindeki gözeneklerin daha homojen dağıldığı ve daha büyük gözeneklerin bulunduğu belirtilmiştir. Biyokompozitin mekanik özellikleri incelendiğinde ise en yüksek oranda nişasta içeren örneğin basınç dayanımının, en az miktarda nişasta içeren örneğe kıyasla iki kat daha fazla olduğu açıklanmıştır. Hücre canlılığı incelendiğinde ise en yüksek oranda nişasta içeren örnekte mitokondri seviyesinin diğer örneklere kıyasla daha fazla olduğu belirtilmiştir ve bu durum nişastanın sağladığı gözenek yapısına bağlanmıştır. Çalışmada nişasta miktarının artmasıyla daha yüksek mekanik özelliklerin sağlandığı ve gözenek yapısının hücreler için daha uygun hale geldiği söylenebilmektedir.

2.3.4.2 Nişastanın Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Nişasta düşük maliyetli, biyouyumlu ve biyobozunabilir özellikte olduğundan kemik doku iskelelerinde de sıkça kullanılmaktadır. Nişasta çeşitli polimerler ya da ajanlarla biyokompozit haline getirilerek kemik doku mühendisliğinde kullanılabilmektedir.

Nişasta çeşitli polimerler ve ajanlar kullanılarak biyokompozit haline getirilebilmektedir. Osteoindüktif ajanlar da kullanılarak biyoetkinliği arttırılabilmekte ya da polimerlerle kompozit haline getirilerek yapısal özellikleri değiştirilebilmektedir. *Mohammadi ve ark.* yaptığı bir çalışmada ipek fibroin

nanolifleri yüklenmiş bir nişasta hidrojeli üretmiştir [58]. İpek fibroin nanolifleri metanol banyosunda ıslak elektro-eğirme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Elde edilen lifler glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak nişasta matrisine eklenmiştir. Ortaya çıkan biyokompozit kalsiyum ve fosfat çözeltilerine daldırılarak kalsiyum fosfat ile kaplanmıştır. Nişastada bulunan hidroksil grupları ve ipek fibroinin karboksil gruplarının, kalsiyum fosfat tabakası oluşmasında etkisi olduğu açıklanmıştır. İpek fibroin nanolifleri nişastanın gözenekli yapısına entegre olarak yüzey alanını arttırdığı, dolayısıyla hücre tutunmasının da arttığı belirtilmiştir.

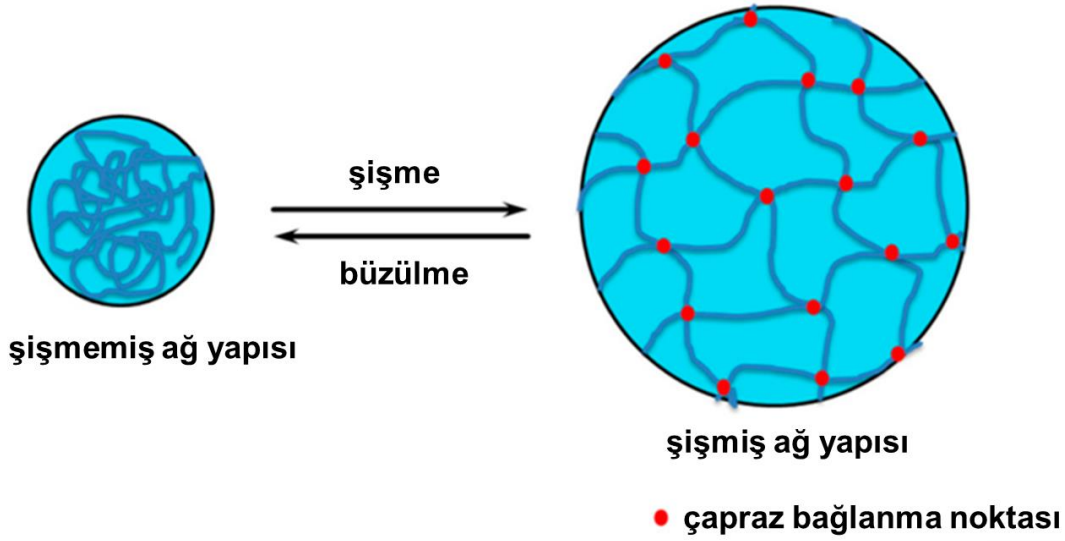
Taherimehr ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada termoplastik nişasta ve β-trikalsiyum fosfat biyokompoziti üretmiştir [59]. Nişasta, β-trikalsiyum fosfat ve gliserol homojen hale gelecek şekilde karıştırılmıştır. Numuneler enjeksiyon kalıplama yöntemi ile elde edilerek biyokompozitin özellikleri incelenmiştir. Biyomineralizasyon etkisini incelemek için numuneler SBF içerisinde bekletilmiş ve β-TCP bulunan nişasta biyokompozitinin yüzeyinde hidroksiapatit tabakası oluştuğu gösterilmiştir. Numunenin 28 gün içerisinde %51 oranında bozunduğu raporlanmıştır. Yapılan MTT testinde örneğin %97.2 oranında hücre canlılığı sağladığı görülmüştür. Biyoaktivitesi, biyouyumluluğu ve biyobozunurluk özelliği olan nişasta β-TCP biyokompozitinin kemik doku iskelesi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

2.4 Hidrojeller

2.4.1 Hidrojellerin Özellikleri

Hidrojeller, üç boyutlu çapraz bağlı polimer ağlarıdır [60]. Sahip oldukları çapraz bağlar sayesinde su içerisinde çözünmeden şişme özelliğine sahiplerdir. Hidrojeller fiziksel ya da kimyasal olarak çapraz bağlanabilmektedir. Hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik ve iyonik etkileşimler hidrojelin fiziksel çapraz bağlanmasını sağlamaktadır [60]. Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller sıcaklık ve pH gibi etkenlere göre çözünmeleri sağlanabilmektedir. Kimyasal bağlı hidrojeller ise kovalent bağlarla bağlı olup dış etkenler değiştiğinde çözünmezler, şişme-büzülme davranışı gösterirler (Şekil 2.5). Hidrojeller kaynağına göre (doğal, sentetik), polimerik yapısına göre (homopolimer, kopolimer, kompozit), konfigürasyonuna göre (amorf, yarı kristalin, kristalin), çapraz bağlanma şekline göre (fiziksel,

kimyasal), fiziksel yapısına göre (matriks, film, mikroküre) ve yüküne göre (nötr, iyonik, amfoterik, zwitteriyonik) sınıflandırılabilmektedir [62].



Şekil 2.5 Büzülmüş ve şişmiş hidrojel [61]

2.4.2 Hidrojellerin Türleri

Hidrojeller kaynağına göre sentetik ve doğal olarak ikiye ayrılmaktadır. Polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), poliakrilamid (PAM) ve poliakrilik asit (PAA) hidrojel sentezinde kullanılan sentetik polimerlerdir. Jelatin, kolajen, nişasta, kitosan, aljinat ise hidrojel sentezinde kullanılan doğal polimerlere örnek verilebilmektedir [62]. Doğal polimerler yüksek biyouyumluluk göstermeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak mekanik özellikleri yetersiz kalabildiğinden sentetik polimerler ile biyokompozit hidrojel haline getirilebilmektedir.

2.4.3 Hidrojellerin Kullanım Alanları

Hidrojeller tarım, atık su arıtımı, gıda paketleri, yara örtüleri, ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği gibi alanları içeren geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir [62].

Tarımsal alanda patojenler, bitkilerin çürümesine ve yüksek miktarda mali kayıplara neden olmaktadır. Bitkilerin patojenlerden korunması için metalaksil ve mancozeb gibi mantar öldürücü kimyasallar kullanılmaktadır [63]. Ancak bu kimyasallar patojenlerde direnç oluşumuna neden olmaktadır. *García-Carvajal ve ark.* gerçekleştirdiği bir çalışmada jelatin/kitosan/PVA kompozit hidrojeli üreterek bitkilerin patojenlere karşı korunmasını incelemiştir [63]. Kompozit hidrojele bir

fruktan olan inülini entegre ederek *Phytophtora capsici* patojenine karşı etkisi araştırılmıştır. Hidrojelden inülinin salınması ile biber bitkisinin doğal bağışıklık sisteminin harekete geçirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda biyobozunur, yaklaşık 12 kat şişebilen hidrojeller elde edilmiş ve inülin eklenmesinin patojen etkisini %80 oranında azalttığı sonucuna varılmıştır.

Sanayi atıkları nedeniyle atıksulara karışan ağır metal iyonları, boyalar ve radyoaktif atıklar çok sayıda canlının hayatını tehlikeye atmaktadır [64]. Hidrojeller yüksek oranda su tutabilmeleri nedeniyle adsorban olarak kullanılmaktadır. Ağır metallerin uzaklaştırılması için *Mohammad ve ark.* gerçekleştirdiği bir çalışmada selüloz/jelatin hidrojelleri üretmiştir [65]. Kompozit hidrojeller farklı jelatin ve farklı epiklorohidrin (ECH) çapraz bağlayıcı oranları ile sentezlenerek Cu^{2+} adsorpsiyonu üzerinde etkisi incelenmiştir. Selüloz/jelatin kompozit hidrojelinde ise, jelatinin eklenmesiyle -NH gruplarının varlığı hidrojelin hidrofilik özelliklerinin arttığı açıklanmıştır. Jelatin eklenmesiyle hidrojelin şişme özelliği artmış, dolayısıyla hidrojel içine alınan Cu^{2+} iyonlarının miktarı artmıştır. Aynı zamanda -NH grupları metalin hidrojel yapısına bağlanabilmesini sağlamıştır.

Hidrojeller kontrollü ilaç taşıma sistemlerinde yüksek miktarda su tutabilme özellikleri, değiştirilebilir mekanik özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Çeşitli ilaçlar bozunmalarını engellemek ya da yavaşlatmak, topaklanmalarını engellemek ve ömürlerini uzatmak amacıyla hidrojellere enkapsüle edilebilmektedir [66]. *Ummartyotin ve ark.* bakteriyel selüloz ve jelatin kompozit hidrojeli üreterek ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılma potansiyelini incelemiştir [67]. Polimerler glutaraldehit çapraz bağlayıcısıyla farklı oranlarda kompozit haline getirilmiştir. Model ilaç olarak bir antikanser ilacı olan doksorubisin gibi pozitif yüklü olan metilen mavisi kullanılmış ve salım özellikleri incelenmiştir. Bakteriyel selüloz/jelatin kompozitinin kontrollü bir salım sağladığı açıklanmıştır.

Gıda paketlerinin paket içerisindeki nemi engellemek ve bu şekilde küf oluşumunu engellemesi gerekmektedir. Hidrojeller yüksek miktarda su tutabilmeleri ve modifiye edilebilir mekanik özellikleriyle gıda paketlemesinde kullanılabilmektedir [68]. Aynı zamanda hidrojeller aracılığıyla petrol-bazlı ve doğada bozunmayan gıda paketlemeleri yerine bozunabilen çevre dostu ürünlerin üretilmesi sağlanabilmektedir. *Wang ve ark.* karboksimetil selüloz/PVA/polietilenimin/tannik asit kompozitini üreterek taze meyvelerin

saklanması için hidrojel bir paket üretmiştir [69]. Karboksimetil selüloz suda çözünebilir ve çevre dostu olması nedeniyle tercih edilmiştir ancak mekanik olarak yetersizdir. Bunun için karboksimetil selüloz PVA, polietilenimin ve tannik asitle kompozit haline getirilmiş ve gıda paketlemesinde etkisi incelenmiştir. PVA, polietilenimin ve tannik asit sıkı hidrojen bağları sağlayarak sağlam bir hidrojel oluşturmuştur. Elde edilen hidrojellerin gıda paketleme alanında kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Deri insan vücudunu çevreleyen, dış etkenlerle ilk karşılaşan organdır. Çevreyle direkt etkileşimi olması nedeniyle savunmasız kalmaktadır. Deri hasar aldığında belirli bir süre içerisinde hasarı tamir edebilme özelliğinde sahiptir. Ancak hasarlı bölge fazla büyük olduğunda, yüksek enflamasyon görüldüğünde, yanıklarda ve enfeksiyon gerçekleştiğinde iyileşme süreci uzayabilmektedir [70]. Yara örtüleri deri hasarlarının üzerini kaplayarak geçici bir bariyer oluşturmaktadır. Hidrojel yara örtüleri ECM benzemeleri ve nemli bir ortam sağlamaları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. *Pagano ve ark.* safran yapraklarından ekstrakt elde ederek nişasta hidrojeline entegre etmiştir [71]. Nişasta ısıtılmış ve gliserol ile eklenerek jelleştirilmiştir. Gallik asit ve klorojenik asit açısından zengin olan safran yaprağı ekstraktı antioksidan özellik göstermiş ve keratinositlerin çoğalmasına destek olmuştur. Nişasta jeline yüklenen ekstrakt çizik testi (scratch assay) 24 saatte hücrelerin göçünü sağlayarak yaranın kapanmasını sağlamıştır. Çalışma sonucunda nişastanın yara örtülerinde kullanımından olumlu sonuç alındığı belirtilmiştir.

Hidrojellerin çok geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. ECM benzemeleri nedeniyle yara örtüleri, ilaç salımı ve doku iskeleleri olarak kullanılabilmektedir. Aşağıdaki kısımlarda, bu tezin konusu olan hidrojellerin kemik doku mühendisliğindeki kullanımları ele alınacaktır.

2.4.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Hidrojeller

Hidrojeller biyouyumlu, biyobozunur, gözenekli, yüksek miktarda su tutma özelliğine sahip ve mekanik özellikleri modifiye edilebilir olduğundan doku iskeleleri olarak kullanılmaktadır [72]. ECM benzemeleri nedeniyle hücre tutunması, hücre göçü ve hücre çoğalmasında etkileri bulunmaktadır. Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere sentezlenen hidrojeller kemik dokusu oluşumunu destekleyecek ajanlar içermeli, kemiğin mekanik özelliklerini

karşılamalı, kemik doku oluşumuyla orantılı olarak bozunma göstermesi gerekmektedir [72]. Hidroksiapatit, kemik yapısında bulunmasıyla birlikte kemik doku oluşumunu destekleyen ajanlardan biridir. *Camcı-Ünal ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada farklı miktarlarda hidroksiapatit parçacığını GelMA hidrojeline yükleyerek şişme özelliklerini mekanik özelliklerini, bozunma özelliğini ve hücre üzerinde etkilerini incelemiştir [73]. Hidroksiapatit parçacıklarının eklenmesiyle hidrojellerin şişme oranlarında azalma görülmüştür. Bu durum, hidroksiapatit parçacıkları eklenmesinin polimer oranının azalmasına neden olmasıyla açıklanmıştır. Mekanik özellikleri incelendiğinde, hidroksiapatit içeren GelMA örneğinin basınç modülü daha yüksek bulunmuştur. Hidroksiapatit parçalarının hidrojel yapısını daha sert hale getirdiği dolayısıyla mekanik özelliklerini de arttırdığı sonucuna varılmıştır. Hidroksiapatit parçacıklarının bozunma özelliğine etkisini inceleme amacıyla, kolajenaz enzimi varlığında enzimatik bozunma testi gerçekleştirilmiştir. 18 saat sonunda hidroksiapatit içermeyen örnek %36.8 oranında kütleye sahipken, en yüksek miktarda parçacık içeren örnek %89 oranında kütlesini korumuştur. Hidroksiapatit parçacıklarının eklenmesiyle bozunma süresinin arttığı sonucuna varılmıştır.

GelMA kemik doku iskelelerinde sıklıkla kullanılmakta olup çeşitli ajanlarla desteklenmektedir. Hidrojeller aynı zamanda antibakteriyel ajanlarla entegre edilerek hasarlı bölgede oluşabilecek enfeksiyonların önüne geçilebilmesini sağlamaktadır. *Huang ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada gümüş nanoparçacıkları ile zenginleştirilmiş hidroksiapatit kürelerini GelMA hidrojeline entegre etmiştir [74]. Hidroksiapatit parçacıklarının eklenmesi mekanik dayanımı arttırmıştır. Hidrojeller *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel özellik göstermiştir. MC3T3-E1 üzerinde yapılan hücre testinde sitotoksisite görülmemiştir.

Kemik doku mühendisliğinde hidrojeller çeşitli osteoindüktif ve antibakteriyel ajanlarla desteklenerek kemik dokusu oluşumuna destek olabilmektedir.

2.4.5 Sonradan Çapraz Bağlanma ile Sentezlenen Hidrojeller

Hidrojellerin çapraz bağlanmasında kullanılan yöntemlerden biri sonradan çapraz bağlanma yöntemidir. Geleneksel çapraz bağlanma yöntemlerinde ise üç boyutlu matris ve çapraz bağlanma aynı anda elde edilmektedir [75]. Sonradan çapraz

bağlanma yönteminde ise üç boyutlu ve istenilen şekilde bir polimer matrisi elde edilmekte, ardından çapraz bağlanma gerçekleştirilmektedir [76].

Gözenekli yapılar, doku mühendisliğinde hücrelerin tutunabilmesi, çoğalabilmesi ve madde alışverişi için gerekmektedir. *Özmen ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada sonradan çapraz bağlanma yöntemiyle hiyerarşik gözenek yapısına sahip bir kitosan hidrojeli elde edilmiştir [9]. İlk olarak buz kalıplama yöntemiyle kitosan -20°C'de dondurulmuştur. Kitosanın dondurulmasıyla polimer çözeltisi içerisinde buz kristalleri oluşmuş ve porojen görevi görmüştür [77]. Farklı miktarlarda PEGDE içeren çözeltiler içerisinde çapraz bağlanarak özellikleri incelenmiştir. Mekanik özellikleri incelendiğinde PEGDE miktarının artmasıyla basınç modülünün arttığı gözlemlenmiştir. Mekanik özelliklerinin çapraz bağlayıcı oranıyla değişmesinin doku iskelelerinin sentezinde avantaj sağlayacağı sonucuna varılmıştır. Şişme özelliklerine bakıldığında mekanik özelliklerle uyumlu olduğu, şişme oranının basınç modülünün artmasıyla azaldığı belirtilmiştir. Gözenekli ve mekanik özellikleri modifiye edilebilen potansiyel bir doku iskelesi elde edilmiştir.

Wang ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada ise üç boyutlu yazıcı Bioplotter kullanarak aljinat/jelatin doku iskelesi üretmiştir [78]. Aljinat/jelatin kompoziti üç boyutlu cihaz aracılığıyla basılmış, elde edilen polimer çözeltisi 5°C'de kalıp haline gelmesi sağlanmıştır. Aljinat ve jelatin çapraz bağlanma gerçekleşmediği sürece kararsız ve mekanik özellikler açısından yetersiz özellikler göstermektedir. Kompozit, sırasıyla $CaCl_2$ ve glutaraldehit çözeltilerinde bekletilerek çapraz bağlanması sağlanmıştır. Çeşitli miktarlarda glutaraldehit kullanarak kompozit üzerinde etkisi incelenmiştir. Sadece $CaCl_2$ ile çapraz bağlanması gerçekleştirilen kompozitin gözenekliliğinin az olduğu, yeterince kararlı olmadığı belirtilmiştir. Gözenekliliğin ve kompozitin kararlı olması için glutaraldehit ile sonradan çapraz bağlanmanın önemi vurgulanmıştır. Çapraz bağlayıcı oranının artmasıyla şişme oranlarının azaldığı görülmüştür. Mekanik özellikleri incelendiğinde ise yüksek miktarda glutaraldehitle çapraz bağlanan grubun Young modülünün arttığı sonucuna erişilmiştir. Bu neden sonradan çapraz bağlanan ve glutaraldehit miktarı yüksek olan grubun dayanıklılığı arttırdığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonucunda sonradan çapraz bağlanma yöntemiyle elde edilen hidrojellerin doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği açıklanmıştır.

Jel yapılarında makrogözeneklerin bulunması doku iskeleleriyle birlikte absorban olarak kullanılmasını da sağlamaktadır. *Özmen ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada polidimetilsiloksan (PDMS) polimerini kullanılarak düşük sıcaklıklarda tiyol-en reaksiyonu gerçekleştirmiştir [79]. Donmuş çözelti LED-UV ışını ve güneş ışığı altında çapraz bağlanmıştır. Donma sırasında oluşan çözücü kristalleri porojen olarak görev yapmış, jelde makrogözenekli bir yapı oluşmasını sağlamıştır. Elde edilen kriyojellerin, birbirine bağlı gözenekler bulundurması nedeniyle süngerimsi ve mekanik açıdan dayanıklı bir yapıya sahip olduğu belirtilmektedir.

Çalışmalar incelendiğinde sonradan çapraz bağlanma yöntemi kullanıldığında polimer matrisinin başarıyla çapraz bağlandığı görülmektedir [77,78,79]. Sonradan çapraz bağlanma yöntemi öncesinde buz kalıplama gerçekleştiğinde hidrojel matrisinde makrogözeneklerin oluşumunun sağlandığı belirtilmektedir.

Hidrojellerin mekanik özelliklerin artması için çeşitli güçlendirici ajanlar kullanılabilmektedir. Bunlardan bir tanesi doğal bir kalsiyum kaynağı olan yumurta kabuğudur. Kemik doku mühendisliğinde kalsiyum iyonu sağlaması ve doku iskelelerinde mekanik dayanım sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir. Aşağıdaki kısımlarda, yumurta kabuğunun özellikleri, yumurta kabuğu yüklü hidrojeller ve yumurta kabuğunun kemik doku mühendisliğindeki önemi ele alınacaktır.

2.5 Yumurta Kabuğu

2.5.1 Yumurta Kabuğu Özellikleri

Yumurta, kuş türleri ve çeşitli sürüngen türlerinin döllenmiş üreme hücresidir. Gelişen embriyoyu fiziksel ve patojenik etkenlere karşı korumaktadır. Embriyoyu çevreleyen yumurta kabuğu zamanla çözünerek incelmektedir [80]. Çözünmesiyle ortaya çıkan iyonlar gelişen embriyonun iskelet sisteminin gelişmesini sağlamakta ve yumurtadan çıkışını kolaylaştırmaktadır.

Yumurta kabukları kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, magnezyum karbonat ve organik maddeden oluşmaktadır. Tavuk yumurta kabuğu kalsit formunda yaklaşık %95 oranında kalsiyum karbonattan ($CaCO_3$), yaklaşık %3.5 oranında ise organik maddeden oluşmaktadır [80]. Yüksek oranda kalsiyum oranına sahip olmaları nedeniyle kemik mineral yoğunluğunu arttırarak kemikleri güçlendirmektedir.

Aynı zamanda yumurta kabuklarından elde edilen kalsiyumun, ticari kalsiyuma kıyasla vücut tarafından daha verimli kullanıldığı açıklanmıştır [81].

Dünya çapında her yıl yaklaşık 65.5 milyon metrik ton yumurta üretilmektedir. Bu miktarın 2030 yılına kadar 90 milyona ulaşması beklenmektedir. Yumurta kabuklarının, yumurtanın %11'ini oluşturması nedeniyle her yıl yaklaşık 7.2 milyon ton yumurta kabuğu atığı ortaya çıkmaktadır [82]. Yumurta kabuğu atıkları genellikle çöplüklerde bertaraf edilmektedir. Bu nedenle kirlilik ve bakteri yuvası kaynağı olarak görülmektedir. Yumurta kabuğu atıklarına kullanım alanlarının açılması hem atık miktarını azaltmakta hem de sürdürülebilir alternatif bir kaynak olarak ortaya çıkmaktadır [82].

2.5.2 Yumurta Kabuğu Kullanım Alanları

Yumurta kabukları atıksu arıtımı, gübre, çimento, polimer kompozitler ve sağlık gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Zararlı endüstriyel atıklar çevreye zarar vermekle birlikte canlıların dokularında birikerek yaşamlarını olumsuz etkilemektedir. Verimliliği ve kolay kullanımı nedeniyle adsorpsiyon zararlı atıkların neden olduğu toksik bileşenleri uzaklaştırılmasında en çok tercih edilen yöntemlerdendir [83]. Aktif karbon, adsorban olarak sıklıkla kullanılmaktadır ancak yüksek maliyetli bir bileşendir. Aktif karbon yerine düşük maliyetli alternatifler için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Yumurta kabuğu, yüksek oranda $CaCO_3$'tan oluşmaktadır ve gözenekli yapısı nedeniyle geniş bir yüzey alanına sahiptir[84]. Bu nedenle yumurta kabukları boya ve metal iyonlarının uzaklaştırılması amacına uygun bir adsorban olarak görülmektedir. *Estevam ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada yumurta kabuklarının endüstride sıklıkla kullanılan Reactive Blue 198 ve Direct Black 22 boyaları ile suya karışan Cd^{2+} ve Cr^{3+} iyonları üzerinde etkisini incelemiştir [84]. Yapılan çalışma sonucunda yumurta kabuklarının yüksek oranda boya ve ağır metal iyonlarını adsorbe edebildiği belirtilmiştir.

Yumurta kabuğunun tarımsal alanda da kullanım alanları bulunmaktadır. Bitkilerin hücre duvarı yapısında bulunması, hücre iç dengesini düzenlemesi, enzim etkinleştirmesi ve iyon absorpsiyonuna görevi bulunması nedeniyle kalsiyum bitki gelişiminde önemli rol oynamaktadır [85]. Yumurta kabukları yüksek oranda kalsiyum iyonu içerdiğinden bitki gelişimini destekleyici bir ajan olarak

kullanılmaktadır. *Tran ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada yumurta kabuğu parçacıklarını gübre olarak yer fıstığı bitkileri üzerinde incelemiştir [85]. Yumurta kabuğunun, kalsiyum kaynağı olarak kullanılan kirece göre daha iyi sonuçlar verdiğini açıklamıştır. Daha uzun dallar, daha fazla nodül sayısı ve daha yüksek kök ağırlığı elde edilerek yumurta kabuğunun tarımda kalsiyum kaynağı olarak etkisi gösterilmiştir.

Yumurta kabuklarının inşaat endüstrisinde de kullanım alanı bulunmaktadır. Beton; çimento, kum ve su ile karıştırılan çakıllardan oluşan bir yapı malzemesidir. Çimento, dayanıklı ve suya dirençli olması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak çimento üretimi dünya çapında CO_2 emisyonlarının %7'sine neden olmaktadır. Bir ton çimento üretiminde 900 kg CO_2 atmosfere salınmaktadır [86]. Sera gazlarının atmosfere salınmasının önemli kaynaklarından biri olmasının yanı sıra karbon monoksit (CO), kükürt dioksit (SO_2) ve azot oksitler salarak hava kirliliğine neden olmaktadır. Bu bileşenlerin çevreye salınmasıyla hem çevre hem de insan sağlığı tehlikeye atılmaktadır. Yumurta kabukları, yılda tonlarca ortaya çıkan bir atık olarak beton yapısında doldurucu madde olarak ya da çakıllar yerine kullanılabilmektedir [86]. Çimento üretiminde sıklıkla kullanılan bir madde olan kireçtaşı $CaCO_3$'ten ve yumurta kabuğu da %95 oranında $CaCO_3$'ten oluşmaktadır. Bu nedenle yumurta kabuğu, kireçtaşı yerine kullanılabilmektedir.

Yumurta kabukları yüksek oranda kalsiyum iyonu içermesi nedeniyle kemik doku mühendisliğinde de kullanılmaktadır. Destekleyici bir ajan olması, biyouyumlu olması doku iskelelerinde tercih edilmesini sağlamaktadır. Salınan kalsiyum iyonları kemik doku oluşumu için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Yumurta kabuğu çeşitli polimerlere eklenerek polimerlerin mekanik özelliklerini arttırabilmekte ve kemik doku oluşumunu destekleyici ajanlar sağlayabilmektedir. Fan ve ark. yumurta kabuklarını MgO nanoparçacıklarıyla kaplamış, elde edilen parçacıkları BMP2 ile kitosan matrisine entegre etmiştir [87]. Kitosan biyokompozitinin mekanik ve biyouyumluluk özellikleri incelenmiştir. Biyokompozit EDC/NHS ile çapraz bağlanmıştır. Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler kompozit içerisinde üç gün boyunca inkübe edilmiştir. Üç gün sonunda hücre bulunduran örneklerde mineralizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Hücre bulundurmayan örnekte ise üç günde mineralizasyon görülmemiştir. Yumurta kabuğundan elde edilen $CaCO_3$ sayesinde bu sonuca ulaşıldığı belirtilmiştir.

$CaCO_3$'ın kompozitin mekanik özellikleri üzerinde etkisini incelemek amacıyla gerilim-gerinim testleri gerçekleştirilmiştir. $CaCO_3$'ın eklenmesiyle mekanik özelliklerin yüksek oranda arttığı görülmüştür. Kompozitin osteojenik özelliklerinin incelenmesi amacıyla hücreler kompozit üzerinde kültür edilmiştir. Kemik oluşumu ile ilgili kemik siyaloproteini, osteokalsin, osteopontin ve osteriks gibi proteinlerin ekspresyonu qPCR ile incelenmiştir. Yüksek miktarda $CaCO_3$ içeren örneğin ekspresyonunun, kitosan doku iskelesine kıyasla çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir. BMP2 entegre edilerek çapraz bağlanan kompozitlerde ise daha yüksek protein ekspresyonu görülmüş ve büyüm faktörü eklentisiyle kemik doku oluşumunun ileri düzeyde destekleneceği açıklamıştır.

Yumurta kabuğu sağlık, inşaat ve çevre alanlarını içeren geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kemik doku oluşumunu destekleyici bir ajan, atıksu arıtımında adsorban ve çimento üretiminde doldurucu madde olarak kullanılabilmektedir. Sürdürülebilir ve çevre dostu çözümler üretilmesi için yumurta kabuğu atıkları uygun ve işlevsel ajanlar olarak tercih edilebilmektedir.

2.5.3 Yumurta Kabuğu Yüklü Hidrojeller

Yumurta kabuğu, destekleyici bir ajan olduğundan hidrojel matrisine entegre edilerek mekanik özellik arttırabilmekte aynı zamanda biyoetkinlik sağlayarak çeşitli uygulamalarda kullanılmasını sağlayabilmektedir.

Probiyotikler; inflamatuar bağırsak hastalıkları, huzursuz bağırsak sendromu ve kolorektal kanser gibi durumlardan korumakta önemli rol oynamaktadır [88]. Ağız yoluyla alınan probiyotikler genellikle enkapsüle edilerek hazırlanmaktadır. Mide asidine *Lactobacillus acidophilus* gibi asidofilik bakteriler bile dayanmadığından, probiyotiklerin enkapsüle edilmesi gereklidir. *Shanmugham ve ark.* probiyotiklerin pektin hidrojeliyle enkapsüle edilmesini incelemiştir [88]. Yumurta kabuğunu destekleyici bir ajan olarak kullanmış, aynı zamanda karbonat iyonlarının mide asidini tamponlayarak bozunmamasını sağlamıştır. Mekanik özellikler incelendiğinde parçacık içeren hidrojelin depolama modülünün, içermeyene kıyasla 100 kat daha fazla olduğu açıklanmıştır. Farklı pH'larda yapılan şişme testlerinde ise parçacık içermeyen jellerde daha az etkileşim olduğundan daha çok şiştiği, parçacık içeren jellerde ise moleküller arası bağların artması ve aynı zamanda mekanik dayanımın artmasıyla daha az şiştiği belirtilmiştir. Parçacık içerikli jelle

kaplanmış probiyotiklerde koloni sayısında önemli bir fark görülmemiştir. Parçacık içermeyen jellerde ise koloni popülasyonunun azaldığı açıklanmıştır. Sonuç olarak yumurta kabuğu parçacıklarının hidrojel destekleyici ve biyoetkinlik kazandıran ajanlar olduğu belirlenmiştir.

Yumurta kabukları yüksek oranda kalsiyum içermeleri nedeniyle kemik doku oluşumunu destekleyici ajanlar olarak kullanılmaktadır. Belirtildiği üzere yumurta kabuğu parçacıkları polimerlere entegre edildiğinde mekanik dayanımın arttığı görülmektedir [87,88]. Kemik doku oluşumunun desteklenmesi için sert yüzeylere ihtiyaç olduğundan parçacık destekli hidrojeller üretilebilmektedir. *Camcı-Ünal ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığını GelMA hidrojeline ekleyerek özelliklerini incelemiştir [13]. UV-çapraz bağlama yöntemini kullanarak hidrojeller elde edilmiştir. Mekanik testler incelendiğinde yumurta kabuğu parçacığı ilavesiyle basınç dayanımının arttığı görülmüştür. Mekanik özelliklerin artmasıyla osteoblast hücrelerinin tutunma, çoğalma, farklılaşma özelliklerinin de arttığı açıklanmaktadır. Şişme özellikleri incelendiğinde parçacık miktarının artmasıyla şişme oranının azaldığı görülmüştür. Polimer miktarının azalması ve parçacık miktarının artması ile bu durum açıklanmıştır. Kompozit hidrojeller 8 saatlik bir bozunma testinden geçirilmiş ve parçacık içermeyen grubun 8 saat sonunda %80, yüksek miktarda parçacık içerenin ise %10 oranında bozunduğu açıklanmıştır. Hücre canlılığı analizi için 14 günlük bir Alamar-Blue testi gerçekleştirilmiş 14. güne kadar tüm örneklerde hücre canlılığında artış görülmüştür. Parçacık içeren grubun hücre canlılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. ALP osteoblast farklılaşmasında ve mineralizasyonda önemli bir rol oynayan enzimdir [13]. Pre-osteoblast hücreleri hidrojeller içerisinde inkübe edilmiş ve ALP etkinliği incelenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla parçacık içeren örneklerin ALP etkinliği çok daha yüksek çıkmıştır ve sonuçlar farklılaşmanın gerçekleştiğini göstermiştir. Kemik morfojenik proteini 7 (BMP7), osteokalsin proteinlerinin ekspresyonu ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu RT-qPCR gerçekleştirilerek incelenmiştir. 14 günlük inkübasyon sonrasında osteoblastların mRNA'ları izole edilmiştir. BMP7 ve osteokalsin ekspresyonu parçacık miktarının artmasıyla artmıştır. Yumurta kabuğunun kemik doku gelişiminde rol oynayan proteinlerin ekspresyonunda etkisi olduğu görülmüştür. Yumurta kabuğu parçacıklı GelMA hidrojelleri kemik hücreleri

üzerinde olumlu etki göstermiş ve kemik doku oluşumunu destekleyici özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Yumurta kabuğu farklı polimer kompozitlerine entegre edilerek hidrojeller elde edilebilmektedir. *Bal-Öztürk ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada GelMA/HyMA/CSMA biyokompozitine yumurta kabuğu parçacıkları entegre etmiş ve özelliklerini incelemiştir [14]. UV-çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen hidrojellere çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacıkları eklenmiştir. Parçacık miktarının mekanik özellikler üzerinde etkisi incelendiğinde parçacık miktarının artmasıyla basınç dayanımının da arttığı görülmüştür. Şişme özellikleri incelendiğinde parçacık eklenmesiyle şişme oranının arttığı belirtilmiştir. Bu durum gözeneklerde gerçekleşen değişiklik ile açıklanmıştır. Parçacıkların eklenmesiyle gözenek boyutunun azaldığı belirtilmiştir. Parçacıkların hidrojel üzerinde birbirine bağlı gözenek yapısı sağladığı açıklanmıştır. Hidrojellerin sitotoksik etkisini incelemek için osteoblastlar üzerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerde canlılığın %80 üzerinde olduğu belirtilmiş ve sitotoksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Yumurta kabuklarının mineralizasyon üzerinde etkisini incelemek için hidrojel örnekleri SVS içerisinde 28 gün boyunca bekletilmiş ve SEM-EDX analizi gerçekleştirilmiştir. En yüksek oranda parçacık içeren örneklerin üzerinde apatit parçacıklarının oluştuğu gözlemlenmiştir. P, Ca, O iyonlarının hidrojel üzerinde toplandığı ve mineralizasyonun gerçekleştiği belirtilmiştir.

Yumurta kabukları hidrojel matrisine direkt olarak eklenebildiği gibi modifiye edilerek de kullanılabilmektedir. *Catelas ve ark.* gerçekleştirdiği çalışmada yumurta kabuğu parçacıklarını fosforik asitle muamele ederek aljinat/kitosan hidrojeli ile kompozit hale getirmiştir [15]. Yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle gözenekliliğin yüksek oranda arttığı belirtilmiştir. Mekanik özellikler incelendiğinde parçacık içeren grubun basınç dayanımının, parçacık içeren gruba kıyasla daha fazla olduğu açıklanmıştır. Yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle mekanik dayanım artmıştır. Biyobozunma özelliklerinin incelenmesi amacıyla hidrojel örnekleri 21 gün boyunca PBS çözeltisi içerisinde inkübe edilmiştir. 21 gün sonunda parçacık içeren grup yüksek oranda hacmini korurken, parçacık içermeyen grup çoğunlukla bozunmuştur. Bu durum, yumurta kabuğu parçacıklarının polimer zincirleriyle yaptığı kimyasal bağlarla açıklanmıştır. Hücre

canlılığını inceleme amacıyla 21 günlük Alamar Blue testi ile mezenkimal kök hücreler hidrojeller içerisinde inkübe edilmiştir. 21 gün sonunda ES ve NTES parçacıkları içeren grupta, parçacık içermeyen gruba kıyasla daha yüksek hücre canlılığı görülmüştür. Çalışma sonucunda iki tür parçacıkla benzer sonuçlar elde edildiği, yumurta kabuğu parçacıklarının hidrojel kompozitinde gözenekliliği arttırdığı, yüksek oranda hücre canlılığı sağladığı ve mekanik dayanımı arttırdığı açıklanmıştır.

Yumurta kabukları belirli işlemlerden geçirilerek hidroksiapatit yapısına dönüştürülebilmekte ve doku iskeleleri gibi çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir. *Kanjanamekanant ve ark.* yumurta kabuğunu çöktürme yöntemi kullanarak hidroksiapatit formuna dönüştürmüştür [89]. Hidroksiapatit tozu ipek fibroin ve aljinat hidrojeline eklenip $CaCl_2$ ile oda sıcaklığında çapraz bağlanmıştır. Sentez sonucunda enjekte edilebilir bir hidrojel elde edilmiştir. Elde edilen enjekte edilebilir hidrojel diş çekimi sonrasında boş kalan ve diş kökünü çevreleyen alveolar kemiğin rezorpsiyonu üzerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Gözeneklilik incelendiğinde hidroksiapatit parçacıklarının eklenmesiyle gözenek boyutlarının azaldığı belirtilmiştir. 24 saatlik şişme testi sonucunda parçacık içermeyen kompozitin, parçacık içeren kompozite kıyasla daha fazla şişme oranına sahip olduğu görülmüştür. Mekanik özellikler incelendiğinde hidroksiapatit parçacıklarının eklenmesiyle Young modülünün düştüğü belirtilmiştir. Buna neden olarak hidroksiapatit parçacıklarının çapraz bağlı ağ yapısını etkilediği ve daha gevşek bir yapı elde edildiği söylenmiştir. Hücre canlılığı üzerine etkisini inceleme amacıyla pre-osteoblast hücreleri olan MC3T3-E1'ler üzerinde MTT testi gerçekleştirilmiş ve hidroksiapatit parçacığı içeren hidrojellerin %70 üzerinde hücre canlılığı gösterdiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda yumurta kabuğu kaynaklı hidroksiapatitlerin eklenmesiyle hidrojel gözenekliliği, mekanik özellikleri ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri görülmüştür.

Çalışmalar incelendiğinde yumurta kabuğu parçacıklarının direkt olarak ya da modifiye edilerek kullanılabildiği görülebilmektedir. Yumurta kabuğu parçacıkları hidrojel matrisinin gözenekliliğini, hidrojelin mekanik özelliklerini, hücre canlılığını etkilemektedir. Yumurta kabuğu parçacıkları hidrojelin özelliklerini değiştirebildiğinden çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir.

2.5.4 Kemik Doku Mühendisliğinde Yumurta Kabuğunun Önemi

Kalsiyum iyonları kemik dokusu oluşumunda büyük rol oynamaktadır. Kemik mineralizasyonunun ve kemik oluşumunun gerçekleşebilmesi için ekstraselüler matriks içerisinde kalsiyum iyonlarının bulunması gerekmektedir [81]. Kalsiyum, besinler aracılığıyla alınarak kemik matrisinde depolanmaktadır. Kalsiyum eksikliği, osteoporoz gibi kemik kütlesinin azalmasına neden olan rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu nedenle gıda takviyeleri aracılığıyla da kalsiyum alınabilmektedir [81].

Kalsiyum, pre-osteoblastların, osteoblastların, makrofajların ve insan periostal türevi kök hücrelerinin osteogenezinde etkili olmaktadır. Kalsiyum iyonu, osteojenik hücrelerin L-tipi kanallarından geçerek kalmoduline (CaM) bağlanmaktadır. Kalsiyum iyonu bağlanan CaM, kalmodulin kinaz II'yi (CaMKII) etkinleştirir [90]. CaMKII, osteoblast çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyecek sinyal yollarını düzenlemektedir. Farklılaşma ve mineralizasyon sürecinde osteokalsin, osteopontin ve BMP2 gibi gerekli proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır.

Kalsiyumun varlığı kemik doku oluşumunda büyük bir öneme sahiptir. Yumurta kabuğu %95 oranında kalsiyum iyonundan oluşması nedeniyle gıda takviyeleri aracılığıyla alınabilmektedir [81]. Yumurta kabuğu aynı zamanda kemik doku iskelelerinde kullanılmaktadır [13,14,15]. Doku iskelesinden salınan Ca^{2+} iyonları osteoblastlarla etkileşerek hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemektedir.

Kemik doku oluşumunu destekleyen etkenlerden biri de sert bir ekstraselüler matrikstir. Kemik, mekanik stresi algılayabilmekte ve ona uygun yanıt yaratabilmektedir. Kemik dokusu fazla mekanik stres altında kaldığında daha güçlü olmaktayken, az mekanik stres altında kaldığında kütlesini kaybetmekte ve zayıflamaktadır [91]. Bu nedenle yatalak hastalarda kemik erimesi görülmektedir. Hücreler mekanoreseptörler ile çevrelerindeki fiziksel sinyalleri algılayabilmektedirler. Daha sonra fiziksel sinyaller biyokimyasal sinyallere dönüşmektedir. İntegrinler mekanik sensörlerden olup ECM'den alınan sinyalleri hücreye iletmektedir [91]. İntegrinin bir ucu ligandlara bağlanmakta, diğer ucu ise hücre içi aktin lifine bağlanmaktadır. Aktin lifinin sıkışma derecesine göre mekanik sinyaller algılanmaktadır. Mekanik sinyaller nükleusa ulaştırılıp protein

ekspresyonunu sağlamaktadır. Aynı zamanda mekanik stres dolayısıyla hücre içi kalsiyum iyonu miktarı artmaktadır [91].

Yapılan çalışmalarda yumurta kabuğu parçacıkları içeren doku iskelelerinin mekanik dayanımının arttığı görülmüştür [13,14,15]. Mekanik dayanımın artması, osteoblast farklılaşmasına neden olmaktadır. Yumurta kabukları, kemik doku oluşumu için hem kalsiyum iyonu sağlamakta hem de mekanik dayanımı arttırmaktadır. Bu nedenle kemik doku iskelelerinde kullanılmak için uygun bir ajan görevi görmektedir.

Bu tez kapsamında, buz kalıplama/sonradan çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yumurta kabuğu parçacıkları içeren nişasta hidrojelleri literatürde ilk defa üretilmiştir. Yumurta kabuğu parçacıkları içeren bir nişasta hidrojeli olması ile birlikte buz kalıplama/sonrada çapraz yöntemi ile üretilmesi nedeniyle özgünlük taşımaktadır. Aşağıdaki bölümlerde nişasta hidrojelleri çeşitli karakterizasyon aşamalarından geçirilerek farklı miktarlarda yumurta kabuğu parçacıklarının hidrojel üzerindeki etkisi incelenmiştir. İlerleyen aşamalarda ise hücre canlılığı testleri gerçekleştirilerek kemik hücreleri üzerindeki biyouyumluluğu incelenmiştir.

3
MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyaller

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan materyallerin listesi

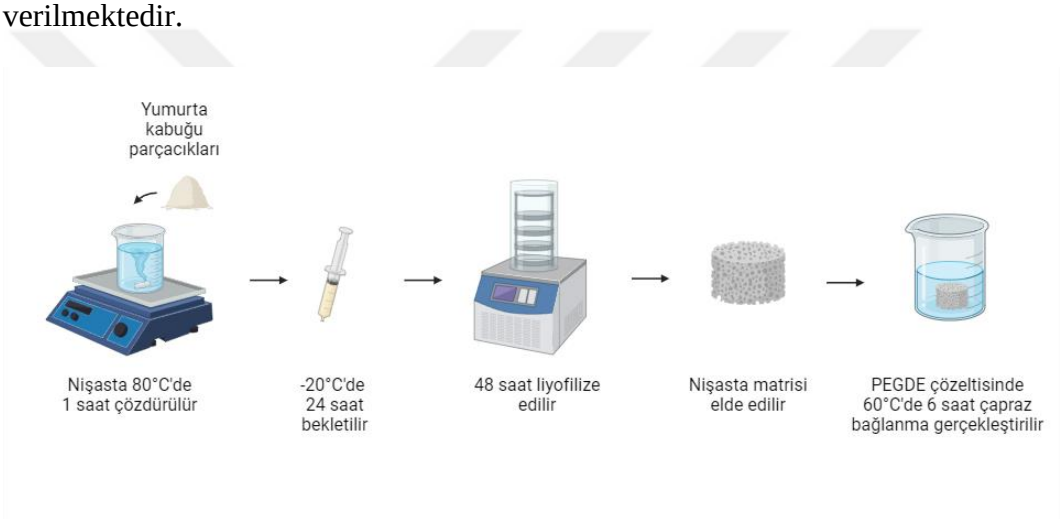
Materyal	**Kaynak**	**Kullanım alanı**
Patates nişastası	Sigma-Aldrich	Hidrojel sentezi
PEGDE	Sigma-Aldrich	Çapraz bağlayıcı
Yumurta	Yerel Market	Hidrojel destekleyici osteoindüktif ajan

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan ekipman listesi

Ekipman	**Model**
Buzdolabı	Ariston
Ultra saf su cihazı	Millipore MilliQ Gradient
Etüv	Binder
Liyofilizatör	Heto / Drywinner DW 1.0-60e
FTIR	Jasco FT/IR-4600
SEM	Thermo Fisher Scientific Quattro S
Universal mekanik test cihazı	Zwick Roell Z0.5 TH
Mikroplaka okuyucu	BMG Spectrostar

3.2 Yöntem

Bu çalışmada, yumurta kabuğu parçacıkları ile biyokompozit hale getirilmiş nişasta hidrojelleri üretilmiştir. İlk olarak nişasta ultra saf suda çözdürülmüş, ardından yumurta kabukları çeşitli miktarlarda olmak üzere çözeltilere eklenerek karıştırılmıştır (Şekil 3.1). Nişasta çözeltileri şırıngalara çekilerek -20°C'de 1 gün dondurulup sonrasında liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen nişasta matrisleri PEGDE çözeltisinde bekletilerek çapraz bağlanmıştır. Hidrojel doku iskelelerinin FTIR, XRD, SEM, şişme dengesi, şişme kinetiği, mekanik testler, MTT ve biyomineralizasyon testleriyle yapısal, fiziksel ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. Aşağıdaki paragraflarda, bu deneysel süreçlerle ilgili detaylar verilmektedir.



Şekil 3.1 Nişasta hidrojellerinin üretim aşamaları

3.2.1 Yumurta Kabuklarının Hazırlanması

Hidrojele entegre edilecek olan yumurta kabukları, sterilize edilmek amacıyla sıcak deiyonize su ile yıkanmış, ardından 70°C'lik fırında 4 saat boyunca kurutulması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen steril parçacıklar öğütücü aracılığıyla küçük boyutlara indirgenmiştir.

3.2.2 Nişasta Hidrojel Doku İskelesinin Sentezlenmesi

0,1 gram nişasta 10 mL distile su içerisinde 80°C'de 1 saat boyunca jelatinize edilmiştir. Nişasta yüksek sıcaklıklarda su içerisinde karıştırıldığında su, nişasta granüllerinin içine absorbe olarak amorf halkaların şişmesine ve bu şekilde yapılarının bozulmasına, hidrojen bağlarının kopmasına neden olmaktadır. Granül yapısının bozulmasıyla nişasta su içerisinde çözünebilir hale gelmektedir.

Kontrol numunesi olan ve %0 oranında yumurta kabuğu parçacık içeren hidrojel ES/0 olarak adlandırılmış ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır. %2,5 oranında parçacık içeren ES/2,5, %5 oranında parçacık içeren ES/5 ve %10 oranında parçacık içeren ise ES/10 olarak adlandırılmıştır. 15 dakika boyunca karışması sağlanan parçacık içeren ve içermeyen nişasta çözeltileri 2 mL'lik şırıngalara çekilerek -20°C'de 24 saat bekletilmiş ve donmuş çözeltiler 48 saat liyofilizatörde tutulmuştur. Dondurma işleminde oluşan buz kristalleri vakumlanarak gözenekli bir matriks yapı elde edilmiştir.

Sonradan çapraz bağlama işlemi için; %50'lik PEDGE-su çözeltisi 700 rpm'de 5 dakika karıştırılmış ve 60°C'lik etüve konulmuştur. Sıcaklığı 60°C'ye ulaşan PEGDE çözeltisi penisilin şişeleri içinde bulunan nişasta matriksleri üzerine eşit miktarda eklenmiş ve yumuşak hareketlerle karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler 6 saat boyunca 60°C'lik etüvde bekletilerek çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen doku iskeleleri distile su içerisinde bekletilmiş ve suları belirli aralıklarla tazelenerek yıkanarak liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.3 Karakterizasyon Yöntemleri

3.3.1 ATR- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

PEGDE ile çapraz bağlanması gerçekleştirilen nişasta doku iskeleleri kurutulmuş ve yapıları ATR adaptörlü Jasco FT/IR-4600 spektroskopisiyle 400–4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir. Hem hidrojeller hem de doku iskelesinin yapımında kullanılan tüm bileşenler birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Nişasta süngerlerinin gözenek özellikleri ve yumurta kabuğu parçacığı eklenince gözeneklerde gerçekleşen değişim SEM aracılığıyla incelenmiştir. Kurutulan örnekler kesilerek Şekil 3.2'de bulunan Polaron SC7640 Sputter Coater ile altın-paladyum alaşımı ile kaplanmıştır. Hazırlanan örnekler Şekil 3.3'te bulunan Thermo Fisher Scientific Quattro S taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Numunelerin gözenek boyutları ImageJ yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Nişasta hidrojel örneklerinin kaplanma aşamasında kullanılan Polaron SC7640 Sputter Coater



Şekil 3.3 Nişasta hidrojel örneklerinin iç yapısının incelenmesinde kullanılan Thermo Fisher Scientific Quattro S

3.3.3 Şişme Oranı

Kuru duruma göre ağırlıkça şişme oranlarını belirlemek için nişasta doku iskeleleri distile su ile belirli aralıklarla yıkanmış ve şişme-denge durumuna gelene kadar bekletilmiştir. Şişen örneklerin ağırlıkları alınmıştır ve liyofilizatörde 48 saat boyunca kurutulmuştur. Şişme oranlarının p değerleri *t*-testi ile elde edilmiştir.

Eşitlik 3.1'de doku iskelelerinin şişme oranı eldesi $m_{şişmiş}$ denge durumuna geldiği ağırlık ve m_{kuru} şişme dengedeki örneğin liyofilizatörde kurutulduktan sonraki ağırlığıdır.

$$q_w = \frac{m_{şişmiş}}{m_{kuru}} \tag{3.1}$$

3.3.4 Şişme Kinetiği

Kurutulan nişasta biyokompozitlerinin ağırlıkları ölçülmüş, kuru süngerler 100 mL distile su içine batırılarak süngerlerin ağırlıkları belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. Süngerlerin zamana bağlı olarak aldığı su Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlikte $m_{bağ}$ bağıl kütle olup jellerin zamana bağlı olarak aldığı su, m_{kuru} jelin kuru ağırlığını, m_t ise jelin t zamanındaki şişmiş ağırlığını göstermektedir.

$$m_{bağ} = \frac{m_t}{m_{kuru}} \tag{3.2}$$

3.3.5 Mekanik Testler

Yumurta kabuğu içeren ve içermeyen nişasta hidrojellerinin mekanik özelliklerinin incelenmesi amacıyla universal test cihazı Zwick Roell Z0.5 TH ile basma testi gerçekleştirilmiştir. Kuru hidrojel örneklerinin Young modülü, akma gerilimi, kırılma gerilimi ve gerinimi hesaplanmıştır. Şişmiş hidrojel örneklerinin ise tokluk, kırılma gerilimi, gerinimi ve Young modülü hesaplanmıştır.

3.3.6 Biyomineralizasyon

Nişasta biyokompozitlerinin biyomineralizasyon etkileri numunelerin simüle vücut sıvısına (SVS) batırılmasıyla ölçülmüştür. SVS literatüre dayanarak NaCl, KCl, $NaHCO_3$, $MgCl_2.6H_2O$, $CaCl_2$, KH_2PO_4, $(HOCH_2)_3CNH_2$ ve Na_2SO_4 reaktanlarının distile su içerisinde çözdürülmesiyle hazırlanmıştır [92]. SVS pH'ı 1 M HCl eklenmesiyle 7.4'e sabitlenmiştir. Kuru numuneler 37°C'de 28 gün boyunca bekletilmiştir. 28 gün sonunda deiyonize su ile yıkanarak dondurulmuş ve tekrardan liyofilize edilmiştir. SEM/EDX analizi ile biyomineralizasyon değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

3.3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

ATCC osteoblast hücre hattı %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 pen-strep içerikli MEM Alpha besiyerinde 37°C'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. T75 hücre kültür flasklarında bulunan besiyeri üç günde bir değiştirilmiştir. Osteoblast hücreleri %90 yoğunluğa ulaştığında hücreler 3 mL %0.05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak 5 dakika boyunca 37°C'de bekletilmiş ve flasktan ayrılmaları sağlanmıştır. 3 mL besiyeri eklenerek Tripsin solüsyonunun inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.

3.3.8 Hücre Canlılığı Testi

Nişasta biyokompozitlerinin osteoblast hücreleri üzerindeki etkiyi incelemek amacıyla indirekt MTT testi gerçekleştirilmiştir. 2 mL MEM Alpha besiyeri, kuru hidrojel örnekleri üzerine eklenmiştir. 24 saat boyunca %5 CO_2 koşullarında 37°C'de bekletilmiştir. Hücreler, 96-oyuklu plakalara, kuyu başı 10 x 10^3 yoğunluğunda, 100 µL MEM Alpha içinde %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin/streptomisin ve %1 (v/v) L-glutamin içeren ortamda ekilmiştir. Kuru hidrojellerin muamele edildiği besiyeri 0,22 µm şırınga filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir. Osteoblastların besiyeri, numune ekstraktı farklı konsantrasyonlarda yumurta kabuğu içeren doku iskeleleri içeren besi yeri ile değiştirilmiştir. Hücreler yeni besi yeri ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda 100 µL MEM Alpha ve 10 µL MTT solüsyonu (PBS içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde çözdürülmüştür) kuyucuklara eklenmiştir. Çözelti eklendikten sonra formazan kristallerinin oluşması için 4 saat daha inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözelti çekilip üzerine 100 µL DMSO eklenmiş ve 20 dakika boyunca 37°C'de bekletilmiştir. Elde edilen formazan çözeltisi 570 nm'de mikroplaka okuyucu (BMG Spectrostar) aracılığıyla ölçülmüştür. Hücre canlılığı (%) hesaplamak için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır. OD_{750}Örnek, numune ekstraktı içeren grupların 570 nm absorbans değerini, OD_{750}Kontrol ise numune ekstarktı içermeyen kontrol grubunun 570 nm absorbans değerini göstermektedir.

$$Hücre\ Canlılığı\ (\%) = \frac{OD_{570}\,Örnek}{OD_{570}\,Kontrol}\ x\ 100 \tag{3.3}$$

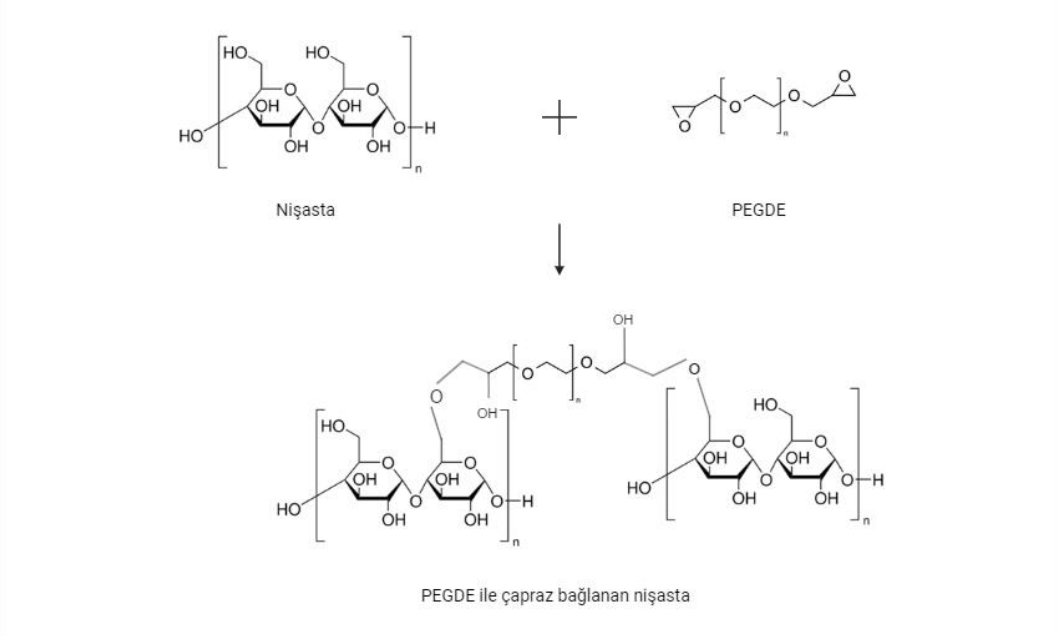
3.3.9 Biyobozunma Testi

Yumurta kabuğu parçacığı içeren kuru hidrojellerin biyobozunma davranışının incelenmesi için örnekler 10 μg·mL^{-1} kolajenaz içerikli 5'er mL'lik PBS çözeltisi içinde belirli aralıklarda bekletilmiştir. 7 günde bir olacak şekilde üç kez liyofilize edilmiş ve tartılmıştır. Örneklerin ağırlıklarındaki azalma incelenerek biyobozunma yüzdesi Eşitlik 3.4 ile hesaplanmıştır. Belirtilen eşitlikte W_i ilk kuru ağırlık, W_d ise son kuru ağırlık olarak belirlenmiştir.

$$Biyobozunma\ yüzdesi\ (\%) = \frac{(W_i - W_d)}{W_i} \times 100 \quad (3.4)$$

4
SONUÇ

Bu tezde kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yumurta kabuğu parçacıkları içeren yeni bir tür biyokompozit nişasta hidrojeli üretilmiştir. Nişasta hidrojellerinin kemik doku iskelesi olarak kullanım potansiyelini incelemek amacıyla karakterize edilmiş ve hücre deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yapılan analizler literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılarak tartışılmıştır. Şekil 4.1'de nişasta ve PEGDE'nin çapraz bağlanma reaksiyonu gösterilmektedir.

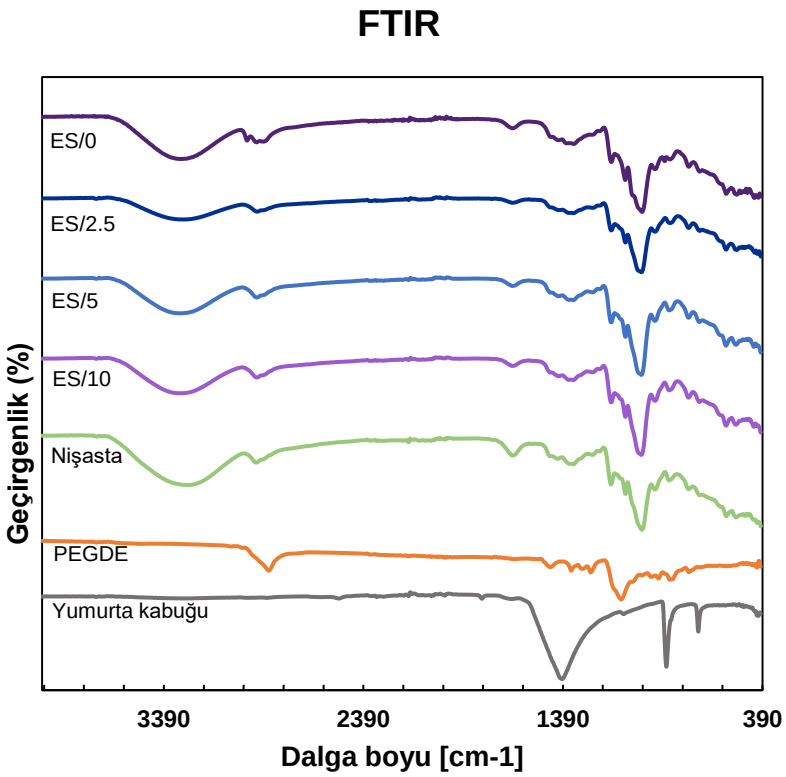


Şekil 4.1 Nişasta ve PEGDE'nin çapraz bağlanma mekanizması

4.1 FTIR Analiz Sonuçları

Hidrojellerin kimyasal yapısı FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere yumurta kabuğu içeren hidrojel biyokompozitlerin nişasta, PEGDE, yumurta kabuğu ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Nişastanın sahip olduğu 3310 cm^{-1}, 2900 cm^{-1}, 1650 cm^{-1}, 1360 cm^{-1}, 1150 cm^{-1}, 1000 cm^{-1} karakteristik pikler şekilde görülmektedir [7]. 3310 cm^{-1} piki tüm nişasta türlerinde OH grubunun esneme titreşimine, 2900 cm^{-1} ise CH_2 deformasyonuna aittir. 1650 cm^{-1} pikinin amorf bölgede absorbe olan su molekülleri ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Parmak izi bölgesi incelendiğinde 1360 cm^{-1}'de görülen piklerin birincil ve ikincil alkollerin OH bükülmelerine ait olduğu belirtilmiştir. 1150

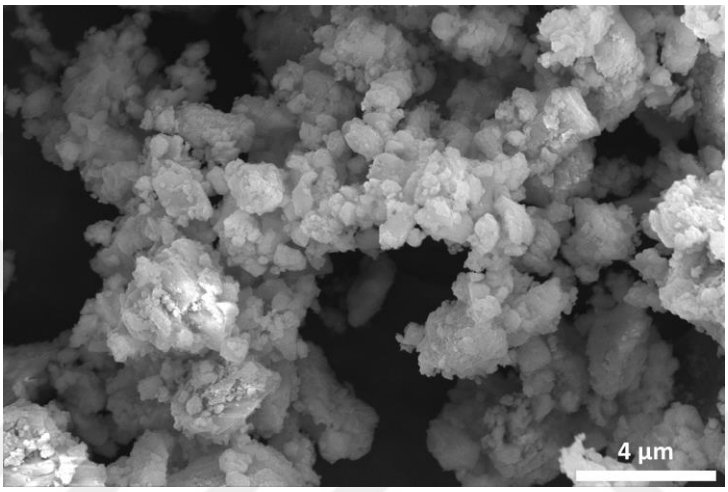
cm^{-1}'de C–O–C alifatik eterdeki asimetrik titreşim, 1000 cm^{-1}'de ise siklik karbon halkaları görülmektedir. PEGDE'nin FTIR spektrumunda 2863 cm^{-1} bandı CH_2 deformasyonuna, 1095 cm^{-1}'de görülen sert pik ise C–O–C alifatik eter asimetrik esnemesine aittir. 1454 cm^{-1} 'de görülen pik CH_2 grubundaki titreşimlere aittir [7]. Yumurta kabuğunun FTIR spektrumu incelendiğinde 1553-1200 cm^{-1} arasındaki geniş pikin C-O asimetrik esneme titreşimine ait olduğu görülmektedir [7]. 872 cm^{-1}'de görülen titreşim piki CO_3'ın düzlem dışı deformasyonuna, 710 cm^{-1} ise O-C-O titreşiminin düzlem içi deformasyonuna aittir. Nişasta hidrojelleri incelendiğinde 3310 ve 1650 cm^{-1} piklerinin zayıfladığı görülmektedir. 1650 cm^{-1} piki nişastada bulunan su gruplarına aitken, 3310 cm^{-1} piki ise OH bandına aittir [93]. Buradan yola çıkarak, nişasta ve PEGDE'nin OH grubu aracılığıyla çapraz bağlandığı söylenebilmektedir.



Şekil 4.2 Çeşitli miktarlarda parçacık içeren hidrojel biyokompozitler, nişasta, PEGDE ve yumurta kabuğunun FTIR spektraları

4.2 SEM Analiz Sonuçları

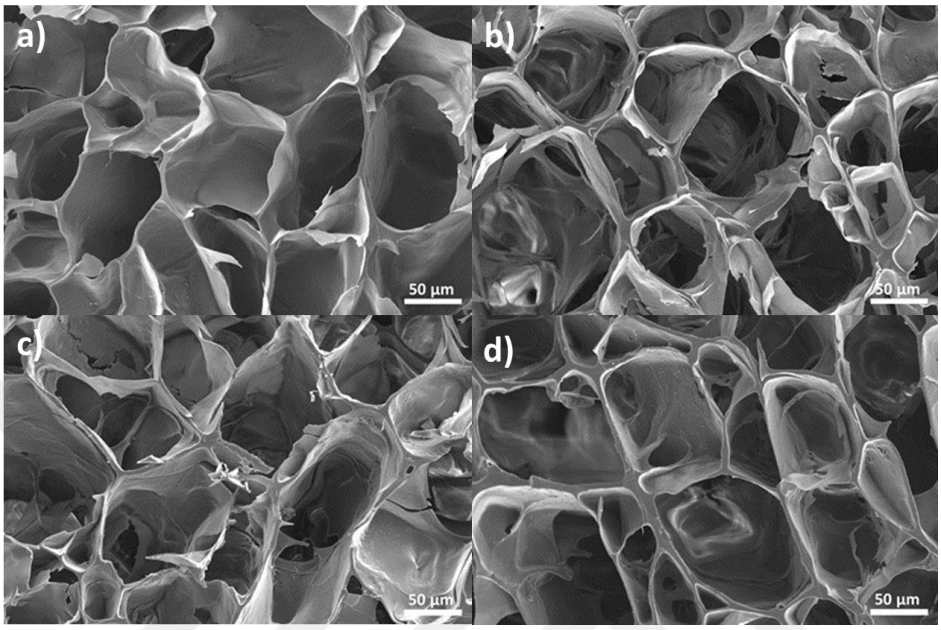
Hidrojellerin gözenek yapıları, şişme özelliklerini ve mekanik özelliklerini de etkilemektedir. Çalışmada kullanılan yumurta kabuğu parçacıkları ve elde edilen nişasta hidrojellerin yapısı SEM ile incelenmiştir. Yumurta kabuğu parçacıklarının boyutları ve nişasta hidrojellerinin gözenek boyutları ImageJ kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 4.3'de sentez aşamasında kullanılan yumurta kabuğu parçacıklarının görüntüsü bulunmaktadır. Parçacıklarda topaklanma gerçekleştiği görülmektedir. Parçacıkların ortalama boyutu 1,14±0,52 µm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3 Yumurta kabuğu parçacıklarının 20.000x büyütmede elde edilen SEM görüntüsü

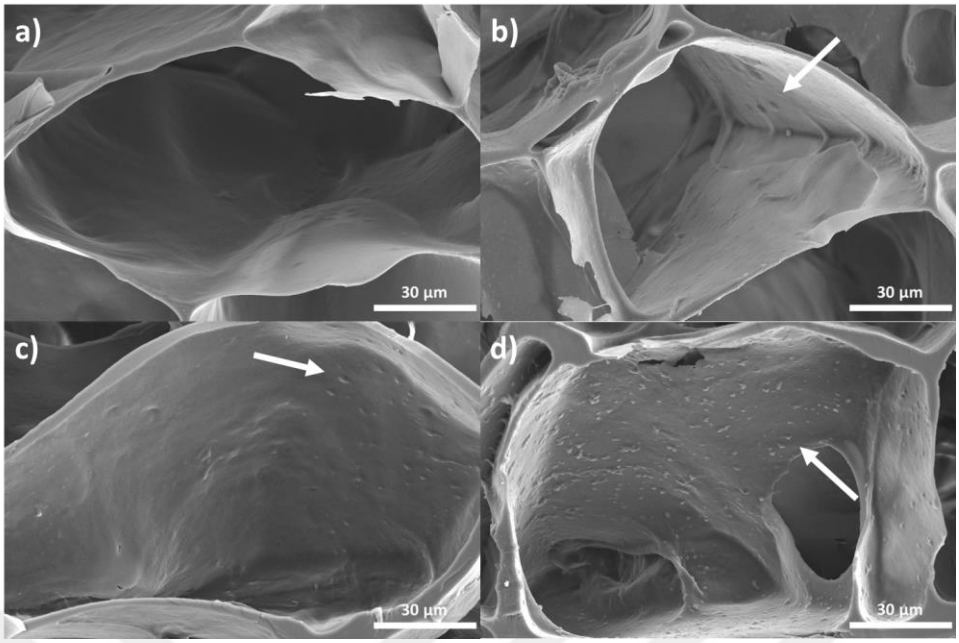
Nişasta hidrojellerinin gözenek görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Nişasta hidrojellerinin gözenek boyutları ES/0, ES/2,5, ES/5 ve ES/10 için sırasıyla 168,37±25,45 µm, 136,24±18,71 µm, 124,52±18,99 µm, 117,62±24,52 µm olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, yumurta kabuğu içermeyen ES/0 ile ES/10 numuneleri karşılaştırıldığında gözenek boyutunun %30,14 oranında azaldığı görülmektedir. Bu bulgular literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur. Örneğin, yumurta kabuğu içeren GelMA hidrojellerinde, parçacık miktarının artmasıyla gözenek boyutlarının azaldığı görülmektedir [14, 15]. Yumurta kabuğu parçacıklarının polimer matriksiyle etkileşime geçmesi nedeniyle daha dar bir gözenek aralığına neden olduğu açıklanmaktadır [14]. Diğer bir çalışmada ise, -20°C'de elde edilen kitosan/kolajen/nanohidroksiapatit hidrojel biyokompoziti incelendiğinde parçacık miktarının buz kristali oluşumunu etkilemiş olduğu, bu nedenle gözenek boyutlarında yine azalttığı belirtilmektedir [95]. Yumurta kabuğu

içeren nişasta hidrojelleri de -20°C'de buz kalıplama işlemi gördüğünden parçacıkların gözenek boyutlarının buz kristali oluşumunu etkilediği söylenebilmektedir. Aynı zamanda parçacık miktarının artmasıyla polimer matrisinin parçacıklarla daha çok etkileşime girdiği söylenebilmektedir.



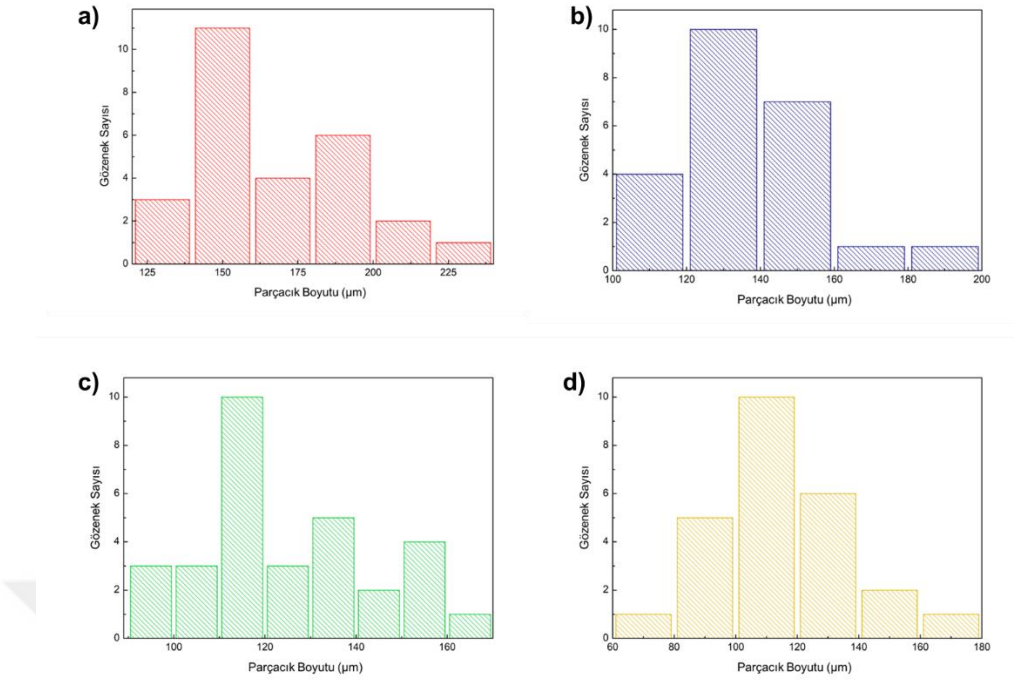
Şekil 4.4 Yumurta kabuğu içeren nişasta hidrojellerinin ve kontrol örneğinin 500x büyütmede elde edilen SEM görüntüleri a) ES/0, b) ES/2.5, c) ES/5, d) ES/10

Şekil 4.5'te kontrol numunesi ES/0 ve çeşitli oranlarda yumurta kabuğu içeren hidrojellerin SEM görüntüsü daha yüksek büyütmelerde verilmektedir. Şekil 4.5a'da görüldüğü üzere, yumurta kabuğu içermeyen hidrojelin gözenek duvarında yumurta kabuğu parçacıklarına rastlanmazken, Şekil 4.5b-d gösterilen ES/2.5, ES/5 ve ES/10 hidrojellerinde ise yumurta kabuğu parçacıkları gözeneklerin içerisinde net bir şekilde görülebilmektedir. En yüksek miktarda yumurta kabuğu içeren ES/10 numunesine ait Şekil 4.5d'de çok sayıda parçacığın gözenek duvarlarını kapladığı görülmektedir.



Şekil 4.5 Yumurta kabuğu parçacığı içeren nişasta örneklerinin ve kontrol örneğinin 3000x büyütmede elde edilen SEM görüntüleri a) ES/0, b) ES/2,5, c) ES/5, d) ES/10

Hidrojellerin gözenek boyutu dağılımları Şekil 4.6'da verilmiştir. Osteoblastların boyutları 10-50 µm aralığında olup 100 µm ve üzeri gözeneklere sahip doku iskeleleri hücre büyümesi ve çoğalması için daha çok tercih edilmektedir [94]. Bu bağlamda çalışma sonucunda elde edilen ES/0, ES/2,5, ES/5 ve ES/10 örneklerinin gözenek boyutları 100 µm üzerinde olması nedeniyle kemik doku iskeleleri için tercih edilen gözenek boyutlarındadır.



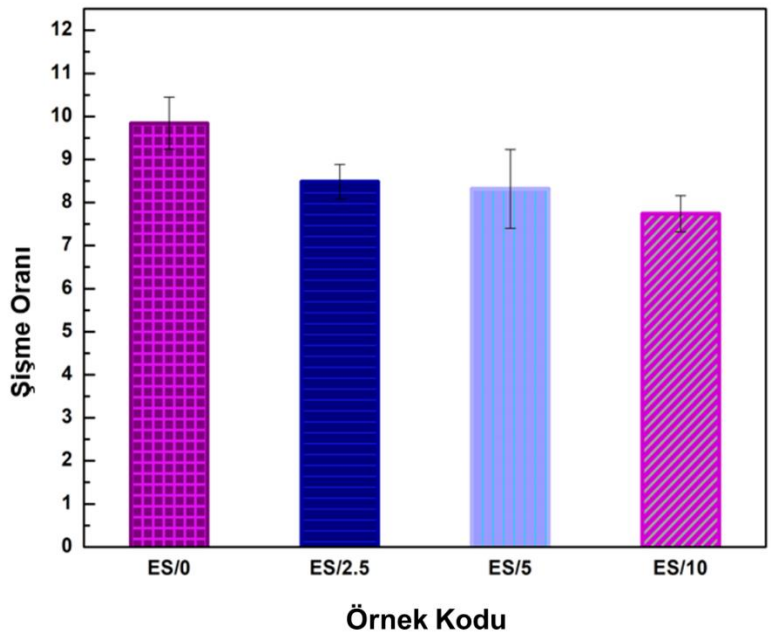
Şekil 4.6 Yumurta kabuğu parçacığı içeren nişasta örneklerinin ve kontrol örneğinin gözenek boyutu dağılımı grafiği a) ES/0, b) ES/2,5, c) ES/5, d) ES/10

Yumurta kabuğu ve hidroksiapatit ile desteklenmiş hidrojel çalışmaları incelendiğinde parçacıkların hidrojel gözenekliliğini etkilediği görülmektedir. Nişasta hidrojellerine yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle de gözenek boyutları küçülmektedir. Yumurta kabuğu parçacıklarının, buz kalıplama aşamasında buz kristallerinin oluşumunu etkilemesi nedeniyle gözenek boyutlarında değişikliğe neden olduğu söylenebilmektedir. Kemik doku iskelesine uygun boyut aralığında ölçülen gözenekler nedeniyle nişasta hidrojelleri doku iskelesi olarak kullanılabileceği söylenebilmektedir.

4.3 Denge Şişme Sonuçları

Hidrojellerin şişme özelliği, besin alışverişi ve hücre hareketi hakkında bilgi vermektedir. Şekil 4.7'de çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu içeren nişasta hidrojellerinin şişme oranları verilmiştir. Yumurta kabuğu parçacığı içermeyen ES/0 örneğinin 9,83±0,60 sonucuyla en yüksek şişme oranına sahip olduğu görülmektedir. %2,5 oranında parçacık içeren ES/2,5 örneğinin 8,48±0,39 sonucuyla daha az şişme eğiliminde olduğu söylenebilmektedir. %5 oranında parçacık içeren ES/5 örneğinin şişme oranı 8,31±0,91 olarak hesaplanmıştır. Son

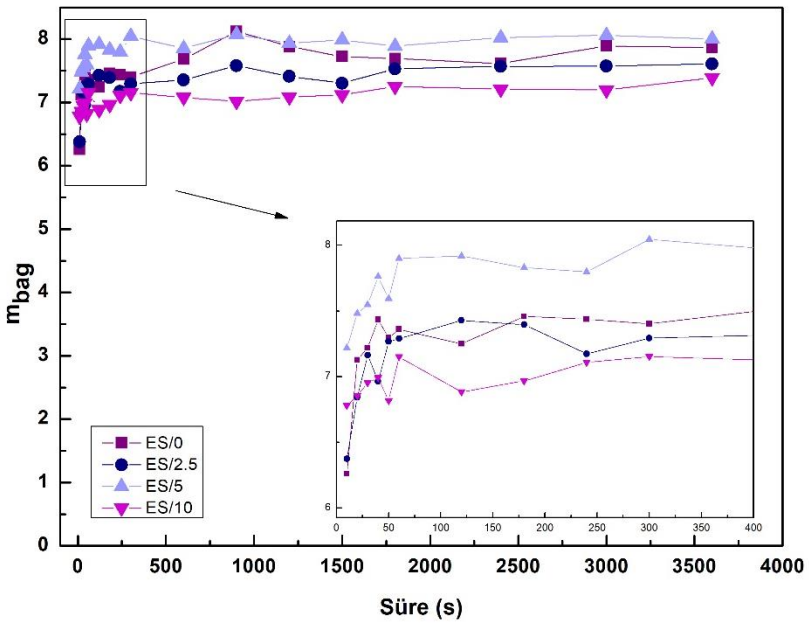
olarak %10 oranında parçacık içeren ES/10 örneğinin 7,74±0,41 sonucuyla en düşük şişme oranına sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesinin şişme oranını %21,26 oranına kadar düşürdüğü söylenebilmektedir. *t*-test ile istatiksel fark incelendiğinde ES/0 ve parçacık içeren gruplar incelendiğinde aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Parçacık içeren ES/2,5, ES/5 ve ES/10 arasındaki istatiksel fark incelendiğinde ise aralarında anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Literatürde, *Bazargan-Lari ve ark.* nanohidroksiapatit parçacıklarının kitosan/kolajen hidrojel biyokompozitine eklenmesiyle de şişme oranının azaldığı belirtmektedir [95]. Öte yandan, büyük gözeneklere sahip hidrojellerin daha fazla şiştiği bilinmektedir. Yumurta kabuğu içeren hidrojellerin gözenek boyutları, parçacık miktarının artmasıyla azalmaktadır. Küçük gözeneklerin varlığı hidrojel matrisine giren su miktarını azaltmakta, dolayısıyla şişme oranı da düşmektedir. Nişasta hidrojellerinin şişme sonuçları incelendiğinde parçacık eklenmesiyle şişme oranının azaldığı görülmektedir. Küçülen gözenekler daha sıkı bir polimer matriks yapısına neden olduğundan parçacık miktarının artmasıyla daha nişasta hidrojellerinin daha az şiştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.7 Hidrojellerin yumurta kabuğu miktarına göre değişen şişme oranları

4.4 Şişme Kinetiği Sonuçları

Şişme kinetiği, kuru durumdaki hidrojellerin distile su içerisinde zamana bağlı olarak şişme oranı ölçülerek Eşitlik 3.2'ye göre belirlenmiştir. Çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu içeren biyokompozitlerin ve kontrol grubunun zamana bağlı olarak şişme oranları Şekil 4.8'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde tüm örneklerin 1 dakika içerisinde şişme denge ağırlığına ulaştığı görülmektedir. Numunelerin hızlı bir şekilde dengeye gelme nedeni makro-gözenekli hidrojellerin birbirine bağlı gözenek yapılarına sahip olmasıdır. Birbirine bağlı gözenek yapıları, çözücünün hidrojel içerisine difüzyon yerine daha hızlı bir süreç olan konveksiyon ile girmesini sağlamaktadır [4].

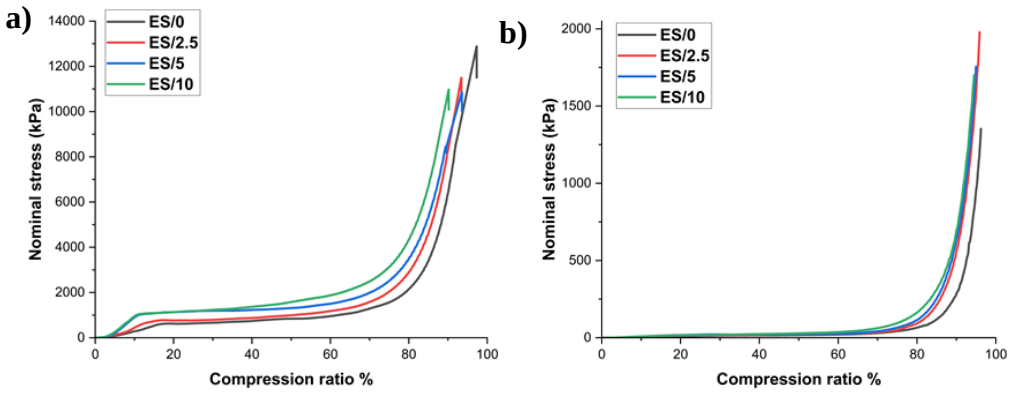


Şekil 4.8 Çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığı içeren hidrojel örneklerinin 1 dakika içerisinde hızlıca denge-şişme ağırlığına geldiğini gösteren şişme kinetiği grafiği

4.5 Mekanik Test Sonuçları

Yumurta kabuğu parçacıklı nişasta hidrojellerinin yumurta kabuğu parçacığı miktarına göre mekanik özelliklerinin belirlenmesi için basma testi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9'da hem kuru hidrojellerin gerilim-gerinim grafiği hem de şişmiş hidrojellerin gerilim-gerinim grafikleri bulunmaktadır. Hem kuru

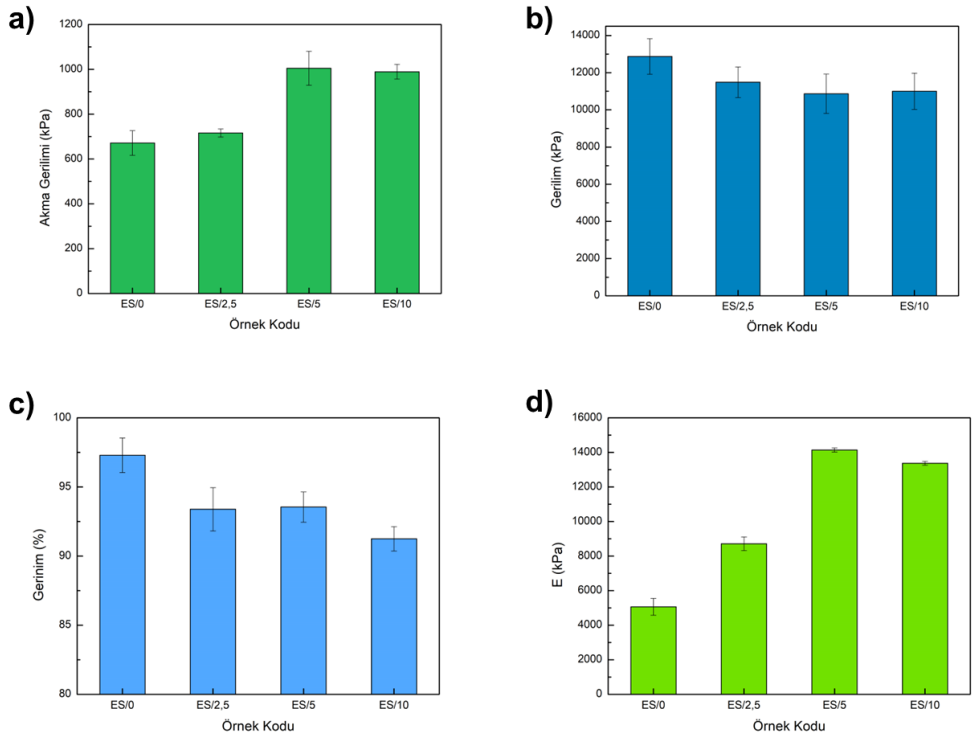
hem şişmiş halde olan tüm hidrojel örneklerinin %80'in üstünde sıkıştırılabildiği görülmektedir.



Şekil 4.9 a) Kuru hidrojel örneklerinin basma testi sonuçları, b) Şişmiş hidrojel örneklerinin basma testi sonuçları

Şekil 4.10'da örneklerin akma gerilimi, kırılma gerilimi, gerinimi ve Young modülü sonuçları bulunmaktadır. Kuru hidrojeller incelendiğinde %0 parçacık içerikli ES/0 örneğinin 12,88±0,96 MPa gerinime dayandığı %97,29±1,25'a kadar dağılmadan sıkıştırılabildiği gözlemlenmiştir. ES/0'ın akma gerilmesi 671,7±55,0 kPa olarak hesaplanmıştır. Young modülü ise 5,07±0,49 MPa olarak bulunmuştur. %2,5 parçacık içeren kuru ES/2.5 örneği ise 11,49±0,84 MPa gerinime dayanmış ve %93,39±1,57'a kadar dağılmadan sıkıştırılmıştır. Kuru ES/2.5 örneğinin akma gerilmesi 716±18 kPa olarak bulunmuştur. Örneğin Young modülü ise 8,72±0,40 MPa olarak hesaplanmıştır. %5 parçacık içeren kuru ES/5 örneği 10,87±1,06 MPa gerinim altında %93,55±1,09'a kadar dağılmadan sıkıştırılabilmiştir. Kuru ES/5 örneğinin akma gerilmesi 1005±76 kPa olarak hesaplanmıştır. Young modülü ise 14,14±0,12 MPa olarak bulunmuştur. %10 parçacık içeren kuru ES/10 örnekleri 11,00±0,98 MPa gerinim altında %91,25±0,88'e kadar dağılmadan sıkıştırılmıştır. Kuru ES/10 örneklerinin akma gerilimleri 989,3±32,7 kPa olarak bulunmuştur. Örneklerin Young modülü ise 13,37±0,11 MPa olarak hesaplanmıştır. Kuru örnekler birbirleri ile karşılaştırıldığında yumurta kabuğu miktarının artmasıyla Young modülünün ve akma geriliminin arttığı görülmektedir. Young modülünün artması sertliğin artması anlamına geldiğinden 14,14±0,12 MPa değeri ile kuru ES/5 örneğinin diğer kuru örneklere kıyasla daha sert olduğu sonucuna varılmıştır. Akma gerilimi değerinin artması, kuru örneklerde gözenek duvarının mekanik

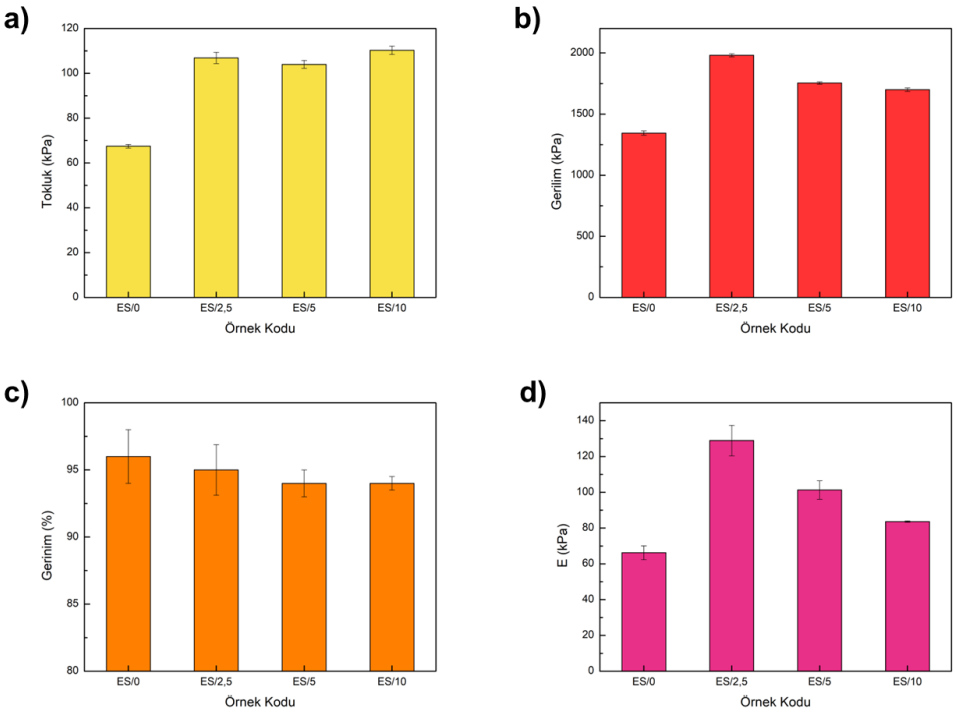
dayanımının artmasını ifade ettiğinden ES/5'nin 1005±76 kPa değeri ile en dayanıklı örnek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10 Yumurta kabuğu içeren kuru hidrojellerin a) akma gerilimi, b) kırılma gerilimi, c) kırılma gerinimi, d) Young modülü grafikleri

Şekil 4.11'de şişmiş hidrojellerin tokluk, kırılma gerilimi, gerinimi ve Young modülü sonuçları bulunmaktadır. Şişmiş hidrojellerin sonuçları incelendiğinde %0 oranında yumurta kabuğu parçacığı içeren ES/0 örneğinin 1345±17 kPa altında %96±2 oranında sıkıştırıldığı görülmektedir. Tokluk sonucuna göre 67,5±0,8 kPa'ya kadar parçalanmadan dayanabilmiştir. Young modülü 66,22±3,86 olarak hesaplanmıştır. %2,5 oranında parçacık içeren şişmiş ES/2.5 örneği 1981±12 kPa gerinim altında %95,00±1,88 oranında sıkıştırılmıştır. Tokluk sonucuna göre 106,9±2,6 kPa'ya kadar parçalanmadan dayanabilmiştir. Young modülü ise 128,93±8,50 olarak bulunmuştur. %5 oranında parçacık içeren şişmiş ES/5 örneği 1754,0±9,5 kPa gerinim altında %94±1 oranında sıkıştırılabilmiştir. Tokluk sonucu 104,0±1,8 kPa'ya kadar dağılmadan dayanabildiğini göstermektedir. Young modülü ise 101,30±5,17 olarak hesaplanmıştır. %10 oranında parçacık içeren şişmiş ES/10 örneğinin 1700±14 kPa gerinim altında %94±0,5 oranında sıkıştırılabildiği görülmektedir. Tokluk sonucu 110,3±1,9 kPa'ya kadar

parçalanmadan kalabildiğini göstermektedir. Young modülü ise 83,59±0,42 olarak bulunmuştur. Şişmiş hidrojellerin sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle Young modülü ve tokluklarının arttığı görülmektedir. Aynı zamanda, yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle daha yüksek gerinime dayandıkları sonucuna varılmaktadır.



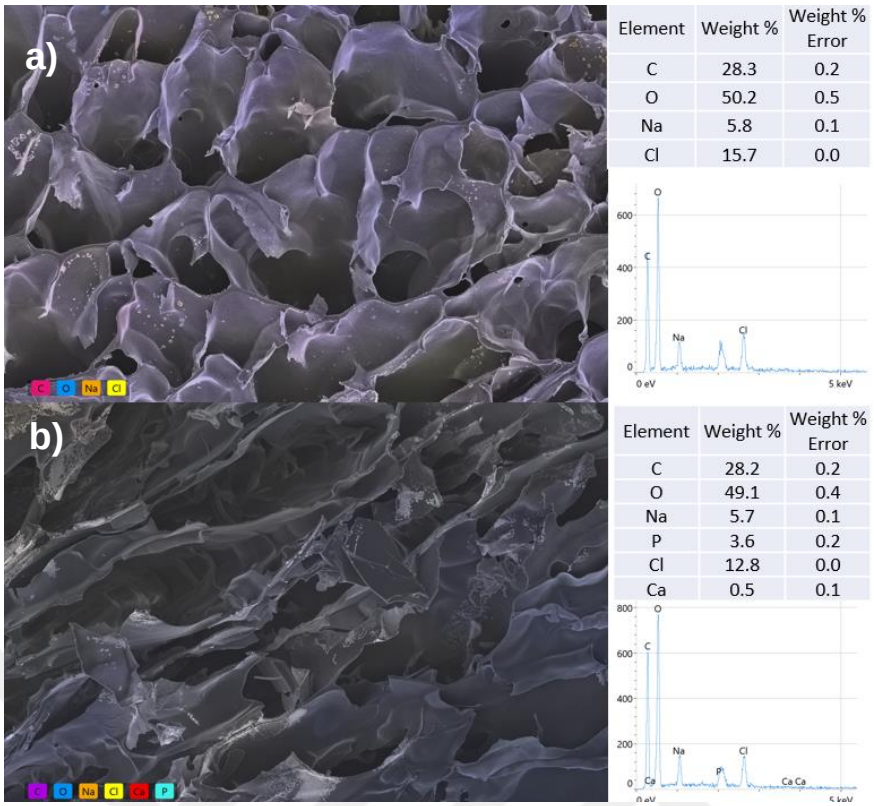
Şekil 4.11 Yumurta kabuğu içeren şişmiş hidrojellerin a) tokluk, b) kırılma gerilimi, c) kırılma gerinimi, d) Young modülü grafikleri

Yumurta kabuğu parçacıkları hidrojel matrisine eklenerek mekanik özelliklerinin arttırılması amaçlanmaktadır. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada kemik doku iskelesi olarak kullanımak üzere üretilen yumurta kabuğu parçacığı içeren GelMA hidrojellerinin, parçacık miktarının artmasıyla mekanik dayanımın arttığını belirtilmiştir [13]. Diğer bir çalışmada GelMA/CSMA/HyMA biyokompozitine yumurta kabuğu parçacıkları entegre edilmiş, mekanik dayanımının parçacık miktarının artmasıyla yükseldiği açıklanmıştır [14]. Aynı şekilde bir başka çalışmada kitosan/aljinat biyokompozitinin yumurta kabuğu parçacığı eklenmesiyle basınç modülünün arttığı gözlemlenmektedir [15]. Literatürdeki örnekler de incelendiğinde yumurta kabuğu parçacıkları hidrojel matrisine eklendiğinde mekanik dayanımın arttığı görülmektedir. Yani literatürdeki bu çalışmalarla birlikte sonuçlarımız ele alındığında, yumurta kabuğu parçacıkları

içeren nişasta hidrojellerine bakıldığında benzer şekilde parçacık eklenmesiyle Young modülünün arttığı ve deformasyona daha dirençli olduğu gözlemlenmiştir. ES/5 örneğinin, yumurta kabuğu içermeyen ES/0 örneğine kıyasla yaklaşık üç kat daha yüksek Young modülüne sahip olduğu görülmüştür. Böylece, mekanik testler sonucunda yumurta kabuğu parçacıklarının hidrojellerde mekanik dayanım arttırıcı bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Kemik doku iskelelerinde dayanıklı hidrojellerin kullanılması, osteoblastların çoğalması ve farklılaşabilmesi için önem taşımaktadır. Bu nedenle örnekler arasından kemik doku iskelesi için en uygun mekanik özelliğe sahip numune olarak ES/5 belirlenmiştir.

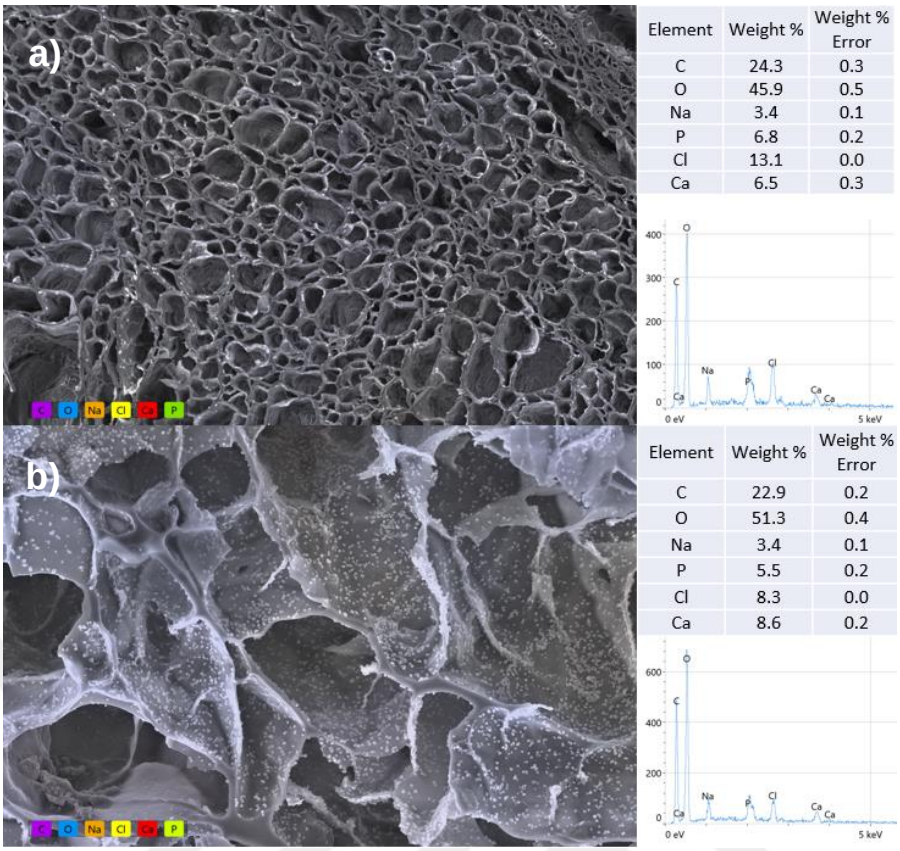
4.6 Biyomineralizasyon Testi Sonuçları

Nişasta hidrojellerinin biyoetkinliğini incelemek amacıyla biyomineralizasyon testi gerçekleştirilmiştir. Nişasta hidrojelleri 28 gün boyunca 37°C'de SVS içerisinde bekletilmiştir. %0 oranında parçacık içeren ES/0 ve %2,5 oranında parçacık içeren ES/2.5 örneklerinin SEM-EDX sonuçları Şekil 4.12'de verilmiştir. Şekil 4.12a'da görülen yumurta kabuğu parçacığı içermeyen ES/0 örneğinde kalsiyum ve fosfat varlığı görülmemektedir. Ancak, SVS içerisinde bekletilmesi nedeniyle NaCl birikimi görülmektedir. Şekil 4.12b'de görülen %2,5 oranında yumurta kabuğu parçacığı içeren ES/2.5 örneğinde ise ağırlıkça %0,5±0,1 oranında kalsiyum ve %3,6±0,2 oranında fosfat birikimi olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.12 Nişasta hidrojellerinin SEM-EDX analizi sonucu sonrası C, O, Na, Cl, Ca, P ağırlıkça yüzdeleri a) ES/0, b) ES/2,5

%5 oranında parçacık içeren ES/5 ve %10 oranında parçacık içeren ES/10 örneklerinin SEM-EDX sonuçları ise Şekil 4.12'de verilmiştir. Şekil 4.13a'da görülen %5 oranında parçacık içeren ES/5 örneğinde ağırlıkça %6,5±0,3 kalsiyum ve %6,8±0,2 fosfat birikimi görülmektedir. Şekil 4.13b'de görülen %10 oranında parçacık içeren ES/10 örneğinde ise %8,6±0,2 kalsiyum ve %5,5±0,2 fosfat birikimi görülmektedir. Yumurta kabuğu parçacığı miktarının artmasıyla biriken kalsiyum ve fosfatın arttığı söylenebilmektedir.



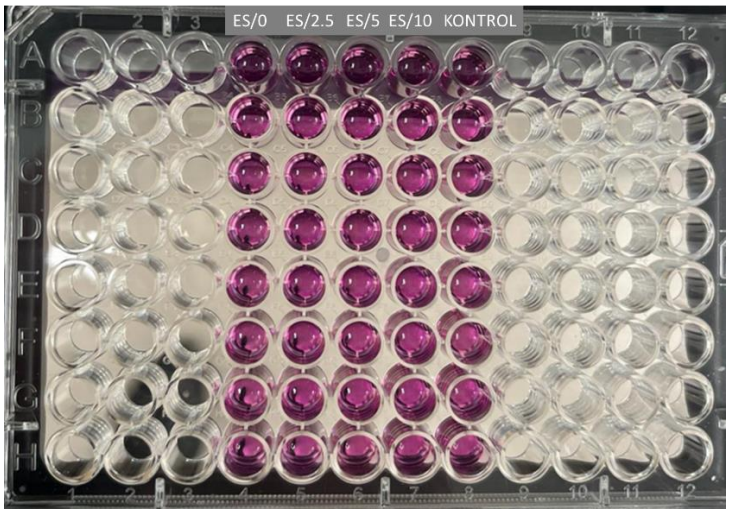
Şekil 4.13 Nişasta hidrojellerinin SEM-EDX analizi sonucu sonrası C, O, Na, Cl, Ca, P ağırlıkça yüzdeleri a) ES/5, b) ES/10

Literatürde bir çalışmada, yumurta kabuğundan elde edilen CaO parçacıklarının PCL-nişasta karışımına eklenerek elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen doku iskelelerinin SEM-EDX analizi incelenmiştir. CaO parçacıklarının varlığının, elde edilen doku iskelesi üzerinde mineralizasyon gerçekleşmesini sağladığı açıklanmaktadır [97]. Başka bir çalışmada ise MgO ile kaplı yumurta kabuğu parçacıklarının kitosan hidrojeline entegre edilmesiyle çiçek şeklinde mikrokürelerin apatit tabakası oluşturduğu açıklanmaktadır [87]. Yapılan çalışmalarda yumurta kabuğu parçacıklarının ve kalsiyumun biyomineralizasyonda etkili olduğu açıklanmaktadır [87, 97]. ES/0, ES/2,5, ES/5 ve ES/10 örnekleri incelendiğinde de literatür ile uyumlu olarak yumurta kabuğu miktarının artmasıyla kalsiyum ve fosfat miktarının arttığı, yumurta kabuğu içermeyen hidrojellerde ise birikim olmadığı görülmektedir. Yumurta kabuğu parçacıklarının mineralizasyonu sağladığı sonucuna varılabilmektedir.

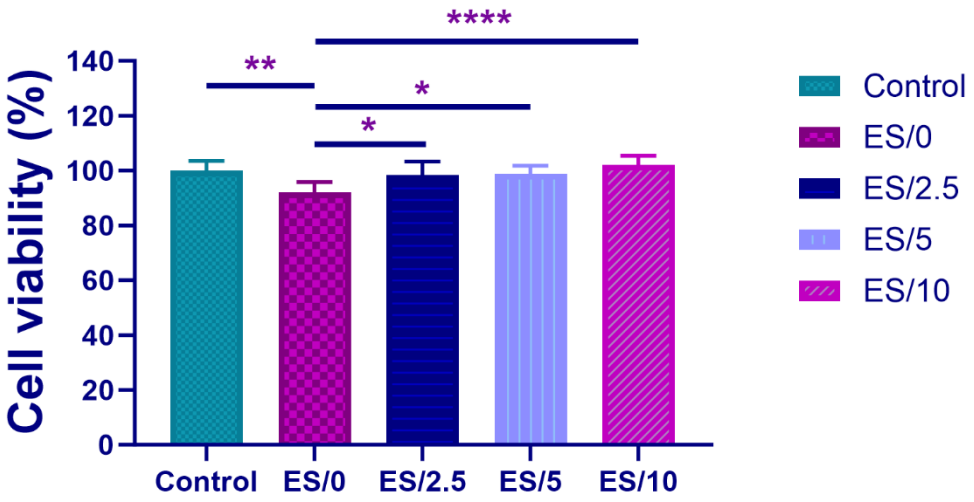
4.7 Hücre Canlılığı Testi Sonuçları

Biyouyumluluk, doku iskelelerinde olması gereken en önemli özelliklerdendir. Kullanılacak olan polimerin ve ajanın hücreler üzerinde sitotoksik etki bırakmaması gerekmektedir. Şekil 4.14'te MTT testi sonucunda oluşan formazan kristallerinin görüntüleri bulunmaktadır. Şekil 4.15'te hidrojel örnekleri için gerçekleştirilen MTT testi sonuçları gösterilmektedir. Grafiğin x ekseninde kontrol grubu, ES/0, ES/2,5, ES/5 ve ES/10'un adlandırılması yer almaktadır. Grafiğin y ekseninde ise elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri gösterilmektedir. Parçacık içermeyen ES/0 örneğinin %91,97±3,89 hücre canlılığına sahip olduğu görülmektedir. %2,5 oranında parçacık içeren ES/2,5 örneği ise %98,43±4,81 hücre canlılığına sahiptir. %5 oranında parçacık içeren ES/5 örneği %98,70±3,03 hücre canlılığına sahip olduğu hesaplanmıştır. %10 oranında parçacık içeren ES/10 örneği %101,99±3,46 hücre canlılığına sahiptir. Kontrol grubunun hücre canlılığına bakıldığında %100,00±3,54 olduğu görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde yumurta kabuğu parçacığı içeren örneklerin, parçacık içermeyen örneğe kıyasla daha yüksek hücre canlılığına sahip olduğu görülmektedir.

One-way Anova testi kullanılarak elde edilen sonuçların p değerleri $p<0,5$ (*) anlamlı, $p<0,01$ (**) oldukça anlamlı, $p<0,001$ (***) çok anlamlı ve $p<0,0001$ (****) son derece anlamlı kabul edilmektedir [13]. Bu bağlamda yapılan çalışmada ES/0 ile ES/2,5 örneği arasındaki istatiksel anlamlılık incelendiğinde $p=0,0145$ ($p<0,05$) olarak hesaplanmıştır. Hidrojele parçacıkların eklenmesiyle canlılığın arttığı söylenebilmektedir. ES/0 ile ES/5 arasındaki istatiksel anlamlılık $p=0,0137$ ($p<0,05$) olarak bulunmuştur. Son olarak ES/0 ve ES/10 arasındaki istatiksel anlamlılık $p<0,0001$ olarak bulunup, %10 oranında yumurta kabuğu parçacığı ilavesinin kontrole kıyasla canlılığı arttırdığı söylenebilmektedir.



Şekil 4.14 MTT sonucunda %0, %2,5, %5, %10 ve kontrol grubunun oluşan görüntüleri



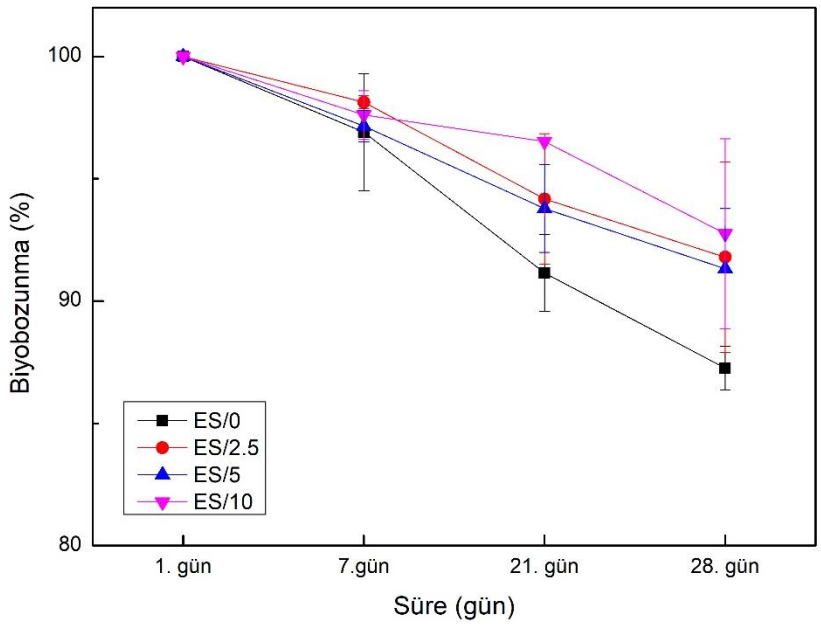
Şekil 4.15 Yapılan MTT testi sonucunda kontrol grubu, %0, %2,5, %5 ve %10 oranında parçacık içeren hidrojellerin hücre canlılığı yüzdesi

Literatürde bulunan benzer bir çalışmada yumurta kabuğu parçacıkları içeren GelMA hidrojellerinde parçacık miktarının artmasıyla hücre canlılığının yüksek oranda arttığı görülmektedir [13]. Yumurta kabuğunun varlığının osteoblast hücrelerinin tutunması ve çoğalması için uygun bir ortam sağladığı açıklanmaktadır. Yumurta kabuklarının ana bileşeni $CaCO_3$ olduğundan sağladığı kalsiyum iyonlarının osteoblastlar için biyomimetik bir ortam oluşturduğu söylenmektedir. Benzer şekilde yumurta kabuğu parçacığı içeren GelMA/CSMA/HyMA hidrojellerinde de parçacık eklenmesiyle hücre canlılığının

arttığı belirtilmektedir [14]. Yumurta kabuğu miktarı arttırıldığında herhangi bir toksik etkinin olmadığı görülmektedir. ES/2,5, ES/5 ve ES/10 örneklerinin hücre canlılığı incelendiğinde aynı şekilde yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle ES/0 grubuna kıyasla hücre canlılığının arttığı görülmektedir. Kalsiyum iyonu kemik hücre çoğalması ve farklılaşmasında büyük rol oynadığından, nişasta hidrojellerinden salınan kalsiyum iyonlarının osteoblastlar için biyomimetik bir ortam sağladığı söylenebilmektedir. Nişasta hidrojelleri incelendiğinde parçacık içeren grup, parçacık içermeyen gruba kıyasla yaklaşık %10,90±0,59 daha fazla hücre canlılığı sağlamaktadır.

4.8 Biyobozunma Testi Sonuçları

Doku tedavisinin başarıyla gerçekleşebilmesi için hidrojel doku iskelelerinin, hücrelerin çoğalmasıyla doğru orantılı olarak bozunması gerekmektedir. Nişasta doku iskeleleri 28 gün boyunca PBS içerisinde inkübe edilmiş, bozunma oranı belirlenmiştir. Şekil 4.16'da görülen grafikte %0, %2,5, %5 ve %10 oranında yumurta kabuğu parçacığı içeren hidrojel örneklerinin 7, 21 ve 28. günlerde ölçülen ağırlıkları ile Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanan biyobozunma yüzdeleri verilmiştir. Tüm örneklerde biyobozunma gerçekleştiği görülmüştür. ES/0 grubunun 7. gününde %3,09±2,39 sonucu elde edilmiştir. 21. güne bakıldığında %8,85±1,57 oranında bozunma gerçekleştiği hesaplanmıştır. 28. güne bakıldığında %12,24±0,89 sonucu bulunmuştur. ES/2.5 grubunda 7. günde %1,87±0,26 oranında bir bozunma görülmüştür. 21. günde ise %5,82±2,66 oranı elde edilmiştir. 28. günde ise %8,20±3,89 sonucu elde edilmiştir. ES/5 grubunda ise 7. günde %2,85±0,63; 21. günde %6,21±1,80 oranında bozunma yüzdeleri elde edilmiştir. 28. güne gelindiğinde %8,67±2,45 sonucu elde edilmiştir. Son olarak ES/10 grubunun 7. gününde %2,39±0,98 bozunma, 21. gününde %3,47±0,03 ve 28. günde %7,25±3,88 olarak biyobozunma yüzdeleri hesaplanmıştır. Yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle bozunma oranının düştüğü anlaşılmıştır.



Şekil 4.16 Çeşitli miktarlarda yumurta kabuğu parçacığı içeren hidrojel örneklerinin 7, 21 ve 28. günlerde ölçülen biyobozunma yüzdeleri

Literatürde benzer sonuçlara sahip yumurta kabuğu içeren GelMA hidrojelleri incelendiğinde yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle bozunma oranının azaldığı görülmektedir [13]. Parçacıkların hidrojel ile etkileşimlerinin polimer matrisini bir arada tuttuğu açıklanmaktadır. Aynı şekilde başka bir çalışmada ES ve NTES içeren kitosan/aljinat hidrojellerinde parçacık eklenmesiyle biyobozunma oranı düşmektedir [15]. Doku iskelesinin bütünlüğünü korumasının nedeni parçacıkların hidrojel zincirleri ile kimyasal bağlar yapması olarak açıklanmaktadır. ES/0, ES/2.5, ES/5 ve ES/10 örnekleri incelendiğinde de parçacık miktarının artmasıyla bozunma oranının düştüğü görülmektedir. Parçacıkların hidrojel zincirleriyle etkileşimlerinin bunu sağladığı sonucuna varılabilmektedir. Doku iskelesi olarak kullanılacak hidrojelin hücre çoğalması ve dokunun oluşması süresi ile uygun olarak bozunması gerekmektedir. Bu nedenle hidrojellerin belirli bir süre boyunca bütünlüğünü koruması gerekmektedir. Yumurta kabuğu parçacıklarının nişasta hidrojeline eklenmesiyle bozunma testi sonunda kalan biyokompozit kütlesi %4,99±3,98 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle hidrojel bütünlüğünün desteklendiği ortaya çıkmaktadır.

5. Genel Sonuçlar

Bu tez kapsamında elde edilen yumurta kabuğu parçacığı yüklü biyokompozit nişasta hidrojellerinin kemik doku iskelesi olarak potansiyelleri çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulardan aşağıdaki genel sonuçlara ulaşılmıştır:

- Nişasta hidrojeli; PEGDE çapraz bağlayıcısı kullanılarak buz kalıplama ve sonradan çapraz bağlanma yöntemi ile sentezlenmiştir. Yapılan FTIR analizi sonucunda, nişastada 3310 cm^{-1}'de pik veren -OH gruplarının, nişasta PEGDE ile çapraz bağlanması ardından verdiği pik azalmıştır. Çapraz bağlanmanın PEGDE ve hidroksil grupları arasında başarıyla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
- SEM görüntüleri incelendiğinde yumurta kabuğu parçacığı eklenmesiyle gözenek boyutlarının 1/3 oranında küçülerek 168,37±25,45 µm'den 117,62±24,52 µm boyutlarına indiği görülmüştür. Tüm hidrojel örneklerinin gözenek boyutları 100 µm üstünde olduğundan kemik doku mühendisliğinde kullanıma uygundur.
- Şişme testleri sonucunda parçacık miktarının artmasıyla ağırlıkça şişme oranının %21,26 düştüğü görülmüştür. Parçacık miktarının artmasıyla gözenek boyutlarının da küçülmesi nedeniyle şişme oranı gözenek boyutlarıyla uyumludur.
- Şişme kinetiği sonuçları incelendiğinde hidrojellerin makrogözenekli yapısı sayesinde örneklerin 1 dakika içerisinde şişme dengesine geldiği görülmüştür.
- Nişasta hidrojellerinin mekanik testleri sonucunda yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle Young modülünün yaklaşık üç kat artarak 14,14±0,12 MPa'ya ulaştığı görülmüştür. Yumurta kabuğu parçacıklarının mekanik dayanımı arttırdığı anlaşılmıştır.
- Mineral birikiminin incelenmesi amacıyla yapılan biyomineralizasyon testi sonucunda yumurta kabuğu parçacıkları eklenmesiyle maksimum %8,6±0,2 kalsiyum ve %5,5±0,2 fosfat birikimi elde edilmiştir. Yumurta kabuğu parçacıklarının eklenmesiyle biyomineralizasyonun sağlandığı ve yumurta kabuğu parçacığı miktarının artmasıyla biriken kalsiyum ve fosfatın arttığı görülmüştür.

- Osteoblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda parçacık içeren grupta, parçacık içermeyen gruba kıyasla %10,90±0,59 daha yüksek hücre canlılığı sonucu elde edilmiştir. Yumurta kabuğu parçacıklarının sağladığı kalsiyum iyonu sayesinde hücre canlılığının arttığı ve hidrojellerin osteoblastlar üzerinde sitotoksik etki göstermediği görülmüştür.
- Nişasta hidrojellerinin 28 günlük biyobozunma testi sonucunda parçacık içeren grubun ağırlıkça maksimum %4,99±3,98 daha fazla olduğu ve parçacık içermeyen gruba kıyasla bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir.
- %5 oranında yumurta kabuğu parçacığı içeren ES/5 numunesinin gözenek boyutları 124,52±18,99 μm olup kemik doku mühendisliği için uygun aralıktadır. 14140±119 kPa sonucu ile en yüksek Young modülüne sahip olduğundan yüksek derecede dayanıklılık göstermiştir. Osteoblastlar üzerinde sağladığı hücre canlılığı %98,70±3,03 olduğundan sitotoksik bir etkisi bulunmamaktadır. 28 günlük biyobozunma analizi sonunda %91,32 oranında ağırlığını koruyabilmiştir. Dolayısıyla, tüm örnekler karşılaştırıldığında gözenek boyutu, mekanik özellikler, hücre canlılığı ve biyobozunma özellikleri açısından kemik doku mühendisliği için en uygun hidrojel numunesinin ES/5 olduğu sonucuna varılmıştır.

Buz kalıplama/sonradan çapraz bağlanma yöntemi ile üretilen nişasta hidrojellerinin geleneksel yöntemlerle elde edilen yumurta kabuğu içerikli hidrojellerden daha yüksek mekanik dayanıma sahip olduğu görülmüştür. Nişasta hidrojeline eklenen yumurta kabuğu parçacıkları dayanımı arttırmakta ve salınan kalsiyum iyonları nedeniyle kemik hücre çoğalmasını destekleyici özellik göstermektedir. Yumurta kabuklarının osteoindüktif bir ajan olarak kullanılabileceği ve nişasta matriksine entegre edilerek doku iskelesi olarak kullanılabileceği çalışma sonucunda gösterilmiştir. Gözeneklilik, yüksek mekanik dayanım ve osteoindüktif aktivitesi nedeniyle yumurta kabuğu parçacığı yüklü nişasta hidrojellerinin kemik doku mühendisliği alanında kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.

İlerleyen çalışmalarda XRD analizi gerçekleştirilerek hidrojellerin kristalinite özellikleri elde edilerek daha detaylı karakterizasyonları sağlanabilecektir. DAPI-ACTIN boyaması yapılarak hücrelerin doku iskelesi üzerinde hareketi ve hücresel

etkinliği incelenebilecektir. Aynı zamanda ALP enzim aktivitesi incelenerek hidrojellerin osteoblast hücrelerinin farklılaşma özellikleri üzerindeki etkisi de belirlenebilecektir.

KAYNAKÇA

[1] G.L. Koons, M. Diba, A.G. Mikos, Materials design for bone-tissue engineering, Nature Reviews Mater, cilt 5, s. 584–603, 2020.

[2] J.L. Brown, C.T. Laurencin, Bone Tissue Engineering, Biomaterials Science (Fourth Edition), Academic Press, s. 1373-1388, 2020.

[3] S. Tajvar, A. Hadjizadeh, S.S. Samandari, Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview, International Biodeterior & Biodegradation, cilt 180, s. 105599, 2023.

[4] B. Akin, B. Akgul, S. Tasdurmazli, E.S. Abamor, T. Ozbek, B. Ozcelik, E. Su, M.M. Ozmen, Tannic Acid Incorporated Antibacterial Polyethylene Glycol Based Hydrogel Sponges for Management of Wound Infections, Macromol Bioscience, s. 2400101, 2024.

[5] X. Wu, K. Walsh, B.L. Hoff, G. Camci-Unal, Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering, Bioengineering, cilt 7(4), s. 132, 2020.

[6] M. Qamruzzaman, F. Ahmed, M.I.H. Mondal, An Overview on Starch-Based Sustainable Hydrogels: Potential Applications and Aspects, Journal of Polymers and the Environment, 2021.

[7] P. Saracoglu, S. Dokuz, T. Ozbek, M. Topuzogullari, M.M. Ozmen, Starch nanogels as promising drug nanocarriers in the management of oral bacterial infections, Journal Drug Delivery Science and Technology, cilt 88, s. 104973, 2023.

[8] J. Wang, H. Sun, J. Li, D. Dong, Y. Zhang, F. Yao, Ionic starch-based hydrogels for the prevention of nonspecific protein adsorption, Carbohydrate Polymers, cilt 117, s. 384-391, 2015.

[9] T. Sen, B. Ozcelik, G.G. Qiao, M.M. Ozmen, Hierarchical porous hybrid chitosan scaffolds with tailorable mechanical properties, Materials Letters, cilt 209, s. 528-531, 2017.

[10] S. Mahdavi, A. Amirsadeghi, A. Jafari, S.V. Niknezhad, S. A. Bencherif, Avian Egg: A Multifaceted Biomaterial for Tissue Engineering, Industrial & Engineering Chemistry Research, cilt 60(48), s. 17348-17364, 2021.

[11] G. De Angelis, L. Medeghini, A.M. Conte, S. Mignardi, Recycling of eggshell waste into low-cost adsorbent for Ni removal from wastewater, Journal Clean Production, cilt 164, s. 1497-1506, 2017.

[12] R. D. Anugrah et al, The effect of eggshell organic fertilizer on vegetative growth of cayenne pepper, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, cilt 755, s. 012001, 2021.

[13] X. Wu, S. Stroll, D. Lantigua, S. Suvarnapathaki, G. Camci-Unal, Eggshell Particle-Reinforced Hydrogels for Bone Tissue Engineering: An Orthogonal Approach, Biomaterials Science, 2019.

[14] Y.E. Erarslan, A. Kızılkurtlu, M. Topal, A. Akpek, A.B. Öztürk, Eggshell integrated GelMA/CSMA/HyMA hybrid hydrogels for cell therapy/tissue engineering, Journal of Applied Polymer Science, cilt 140, s. 54310, 2023.

[15] N.D. Calvert, S. Proulx, A. Rodriguez-Navarro, T. Ahmed, Eric A. Lehoux, Maxwell T. Hincke, I. Catelas, Development of hydrogel-based composite scaffolds containing eggshell particles for bone regeneration applications, Journal of Biomedical Materials Research, cilt 112(1), s. e35296, 2024.

[16] R. Florencio-Silva, G.R. da Silva Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, BioMed Research International, cilt 2015, s. 421746, 2015.

[17] F.F. Safadi, M.F. Barbe, S.M. Abdelmagid, M.C. Rico, R.A. Aswad, J. Litvin, S.N. Popoff, Bone Structure, Development and Bone Biology, Bone Pathology, s. 1-50, 2009.

[18] R.K. Fuchs, W.R. Thompson, S.J. Warden, Bone biology, Bone Repair Biomaterials (Second Edition), s. 15-52, 2019.

[19] J. Scheinpflug, M. Pfeiffenberger, A. Damerau, F. Schwarz, M. Textor, A. Lang, F. Schulze, Journey into Bone Models: A Review, Genes, cilt 9(5), s. 247, 2018.

[20] D.W. Buck 2nd, G.A. Dumanian, Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals, Plastic Reconstructive Surgery, cilt 129(6), s. 1314-1320, 2012.

[21] A. Del Fattore, A. Teti, N. Rucci, Bone cells and the mechanisms of bone remodelling, Frontiers Bioscience-Elite, cilt 4(6), s. 2302-21, 2012.

[22] B.M. Manzini, L.M.R. Machado, P.Y. Noritomi, J. Vicente, L.d. Silva Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review, Journal of Bioscience, cilt 46, s. 17, 2021.

[23] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges, Critical Reviews in Biomedical Engineering, cilt 40(5), s. 363-408, 2012.

[24] R. Davis, A. Singh, M.J. Jackson, R.T. Coelho, D. Prakash, C.P. Charalambous, W. Ahmed, L.R.R. da Silva, A.A. Lawrence, A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing, The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, cilt 120(3-4), s. 1473-1530, 2022.

[25] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, Materials Science Engineering C, cilt 78, s. 1246-1262, 2017.

[26] H. Jodati, B. Yılmaz, Z. Evis, A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features, Ceramics International, cilt 46(10), s. 15725-15739, 2020.

[27] J. Liu, L. Yang, K. Liu, F. Gao, Hydrogel scaffolds in bone regeneration: Their promising roles in angiogenesis, Frontiers in Pharmacology, cilt 14, 2023

[28] K.K. Papachroni, D.N. Karatzas, K.A. Papavassiliou, E.K. Basdra, A.G. Papavassiliou, Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease, Trends in Molecular Medicine, cilt 15(5), s. 208-216, 2009.

[29] C. Zhao, W. Liu, M. Zhu, C. Wu, Y. Zhu, Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review, Bioactive Materials, cilt 18, s. 383-398, 2022.

[30] M. Bas, S. Daglilar, N. Kuskonmaz, C. Kalkandelen, G. Erdemir, S.E. Kuruca, D. Tulyaganov, T. Yoshioka, O. Gunduz, D. Ficai et al., Mechanical and Biocompatibility Properties of Calcium Phosphate Bioceramics Derived from Salmon Fish Bone Wastes, International Journal Molecular Sciences, cilt 21(21), s. 8082, 2020.

[31] C. Gao, S. Peng, P. Feng, C. Shuai, Bone biomaterials and interactions with stem cells, Bone Research, cilt 5, s. 17059, 2017.

[32] El-Ghannam, P. Ducheyne, Bioactive Ceramics, Comprehensive Biomaterials II, Editor(s): Paul Ducheyne, Elsevier, cilt 1.9, s. 204-234, 2017.

[33] M.S. Kamath, S.S. Ahmed, M. Dhanasekaran, S.W. Santosh, Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering, International Journal of Nanomedicine, cilt 9, s. 183-195, 2013.

[34] F. Sharifi, S.M. Atyabi, D. Norouzian, M. Zandi, S. Irani, H. Bakhshi, Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone

tissue engineering application, International Journal Biological Macromolecules, cilt 115, s. 243-248, 2018.

[35] F.D. Al-Shalawi, M.A. Azmah Hanim, M.K.A. Ariffin, C.L. Seng Kim, D. Brabazon, R. Calin, M.O. Al-Osaimi, Biodegradable synthetic polymer in orthopaedic application: A review, Materials Today: Proceedings, cilt 74, Parça 3, s. 540-546, 2023.

[36] A. Zimina, F. Senatov, R. Choudhary, E. Kolesnikov, N. Anisimova, M. Kiselevskiy, P. Orlova, N. Strukova, M. Generalova, V. Manskikh, A. Gromov, A. Karyagina, Biocompatibility and Physico-Chemical Properties of Highly Porous PLA/HA Scaffolds for Bone Reconstruction, Polymers, cilt 12(12), s. 2938, 2020.

[37] M.A. Osman, N. Virgilio, M. Rouabhia, F. Mighri, Development and Characterization of Functional Polylactic Acid/Chitosan Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Polymers, cilt 14(23), s. 5079, 2022.

[38] F. Chen, J. Han, Z. Guo, C. Mu, C. Yu, Z. Ji, L. Sun, Y. Wang, J. Wang, Antibacterial 3D-Printed Silver Nanoparticle/Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Materials, cilt 16(11), s. 3895, 2023.

[39] J. Wei, Y. Yan, J. Gao, Y. Li, R. Wang, J. Wang, Q. Zou, Y. Zuo, M. Zhu, J. Li, 3D-printed hydroxyapatite microspheres reinforced PLGA scaffolds for bone regeneration, Biomaterials Advences, cilt 133, s. 112618, 2022.

[40] K. Sri, C. Arthi, N.R. Neya, G.S. Hikku, Biomedical. Materials, cilt 18, s. 032002, 2023.

[41] L. Guo, Z. Liang, L. Yang, W. Du, T. Yu, H. Tang, C. Li, H. Qiu, The role of natural polymers in bone tissue engineering, Journal of Controlled Release, cilt 338, s. 571-582, 2021.

[42] Z. Jing, Y. Wu, W. Su, M. Tian, W. Jiang, L. Cao, Z. Zhao, Carbon Nanotube Reinforced Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds Improve Bone Tissue Formation In Vitro and In Vivo, Annals of Biomedical Engineering, cilt 45(9), s. 2075-2087, 2017.

[43] D. Liu, M. Nikoo, G. Boran, P. Zhou, J.M. Regenstein, Collagen and Gelatin, Annual Review of Food Science and Technology, cilt 6(1), s. 527-557, 2015.

[44] I. Lukin, I. Erezuma, L. Maeso, J. Zarate, M.F. Desimone, T.H. Al-Tel, A. Dolatshahi-Pirouz, G. Orive, Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, Pharmaceutics, cilt 14(6), s. 1177, 2022.

[45] A. Georgopoulou, F. Papadogiannis, A. Batsali, J. Marakis, K. Alpantaki, A.G. Eliopoulos, M. Chatzinikolaidou, Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, cilt 29(5), 2018.

[46] P. Zhai, X. Peng, B. Li, Y. Liu, H. Sun, X. Li, The application of hyaluronic acid in bone regeneration, International Journal of Biological Macromolecules, cilt 151, s. 1224-1239, 2020.

[47] P. Makvandi, G.W. Ali, F. Della Sala, W.I. Abdel-Fattah, A. Borzacchiello, Hyaluronic acid/corn silk extract based injectable nanocomposite: A biomimetic antibacterial scaffold for bone tissue regeneration, Materials Science Engineering: C, cilt 107, s. 110195, 2020.

[48] T. Sukpaita, S. Chirachanchai, A. Pimkhaokham, R.S. Ampornaramveth, Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration, Marine Drugs, cilt 19(10), s. 551, 2021.

[49] S. Saravanan, S. Vimalraj, D. Anuradha, Chitosan based thermoresponsive hydrogel containing graphene oxide for bone tissue repair, Biomedicine & Pharmacotherapy, cilt 107, s. 908-917, 2018.

[50] C. Ocando, S. Dinescu, I. Samoila, C.D. Ghitulica, A. Cucuruz, M. Costache, L. Averous, Fabrication and properties of alginate-hydroxyapatite biocomposites as efficient biomaterials for bone regeneration, European Polymer Journal, cilt 151, s. 110444, 2021.

[51] Y.I. Cornejo-Ramírez, O. Martínez-Cruz, C.L. Del Toro-Sánchez, F.J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores, F.J. Cinco-Moroyoqui, The structural characteristics of starches and their functional properties, CyTA – Journal of Food, cilt 16(1), s. 1003-1017, 2018.

[52] H. Nawaz, R. Waheed, M. Nawaz, D. Shahwar, Physical and Chemical Modifications in Starch Structure and Reactivity, IntechOpen, cilt 2020, s. 908-917, 2020.

[53] C.C. Villa Zabala, An Overview on Starch Structure and Chemical Nature, Starch-based Nanomaterials, SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, Springer, Cham, cilt 2, s. 1-17, 2020.

[54] N. Lin, J. Huang, P.R. Chang, D. P Anderson, J. Yu, Preparation, Modification, and Application of Starch Nanocrystals in Nanomaterials: A Review, Journal of Nanomaterials, 573687, 2011

[55] W.S. Ratnayake, D.S. Jackson, Gelatinization and Solubility of Corn Starch during Heating in Excess Water: New Insights, Journal of Agricultural and Food Chemistry, cilt 54, s. 3712-3716, 2006.

[56] Hassan, M.B.K. Niazi, A. Hussain, S. Farrukh, T. Ahmad, Development of Anti-bacterial PVA/Starch Based Hydrogel Membrane for Wound Dressing, Journal of Environmental Polymer Degradation, cilt 26, s. 235-243, 2017.

[57] C.-W. Lin, P.-T. Wu, K.-T. Liu, Y.-J. Fan, J. Yu, An Environmental Friendly Tapioca Starch-Alginate Cultured Scaffold as Biomimetic Muscle Tissue, Polymers, cilt 13, s. 2882, 2021.

[58] Z. Hadisi, J. Nourmohammadi, J. Mohammadi, Composite of porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration, Ceramics International, cilt 41, s. 10745-10754, 2015.

[59] M. Taherimehr, R. Bagheri, M. Taherimehr, In-vitro evaluation of thermoplastic starch/beta-tricalcium phosphate nano-biocomposite in bone tissue engineering, Ceramics International, cilt 47, s. 15458-15463, 2021.

[60] R. Foudazi, R. Zowada, I. Manas-Zloczower, D.L. Feke, Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities, Langmuir, cilt 39, s. 2092-2111, 2023.

[61] M. Bercea, Bioinspired Hydrogels as Platforms for Life-Science Applications: Challenges and Opportunities, Polymers, cilt 14, s. 2365, 2022.

[62] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, Journal of Advanced Research, cilt 6, s. 105-121, 2015.

[63] J.C. López-Velázquez, R. Rodríguez-Rodríguez, H. Espinosa-Andrews, J.A. Qui-Zapata, S. García-Morales, D.E. Navarro-López, G. Luna-Bárcenas, E.C. Vassallo-Brigneti, Z.Y. García-Carvajal, Gelatin–chitosan–PVA hydrogels and their application in agriculture, Journal of Chemical Technology Biotechnology, cilt 94, s. 3495-3504, 2019.

[64] V. Van Tran, D. Park, Y.-C. Lee, Hydrogel applications for adsorption of contaminants in water and wastewater treatment, Environmental Science and Pollution Research, 2018.

[65] Y.H. Teow, L.M. Kam, A.W. Mohammad, Synthesis of cellulose hydrogel for copper (II) ions adsorption, Journal of Environmental Chemical Engineering, cilt 6, s. 4588-4597, 2018.

[66] C.A. Dreiss, Hydrogel design strategies for drug delivery, Current Opinion in Colloid & Interface Science, cilt 48, s. 1-17, 2020.

[67] W. Treesuppharat, P. Rojanapanthu, C. Siangsanoh, H. Manuspiya, S. Ummartyotin, Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems, Biotechnology Reports, cilt 15, s. 84-91, 2017.

[68] R.A. Batista, P.J. Perez Espitia, J.S. Siqueira Quintans, M.M. Freitas, M.Â. Cerqueira, J.A. Teixeira, J.C. Cardoso, Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems, Carbohydrate Polymers, cilt 205, s. 106-116, 2019.

[69] Y. Zhao, S. Zhou, X. Xia, M. Tan, Y. Lv, Y. Cheng, Y. Tao, J. Lu, J. Du, H. Wang, High-performance carboxymethyl cellulose-based hydrogel film for food packaging and preservation system, International Journal of Biological Macromolecules, cilt 223, s. 1126-1137, 2022.

[70] Y. Liang, J. He, B. Guo, Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing, ACS Nano, cilt 15, s. 12687-12722, 2021.

[71] C. Pagano, M.R. Ceccarini, M. Faieta, A. di Michele, F. Blasi, L. Cossignani, T. Beccari, E. Oliva, P. Pittia, M. Sergi, S. Primavilla, D. Serafini, L. Benedetti, M. Ricci, L. Perioli, Starch-based sustainable hydrogel loaded with Crocus sativus petals extract: A new product for wound care, International Journal of Pharmaceutics, cilt 625, s. 122067, 2022.

[72] H.D.N. Tran, K.D. Park, Y.C. Ching, C. Huynh, D.H. Nguyen, A comprehensive review on polymeric hydrogel and its composite: Matrices of choice for bone and cartilage tissue engineering, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, cilt 89, s. 58-82, 2020.

[73] S. Suvarnapathaki, X. Wu, D. Lantigua, M.A. Nguyen, G. Camci-Unal, Hydroxyapatite-Incorporated Composite Gels Improve Mechanical Properties and Bioactivity of Bone Scaffolds, Macromolecular Bioscience, cilt 20, s. 2000176, 2020.

[74] J. Wang, X. Wang, Z. Liang, W. Lan, Y. Wei, Y. Hu, L. Wang, Q. Lei, D. Huang, Injectable antibacterial Ag-HA/ GelMA hydrogel for bone tissue

engineering, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, cilt 11, s. 1219460, 2023.

[75] K. Shang, W. Liao, J. Wang, Y.-T. Wang, Y.-Z. Wang, D.A. Schiraldi, Nonflammable Alginate Nanocomposite Aerogels Prepared by a Simple Freeze-Drying and Post-Cross-Linking Method, ACS Applied Materials and Interfaces, 8(1), 643-650, 2016.

[76] G. Tillet, B. Boutevin, B. Ameduri, Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature, Progress in Polymer Science, 36(2), 191-217, 2011.

[77] D. Chen, B. Yang, C. Yang, J. Wu, Q. Zhao, Macroporous Hydrogels Prepared By Ice Templating: Developments And Challenges, Chinese Journal of Chemistry, 41, 3082-3096, 2023.

[78] T. Pan, W. Song, X. Cao, Y. Wang, 3D Bioplotting of Gelatin/Alginate Scaffolds for Tissue Engineering: Influence of Crosslinking Degree and Pore Architecture on Physicochemical Properties, Journal of Materials Science & Technology, 32(9), 889-900, 2016

[79] M. M. Ozmen, Q. Fu, J. Kim, G. G. Qiao, A rapid and facile preparation of novel macroporous silicone-based cryogels via photo-induced thiol–ene click chemistry, Chemical Communications, cilt 51(98), s. 17479–17482, 2015.

[80] A.T.A. E., W. Ling, Y. Manar, H. Maxwell, Biotechnological Applications of Eggshell: Recent Advances, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021.

[81] M. Waheed, M.S. Butt, A. Shehzad, N.M. Adzahan, M.A. Shabbir, H.A.R. Suleria, R.M. Aadil, Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements, Trends in Food Science and Technology, 91, 219-230, 2019.

[82] V. Vandeginste, Food waste eggshell valorization through development of new composites: A review, Sustainable Materials and Technologies, 2021.

[83] Mittal, M. Teotia, R.K. Soni, J. Mittal, Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review, Journal of Molecular Liquids, 223, 376-387, 2016.

[84] R.O. Zonato, B.R. Estevam, I.D. Perez, V.A.S. Ribeiro, R.F. Boina, Eggshell as an adsorbent for removing dyes and metallic ions in aqueous solutions, Cleaner Chemical Engineering, 2, 100023, 2022.

[85] N.-T. Vu, T.-H. Dinh, T.-T.-C. Le, T.-T.-H. Vu, T.-T.-T. Nguyen, T.-A. Pham, N.-L. Vu, S. Koji, S. Hama, I.-S. Kim, D.-C. Jang, D.-H. Kim, A.-T. Tran, Eggshell powder as calcium source on growth and yield of groundnut (Arachis hypogaea L.), Plant Production Science, 25(4), 413-420, 2022.

[86] B.W. Chong, R. Othman, P.J. Ramadhansyah, S.I. Doh, X. Li, Properties of concrete with eggshell powder: A review, Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, cilt 120, 102951, 2020.

[87] Y.-Z. Huang, Y.-R. Ji, Z.-W. Kang, F. Li, S.-F. Ge, D.-P. Yang, J. Ruan, X.-Q. Fan, Integrating eggshell-derived $CaCO_3$/MgO nanocomposites and chitosan into a biomimetic scaffold for bone regeneration, Chemical Engineering Journal, 395, 125098, 2020.

[88] B.K. Sahu, S. Sharma, K. Kaur, M. Chandel, P. Sood, M. Singh, V. Shanmugham, Farm waste-eggshell nanoparticles constitute gel for safe navigation of probiotic across the stomach, Materials Today Communications, cilt 34, 104876, 2023.

[89] P. Chuysinuan, P. Nooeaid, T. Thanyacharoen, S. Techasakul, P. Pavasant, K. Kanjanamekanant, Injectable eggshell-derived hydroxyapatite-incorporated fibroin-alginate composite hydrogel for bone tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, cilt 193(Part A), 799-808, 2021.

[90] M. Zayzafoon, Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation, Journal of Cellular Biochemistry, cilt 97, 56-70, 2006.

[91] Y. Sun, B. Wan, R. Wang, B. Zhang, P. Luo, D. Wang, J.-J. Nie, D. Chen, X. Wu, Mechanical Stimulation on Mesenchymal Stem Cells and Surrounding Microenvironments in Bone Regeneration: Regulations and Applications, Frontiers in Cell and Development Biology, cilt 10, 808303, 2022.

[92] M.R. Marques, R. Loebenberg, M. Almukainzi, Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing, Dissolution Technologies, 18, 15, 2011.

[93] C. Pozo, S. Rodríguez-Llamazares, R. Bouza, L. Barral, J. Castaño, N. Müller, I. Restrepo, Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. Journal of Polymer Research, cilt 25(12), 2018.

[94] N. Abbasi, S. Hamlet, R.M. Love, N.-T. Nguyen, Porous scaffolds for bone regeneration, Journal of Science: Advanced Materials and Devices, cilt 5(1), s. 1-9, 2020.

[95] A. Kaviani, S. M. Zebarjad, S. Javadpour, M. Ayatollahi, R. Bazargan-Lari, Fabrication and characterization of low-cost freeze-gelated chitosan/collagen/hydroxyapatite hydrogel nanocomposite scaffold. International Journal of Polymer Analysis and Characterization, cilt 24(3), s. 191–203, 2019.

[96] P. Deb, E. Barua, A. B. Deoghare, S. Das Lala, Development of bone scaffold using Puntius conchonius fish scale derived hydroxyapatite: Physico-mechanical and bioactivity evaluations, Ceramics International, cilt 45(8), s. 10004-10012, 2019.

[97] G. García, V. Moreno-Serna, M. Saavedra, A. Cordoba, D. Canales, A. Alfaro, A. Guzmán-Soria, P. Orihuela, S. Zapata, C.D. Grande-Tovar, C.H. Valencia-Llano, P.A. Zapata, Electrospun scaffolds based on a PCL/starch blend reinforced with CaO nanoparticles for bone tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, cilt 273 (Part 1), 132891, 2024.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Z. Ak, B. İzbudak, E. Su, A. Bal-Öztürk, M. M. Özmen, "Atık Yumurta Kabuğu Parçacıkları İçeren Hidrojel Biyokompozit Doku İskelesi Üretimi", VIII. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Manisa, TÜRKİYE, 16-18 Mayıs 2024.

Projeler

2. "Atık Yumurta Kabuğu Parçacıkları İçeren Hidrojel Biyokompozit Doku İskelesi Üretimi", Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje Numarası: TYL-2024-6139, Proje Danışmanı: Prof Dr. Mehmet Murat ÖZMEN