



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**KEMİK DOLGU MALZEMESİ OLARAK BİYOLOJİK OLARAK
PARÇALANABİLEN KERATİN BAZLI MACUNLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞERİFE YENİCAN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**KEMİK DOLGU MALZEMESİ OLARAK BİYOLOJİK OLARAK
PARÇALANABİLEN KERATİN BAZLI MACUNLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞERİFE YENİCAN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

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

Proje No: FYL-2022-3981

ÇANAKKALE – 2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Şerife YENİCAN

06/07/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN'a

Laboratuvar çalışmalarında bilgi birikimleri ve desteğini benimle paylaşan değerli Tuğba Sezgin ARSLAN' a

Laboratuvar çalışmalarım süresince ve günlük hayatta görüş ve düşünceleriyle desteklerini esirgemeyen kıymetli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Hilal Deniz YILMAZ, Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU ve Elif Beyza DEMİRAY' a

Tez çalışmalarım boyunca beni maddi manevi ve bilimsel anlamda destekleyen, benimle bütün zorlukları göğüsleyen kıymetli arkadaşlarım Safiye Nur YILDIZ ve Tuğçe KURT' a

Bu süreçte maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili ev arkadaşım Fatma Özsoy'a

Hayatımın her aşamasında ve eğitim sürecim boyunca her daim yanımda olan kıymetli annem Emel YENİCAN, babam Yavuz YENİCAN ve sevgili kardeşlerim Afra YENİCAN ve Mustafa Baki YENİCAN' a

Hayatımın her alanında manevi destekleriyle yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Hüsne Şevval KIYMAZ ve Büşra DOĞRAMACI' ya

Hayatı boyunca değerli fikirleriyle ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olmaya gayret göstermiş çok kıymetli arkadaşım Hilal GÖDELEK' e çok teşekkür ederim.

Bu araştırma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (FYL-2022-3981).

Şerife YENİCAN

Çanakkale, Temmuz 2023

ÖZET

KEMİK DOLGU MALZEMESİ OLARAK BİYOLOJİK OLARAK PARÇALANABİLEN KERATİN BAZLI MACUNLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Şerife YENİCAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

06/07/2023, 76

Doğal polimerler, doku mühendisliği uygulamalarının cephaneliğinde önemli bir araç olarak konumunu korumaktadır. Bu çalışmada kemik doku mühendisliği için mimik yapı ve işlev gösterebilecek, keratin macun (KP) ve keratin macun/ *Bombyx mori* ipek fibroini (KPSF) kompozit yapı iskelelerinin üretimleri için kimyasal çapraz bağlamaya gerek duyulmayan yenilikçi bir yaklaşım sunulmaktadır. Bu yaklaşımda keratin ile karboksil gruplarınca zengin sitrik asit arasında hidrojen bağlarıyla güçlü etkileşimler oluşturuldu ve elde edilen keratin macun tozlarının hidrolize ipek fibroini içerisinde dağıtılmasıyla kompozit iskeleler üretildi. Her iki iskele Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, X-ışını kırınımı (XRD), termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskopu (SEM), mikromekanik testleri ve biyobozunurluğu derinlemesine karakterize edilmiştir. Ayrıca *in ovo* civciv koryoallantoik membran (CAM) tahlili ile malzemelerin anjiyogenez özellikleri test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar malzemelerin mekanik dayanımlarının, biyobozunurluk ve anjiyogenez özelliklerinin tatmin edici düzeyde olduklarını sergilemiş ve dolayısıyla kemik doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel oluşturduklarını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Keratin Macun, İpek Fibroini, Kemik Dolgu Malzemesi, Kemik Doku Mühendisliği

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE KERATIN-BASED PASTES AS BONE FILLERS MATERIALS

Şerife YENİCAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

06/07/2023, 76

The use of natural polymers remains an important tool in the arsenal of regenerative medicine and tissue engineering applications. In this study, an innovative method for producing keratin paste (KP) and keratin paste/*Bombyx mori* silk fibroin (KPSF) composite scaffolds that can mimic structure and function for bone tissue engineering is presented, which does not require chemical cross-linking. In this approach, strong interactions formed between keratin and citric acid rich in carboxyl groups by hydrogen bonds, and composite scaffolds were created by dispersing the obtained keratin paste powders in hydrolyzed silk fibroin. The scaffolds have been extensively characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscope (SEM), micromechanical tests and biodegradability. In addition, the materials' angiogenesis properties were also evaluated using the *in ovo* chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. The results showed that the materials' mechanical strength, biodegradability, and angiogenesis properties were satisfactory, indicating that they had potential for bone tissue engineering applications.

Keywords: Keratin Paste, Silk Fibroin, Bone Filler, Bone Tissue Engineering

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ETİK BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

1.1. Kemik Anatomisi	3
1.2. Kemiğin Doku Düzeyinde İncelenmesi	5
1.3. Kemiğin Mekanik Özellikleri	7
1.4. Kemik Hücreleri.....	8
1.5. Kemik ve İlgili Patolojiler.....	9
1.6. Kemik Doku Onarımı için Klinik İhtiyaçlar.....	11
1.7. Kemik Doku Mühendisliği.....	13
1.8. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyomalzemeler.....	17
1.9. Kemik Doku Mühendisliği için Sentetik Polimerler.....	18
1.10. Kemik Doku Mühendisliği için Doğal Polimerler.....	20
1.11. Keratin.....	21
1.12. İpek Fibroini.....	24

İKİNCİ BÖLÜM	27
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	32
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM	

3.1.	Materyal	32
3.2.	Yöntem	32
3.2.1.	Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu.....	33
3.2.2.	<i>B. Mori</i> İpek Kozalarından İpek Fibroini Eldesi.....	34
3.2.3.	Koyun Yünü Keratininin Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini.....	35
3.2.4.	Serbest Sülfidril Grupları Tayini.....	37
3.2.5.	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) Analizi.....	38
3.2.6.	Keratin Macun Kriyojellerinin Üretimi.....	41
3.2.7.	Keratin Macun – İpek Fibroini Kompozit İskelelerin İmalatı.....	42
3.2.8.	KP ve KPSF Kriyojellerin Fizikokimyasal Karakterizasyonları.....	43
3.2.9.	İskelelerin Mikromekanik Özelliklerinin İncelenmesi.....	44
3.2.10.	Enzimatik <i>in vitro</i> Biyobozunurluk Testi.....	44
3.2.11.	KP ve KPSF İskelelerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.12.	İstatistiksel Analizler.....	45

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	46
ARAŞTIRMA BULGULARI	

4.1.	Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu	46
4.2.	Serbest Sülfidril Grupları Tayini	47
4.3.	İpek Böceği Kozalarından Hidrolize İpek Fibroini Eldesi.....	47
4.4.	KP ve KPSF Kriyojellerinin Optimizasyonları.....	49
4.5.	Geliştirilen Kemik Dolgu Malzemelerinin Fizikokimyasal Karakterizasyonları: FTIR, XRD.....	51
4.6.	Termal Karakterizasyon: TGA.....	53
4.7.	Yapısal Gözeneklilik ve Morfolojinin Değerlendirilmesi: SEM.....	54

4.8.	Mikromekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	55
4.9.	KP ve KPSF İskelelerin Enzimatik Biyobozunurluklarının Değerlendirilmesi...	57
4.10.	KP ve KPSF İskelelerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	58
	BEŞİNCİ BÖLÜM	61
	SONUÇ ve ÖNERİLER	
	KAYNAKÇA	64



SİMGELER VE KISALTMALAR

SF	İpek fibroini
WK	Yün keratini
NCP	Kollajen harici proteinler
MKH	Mezenkimal kök hücre
HDM	Hücre dışı matriks
KP	Keratin macun iskele
KPSF	Keratin macun- ipek fibroini kompozit iskele
3B	Üç boyutlu
ATR-FTIR	Zayıflatılmış toplam yansıtımlı-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
XRD	X-ışını difraktometresi
TGA	Termogravimetrik analiz
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetrisi
TMDSC	Sıcaklık modülasyonlu diferansiyel tarama kalorimetrisi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
-SH	Serbest sülfidril grubu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
HA	Hidroksiapatit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ALP	Alkalin fosfataz
CaP	Kalsiyum fosfat
BSA	Sığır serum albümin
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfid
LiBr	Lityum bromür
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
kDa	Kilo dalton
MPa	Mega paskal
GPa	Giga paskal

APS	Amonyum per sülfat
°C	Derece Santigrat
M	Molar
mM	Milimolar
UV	Ultraviyole
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
nm	Nanometre
%	Yüzde oranı
w/v	Kütle/Hacim
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
PLA	Polilaktik asit
PGA	Poli glikolik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PEG	Polietilen glikol
PCL	Polikaprolakton
PVA	Polivinil alkol
PPF	Polipropilen fumarat
PAA	Poliakrilik asit
PUR & PU	Poliüretan
pI	İzoelektrik nokta
BMP-2	Kemik morfojenetik proteini
HPMC	Hidroksipropil metilselüloz
LDV	Lösin-Aspartik asit-Valin
EDS	Glutamik asit-Aspartik asit-Serin
CAM	Koryoallantoik membran
mA	Miliamper
kV	Kilovolt

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Kompakt ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri	8
Tablo 2	Kemik dokusu patolojilerinin risk faktörleri ve mevcut tedaviler	10
Tablo 3	Kemik doku rejenerasyonlarında kullanılan greftlerin avantajları ve dezavantajları	13
Tablo 4	Kemik doku mühendisliğinde kullanılan bazı sentetik polimerlerin özellikleri	19
Tablo 5	Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan bazı doğal polimerlerin uygulamaları, avantajları ve dezavantajları	21
Tablo 6	SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri ve jel hazırlama prosedürü	39
Tablo 7	Kolloidal Coomassie boya çözeltisi ve boya uzaklaştırma çözeltisi hazırlama protokolü	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Kemiğin makrodan nanoya hiyerarşik yapısı	5
Şekil 2	Kemik anatomisi	6
Şekil 3	Kemik rejenerasyonlarında kullanılan doğal ve sentetik kemik greftleri	11
Şekil 4	Kemik doku mühendisliği uygulamaları için ideal iskelede bulunması gereken özellikler	15
Şekil 5	Yün keratininin yapısı	23
Şekil 6	Keratinin α -heliks ve β -tabaka yapısı	24
Şekil 7	İpek fibroininin farklı materyal formlarında kullanımı ve farklı uygulama alanları	25
Şekil 8	Koyun yünlerinden keratin ekstraksiyonu işleminin genel şeması	34
Şekil 9	İpek kozalarından rejenere ipek fibroini çözeltisi eldesi	35
Şekil 10	SDS-PAGE numunelerin yüklenmesi ve yürütme işlemi	40
Şekil 11	Keratin macun kriyojellerin üretimi	42
Şekil 12	Keratin macun ve kompozit iskelelerin görüntüsü	43
Şekil 13	KP ve KPSF kriyojellerin basma testi sırasındaki görüntüleri	44
Şekil 14	Lowry metodu ile oluşturulan BSA kalibrasyon grafiği	46
Şekil 15	L-sistein standardı ile çizdirilen kalibrasyon grafiği	47
Şekil 16	İpek fibroini SDS-PAGE jel görüntüsü	48
Şekil 17	Keratin macun kriyojellerin boyutları ve stereo mikroskop görüntüsü	49
Şekil 18	Keratin macun – ipek fibroini kompozit kriyojellerin boyutları ve stereomikroskop görüntüsü	50
Şekil 19	Keratin macun, ipek fibroini, KPSF kompozit iskele ve toz keratinlerin FTIR spektrumları	52

Şekil 20	Keratin tozları, ipek fibroini, keratin macun ve KPSF kompozit iskelelerin XRD spektrumları	53
Şekil 21	Keratin macun, KPSF kompozit iskele ve ipek fibroini TGA eğrileri	54
Şekil 22	KP ve KPSF kriyojellerin SEM mikrografileri	55
Şekil 23	KP ve KPSF iskelelerin gerilim-gerinim eğrileri, düşük ve yüksek gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri	56
Şekil 24	İskelelerin 3 ve 10 günlük periyotlarda kaydedilen bozunma oranları	57
Şekil 25	İskelelerin implantasyon sonrası ve eksplantasyon öncesi kaydedilen görüntüleri, vaskülarizasyonun değerlendirilmesi için işlenmiş görseller ve vasküler indeksler	58
Şekil 26	İn ovo CAM testi sonucu iskelelerden elde edilen histogramlar	59
Şekil 27	İn ovo CAM testi sonrası iskelelerin SEM görüntüleri	60

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Kemik, vücuda mekanik destek ve hareketlilik sağlamanın yanı sıra bazı minerallerin depolanması, homeostaz ve kan pH düzenlenmesi gibi önemli işlevlere sahiptir (Kashte vd., 2017). Oldukça dinamik ve vaskülerize bir bağ dokusu olan kemiğin kendisini yenilemek için içsel bir kapasitesi mevcuttur (Farokhi vd., 2018; J. J. Li vd., 2018). Bununla birlikte tümör rezeksiyonları, travma, enfeksiyonlara bağlı durumlar ve artan yaşa bağlı olarak azalan rejenerasyon kapasitesi bir doku onarımı ihtiyacı meydana getirmektedir (Farokhi vd., 2018; Guo vd., 2021). Öte yandan, kemik iyileşmesi için klinikte yaygın olarak kullanılan otogreftleme ikinci bir cerrahi prosedür gerektirmesi ve deformite, morbidite, donör alan yaralanmaları, yara izi, enfeksiyon ve kronik ağrı gibi komplikasyonlara yol açabilmesi sebebiyle sınırlamalara sahiptir (Haugen vd., 2019). Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, kemik dokusunun onarımını ve yenilenmesini tetikleyebilecek farklı doku mühendisliği yaklaşımları çalışılmıştır (Maia vd., 2022). Kemik doku mühendisliği için geliştirilen stratejiler, doku yenilenmesini tetikleyerek fonksiyonel kemik dokusu gelişimini desteklemek için karmaşık kemik dokusunun taklit edilmesi esasına dayanmaktadır (Maia vd., 2022; X. Zhao vd., 2015). İdeal bir kemik doku ikamesinin yüzey özellikleri ve gözenekli yapısının hücre göçü, proliferasyonu ve anjiyogenez için uygun ortam sağlayabilmesi beklenmektedir (Haugen vd., 2019).

Yeni nesil doğal polimerik biyomalzemeler, biyobozunmaları sırasında sitotoksisiteye sebep olmayan biyouyumlu malzemeler olmaları sebebiyle rejeneratif tıp uygulamalarında çekiciliklerini muhafaza etmektedirler (Ebhadaghe, 2021; Venkatesan & Kim, 2010). Biyopolimerlere, kondroitin sülfat, hiyalüronik asit, dekstran, heparin, selüloz, aljinat gibi polisakkaritler ile jelatin, elastin, albümin, keratin ve ipek fibroini gibi polipeptitler örnek verilebilir (Muir & Burdick, 2021).

Keratinin hücre adezyonu ve proliferasyona olanak sağlaması, biyouyumluluğu ve dikkat çekici mekanik dayanımı sayesinde yapı iskelesi malzemesi olarak kullanımı geniş çapta ilgi görmüştür (Esparza vd., 2017). Ayrıca diğer protein polimerlerle karşılaştırıldığında kollajenden sonra en önemli hayvansal protein olması ve doğal bolluğu sebebiyle keratin, doku mühendisliği çalışmalarında kendisine önemli bir yer edinmiştir (Islam vd., 2022). Bunlara ek olarak hayvan kaynaklı diğer osteoindüktif proteinlerin aksine tırnak, tüy, yün ve saç gibi hayvan dokularından elde edilebilmesi dolayısıyla hayvan kurban

edilmesine gerek kalmaması keratini daha çekici bir polimer olarak öne çıkarmaktadır (Bloise vd., 2020; Islam vd., 2022). Öte yandan antibakteriyel özelliğe sahip olan sitrik asit, mekanik özelliklerin iyileştirilmesi için bazı polimerlerle birlikte plastikleştirici ve uyumlaştırıcı olarak kullanılabilir. Bununla birlikte sitrik asit doğal polimerlerin yapılarındaki hidroksil gruplarıyla etkileşime girerek daha güçlü hidrojen bağları oluşturması sebebiyle moleküller arası etkileşimi artırmaktadır (Ramirez vd., 2017). Plastikleştirici ve çapraz bağlayıcı olarak sitrik asidin kullanılması, malzemenin biyobozunması sırasında toksisiteye sebep olacak maddelerin salınması probleminin üstesinden gelinmesi açısından önem arz etmektedir.

B. mori ipek fibroini (SF) biyouyumluluğunun yanı sıra düşük immünojenite ve toksik olmama gibi özellikleriyle dikkatleri üzerine çeken bir doğal polimerdir (Tian vd., 2021a). Şimdiye kadar hidrojel, sünger, film ve kompozit iskeleler gibi farklı formlarda çalışılmış olan SF yüksek mekanik özelliklere sahip olması nedeniyle kemik doku onarımları için uygun bir materyaldir (X. Ding vd., 2021; Gambari vd., 2019). Ayrıca SF' in lifli ve beta tabakalı yapıyı bir arada bulundurması osteojenik farklılaşmayı destekleyebilecek özelliklere sahip olduğunu gösterir. Öyle ki bu polimerin lifli yapısı kollajen tip I ile büyük bir benzerlik gösterirken beta tabakalar arasındaki bağlantılar diğer proteinlerin anyonik yapılarına benzer davranışlar gösterebilir ve böylece kemiğin doğal yapısını rahatlıkla taklit edebilir (Farokhi vd., 2018). Bunlara ek olarak SF' in sunduğu bir diğer avantaj da kristal yapısının indüklenebilmesi için metanol muamelesinin yeterli olması dolayısıyla zararlı kimyasallara ihtiyaç duyulmadan suda çözünmeyen gözenekli malzemeler elde etme imkânı sunmasıdır (Hines & Kaplan, 2011).

Mevcut çalışmada, yeni bir osteoindüktif biyomateryal olarak WK ve SF' den yapılmış yapı iskelelerinin üretimi sunulmuştur. Keratin macunun üretiminde sitrik asidin hidroksil gruplarıyla güçlü bağlar oluşturma eğilimlerinden yararlanılmış ve üç boyutlu gözenekli yapı için liyofilizasyon tekniği kullanılmıştır. Kompozit iskelenin imalatı, keratin macun tozlarının SF çözeltisiyle karıştırılması ve dondurarak kurutmanın ardından metanol muamelesi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki malzemenin yapısal, biyokimyasal, fizikokimyasal ve mekanik özellikleri araştırıldı. İskelelerin kemik doku mühendisliğinde uygulanabilirliğini belirlemek ve vaskülarizasyon özelliklerini incelemek üzere *in ovo* koryoallantoik membran (CAM) testi kullanıldı.

1.1. Kemik Anatomisi

İnsan vücudundaki diğer tüm organlar için sağlam bir destek sağlayan iskelet sistemi 206 kemikten meydana gelmiştir. Kasların ve diğer organların bağlı olduğu iskelet yapısı adaptif bir yapı olma özelliği taşır. Kişinin çocukluktan erişkinliğe kadar olan büyüme sürecinde kemik doku büyüdükçe onunla birlikte vücudun geri kalanı da büyür (Le vd., 2017). Çok çeşitli işlevleri yerine getirebilme potansiyeline sahip olan kemik, vücutta çeşitli fiziksel, metabolik ve endokrin uyarılara karşı yanıt oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Kemiklerin vücuttaki işlevlerini sınıflandıracak olursak karşımıza şu 5 madde çıkmaktadır (Amini vd., 2012):

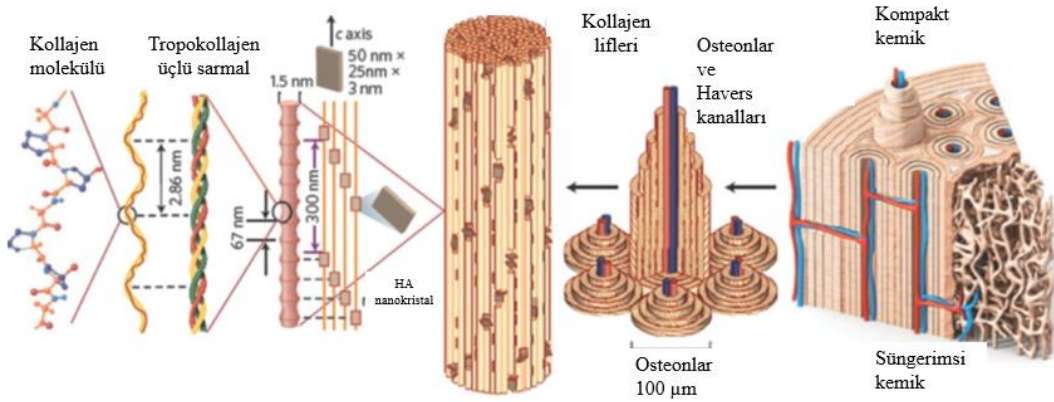
1. İnsan bedeninin hareket mekanizmasının temel unsurudur,
2. İskelet sisteminin yapılanması vücuda yük taşıma kapasitesi sağlamanın yanı sıra iç organlar için de koruma sağlar,
3. Hematopoez aktivitelerinin gerçekleştirilebilmesi için gereken biyolojik elementleri bünyesinde barındırır,
4. Kurşun gibi bazı tehlikeli metallerin hapsedilmesinde rol oynar,
5. Kalsiyum ve fosfat iyonlarının depolanması görevini üstlenerek vücuttaki temel elektrolit dengesini kontrol altında tutar.

Oldukça dinamik ve vaskülerize bir doğal doku olan kemik, insan yaşamı boyunca sürekli kendisini yeniden şekillendirmektedir (Zhu vd., 2021). Bu yeniden şekillenme mekanizması, hem dış mekanik taleplerin hem de iç araçların sebep olduğu yapısal ve kimyasal değişimlerin meydana getirdiği sürekli bir yenilenme döngüsünü kapsamaktadır (Amini vd., 2012).

Kendisine ait özel hiyerarşik sisteme sahip bir bağ dokusu olan kemiğin esas olarak yaklaşık %10-20'lik bir kısmı kollajen liflerinden, %60-70'lik kısmı inorganik bileşenleri oluşturan hidroksiapatit ve bazı nano kristallerden, son olarak yaklaşık %9-20'lik bir kısmı ise su moleküllerinden oluşmuştur (Z. Ding vd., 2021). Ayrıca kemik doku, yapısında diğer bazı polisakkaritler, protein, lipid, sodyum, magnezyum ve bikarbonat gibi organik ve inorganik bileşenleri de barındırır. Kemik doğal matrisi, bir dizi kollajen harici protein (NCP), lipid ve su ile stabilize edilmiş olan kollajen fibrillerinden meydana gelir. Mikrofibriller belirlenemeyecek uzunlukta ve değişken çaptaki fibrilleri oluşturmak için

birbirleriyle hem uzunlamasına hem de yanal olarak bir araya gelirler. Ağır metal tuzları ile boyanan kollajenin, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntülerinde fibril eksenine dik olacak şekilde değişkenlik gösteren bazı açık ve koyu bantlardan oluşan bir model gözlemlenebilir. Bu bantlar pozitif ve negatif yüklü alanlara karşılık gelmektedir. Kemik biyomineralizasyonlarında yüklü aminoasitler önemli bir rol oynamaktadır. Öte yandan osteoblastların salgıladığı alkalın fosfataz (ALP) içeren veziküller, fosfat gruplarının parçalanması ile fosfat ve kalsiyumun çökmesi görevlerini üstlenerek kemiği mineralize etmektedirler. Kemik minerali, Ca/P oranı yaklaşık olarak 1,67'den az olan ve kemiğe sertliğini veren hidroksiapatitten (HA) oluşur. Doğal kemik matrisinin yaklaşık %10'luk bir kısmına tekabül eden NCP'ler, biyomineralizasyon işleminde mineral büyümesi ve çekirdeklenmesinde kritik bir düzenleme görevi üstlenmektedirler. Ayrıca NCP'ler , kemiğin mekanik özellikleri ve yapısal hiyerarşisini belirlemek için çok işlevli roller sergiler. Son olarak kemik yapısı içerisinde bulunan su molekülleri, kollajen yapısının stabilizasyonu için bitişik bazı molekülleri hidrojen bağlarıyla köprülemenin yanı sıra kemiğin mekanik ve yapısal özelliklerine katkıda bulunan bazı görevleri üstlenmektedir (Liu vd., 2016).

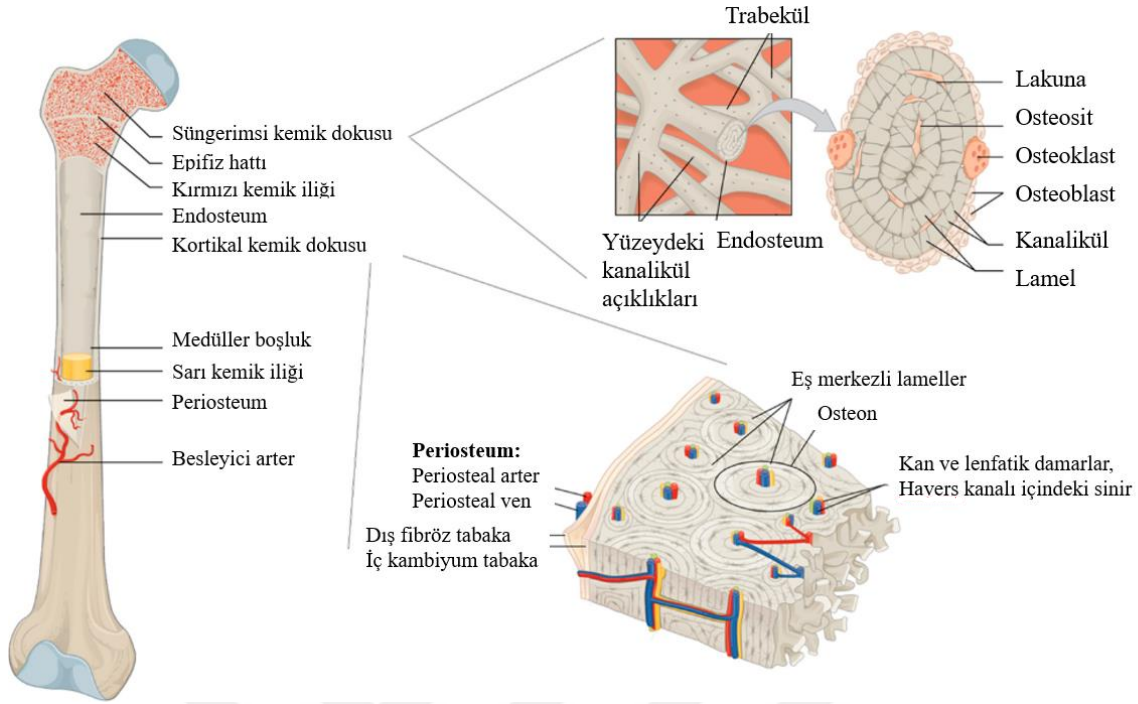
Kemik dokusu, anizotropik ve hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Bu hiyerarşik yapı, bütün kemik dokusundan makro ve mikro ölçekli yapılarına kadar açıklayabilmeyi amaçlayan bazı ardışık araştırma düzeylerine ayrılabilir. Weiner ve Wagner ilk olarak 1988 yılında kemik dokusunun hiyerarşik yapısını yedi seviyeye ayırmayı önermişlerdir. O zamandan günümüze kadar olan süreçte hiyerarşik yapıların dört ila dokuz seviyeli sınıflandırılmasıyla ilgili çeşitli yöntemler sunulmuştur (Zhu vd., 2021).



Şekil 1. Kemiğin makrodan nanoya hiyerarşik yapısı
(Liu vd., 2016)

1.2. Kemiğin Doku Düzeyinde İncelenmesi

Kemiğin en dış tabakası olan ve bir örtü görevi üstlenen yapı periosteum olarak adlandırılır ve bu tabaka tendon bağlantıları, ligament bağlantıları, eklemli kıkırdak gibi yapılarla kaplı kısımların dışında kalan alanın tamamını örtmektedir. Öte yandan endosteum tabakası ise kemik iliği boşluğunu oluşturan duvarın yüzeyini tamamen kaplayan zar olarak bilinmektedir. Bu tabakalar kemiğin yeniden şekillenmesi ve kırıkların iyileşmesi için gerekli olan hücreleri barındırmaları sebebiyle rejenerasyon sürecinde önem arz etmektedirler. Öyle ki, kemiğin işlevsel durumunun periosteum zarı üzerindeki etkileri mikroskopik düzeyde incelendiğinde gözle görülür değişikliklere sebep olduğu söylenebilir (Ahmed Nahian; Pradip R. Chauhan., 2022). Bu bağlamda kemiğin periosteum, endosteum ve bu zarların örttüğü diğer kısımlar olan kemik dokusu, kemik iliği gibi katmanlarının anlaşılması kemiğin patolojik durumlarının çözümüne ışık tutacak niteliktedir.



Şekil 2. Kemik anatomisi

(Le vd., 2017)

Periosteum: Periosteum tabakası hemen hemen vücutta bulunan her kemiğin en dış tabakasını oluşturur. Çocuklarda kemiğe kısmi kan temini, apozisyonel kemik büyümesi ve kemik kırıkdağı onarımı gibi bazı işlevleri üstlenmektedir. Periosteum, temelde iki tabakadan oluşmaktadır. Bahsi geçen tabakalar, içerisinde bol miktarda osteoprogenitör hücre barındıran iç kambiyum tabakası ve yapısal destek görevini üstlenen dış fibröz tabaka olarak açıklanabilir. Cerrahlar tarafından 18. Yüzyılın başlarında periosteum zarının yeni kemik oluşumuna öncülük edebilecek potansiyele sahip olduğu keşfedilmiştir. Bu sebeple günümüz klinik uygulamalarında yaralanma bölgelerinin etrafında bulunan periost tabakalarına zarar verilmemeye özen gösterilmektedir.

Kemik Dokusu: Kemik dokusu esasen mineralize ve sert bir doku olması sebebiyle iskeletin yapısal yönünü temsil eden doku olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda kemik doku, endosteum ve periosteum tabakaları arasında yer alan ve kemik iliğinin haricindeki bölgeyi temsil eden doku olarak açıklanabilir. Kemik dokusunda biyokimyasal olarak özdeş osseoz dokusuna sahip olmalarına rağmen yapısal anlamda farklılık gösteren kortikal ve süngerimsi kemikten bahsedilebilir. Kortikal kemik dokusunun yapısal özellikleri incelendiğinde volkman kanalları, haversian kanalları, kanaliküller ve boşlukları içeren

yaklaşık %10 gözenekliliğe sahip katı bir yapı olduğu söylenebilir. Öte yandan %50-90 arasında gözenekliliğe sahip süngerimsi kemik dokusu birbirine bağlı, küçük trabekül plakaları ve bu plakalar arasında bulunan nispeten geniş boşlukardan meydana gelen bir ağdır. Kemik dokusu allojenik, otojenik, ksenojenik ve başka birçok kemik gerfti materyallerinde tercih edilen birinci bileşendir.

Endosteum: Apozisyonel kemik büyümesi esnasında periosteumun sıkışmasından kaynaklanan endosteum kemik bileşenleri arasında en az çalışılan bileşendir. Periosteum tabakasından farklı olarak endosteum, ortalama kalınlığı yaklaşık 10-40 µm olan, birkaç hücre tabakası ve belirsiz bir bağ dokusu tabakasından oluşan oldukça ince bir zardır. Bu yapının içerisinde barındırdığı hücreler dinlenme, biçimlendirme ve resorptif alanların oluşturduğu, preosteoblast, aktif osteoblast ve osteoklast hücrelerinin varlığıyla karakterize edilmiş mozaik bir model şeklinde düzenlenmiştir. Osteoprogenitör hücrelerin endosteum içerisindeki mevcudiyeti bu yapıya kemiğin yeniden yapılanması ve onarımında fonksiyonel olarak katkıda bulunmasını sağlar. Bütün bu özelliklerine ek olarak, kemiğin kalınlaşması sürecinde gereksiz kemik dokusunu medüller boşluktan emerek kemiklerdeki ağırlık-kuvvet oranındaki dengenin kontrol altında tutulması hususunda hizmet eder.

Kemik İliği: Kemiğin içerisinde bulunan hassas ve yumuşak dokulardan biri olan kemik iliğinin kemik anatomisinin bir parçası olmasına karşın kan organı olarak işlev göstermesi onu daha iyi karakterize etmektedir. Kan organı işleviyle öne çıkan kemik iliği hematopoetik kök hücreler için bir niş görevi üstlenmektedir. Hematopoetik kök hücreler tüm kan sistemini küçük tek bir hücrede yeniden üretebilme potansiyeli gösteren hücreler olarak açıklanabilir. Uzun kemiklerin bir parçası olan kemik iliğinin doku yenilenmesi çalışmalarında kullanılabilirliği günümüzde tartışılmaz bir gerçektir (Le vd., 2017).

1.3. Kemiğin Mekanik Özellikleri

Kemiğin mekanik özellikleri kemik kalitesi, anatomik bölge ve yaşa göre değişkenlik göstermektedir. Kemik dokusunun mekanik özelliklerini tam manasıyla anlamak, günümüzde bilimsel açıdan büyük bir zorluktur. Kemiğin dayanıklılık, yorgunluk, sertlik gibi çeşitli biyomekanik özellikleri arasında elastik modül, yapay implant geliştirilmesine rehberlik etme ve kemikteki çeşitli patolojilerin karakterizasyonu adına kritik önem arz etmesi sebebiyle en çok ilgi gören araştırma konusu olmuştur. Kemiğin mukavemeti ve elastik modülü anizotropiktir. Kompakt kemik mekanik kuvvete diyafiz eksenini boyunca yani uzunlamasına maruz bırakıldığında radyal enine nazaran hem daha sert hem daha güçlü

olduğu görülür. Bununla birlikte sıkıştırılmasında gösterdiği mukavemetin germe mukavemetinden yüksek olduğu da görülebilir. Öte yandan trabeküler doku için mekanik özellikler gözenekliliğe bağlı olduğu gibi her bir trabekül için farklılık gösterebilen mimari özelliklerine de doğrudan bağlıdır. İnsan kemiğinin mekanik ve fiziksel özellikleri literatürde bildirilen verilerin ortalaması olarak Tablo 1’ de verilmiştir (X. Wang vd., 2016).

Tablo 1

Kompakt ve trabeküler kemiğin mekanik özellikleri (X. Wang vd., 2016)

	Gözeneklilik		modül (GPa)		mukavemet (MPa)	poisson oranı
kompakt kemik	%3-5	boyuna	17,9 ± 3,9	gerilme	135±15,6	0,4±0,16
				sıkıştırma	205±17,3	
		enine	10,1 ± 2,4	gerilme	53±10,7	0,62±0,26
				sıkıştırma	131±20,7	
trabeküler kemik	%90’a kadar	omur	0,067±0,045		2,4±1,6	
		kaval kemiği	0,445±0,257		5,3±2,9	
		uyluk kemiği	0,441±0,271		6,8±4,8	

1.4. Kemik Hücreleri

Hücre dışı kemik dokuları, esasen tip-I kollajenden ve nano-HA moleküllerinden oluşan üç boyutlu (3B) bir nanokompozit iskele olarak anlaşılabilir. Bu dokular gözeneklilik, yapısal organizasyon ve mekanik özelliklerinin gösterdikleri farklılıklara göre temel olarak süngerimsi veya kortikal kemik olarak tanımlanır (Fernandez-Yague vd., 2015). Süngerimsi

kemik ve kortikal kemik, kemik doku hücreleri için koruyucu ve destekleyici bir alan sağlayarak hücre büyümesinde önemli rol üstlenir (Zhu vd., 2021). Kemikte temelde mezenkimal kökenli ve osteojenik fonksiyonlara sahip olan osteoblastlar, kemiğin rezorbe edilmesinde görev alan ve monosit makrofaj hattı kaynaklı çok çekirdekli osteoklastlar ve hareketsiz olgun osteoblastlardan kaynaklanan ve toplam kemik hücrelerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan (%90'dan fazla) osteositler olmak üzere üç hücre tipi bulunmaktadır(Fattore vd., 2012).

Osteoblastlar: Osteoblastlar, kemik yüzeyi boyunca yer alan, genelde kemik oluşturma işlevleriyle bilinen ve kemikte bulunan hücrelerin yaklaşık %4-6'sını oluşturan kübik hücrelerdir. Bu hücreler belirgin golgi aygıtı ve bol miktarda endoplazmik retikulum ile birlikte çeşitli salgı keseciklerini de içerisinde bulunduran protein sentezleme kabiliyetine sahip hücrelerin morfolojik özelliklerini sergilemektedirler. Kemik matrisine doğru osteoid salgılanması görevini üstlenen osteoblastlar aynı zamanda polarize hücrelerdir.

Osteositler: Osteosit hücreleri kemik hücrelerinin %90-95 oranında çok büyük bir kısmını oluşturmalarının yanı sıra oldukça uzun ömürlü hücrelerdir. Osteoblast farklılaşması yoluyla mezenkimal kök hücre (MKH) soyundan türetilen osteositler dendritik bir morfoloji göstermektedirler. Bu hücrelerin içerisinde bulunduğu lakünler mineralize bir matriksle çevrilidirler. Bununla birlikte osteositler kemik tipine göre morfolojileri değişkenlik gösteren hücrelerdir (Rinaldo vd., 2015).

Osteoklastlar: İşlevi ait olduğu dokuyu rezorbe etmek olan özel hücrelerdir. Howship lakunası, osteoklastların kemik rezorbe etme aktivitelerinin bir sonucudur ve osteoklast hücreleri bu küçük çöküntüler içerisinde kemik matriksine yapışık bir şekilde görünürler. Monosit makrofaj soyuna ait mononükleer hücrelerin füzyonundan türetilen ve 4 ila 50 çekirdek içeren polikaryalardır. Bu hücreler kemiği rezorbe etmek için polarize olurlar, rezorbe olan lakunayı asitleştirirler ve proteolitik enzimler salgırlar(Fattore vd., 2012).

1.5. Kemik ve İlgili Patolojiler

Kemik hastalıkları, kemik dokusunda güç ve yoğunluk kaybına neden olabilir. Bu rahatsızlıklar anormal gelişim, besin eksiklikleri, bozulmuş damar sistemi, genetik bozukluklar ve diğer nedenlerden kaynaklı olabilir. Kemik hastalıklarının çok faktörlü doğası, travmaya bağlı yaralanmaların artması ve yaşlanan nüfus nedeniyle kemik doku bozuklukları büyük bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir. İlgili alandaki mevcut tedaviler optimal sonuçlar sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Belirli hastalıkların nedenlerinin

ve ilerlemesinin incelenmesi, aday terapötik stratejilerin geliştirilmesi gibi konular üzerine odaklanan doku mühendisliği çalışmaları bu ve diğer eksikliklerin üstesinden gelmek için önem arz etmektedir (Piroso vd., 2018). Kemik dokusunu etkileyen ana patolojilerin özetlenmesi ve karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2

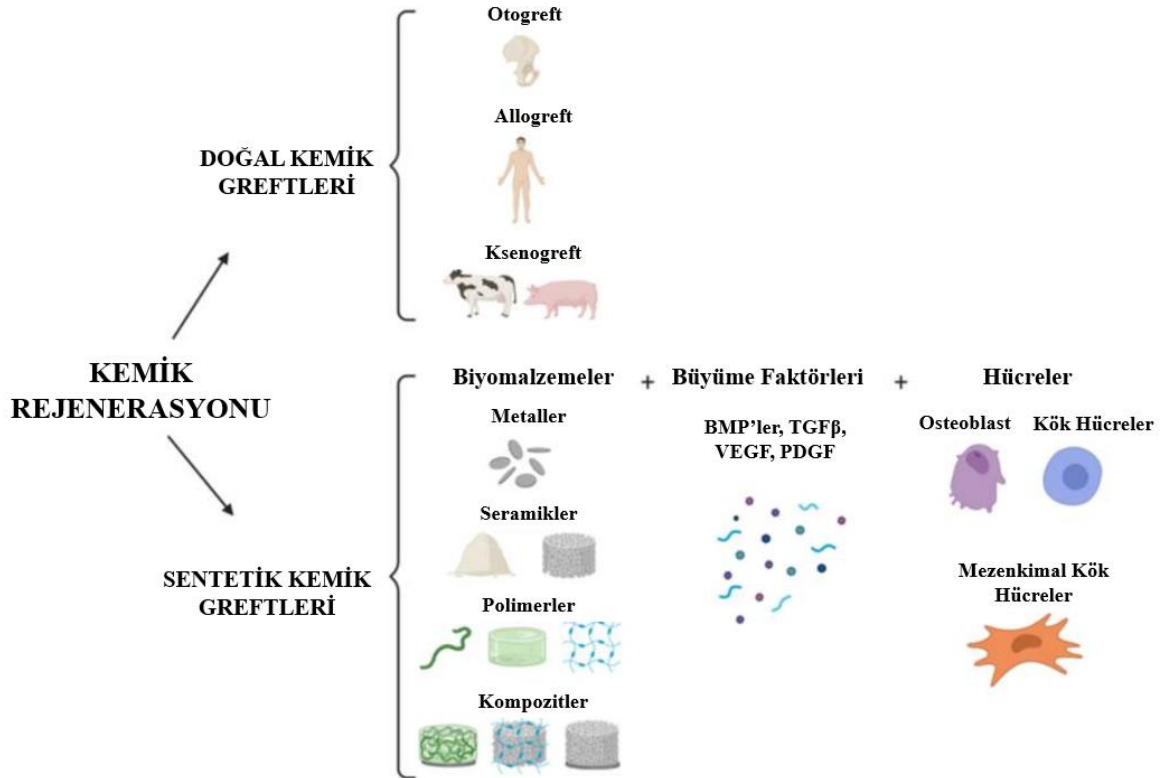
Kemik dokusu patolojilerinin risk faktörleri ve mevcut tedaviler (Piroso vd., 2018)

Patolojiler	Etiyoloji/risk faktörleri	Mevcut tedaviler
Osteoporoz, kemik yoğunluğunun kaybı	Kemik yeniden şekillenmesinin değişen dengesi: osteoklastlar tarafından daha fazla kemik uzaklaştırılması ve ardından osteoblastlar tarafından üretim	Osteoklast ömrünü kısaltan ve kemik rezorpsiyonunu engelleyen bifosfonatların uygulanması
Osteoartrit , kıkırdak ve kemiğin ilerleyici dejenerasyonu	Travmatik, doğuştan, ameliyat sonrası, metabolik, endokrin; yaş, aşırı eklem kullanımı, obezite yaygın risk faktörleridir	Fizyoterapi, ortopedik yardımcıları ve ortezler, farmakoterapi, total eklem replasmanı yoluyla semptomatik tedaviler
Osteomyelit, kemik içinde enfeksiyon	Staphylococcus aureus'un yanı sıra diğer Gram-negatif koklar ve Gram-pozitif basillerin neden olduğu enfeksiyon	Geniş spektrumlu antibiyotiklerin parenteral seyri ve cerrahi debridman
Osteonekroz, kemik hücrelerinin ölümü, artrit ve kemik yıkımı	Kemiğe yetersiz vasküler besleme; uzun süreli steroid tedavisi, alkol kötüye kullanımı, eklem yaralanması, artrit, kanser yaygın risk faktörleridir	Ağrı ve iltihaplanmayı azaltmak için nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar; kemik cerrahisi, aşılama ve eklem replasmanı
Kırıklar, kemik bütünlüğünün kaybı .	Ağırlıklı olarak travma; osteoporoz, düşük mineral yoğunluğu, yaş, tümörler yaygın risk faktörleridir	Kırık redüksiyonu ve immobilizasyon; kemik otogrefti, allogreft veya sentetik materyaller
Osteosarkom, kemik malignitesi	Çoğunlukla uzun kemiklerin medüller boşluğunda meydana gelir: çevresel faktörler, kromozomal anormallikler, p53 mutasyonu yaygın risk faktörleridir	Evreye bağlı olarak kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi (ampütasyon, greftleme, lokal eksizyon)

1.6.Kemik Doku Onarımı için Klinik İhtiyaçlar

Kırığa karşı normal fizyolojik reaksiyon, kısaca ilk enflamasyon olarak özetlenen spontan olaylar dizisidir. Ardından yumuşak kallus oluşumu, sert kallus oluşumu ve nihayetinde kemiğin yeniden şekillenmesi gelir. Kırık kaynamamalarında veya büyük ölçekli travmatik kemik yarananmasında olduğu gibi bu doğal süreç meydana gelmediğinde, cerrahi müdahale garanti edilir (Khan vd., 2008).

Kemik greftleme, kemik tedavisinin temel dayanağıdır. Kemik grefti, tek başına veya diğer malzemelerle kombinasyon halinde kullanılan, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenez yoluyla kemik iyileşmesini destekleyen implante edilmiş bir malzemedir . Doku canlılığı, kusur boyutu, greft boyutu, şekli ve hacmi, biyomekanik özellikler, greft kullanımı ve maliyet, ideal bir kemik greftinin seçimini etkileyen faktörlerden sadece birkaçıdır. Bu, bir otogreft (hastadan hasat edilmiş), bir allogreft veya ksenogreft (bir donörden veya hayvandan elde edilmiş), tasarlanmış bir sentetik veya biyomateryal ikamesi şeklinde olabilir. Yılda iki milyondan fazla kemik grefti yapılmaktadır (Tang vd., 2016).



Şekil 3. Kemik rejenerasyonlarında kullanılan doğal ve sentetik kemik greftleri (Ansari, 2019)

Kemik kırıklarının çoğu, uygun olmayan veya yetersiz kemik rejenerasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Büyük segmental kemik kırıkları içgüdüsel olarak tamir edilememekte ve ortopedik operasyon gerektirmektedir. Ayrıca spinal füzyon ameliyatları sıklıkla kaynamama ile sonuçlanabilmektedir. Kemik kusurları günümüzde kemik otogrefti (cerrahlar için altın standart), allogreftler ve biyouyumlu, osteointegratif “konakçı kemik dokusu ve ikame edilen materyaller arasında yoğun iletişim sağlayan”, osteokondüktif “malzemelerin konakçı kemik hücreleri ve kan damarları tarafından kolonize edebilen” ve osteoindüktif “ev sahibi mezenkimal kök hücreleri çevreleyen dokulardan kemik hücrelerine farklılaşmaya motive edebilen” özellikleri bünyesinde barındıran biyomalzemeler içeren yaklaşımlarla tedavi edilebilmektedir (Battafarano vd., 2021).

Son yıllarda kemik yerine geçen materyallerde çok sayıda yenilik gerçekleşmiş olmasına rağmen, kemik defektlerinin otolog kemik greftleme materyali ile tedavisi, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Otolog kemik, bir kemik aşılama malzemesinde istenen tüm özellikleri bir araya getirir: Kemik rejenerasyonu için gerekli hücrelerin iç büyümesi için bir yapı iskelesi sağlar (=osteokondüktif); kök hücrelerin çoğalmasını ve osteojenik hücrelere farklılaşmasını destekler (=osteindüktif) ve yeni kemik dokusu oluşturabilen canlı hücreleri tutar (=osteojenik). Bununla birlikte, bir hastadan alınan mevcut otolog kemik grefti hacmi sınırlıdır ve önemli bir donör bölgesi morbiditesi riski ile ilişkili olan greftleme materyalinin alınması için ek bir cerrahi prosedür gereklidir (Henkel vd., 2013).

Allogreftlerde, kemik grefti bir donörden alınmaktadır ve otogreft ile karşılaştırıldığında daha büyük miktarlarda elde edilebilmektedir. Standart toplama ve depolama protokolleri nedeniyle hastalık bulaşma riski ihmal edilebilir düzeydedir; ancak, bu greftler otogreftlerden daha yavaşlar ve daha düşük derecede entegrasyonla gerçekleşmektedir. Ksenogreftler veya heterolog greftler, diğer türlerden, genellikle domuz ve sığır kaynaklarından elde edilmektedirler. Ksenogreftlerin mevcudiyeti, potansiyel zoonoz bulaşma riskine rağmen, konakçı için güvenli ve doğru bir şekilde işlendiğinde teorik olarak sınırsızdır. Hem allogreftler hem de ksenogreftler, antijenisiteyi azaltmak için hücreleştirilmeye tabi tutulmaktadır, bu da onların doku mühendisliği kategorisine ait olmalarıyla sonuçlanmaktadır (Ansari, 2019).

Tablo 3

Kemik doku rejenerasyonlarında kullanılan greftlerin avantajları ve dezavantajları (Tang vd., 2016)

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
Otogreft	Osteoindüktif Osteoindüktif	Artan hasta morbiditesi: donör bölgesinde ağrı ve enfeksiyon, hasat sırasında iç organ yaralanması Vaskülarizasyon eksikliği Sınırlı miktar ve mevcudiyet
Allogreft veya Ksenogreft	Osteokondüktif Osteoindüktif Yüksek kullanılabilirlik Donör alan morbiditesi yok	Osteojeniklik ve vaskülarizasyon eksikliği Nispeten daha yüksek ret riski Hastalık bulaşma riski Daha yüksek maliyet
Biyolojik veya sentetik malzemeler kullanılarak tasarlanmış ikameler	Osteojenikliği ve greft entegrasyonunu iyileştirmek için büyüme faktörlerini ve kök hücreleri dahil etme yeteneği 3D baskı teknikleri kullanılarak defekt bölgesiyle eşleşecek şekilde kalıplanabilme Donör alan morbiditesi yok	Osteojeniklik, malzeme gözenekliliği ile sınırlıdır (üretim sürecinin bir sonucu olarak) Farklı malzemelerin değişik biyobozunurluğu Zayıf neovaskülarizasyon Bilinmeyen bağışıklık tepkisi Sınırlı mekanik özellikler

1.7.Kemik Doku Mühendisliği

Kaybolan veya hasar gören kemiği laboratuvar yapımı malzemeler kullanarak onarma girişimlerine ilişkin ilk raporlar, cerrahların kemik aşısı olarak kalsiyum fosfat kullanımını araştırmaya başladıkları 19. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. Kemik kusurlarını tedavi etmek için kullanılan implantlar, o zamandan beri, biyolojik olarak inert bir madde ile kusur hacmini basitçe doldurarak kayıp kemiği değiştirmeyi amaçlayan stratejilerden, biyolojik olarak aktif malzemeler kullanarak fonksiyonel kemik dokusunun yenilenmesine yönelik stratejilere doğru evrilmiştir. Sonraki yıllarda farklı malzeme türleri tanıtılmış ve kemik doku mühendisliği sonunda 1990'larda bağımsız bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır (Koons vd., 2020).

Doku mühendisliği, tedavi amacıyla doğal dokuların ve hücrelerin rejenerasyonunu ve büyümesini kolaylaştırmak için özel olarak tasarlanmış geçici yapay ortamlar yaratarak kemik greftleri oluşturmaya alternatif bir yaklaşımdır. Kemik doku mühendisliği bu

bağlamda, kemik dokusu büyümesi için destekleyici bir ortam yaratmak amacıyla kontrollü gözenekliliğe sahip üç boyutlu yapıların oluşturulmasını içerir. Bu yapılar genellikle kemik iskeleleri olarak bilinir (Wubneh vd., 2018).

Elektroeğirme, dondurarak kurutma, biyobaskı ve hücreleştirme gibi çeşitli yapı iskelesi üretim teknikleri doku mühendisliğinin ön saflarında yer almaktadır. Bu imalat yöntemleriyle birlikte kemik doku mühendisliği için çok çeşitli malzemeler seçilmiştir. Bu seçim genellikle inorganik ve doğal bileşenlerden oluşan, oldukça hiyerarşik bir şekilde organize edilmiş kompozit bir malzeme olan kemik dokusunun fonksiyonel ve biyolojik gereksinimlerine dayanmaktadır (Collins vd., 2021).

Yapı iskeleleri, hastalıklı bölgede yeni doku oluşumuna kadar mekanik destek sağlarken, hücre adezyonu ve proliferasyonu için geçici şablon görevi gören gözenekli üç boyutlu matrislerdir. Yapı iskeleleri ayrıca , konakçının bağışıklık tepkisini veya toksik metabolitlerin salgılanmasını aktive etmeden doğal hücre dışı matrisini taklit edebilir. Metaller, seramikler, doğal ve sentetik polimerler ve bunların kombinasyonları gibi çeşitli malzemeler, hasar görmüş veya travmatize olmuş kemik dokularının değiştirilmesi ve onarılması için araştırılmıştır (Kashte vd., 2017).

Kemik doku mühendisliği uygulamalarına uygun bir iskele yapmak için modüle edilebilen, iyileştirilebilen veya değiştirilebilen iskele özellikleri; biyolojik gereksinimler, yapısal özellikler, biyomalzeme bileşimi ve imalat süreci türleri olmak üzere dört ana tipte gruplandırılabilir (Roseti vd., 2017).



Şekil 4. Kemik doku mühendisliği uygulamaları için ideal iskelede bulunması gereken özellikler

(Roseti vd., 2017)

İdeal bir kemik doku mühendisliği iskelesi, osteoprogenitör hücrelerin bağlanmasına, çoğalmasına ve fonksiyonel kemik dokusuna farklılaşmasına, yani kemik hücreleri için bir büyüme matrisi olarak hizmet etmesine olanak vermelidir. Daha spesifik olmak gerekirse, yapı iskelelerinin aşağıdaki beş özelliği taşıması beklenir (X. Y. Zhang vd., 2017):

1. İyi biyoyumluluk;
2. Kemik hücresi infiltrasyonu ve büyümesi için uygun gözenek boyutları ve gözenekliliği;
3. Bitişik kemik dokusu ile karşılaştırılabilir mekanik özellikler;
4. Osteokondüktivite ve osteoindüktivite;

5. Biyobozunurluk. Kemik defekti iyileştiğinde orijinal protezden eser kalmamalıdır. Bozunma ürünlerinin insan vücudu üzerinde hiçbir yan etkisi olmamalıdır.

Biyouyumluluk: Konakta lokal veya sistemik olumsuz etkiler ortaya çıkarmadan veya uyandırmadan moleküler sinyalizasyon sistemleri dahil olmak üzere normal hücre sel aktiviteyi destekleme yeteneğidir. Vücutta iskele implantasyonu üzerine ortadan kaldırılması, en aza indirilmesi veya kontrol edilmesi gereken, istenmeyen etkilere sitotoksosite, genotoksosite, immünojenisite, mutajenisite, trombojenisite ve şişme vb. durumlar örnek verilebilir. Örneğin, rejenerasyon oranını azaltabileceği ve doku reddini artırabileceği için iltihaplanmadan kaçınılmalıdır (Velasco vd., 2015).

Birbirine bağlı gözenekler ve yüksek gözeneklilik, hücre bağlanmasına, 3 boyutlu doku yenilenmesine, hücre büyümesine, çoğalmasına ve farklılaşmasına, atıkların difüzyonunu ve yapı iskelelerinin bozunma ürünlerini kolaylaştırmasına olanak tanır (Qu vd., 2019). Gözenek boyutu, hücrelerin göç etmesine izin verecek kadar büyük, ancak hücrelerin yapı iskelesine bağlanmasına izin verecek kadar küçük olmalıdır (Chocholata vd., 2019).

İdeal bir kemik iskelesinin mekanik özellikleri, konakçı kemiğin özellikleriyle eşleşmelidir ve uygun yük transferi bu bağlamda önemli bir parametredir. Kemiğin mekanik özellikleri süngerimsi kemikten kortikal kemiğe kadar geniş ölçüde değişkenlik göstermektedir. Kortikal kemiğin Young modülü 15 ila 20 GPa arasında ve süngerimsi kemiğin modülü 0,1 ila 2 GPa arasındadır. Basınç dayanımı kortikal kemik için 100 ile 200 MPa arasında ve süngerimsi kemik için 2 ile 20 MPa arasında değişmektedir. Mekanik özellikler ve geometrideki büyük çeşitlilik, 'ideal bir kemik iskelesi' tasarlamayı zorlaştırır (Maia vd., 2022).

Osteokondüktivite, tüm yüzeylerinde hücre dışı matiks (HDM) oluşumunun yanı sıra kemik oluşturan hücrelerin çoğalmasına ve yapışmasına izin vermesi gerektiğinden, iskelenin yüzeylerinde ve gözeneklerinde osteogenezi teşvik etme kabiliyetini ifade eder. İskelenin osteokondüktivitesi, iskelenin kimyasal bileşimi, yapısı, biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, hidrofilikliği, gözenekliliği ve mekanik özellikleri gibi çeşitli parametrelerle belirlenir. İdeal bir yapı iskelesi, anjiyogenezin yanı sıra osteogenez için gerekli olan besinlerin, atıkların ve oksijenin difüzyonuna izin vermek için ortalama 100 µm gözenek boyutuna sahip olmalıdır.

Osteoindüksiyon, yapı iskelesinin progenitör hücreleri iyileşme bölgesine toplama ve biyomoleküler sinyalleme yoluyla onların osteojenik farklılaşmasını destekleme yeteneği olarak tanımlanabilir. İskelenin pürüzlü yüzeyinin ve nano ölçekli yapılarının, kök hücrelerin osteoblastlara osteojenik farklılaşmasını desteklediği gözlemlenmiştir. Oksijen kısmi basıncı azaltılmış implantların, kan damarlarındaki perisitlerin kemik oluşturan hücrelere farklılaşmasını teşvik ettiği de gözlenmiştir (Abdelaziz vd., 2023).

Biyobozunur malzemeler, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri nedeniyle kemik dokusu mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Greft bozuldukça, kemik dokusu greftin iç kısmına doğru büyür ve bozunmanın ürettiği küçük biyomoleküller, kemik dokusunun büyümesine uyum sağlamak için rejeneratif mikro ortamı düzenleyebilir. Aynı zamanda greftin mekanik özellikleri giderek azalır ve vücudun biyolojik stresi greftten yeni kemik dokusuna geçer, bu da doku rejenerasyonunu uyarmaktadır. Bu nedenle, bozunabilir biyomateryal, ikinci bir ameliyatın neden olduğu yaralanmayı ve buna bağlı ekonomik yükü önler (Wei vd., 2020).

1.8.Kemik Doku Mühendisliğinde Biyomalzemeler

Biyomalzeme kavramı, "canlı sistemlerin bileşenleri ile etkileşimlerini kontrol ederek herhangi bir terapötik veya teşhis prosedürünün seyrini yönlendirmek için kullanılan, bir form almak üzere tasarlanmış bir madde" olarak tanımlanmıştır. Biyomalzemelerdeki yaklaşımlar, hastalıklı bir doku veya organın yapısal yönünü değiştirme ve fonksiyonel biyolojiyi geri kazandırabilen rejeneratif süreçleri tetikleme/kullanma arzusuyla yönlendirilir (W. Cui vd., 2022).

Doğal ve sentetik polimerlerden biyoseramiklere ve bunların kompozitlerine kadar değişen farklı biyomalzemeler, kemik dokusunun özelliklerini olabildiğince taklit etmek için çeşitli teknikler kullanılarak üretilmektedir (Maia vd., 2022).

İskelelerin temel bileşenleri olan biyomalzemeler (biyomedikal malzemeler), kemik doku mühendisliğinde önemli rol oynamaktadır. Arkeolojik bulgular, insan veya hayvan kemikleri ve dişleri, mercanlar, kabuklar, tahta ve çeşitli metaller (altın, gümüş ve amalgam) gibi malzemelerin eksik insan kemikleri ve dişlerinin yerine kullanıldığını göstermiştir. Örneğin, eski zamanlarda Etrüskler, hasarlı dişleri öküz kemiklerinden elde edilen yapay aşılarda değiştirmeyi öğrendiler. 1960'ların başlarında, biyolojik kemik ikame malzemelerinin sınırlamaları, "Biyomateryaller" adı verilen multidisipliner bir alanın ortaya

çıkmasına neden oldu. Biyomalzemeler, vücuttaki doku veya organların değerlendirilmesi, tedavisi, büyütülmesi, onarımı veya değiştirilmesi için kullanılır. Eski alternatif malzemeler çoğunlukla biyo inerttir ancak malzemeyi çevreleyen dokularla daha az etkileşime girer ve hatta insanlar için toksiktir. İdeal bir biyomateryal sitotoksik olmamalı, basılabilir, biyolojik olarak parçalanabilir, biyoaktif ve *in vivo* osteokondüktif olmalıdır. İskelelerin çeşitli ihtiyaçları nedeniyle, mükemmel özelliklere sahip iki veya daha fazla malzemeden oluşan kompozit materyaller, kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Qu vd., 2019).

Son yüzyılda, çeşitli biyomalzemeler cerrahi implantasyonda yaygın olarak kullanılmıştır. Polimer malzemeler, parçalanabilirlik, biyoyumluluk ve işlenebilirlik kolaylığı gibi iyi özelliklerinden dolayı doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik ve doğal olmak üzere iki tür polimer malzemeden bahsedilebilir. Polimer malzemeler, moleküler ağırlıkları, polidispersiteleri, kristallikleri, termal geçişleri ve polimer iskele özelliklerini güçlü bir şekilde etkileyecek farklı bozunma hızları bakımından farklılık gösterir. Örneğin, polimer hidrofobikliği ve kristallik yüzdesi hücre fenotipi etkileyebilirken yüzey yüklerindeki sapma hücre yayılmayı etkilemektedir. Dolayısıyla bu özellikler, hücre aktiviteledeki değişikliklerin nedeni olabilir (Sabir vd., 2009).

1.9.Kemik Doku Mühendisliği için Sentetik Polimerler

Çoğu araştırma, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan cihazlarda halihazırda kullanılan polimerlere odaklanmış olsa da yeni polimerlerin büyük kitaplıklarının hücre fenotipi üzerindeki etkisini doğrudan değerlendirmek için yüksek verimli tarama yaklaşımları da devam etmektedir (Stevens, 2008).

Doğal malzemelerle karşılaştırıldığında, sentetik malzemeler belirlenmiş kimyasal ve fiziksel özellikler için tasarlanabilir ve özelleştirilebilir olmaları sebebiyle bazı avantajlar sunmaktadırlar. Bu özellikler, gerilme mukavemeti, esneklik ve bozunma oranı dahil olmak üzere yapı iskelelerinin kontrol edilebilir mekanik özelliklerine ve toksisite, immünojeniklik ve enfeksiyon risklerinin azaltılması gibi arzu edilen biyolojik sonuçların uyarlanmasına katkıda bulunur. Bununla birlikte, sentetik malzemeler, biyoyumluluk, osteoindüktivite ve osteokondüktivite gibi biyoaktif özelliklerden yoksundur ve kullanımdan önce daha fazla modifikasyon gerektirir (Cheng vd., 2016).

Yaygın olarak kullanılan bazı sentetik polimerler ve özellikleri Tablo 4’de verilmiştir (Ghassemi vd., 2018).

Tablo 4

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan bazı sentetik polimerlerin özellikleri (Ghassemi vd., 2018)

İsim	Mekanik Özellikler	Avantajlar	Uygulamalar	Toksosite
Polilaktik asit (PLA)	+++	biyouyumlu biyolojik olarak parçalanabilir hücre yapışmasını destekler	Kemik dokusu mühendisliği sinüsler ve burun boşluğu dolgusu	toksik değil enflamatuvar değil FDA onaylı
Poli glikolik asit (PGA)	+++	biyouyumlu biyolojik olarak parçalanabilir hücre yapışmasını destekler	kemik doku mühendisliği	toksik değil enflamatuvar değil FDA onaylı
Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	+	biyolojik olarak parçalanabilir hücre yapışmasını destekler	kemik doku mühendisliği	immünojenite sergiler ve patojenik safsızlıklar içerir FDA onaylı
Poli etilen glikol (PEG)	+	biyouyumlu hücreleri yapı iskelelerine yönlendirme vücutta ozmotik etkiler	kemik rejenerasyonu eczacılık tıp-biyoloji endüstriyel kimya sinüsler ve burun boşluğu dolgusu	oksik değildir FDA onaylıdır
Poli ε-kaprolakton (PCL)	++	biyolojik olarak parçalanabilir	kemik doku mühendisliği	toksosite eksikliği FDA onaylı
Polivinil alkol (PVA)	+++	biyolojik olarak parçalanmaz organik çözücülere karşı yüksek direnç	kalıcı implantlar	oral tüketimde çok az toksik etki
Polipropilen fumarat (PPF)	++	biyouyumlu uygun fiziksel özellikler ve bozunma hızı	biyomedikal mühendisliği ortopedik uygulamalar	toksik değildir FDA onaylıdır
poliakrilik asit (PAA)	+	biyolojik olarak parçalanmaz	kalıcı implantlar	Belirgin olmayan sitotoksik etki FDA onaylı
Poliüretan (PUR & PU)	+	değişken parçalanabilirlik enjekte edilebilirlik	doku mühendisliğinde yumuşak ve sağlam doku kemik çimentosu	-

1.10. Kemik Doku Mühendisliği için Doğal Polimerler

Biyopolimerler, bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilebilmekle birlikte bakteriyel veya ekolojik kaynaklardan da elde edilebilen ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerdir (Pramanik vd., 2022). Hücre dışı matris ile biyobozunurluk ve yapısal benzerlik, doğal polimerleri kemik rejenerasyonu için uygun bir aday yapmaktadır. Doğal polimerlerin ana avantajı, kimyasal yapılarının biyolojik olarak tanınması nedeniyle yüksek derecede iskele-doku uyumluluğudur (Ozdil & Aydin, 2014). Hücre adezyonu, hücre hareketliliği ve hücre bölünmesi temel olarak hücre dışı matris yapısına bağlıdır ve doğal polimerler, dokuların doğal özelliklerini *in vitro* veya *in vivo* olarak ölçülü bir şekilde özetlemek için önemli bir başlangıç noktası olarak yardımcı olmaktadır (Pramanik vd., 2022).

Son zamanlarda, doğal polimer bazlı kompozitler, kemik doku mühendisliği uygulamaları için sentetik polimer kompozitlerden daha fazla ilgi görmektedir. Bunun nedeni genellikle doğal polimerlerin biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir davranışlarıdır (Biswal, 2019). Doğal polimerler genellikle oldukça organize yapılara sahiptir ve hücre reseptörlerine bağlanmak için gerekli olan, ligand adı verilen hücre dışı bir madde içerebilir. Kemik dokusu mühendisliğindeki uygulamaları için çeşitli doğal polimerler rapor edilmiştir. Doğal polimerik malzemeler, polisakkaritleri veya proteinleri ve lignoselülozlar gibi çeşitli biyolifleri içeren biyopolimerlerdir (Swetha vd., 2010). Doğal polimerler içerisinden protein ve polisakkaritler, hücre yapışmasını ve fonksiyonlarını desteklemek için HDM ile olan benzerlikleri sebebiyle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan başlıca doğal türevli ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerdir (Shi vd., 2016).

Doğal kaynaklı parçalanabilir polimer hidrojeller ve bunların türevleri, hücreleri kapsüllemek, hücre çoğalmasını ve doku yenilenmesini desteklemek için başarıyla kullanılmıştır. Kısacası doğal polimerler, HDM yapılarına benzemeleri, toksik olmamaları ve enflamatuar veya immünolojik reaksiyonları uyarmamaları açısından avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, bu polimer yapı iskeleleri vücut içerisinde bozunabilir ve metabolizma süreci yoluyla vücut tarafından emilebilir (W. Zhao vd., 2013).

Tablo 5

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan bazı doğal polimerlerin uygulamaları, avantajları ve dezavantajları (Guo vd., 2021)

Polimer	Avantaj	Dezavantaj	Formülasyon
Kitosan	Biyouyumluluk, biyobozunurluk, antimikrobiyal aktivite, immünojeniklik yok	Düşük stabilite, zayıf mekanik dayanım	Kompozit yapı iskeleleri, hidrojeller, sünger, mikro-nanosfer
Kollajen	Biyouyumluluk, biyobozunurluk, hidrofilitiklik, yüksek gözeneklilik, diğer polimerlerle birleşme kolaylığı	Zayıf sertlik, düşük antijenite	İskeleler
Jelatin	Biyouyumluluk, biyobozunurluk, jelleşme yeteneği	Düşük mekanik özellikler, hızlı bozunma oranı	Hidrojeller, mikro-nanosfer
Selüloz	Biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüksek mekanik dayanım	Düşük hücre bağlama özellikleri	Kompozit iskeleler
aljinat	Biyouyumluluk, biyobozunurluk, jelleşme yeteneği	Düşük mekanik özellikler	Hidrojeller, mikro-nanosfer
Nişasta	Biyouyumluluk, biyobozunurluk	Düşük yüzey alanı, kırılğan	Kompozit iskeleler

1.11. Keratin

Keratin, kükürt amino asitleri içeren lif proteinleri grubundan bir polimerdir. Keratinin moleküler zincirleri, disülfit bağları yoluyla güçlü enine bağlar oluşturur ve fibröz yapıda uygun mekanik özellikler sağlar. Ayrıca keratinin doğal biyoyuymuluk, biyobozunurluk, uygun fiziksel ve mekanik özellikler, doğal bolluk, antimikrobiyal özellikler ve hücre sel uyumluluk gibi avantajları doku mühendisliği uygulamalarında çekiciliklerini artırmaktadır (Naderi vd., 2020).

Keratin, saç, boynuz, tüy, yün ve tırnak gibi hücre iskeleti ve epidermal yapıların büyük kısmını oluşturan ara filamentler ile birleşen, sistein açısından zengin bir fibröz proteindir. Bu biyopolimerler, özellikleri ve yapıları bakımından geniş farklılıklar göstermekle birlikte kükürt miktarına göre sert ve yumuşak keratinler olarak

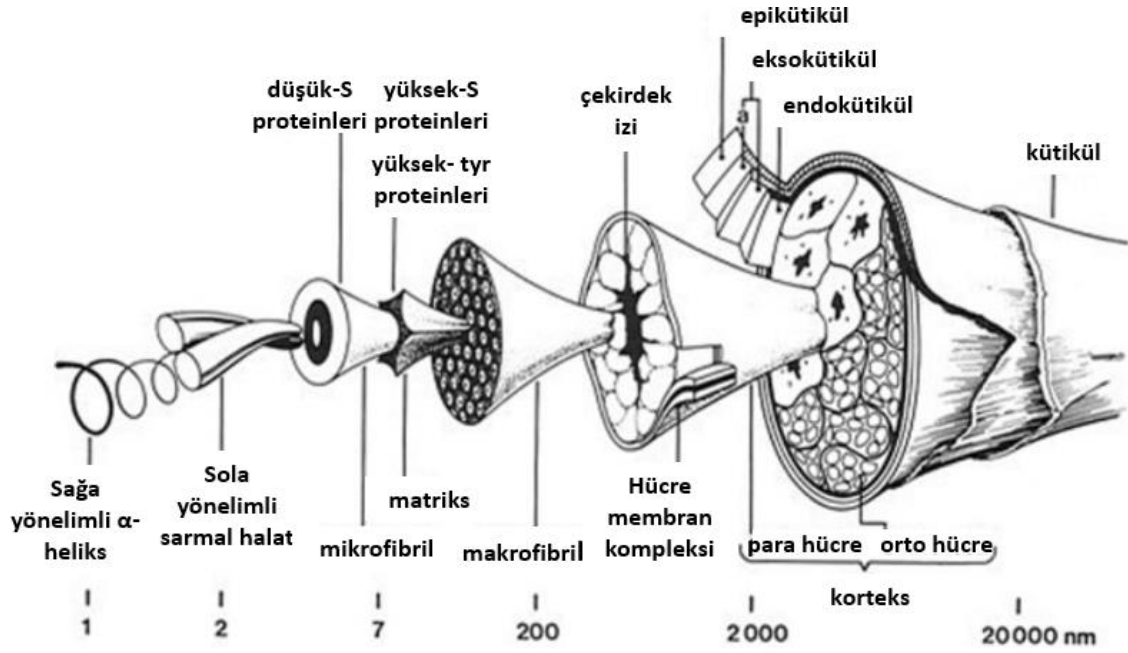
sınıflandırılabilirler. Keratin üzerine 1940 ve 1970 yılları arasında yapılan araştırmalar, biyomalzemelerin temellerine yönelik yeni bir yaklaşım sunmuştur. Birçok keratin sınıfı ve alt sınıfının çeşitli özellikleri farklı bilimsel çalışmalar kapsamında incelenmiştir (Feroz vd., 2020).

Keratin, polipeptit sınıfından bir proteindir ve hem polar olmayan hem de polar asitlerin intra ve inter moleküler bağlarıyla birlikte disülfidsistein amino asidinin moleküller arası bağlantısına sahip bir dizi amino asitten oluşmaktadır. Keratin, biyolojik özellikleri ve amino asitlerin çok işlevli yapısı nedeniyle hücre yapışmasını ve çoğalmasını kolaylaştırabilir (Biswal, 2019).

Keratin, omurgalıların belirli epitel hücrelerinde bulunan en önemli yapısal ara filament proteinlerden biridir. Keratin proteinleri, uzun polipeptit zincirleri ve çapraz bağlanan liflerle örüldür. Polipeptit zincirleri, keratinin temel makromoleküler yapısını oluşturur. Keratinler sağlam, oldukça kararlı ve organik çözücülerin çoğunda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. Ayrıca proteolitik enzimler tarafından enzimatik bozunmaya karşı dirençlidirler. Keratindeki yüksek sistein içeriği, mekanik ve kimyasal direnç sağlamaktadır. Keratin proteini ayrıca yüksek bir termal dirence sahiptir ve 100 °C'den daha yüksek bir sıcaklıkta denatüre olabilmektedir (Chilakamarry vd., 2021).

Molekül içi ve moleküller arası disülfid, hidrofobik, hidrojen ve iyonik bağların varlığı, keratine mükemmel gerilme özellikleri tokluk, çözünmezlik, enzimatik parçalanmaya karşı direnç ve yüksek stabilite verir. Kollajenden farklı olarak keratin, yüksek denatürasyon sıcaklığı nedeniyle ısıl işleme dirençlidir, suya toleranslıdır ve daha az kırılıgandır (Ranjit vd., 2022).

Yünün lifi yapısı son derece karmaşıktır ve yaklaşık %82 oranında sistein aısından zengin keratinöz proteinler, yaklaşık %17 oranında hücre zarında yer alan sistein aısından fakir keratinöz olmayan proteinler, yaklaşık %1 oranında mumsu lipidler ve az miktarda polisakaritten oluşmaktadır. Genel olarak yün ve insan saçı birçok benzer özelliğe sahiptir. Kütikülün üst üste binen düz kütikül hücreleri, iç şeklindeki kortikal hücrelerin oluşturduğu korteksi çevreler. Bununla birlikte, yün insan saçıdan önemli ölçüde daha küçük bir çapa sahiptir (20 µm'ye karşı 80 µm) . Saç ve yüne özğü keratinlerin izoelektrik noktası (pI) 4,7–5,4'tür (Rajabi vd., 2020).

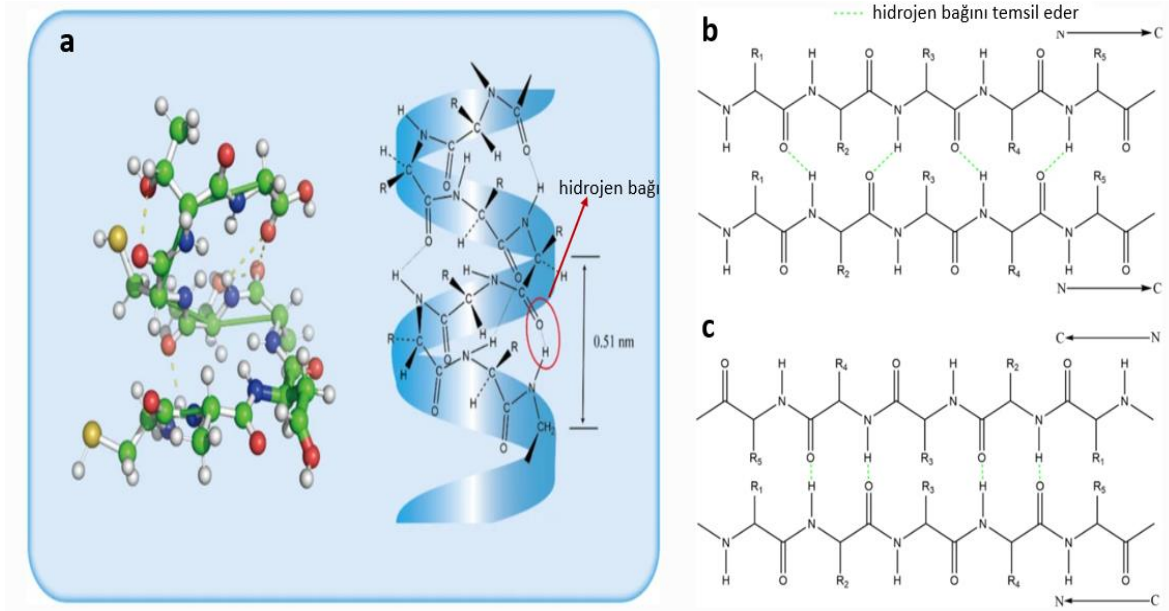


Şekil 5. Yün keratininin yapısı
(Rajabi vd., 2020)

Keratin proteinleri, kendiliğinden bir araya gelme ve gözenekli, lifli iskeleler halinde polimerleşme konusunda içsel bir yeteneğe sahiptir. Keratin solüsyonlarının kendiliğinden birleşmesi, hem mikro ölçekte hem de makro ölçekte gerçekleşebilir. Ek olarak, yün ve insan saçından elde edilen keratin biyomalzemelerinin, lösin-aspartik asit-valin (LDV) ve glutamik asit-aspartik asit-serin (EDS) gibi hücre bağlama motiflerine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu özellikler hücre sel sızmaya, bağlanmaya ve çoğalmaya izin veren uygun bir üç boyutlu matris oluşumuna katkı sağlar. Diğer ara filamentler gibi, keratinlerin de hücre sel davranışa aracılık eden bazı düzenleyici işlevlere katıldığına inanılmaktadır. Bu nedenle, rejenere keratin biyomalzemeleri içerisindeki biyolojik aktivitenin korunması, çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında spesifik biyolojik fonksiyonların kontrolü için avantajlı olabilir (Rouse & Van Dyke, 2010).

Keratin, birincil yapı seviyesinde 19 amino asidin kopolimerizasyonu ile oluşturulur. İkincil yapı seviyesinde ise iki farklı yapıdan söz edilebilir: α -heliks (Şekil 6a) ve β -tabaka (Şekil 6b); α -heliks yapısı uygun esnekliğe sahiptir ve β -tabaka yapısı yüksek gerilme mukavemetine sahiptir. Keratin, α -sarmal ve β -tabaka yapısını içermesi nedeniyle güçlü tokluğa ve mekanik dayanıma sahiptir. Üçüncül yapı düzeyinde, keratin moleküllerinin α -heliks yapısı, peptit zincirleri içerisinde hidrojen bağları içerirken β -tabaka yapısı, peptit

zincirleri arasında hidrojen bağları içermektedir. Keratin makromoleküllerinin ana zincirleri esas olarak disülfid bağlarının ve hidrojen bağlarının etkisiyle birleşir, böylece peptit zincirleri çapraz bağlanır ve yoğun bir üç boyutlu ağ yapısı oluşur. Bu sayede keratinin suda çözünmeyen ve belirli bir stabiliteye sahip yapısı oluşmaktadır (Yan vd., 2022).



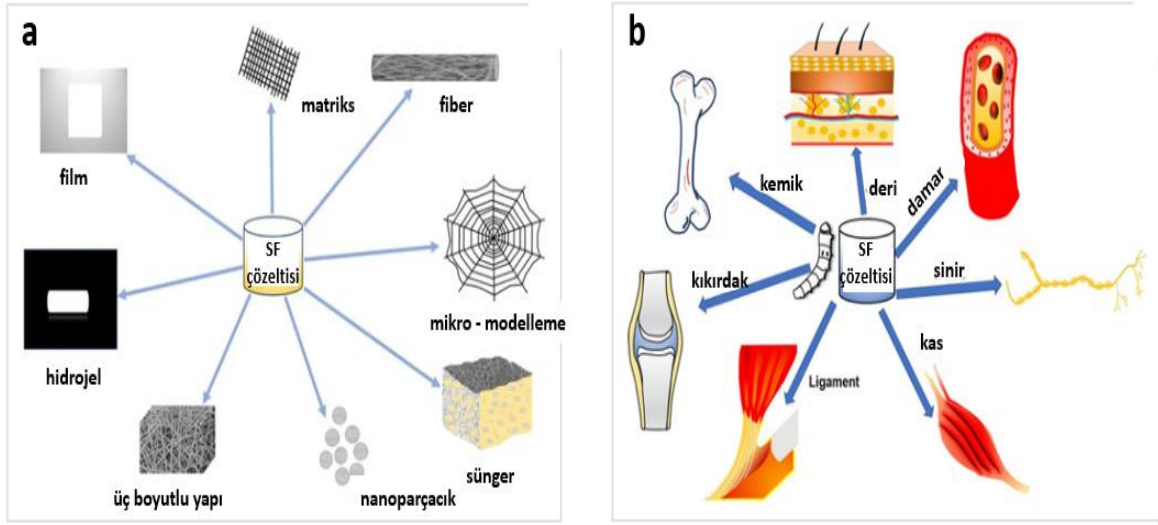
Şekil 6. Keratinin (a) α -heliks ve (b) β -tabaka yapısı (Yan vd., 2022)

1.12. İpek Fibroini

İpekböceği ipeği, parlaklık, hafiflik, esneklik ve güçlü mekanik mukavemet gibi olağanüstü fiziksel özelliklerinden dolayı geleneksel tekstil endüstrisinde 4000 yılı aşkın bir süredir ticarileştirilmiştir. Ayrıca ipek, FDA tarafından sütürlerde kullanım için onaylanmıştır ve yaklaşık olarak son 20 yıldır biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Sun vd., 2021).

Son araştırmalarda, ipekböceği ipeğinin yapı iskeleleri için potansiyel olarak mevcut materyallerin birçok sınırlamasının üstesinden gelebilecek olasılıkları üzerinde durulmuştur. İpek fibroini, biyoyumluluk, ayarlanabilir biyobozunma, minimum immünojenisite, çeşitli formatlara uyarlanabilirlik, mükemmel mekanik dayanım, kolay erişilebilirlik, maliyet etkinliği ve çevre dostu işleme teknikleri gibi özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde kullanılmak üzere potansiyel sunmaktadır. SF aynı zamanda farklılaşma, çoğalma ve bağlanma gibi hücrel davranışları sinerjistik olarak teşvik edebilen SF-bazlı kompozit

iskeleler oluşturmak için diğer polimerlerle birleştirilebilir ve SF-bazlı biyomateryalleri çeşitli materyal formatlarında imal etmek mümkündür (G. Li & Sun, 2022).



Şekil 7. İpek fibroininin (a) farklı materyal formlarında kullanımı ve (b) farklı uygulama alanları

(G. Li & Sun, 2022)

Biyotıp için işlevsellik, araştırma odaklarından biri haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, SF'nin hücre adezyonunu, ilaç yükleme kapasitesini ve osteoindüktivitesini araştırmayı amaçlamaktadır. Lifli yapı, SF'nin tipik özelliğidir. Farklı gözeneklilik ve lif kalınlığına sahip SF-bazlı yapı iskeleleri, makrofajların ve T hücrelerinin bağışıklık aktivasyonunda değişiklikler meydana getirebilir ve dolayısıyla inflamatuvar yanıtın farklı ipek fibroin mimarileri aracılığıyla düzenlenebileceği söylenebilir (Fan vd., 2022).

Doğal ipek lifi, bir serisin tabakasıyla kaplı iki fibroin çekirdeğinden oluşur. Doğada serisin, kozanın yapısını korumaya yardımcı olmayı amaçlayan bir yapıştırıcı gibi davranır. Öte yandan, ipeğin bir biyomateryal olarak kullanımı değerlendirildiğinde, implantasyonun ardından vücut içerisinde ters bir bağışıklık tepkisine neden olabilecek serisin proteininin yapıdan uzaklaştırılması önem arz etmektedir. Sakızlı serisin proteini, ipekböceği kozalarının tuzlu suda kaynatılması işlemiyle kolayca uzaklaştırılabilmektedir (Sell vd., 2010).

İpeğe karşı alerjik reaksiyonların, ilk olarak onun biyomedikal uygulamalardan dışlanmasıyla sonuçlanan serisine atfedildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda

sadece serisin biyouyumlu bir materyal olarak kabul edildiğinden, bu reaksiyonlara serisin ve fibroin kombinasyonunun neden olduğu düşünölmektedir. Fibroini kaplayan yapışkan benzeri protein serisin, gam giderme olarak da bilinen kozaların termokimyasal bir işlemlle yapıdan uzaklaştırılabilir (Melke vd., 2016).

SF, küçük hidrofilik gruplar tarafından kesintiye uğrayan, hacimli, tekrarlayan modöler hidrofobik alanlara sahip ve büyük moleköler ağırlığa (200-350 kDa veya daha fazla) sahip bir proteindir. *B. mori*'nin ipek lifi, bir disülfid bağı ile birbirine bağlanmış bir ağır (A) ve bir hafif (H) zincirden oluşur. A zincirlerinin hidrofobik alanları Gly-X (X, Ala, Ser, Thr, Val'dir) tekrarları içerir ve anti-paralel β -tabakaları oluşturabilir. H-zinciri doğası gereği hidrofiliktir ve nispeten elastiktir (Kundu vd., 2013). Yapıdaki yüksek glisin içeriğinin, örneğın potasyum fosfat veya metanol işleml ile indüklenebilen son derece kararlı β -yapraklı nanokristaller halinde sıkı bir paketlemeye izin verdiği söylenebilir (Melke vd., 2016).

İpeğın araştırmacıları cezbeden mekanik özellikleri ile ilgili olarak, kopma mukavemeti, modölü ve uzamanın uygun dengesi, esneklik ve sertlikle sonuçlanmaktadır. İpeğın mukavemet-yoğunluk oranı çelikten on kat daha fazladır. Bu üstün mekanik özellikler göz önüne alındığında, ipek lifinin yüksek çekme mukavemeti sütün için uygunken, esnekliğı ise yük taşıyıcı iskele hazırlamak için uygundur. İpek fibroininin bu özellikleri, farklı formlarda SF bazlı materyaller tasarlarırken geniş seçenekler sunabilir (Ma vd., 2018).

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Roche C. de Guzman ve arkadaşları FDA onaylı, kollajen temelli, klinikte kemik doku rejenerasyonunu hızlandırmak için kullanılan Infuse adlı biyomateryalin dezavantajlarından bahsetmiş ve onun yerine kullanılabilir bir keratoz biyomalzeme önermişlerdir. Infuse ile karşılaştırıldığında keratoz biyomateryallerin kemik morfogenetik proteini (BMP-2) salınımını daha kontrollü şekilde gerçekleştirdiği ve bunun nedeninin malzemelerin bozunma mekanizmasıyla ilgili olduğunu göstermişlerdir. BMP-2 ile modifiye edilmiş keratoz iskeleleri sıçan femurlarında oluşturulan defektlerin yerine yerleştirdikten sonra kemik doku rejenerasyonunu kontrollü bir şekilde incelemişlerdir. Yapılan analizler sonucu elde edilen verilere göre keratoz yapı iskelesinin direkt olarak doku rejenerasyonunu indüklemeye özelliğini göremeseler de implante edildikleri bölgede yağ dokusu oluşumunu engelleyerek rejenerasyonu hızlandırdıkları ve Infuse yerine kullanılabilir bir biyomateryal olduğunu göstermişlerdir (de Guzman vd., 2013).

George J. Dias ve arkadaşları yoğun gözenekli, hidroksiapatit (HA) içerikli, keratin iskele (KP) ve yoğun hidroksiapatit içerikli keratin iskele (KS) ile ticari olarak bulunabilen polilaktik asit hidroksiapatit kompozit iskelenin (PLA-HA) kemik doku rejenerasyonlarına etkilerini karşılaştırmışlardır. Elde edilen keratin temelli kompozit yapı iskelelerini koyunların uzun kemiklerinde denemişler, doku rejenerasyonunu belli zaman aralıklarında incelemişler, rejenerasyon dokunun histolojik ve mekanik özelliklerini analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre PLA-HA iskelenin 18 aydan daha uzun süre bozunma davranışı göstermeyip doku rejenerasyonuna yardımcı olduğu doğrulanmıştır. Karşılaştırılan üç kompozit yapı iskelesinin de inflamasyona veya enfeksiyona sebep olmadığını göstermişlerdir. Bununla birlikte KS iskelenin hızlı bir bozunma gerçekleştirmesi ve 8 haftadan sonra rejenerasyonu yavaşlatması nedeniyle yeterli etkinlikte olmadığını göstermişlerdir. Ancak KP iskelenin karşılaştırılan diğer iki malzemeye göre üstün özellikler gösterdiğini vurgulamışlardır. İmplantasyondan 18 hafta sonra defekt bölgesinin tamamen rejenerasyon olduğunu ve orijinal kemiğe yakın mekanik özellikler sunduğunu gözlemlemişlerdir (Dias vd., 2010).

Xinxin Zhao ve arkadaşları elektrospinning yöntemi kullanarak CaP kaplı, polikaprolakton (PCL) içerikli ve çapraz bağlanmış bir yapı iskelesi imal etmişlerdir. Bu

iskelenin imalatı için öncelikle PCL ve keratini karıştırarak kompozit oluşturmuş ardından da çözünürlüğü gidermek için çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektrospinning işlemi ile üretilen bu iskelede, CaP kaplaması sayesinde mekanik mukavemeti daha yüksek iskeleler elde etmiş ve mineralizasyon oranını artırdığını gözlemlenmiştir. İskelelere CaP kaplaması yapmadan önce yüzey kaplamasının indüklenmesi amacıyla HA eklenmiştir. Daha sonra morfolojik, mekanik ve histolojik analizler yapılmış ve optimizasyonu gerçekleştirilen bu iskelenin artan mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu gibi özelliklerinin yanı sıra insan mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyon hızını artırdığı da gözlemlenmiştir (X. Zhao vd., 2015).

Shinichi Hamasaki ve arkadaşları partikül süzme ve liyofilizasyon yöntemlerini birleştirerek keratin temelli esnek ve yüksek gözenekli yapı iskeleleri geliştirmek için yeni bir yaklaşım sunmuşlardır. Öncelikle indirgenmiş keratin solüsyonunu elde edip daha sonra yine kendi elde ettikleri ve kuruttukları kalsiyum aljiant tanecikleriyle elde edilen keratin solüsyonunu karıştırmışlar. Elde edilen bu karışımı liyofilize ettikten sonra iki aşamada yıkama gerçekleştirmişler. İlk aşamada EDTA içerisinde kalsiyum aljinate taneciklerinin yapıdan uzaklaştırılması sağlanıp daha sonra saf suda iyice yıkanmıştır. İçerisinde bulunan kalsiyum aljinate tanecikleri ve su elemine edildikten sonra elde edilen keratin sünger, sadece keratin solüsyonunun liyofilizasyonu ile elde edilen keratin süngerle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre, birleştirilmiş yöntemle elde edilen süngerin sadece keratin süngere göre son derece esnek bir yapıya ve oldukça yüksek gözenekliliğe sahip olduğu görülmüştür (Hamasaki vd., 2008).

Sandleen Feroz ve arkadaşı alveolar kemik rejenerasyonu için koyun yünü keratini temelli ve dondurarak kurutma tekniğiyle elde edilmiş iskelelerin üretimini sunmuşlardır. Geliştirilen bu iskelede inorganik bileşen olarak hidroksiapatit kullanılmasıyla birlikte çapraz bağlama için hidroksipropil metilselüloz (HPMC) kullanılmıştır. Çapraz bağlama için kullanılan HPMC'nin hücreler için toksik bir etkiye sahip olmadığı bilinmektedir. Çalışma kapsamında geliştirilen iskelenin fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerini farklı analiz yöntemleriyle incelenmiştir. Geliştirilen iskelenin yapısının oldukça stabil olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, yapılan *in vitro* biyouyumluluk testi ile iskelenin sitouyumlu olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, yapısal benzerlik ve biyouyumluluk açısından yüksek potansiyel gösteren bu iskelenin alveolar kemik yenilenmesi için ideal bir biyomalzeme olabileceği vurgulanmıştır (Feroz & Dias, 2021).

Dias ve arkadaşları gözenekli keratin kemik greftlerinin immünojenitesinin gözlemlenmesi için koyun modelinde inceleme yapmışlardır. Çalışmada kullanılacak olan on iki koyundan kan ve kemik örnekleri alınmıştır. Yeniden yapılandırılmış keratinden elde edilen sert doku iskeleleri, koyunların tibial kemiklerinde cerrahi olarak oluşturulan defekt bölgelerine yerleştirilmiştir. Lokal kemik dokusunda inflamatuvar işaretleyicinin mRNA'sını saptamak için ve serumdaki antikeratin antikörlerini saptamak için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. 1,2,4,6,8 ve 12. haftalarda her hafta iki hayvan incelenmiştir. Bütün bu incelemeler sonucu ne serumdaki antikeratin antikörlerinde ne de inflamatuvar işaretleyici mRNA'sında herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara dayanarak modifiye edilmiş keratin yapı iskelelerinin bir ümmün tepkiye neden olmadığını göstererek yapılabilecek olan çalışmalara ışık tutmuşlardır (Dias vd., 2020).

Trang Vu ve arkadaşları doğal ipek kozası fibroinleri ve koyun yünü keratinlerinden protein polimerleri kullanılarak biyoyumlu hidrojellerin üretimini sunmuşlardır. İki grup numune üzerine yaptıkları çalışmada, birinci grupta hızlı ve homojen bir jelleşme için ultrasonikasyon kullanırken ikinci grupta keratin/ipek fibroini karışımlarının oda sıcaklığında birkaç gün bekletilmesiyle doğal olarak jelleşmiş solüsyonlar elde edilmiştir. İpek/yün karışımı çözeltilerin, yün içeriği birinci grup için (ultrasonikasyon) ağırlıkça yüzde 30'dan ve ikinci grup için (doğal jel) ağırlıkça yüzde 10'dan az olduğunda, mükemmel şekilde birbirine bağlı jel yapısıyla farklı karışım oranlarında hidrojeller oluşturabildiğini rapor etmişlerdir. Fibroin/keratin hidrojel sisteminin homojenliklerinin, ikincil yapılarının ve örneklerin karakteristik morfolojilerinin (hem mikro hem nano ölçekte) incelenmesi için diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), sıcaklık modülasyonlu DSC (TMDSC), Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yöntemleri kullanılmıştır. Sistem her iki numune grubu için daha fazla ipek içerdiğinden, moleküller arası β -yaprak içeriklerinin önemli ölçüde arttığı, bunun da harmanlanmış hidrojel yapılarında kararlı kristal çapraz bağlayıcılar ile sonuçlandığı görülmüştür. SEM ve AFM verileri, ultrasonik dalgaların çapraz bağlayıcı oluşumunu önemli ölçüde artırabildiğini ve harmanlanmış sistemlerde ipek ve keratin molekülleri arasındaki faz ayrımını önleyebildiğini göstermiştir. Kimyasal olmayan bir şekilde çapraz bağlar oluşturabilen bu ipek/yün hidrojellerinin, protein moleküllerinin iyi biyoyumluluğu ve hidrojel sistemlerinin çeşitli özellikleri sayesinde çeşitli biyomedikal uygulamalar için ekonomik olarak faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Vu vd., 2016).

Andreia Vasconcelos ve arkadaşları tarafından, yün ve ipek kompozit filmlerin hazırlanması için iki farklı sistem önerilmiştir. Birinci sistem, ipek fibroin ve keratin sulu çözeltilerinden elde edilen kompozit filmleri temsil ederken, ikinci sistem formik asit içerisinde çözdürülmüş ipek fibroini ve keratinden elde edilen filmleri temsil etmektedir. FTIR sonuçları ile, formik asidin SF kristalleşmesini indüklemeye ve keratin üzerindeki β -tabaka yapılarının miktarını artırma kabiliyeti gösterdiği kanıtlanmıştır. Karışımların termal davranışlarının incelenmesiyle, FTIR sonuçlarının doğruluğu desteklenmiştir. Her iki SF/keratin sisteminin FTIR analizinden ve DSC eğrilerinden elde edilen farklı parametrelerin doğrusal olmayan eğilimi, proteinler karıştırıldığında katkı maddelerinin kurallarına uymadıklarını ancak moleküller arası etkileşimler kurabildiklerini göstermiştir. Tripsin ile *in vitro* enzimatik bozunma davranışlarının incelenmesi sonucu, sulu çözeltilerden elde edilen SF/keratin filmler, formik asit içerisinde hazırlanan filmlerden daha yavaş bir biyolojik bozunmaya sergilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma, doku mühendisliği yapı iskeleleri veya kontrollü salımlı ilaç dağıtım araçları olarak uygulanmak üzere sunulan matris türlerinin daha fazla araştırılmasını teşvik etmektedir (Vasconcelos vd., 2008).

Yankuan Tian ve arkadaşları kıkırdak doku mühendisliği için mimik yapı ve işleve sahip gözenekli *Bombyx mori* ipek fibroin (SF)/yün keratin (WK) kompozit yapı iskelesi için bir yaklaşım sunmuşlardır. Uygun bir konsantrasyon ve kütle oranında SF/WK'den yapılan gözenekli kompozit iskele, dondurarak kurutma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Sonuçlar, kompozit yapı iskelelerinin suda çözünmez olduğunu göstermiş; iyi mekanik özelliklere, %80'in üzerinde gözenekliliğe ve 200 μ m'nin üzerinde gözenek boyutuna sahip olduğu rapor edilmiştir. Kompozit iskelenin saf SF iskelelerinden daha büyük gözenek boyutu ve daha iyi bağlanabilirliği, WK ilavesinin yapısal özelliklere katkıda bulunduğunu göstermiştir. WK'nin termal stabilitesi ve sulu ortamda şişme özelliği göstermesi, kompozit yapı iskelelerinin termal ve mekanik özelliklerini iyileştirmeye katkıda bulunmuştur. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen sitotoksikite değerlendirmeleri, hücrelere karşı herhangi bir toksisite olmadığını doğrular nitelikte iyi bir büyüme durumuna sahip hücrelerin varlığını göstermiştir. *In vivo* biyouyumluluk değerlendirmelerinin sonuçları, sıçanların implantasyon bölgesindeki dokularında neredeyse hiç inflamatuvar yanıtı rastlanmadığını göstermiştir. Gözenekli SF/WK kompozit yapı iskelesinin geliştirilmesinin, kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere bir potansiyel sergileyebileceği rapor edilmiştir (Tian vd., 2021a).

Matine Atrian ve arkadaşları keratinin zwitteriyonik özelliklerine göre, bir keratin kaplama kullanarak antibakteriyel ve biyoaktivite özelliklerine sahip kılavuzlu kemik rejenerasyonu (GBR) zarı geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu çalışmada, GBR membranları olarak elektrospun ipek fibroin (SF)-Laponit (LAP) lifli membranlar geliştirilmiş ve koyun yününden ekstrakte edilen keratin üzerine elektrosprey uygulanmıştır. Sonuçlar, basit bir elektrosprey işlemi kullanarak SF-LAP lifli membranlar üzerinde homojen yün keratin kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Yün keratin kaplama, SF-LAP membranın uzamasını ve hidrofiliğini önemli ölçüde artırırken, mekanik mukavemetini negatif yönde etkilemiştir. Keratin kaplama, amino asitlerin karboksil grupları sayesinde SF-LAP membranlarının biyoaktivitesini ve bozunma oranını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Son olarak, yün keratin kaplamanın eşit pozitif (NH^{3+}) ve negatif (COO^-) yüklerinden kaynaklanan zwitteriyonik özelliği, SF-LAP membranının antibakteriyel aktivitesini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Genel olarak, önemli mekanik ve biyolojik özelliklere sahip olduğu gözlemlenen keratin kaplı SF-LAP lifli membranların, GBR membranları için potansiyele sahip olabileceği vurgulanmıştır (Atrian vd., 2022).

Cal ve arkadaşları kemik doku rejenerasyonları için kullanılmak üzere sol-jel reaksiyonları yardımıyla bor ve silisyum içeren kolajen/saç keratini kriyojellerinin üretimi için yenilikçi bir yaklaşım sundular. Bu yaklaşımda, kolajen ve saç keratini, silika öncüsü olarak tetraetil ortosilikat kullanılarak bir B-Si ağı ile birleştirilmiştir. Elde edilen kriyojeller FT-IR, katı hal NMR, XRD, TGA, gözeneklilik ve şişme testleri, BET-BJH analizleri, frekans taraması ve sıcaklığa bağlı reoloji, temas açısı analizi, mikromekanik testler ve enerji dağılımlı X-ışını analizi ile SEM yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Ek olarak, kriyojellerin hücre canlılığı ve osteojenik özellikleri MTS testi, canlı/ölü tahlili, immüno/histokimya ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri ile değerlendirilmiştir. İyi mekanik dayanıklılığa ve osteoindüktif özelliklere sahip B-Si-ağlı Col-HK kriyojellerinin potansiyel kemik oluşturma kabiliyetine sahip olacağı sonucuna varılmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında kemik dolgu malzemesi olarak geliştirilen iskelelerin üretiminde keratin ve ipek fibroini doğal polimerleri kullanılmıştır.

Keratin ekstraksiyonunda kaynak olarak kullanılan koyun yünleri Çanakkale’ de bulunan yerel bir çiftlikten temin edilmiştir. Koyun yünleri satın alınırken önceden temizlenmiş olmasına dikkat edilmiş bu nedenle keratin ekstraksiyonu aşamasında ön işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

DeneySEL süreçlerde kullanılan bir diğer polimer olan ipek fibroini ekstraksiyonu için kullanılan *Bombyx mori* ham ipek kozaları Bursa ilinde bulunan Koza Han’dan temin edilmiştir.

Tez çalışmasının deneysel sürecinde kullanılan kimyasallar ve reaktifler Merck firmasından tedarik edilmiştir. DeneYlerde ve analizlerde kullanılan cihazların marka ve model bilgileri isimlerinin geçtiği ilgili bölümlerde belirtilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında koyun yünlerinden keratin ve ham *Bombyx mori* ipek kozalarından ipek fibroini ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Keratin ekstraksiyonu için CAL 2021’in tezinde açıklanan optimize sülfitoliz reaksiyonu kullanılmıştır. Suda çözünebilen koyun yünü keratini ve yaklaşık 1-2 ay kadar stabil kalabilen sulu çözelti formunda saklanan ipek fibroini ekstraktlarının biyokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Koyun yünü keratinlerinin Lowry protein tayini ve serbest sülfidril grupları tayini analizleri ve ayrıca ipek fibroini proteinlerinin SDS-PAGE analizi ilgili tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Belli optimizasyon aşamaları sonucu geliştirilen keratin macun ve keratin macun/ipek fibroini kompozit iskeleleri dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır. Üretilen iskelelerin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, XRD, TGA ve SEM cihazları kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca mikromekanik testler ve enzimatik *in vitro*

biyobozunurluk deneylerinin yanı sıra *in ovo* CAM testi ile malzemelerin anjiyogenez aktiviteleri değerlendirilmiştir.

DeneySEL süreçlerin ana başlıkları, koyun yününden keratin ekstraksiyonu, ipek fibroini sulu çözeltilerinin eldesi, protein ekstraktlarının biyokimyasal karakterizasyonu, kemik dolgu malzemelerinin üretimi, KP ve KPSF iskelelerinin fizikokimyasal karakterizasyonu, mikromekanik testler, enzimatik *in vitro* biyobozunurluk testi ve iskelelerin anjiyojenik özelliklerinin belirlenmesi şeklinde düzenlenmiştir.

3.2.1. Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu

Keratin, daha önceden bildirilen çalışmaya göre modifiye bir sülfitoliz reaksiyonu kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Cal vd., 2021). Önceden temizlenmiş koyun yünleri reaksiyon çözeltisine eklenmeden önce küçük parçalar halinde kesilmiştir. Daha sonra Na₂SO₃ (%5, w/v) ve NaOH (%5, w/v) içeren 200 ml reaksiyon çözeltisi hazırlanmış ve önceden tartılan yün lifleri (10 g) çözelti içerisine eklenmiştir. Ardından karışım bir dinamik çalkalayıcı yardımıyla (Incu-Shaker, Mini Benchmark, ABD) 50°C 'de yaklaşık 2-3 saat boyunca karıştırılarak işlenmiştir. İnkübasyonun ardından akan su altında 1-2 dk bekletilerek oda sıcaklığına getirilen nihai çözelti, içerisindeki çözünmeyen yün liflerinin uzaklaştırılması için tıbbi gazlı bez yardımıyla süzölmüş ve süzöntü 6000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Hettich, EBA20, Almanya). Santrifüj işleminin ardından toplanan süpernatant, içeriğinde bulunan NaOH ve Na₂SO₃ gibi safsızlıklardan arındırılması ve çözelti pH' sının 7,2-7,4 olarak ayarlanması için bir membran içerisinde (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 43 mm, D9527, Sigma) 72 saat süreyle oda sıcaklığında saf suya karşı diyaliz edilmiştir. İlgili süreçte diyaliz suları günde 2 kez olmak üzere her gün değiştirilmiştir. Elde edilen diyalizat, agrega olmuş proteinlerin çözülden uzaklaştırılması için 5 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir (Hettich, Micro120, Germany). Cam balonlara aktarılan saflaştırılmış keratin çözeltileri -26°C'de gece boyunca dondurulmuş ve liyofilizasyon (Telstar, LyoQuest, İspanya) işleminin ardından keratin tozları elde edilmiştir. Koyun yününden keratin ekstraksiyonu aşamalarını gösteren şema Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Koyun yünlerinden keratin ekstraksiyonu işleminin genel şeması

3.2.2. *B. mori* İpek Kozalarından İpek Fibroini Eldesi

İpek fibroini ekstraksiyonu D. Kaplan ve arkadaşlarının daha önceden bildirdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir (Rockwood vd., 2011). Bu işlem için öncelikle ham ipek kozaları makas ve bistüri gibi cerrahi aletler yardımıyla ikiye kesilmiş ve ardından içerisinde bulunan ipek böceği çıkarılmış, varsa istenmeyen hasarlı kısımlar temizlenmiştir. Temizlenmiş ipek kozaları tekrar iki parçaya kesilmiş ve kozalar toplamda dört eş parça elde edilecek şekilde hazırlanmıştır. İpek kozaları, yapısında serisin ve fibroin olmak üzere iki çeşit protein bulundurmaktadır. İpek kozalarında bulunan tutkal benzeri serisin proteininin uzaklaştırılması işlemi zank giderme işlemi olarak adlandırılmaktadır. Bu işlem için otoklav şişelerinde önceden kaynatılarak hazırlanan 1 litre saf su içerisine Na_2CO_3 (0,02 M), taşmamasına dikkat edilerek, yavaşça eklenmiştir. Hazırlanan çözelti içerisine temizlenmiş ve eş parçalara ayrılmış olan ipek kozaları (2,5 g) eklenmiştir. İpek kozaları 15 dk boyunca zank giderme çözeltisi içerisinde kaynamaya bırakılmış ve işlem bitiminin ardından saf su içerisinde 3 kez 20 dk boyunca durulanmıştır. Daha sonra fazla suyu uzaklaştırılan ham ipek fibroinleri oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 9. İpek kozalarından rejenere ipek fibroini çözeltisi eldesi

Ham ipek fibroinlerinden berrak çözeltiler elde edilmesi için 9,3 M LiBr çözeltisi kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için 1 g kurutulmuş ham ipek fibroini tartılmış ve ardından, önceden hazırlanan 4 ml LiBr çözeltisi fibroinlerin üzerine eklenmiştir. Reaksiyon için karışım evaporatör cihazının sıcak su kazanı içerisinde (Buchi, B-491 Heating Bath 120V, Marshall Scientific) 60 °C sıcaklıkta 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen berrak çözelti 24 saat boyunca saf suya karşı diyaliz edilmiş ve diyaliz suları bu süre zarfında 6 kez değiştirilmiştir. Elde edilen diyalizat, içerisindeki çözünmeyen fibroinlerden arındırılması için 9600 rpm’de 20 dk boyunca santrifüj (Hettich, Micro120, Germany) edilmiştir. Nihai rejenere ipek fibroini çözeltisinin konsantrasyonu, liyofilize edildikten sonra kalan katı kütlenin ölçülmesi ile belirlenmiştir (Lu vd., 2011).

3.2.3. Koyun Yünü Keratininin Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini

Keratin ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesinin ardından elde edilen diyalizatın konsantrasyonlarının belirlenmesi için Lowry protein tayini yöntemi kullanılmıştır (LOWRY vd., 1951). Bu yöntem için öncelikle BSA (Sığır Serum Albümin) standart

proteini kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Lowry metodu, Folin-Ciocalteu reaktifinin alkali ortamda protein içeriklerindeki fenolik aminoasitlerle girdiği tepkime sonucu gerçekleşen renk değişiminin ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Reaksiyon için gerekli olan Çözelti A (0,571 g NaOH ve 2,86 g Na₂SO₃-100 ml ultra saf su içerisinde), Çözelti B (1,4232 g CuSO₄.5(H₂O)- 100 ml ultra saf su içerisinde) ve Çözelti C (1,34 g NaK(COO)₂ (CHOH)₂.4H₂O - 100 ml ultra saf su içerisinde) stok olarak hazırlanmıştır. Deney sırasında kullanılacak olan Lowry çözeltisi (A, B ve C çözeltilerinin sırasıyla 100:1:1 oranlarında karıştırılması sonucu elde edilir) ve Folin-Ciocalteu reaktifi (6 ml ultra saf su ile 5 ml Folin Ciocalteu's Fenol reaktifinin karıştırılmasıyla elde edilir) taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Standart protein çözeltisi olan BSA 1 mg/ml bir stok çözeltisi olarak %0,9 (w/v) NaCl çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden 0,01-0,1 konsantrasyon aralıklarında dilüsyonlar elde edilmiş ve her bir konsantrasyon için üç tekrarla deney gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 0,5 ml protein çözeltisi ile 0,7 ml taze hazırlanmış Lowry çözeltisi iyice karıştırıldıktan sonra 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İlk inkübasyonun ardından yine taze hazırlanmış olan Folin-Ciocalteu her bir numune için 0,1 ml eklenmiş ve iyice karıştırılmasının ardından 30 dk boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlemler protein içermeyen kör çözelti için de tekrarlanmıştır. Tepkimelerin tamamlanmasının ardından protein yoğunluğu arttıkça daha yoğun şekilde gözlemlenen mavi renkli kompleks çözeltiler elde edilmiştir. Son olarak, elde edilen kompleks çözeltilerin absorbansları bir spektrofotometre (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) yardımıyla kör çözeltiliye karşı 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Keratin diyalizatlarının % verim hesapları, kalibrasyon eğrilerinden ve denklem 3.1'den yararlanılarak hesaplanmıştır.

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

Liyofilize edilmiş olan koyun yünü keratininin kuru ağırlığa göre yüzde verim hesabı denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

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

3.2.4. Serbest Sülfidril Grupları Tayini

Sistein içeriği oldukça yüksek olan keratinin ekstraksiyonu sırasında disülfid bağlarının parçalanması neticesinde sistein tiyol grupları meydana gelmektedir. Bu nedenle indirgenmiş (hidrolize) keratinin yapısındaki serbest sülfidril gruplarının analizi Ellman's reaktifi (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) kullanılarak spektrofotometrik ölçümlerle gerçekleştirilmiştir. Analiz, Silva ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (Silva vd., 2014).

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için ticari olarak elde edilmiş L-sistein standart proteinini kullanılmıştır. Öncelikle reaksiyon tamponu için 0,1 M NaH₂PO₄ (sodyum fosfat mono bazik) ve 1 mM etilendiamintetra asetik asit (EDTA) saf su içerisinde hazırlanmış ve pH 8,0 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra Ellman's reaktifi (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde reaksiyon tamponu içerisinde hazırlanmıştır. L-sistein standart çözeltisi için 1 mM stok, benzer şekilde reaksiyon tamponu içerisinde hazırlanmış ve 0,1-1 mM konsantrasyonlarda dilüsyonlar elde edilmiştir.

Reaksiyon için, 250 µl protein çözeltisi üzerine 2,5 ml reaksiyon tamponu ve 50 µl Ellman's reaktifi içeren çözelti eklendikten sonra iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda, protein derişimi arttıkça renk yoğunluğu artan sarı renkli çözeltiler elde edilmiştir. İnkübasyonun ardından, UV-VIS spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçümler alınmış ve nihai kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Son olarak, serbest sülfidril gruplarının belirlenmesi için toz keratin reaksiyon tamponu içerisinde çözdürülmüş ve deneysel süreç benzer şekilde tekrarlanmıştır. Serbest sülfidril grup içeriğinin hesaplanması için kalibrasyon grafiği ve denklem 3.3 kullanılmıştır.

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

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

Analizi

İzole edilen ipek fibroin proteinlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi ve proteine özgü bantların gösterilmesi için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Analizin gerçekleştirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan Laemli (1970) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. *Bombyx mori* ipek fibroini ekstraktları için yükleme ve ayırma jelleri sırasıyla %4'lük ve %12,5'luk olarak Tablo 6'ya göre hazırlanmıştır.

Öncelikle dikey elektrofrez sistemi dikkatli bir şekilde ayarlanmıştır. Bu aşamada özellikle camların temizliğine ve iki cam arası boşluğun boyutunu belirleyen spacerların düzgünce yerleştirilmesine dikkat edilerek jel düzeneği kurulmuştur. Kurulan düzenek jel dökme standına dikkatle yerleştirildikten sonra daha kalın bir cam ile basıncın homojen dağılmasını sağlayarak, mandallar yardımıyla eşit şekilde sıkıştırılmıştır. Jelleşmenin düzgün bir şekilde gerçekleştirilmesi için jel standının su terazisi dikkatli bir şekilde ayarlanmıştır. Dikey elektrofrez sisteminin hazırlanması bu şekilde tamamlanmıştır. Sistem içerisinde jeller alt kısımda ayırma jeli ve üst kısımda yükleme jeli olacak şekilde dökülmelidir. Bu nedenle ilk olarak %12,5'luk ayırma jeli prosedüre göre hazırlanmış ve daha önce hazırlanan düzenek içerisine düzgün bir şekilde eklenmiştir. Jellerin hazırlanması aşamasında başlatıcı olarak kullanılan APS ve katalizör olarak kullanılan TEMED diğer çözeltilerin homojen olarak karıştırılmasının ardından sırasıyla eklenmelidir. Polimerleşmenin düzgün bir şekilde gerçekleşmesi ve havayla temasının kesilmesi için üzerine 1 ml izopropil alkol (%99,9) eklenmiş ve polimerleşme için bir saat kadar beklenmiştir. Polimerleşmenin tamamlanmasının ardından jel üzerine eklenmiş olan alkol uzaklaştırılmış ve ardından 2 kez overlay ile yıkama işlemine tabi tutulup filtre kağıdı kullanılarak dikkatli bir şekilde kurulanmıştır. Ardından, %4'lük yükleme jeli hazırlanmış ve içerisinde yürütme jelini barındıran düzeneğe eklenmiştir. Bu aşamada kuyucukları oluşturmak üzere kullanılan tarak, hem hızlı hem dikkatli bir şekilde ve alttaki jel ile arasında kalan mesafe en az 1 cm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Polimerleşmenin gerçekleşmesi için beklenen 30 dk'lık sürenin ardından jel düzeneği tank içerisine yerleştirilmiştir. Tankın alt kısmında belirtilen referans çizgisine kadar ve üst kısmında da jelin ıslanmasına olanak sağlayacak seviyeye kadar yürütme tamponu eklenmiştir. Jelin yeterli düzeyde ıslanabilmesi için bir süre beklenmesinin ardından kuyucukların dağılmamasına dikkat edilerek tarak çıkarılmıştır.

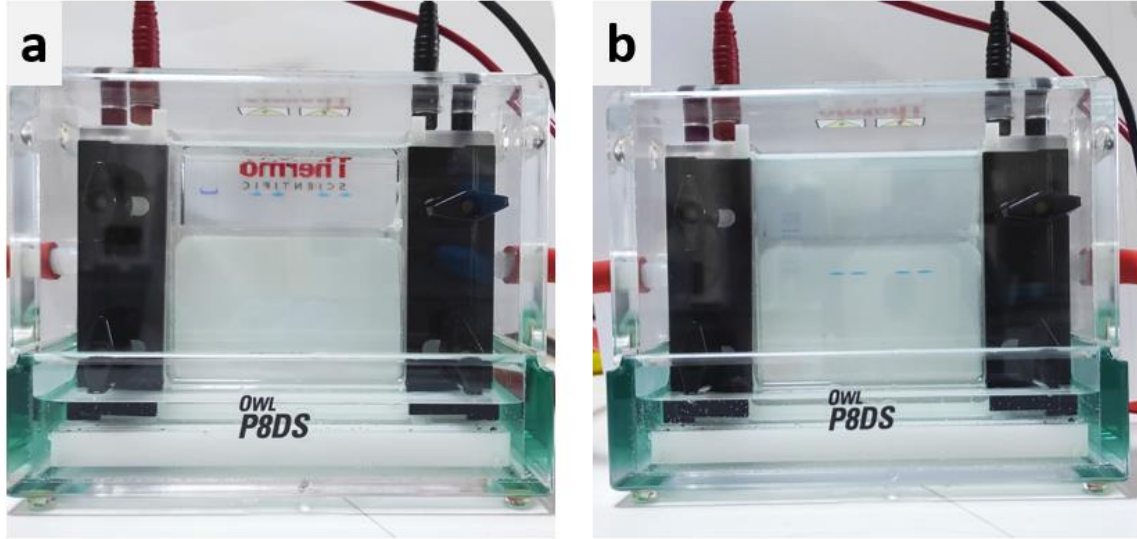
Tablo 6

SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri ve jel hazırlama prosedürü

Jel Hazırlama Çözeltileri	%12,5'lük yürütme jeli (10 ml)	%4'lük yükleme jeli (5 ml)
Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi: %30 (w/v) Akrilamid ve %0,8 (w/v) Bisakrilamid sulu çözeltisi	4,16 ml	0,66 ml
4X yürütme jeli tamponu: 1,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi (pH 8,8)	2,5 ml	-
4X yükleme jeli tamponu: 0,5 M Tris-HCl'ün ultra saf sudaki çözeltisi (pH 6,8)	-	1,26 ml
SDS çözeltisi: %10 (w/v) SDS'in ultra saf sudaki çözeltisi	100 µl	50 µl
Ultra saf su	3,185 ml	3 ml
Amonyum persülfat çözeltisi: %10 (w/v) APS'nin ultra saf sudaki çözeltisi. (Taze hazırlanmalıdır)	50 µl	25 µl
TEMED (Ticari olarak satın alınmıştır)	5 µl	5 µl
Diğer çözeltiler		
1X Yürütme Tamponu: 0,025 M Tris, 0,192 M glisin ve %0,1 (w/v) SDS'in sudaki çözeltisi (pH 8.3). (Oda sıcaklığında muhafaza edilebilir ve kullanılan tampon süzülerek tekrar kullanılabilir.)		
2X Numune Hazırlama Tamponu: 0.125 M Tris-HCl, %2 SDS, %25 (v/v) gliserol ve %0,01 (w/v) bromofenol blue'nun sudaki çözeltisi (pH 6.8). (Tampon ışıktan korunmalıdır. Porsiyonlanarak -26 °C'de saklanabilir.)		
Merkaptoetanollü Numune Tamponu: 2X numune hazırlama tamponu (950 µl) ile 2-merkaptoetanol (50 µl) karışımıdır. (Karışım taze olarak hazırlanmalıdır.)		
Ayrırma jeli overlay: 0.375 M Tris-HCl, % 0,1 SDS'in sudaki çözeltisi (pH 8.8). (Elde edilen çözelti 4 °C'ta 3 ay saklanabilir.)		

Bekleme süresinde kuyucuklara yüklenecek olan ipek fibroini protein çözeltisi 25 mg/ml ve BSA çözeltisi (ultra saf su içerisinde) 0,2 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Protein çözeltileri her iki numune için merkaptoetanol içeren numune tamponu kullanılarak 1:1 oranında seyreltilmiştir. Homojen bir karışım elde edilmesi için iyice pipetlenen numune-tampon karışımı denatürasyon için bir blok ısıtıcı yardımıyla 100 °C sıcaklıkta 5 dk boyunca karışmaya bırakılmıştır. Denatürasyon işleminin ardından numuneler soğutulmaları için hemen buz aküsü içerisine alınmış, böylece soğuyan protein çözeltileri yüklemeye hazır

hale gelmiştir. Kuyucukların içerisine ipek fibroini, BSA protein çözeltilerinden ve protein marker (Biorad, Precision Plus Protetein Dual Xtra Standarts; Katalog numarası: 161-0377) çözeltilerinden 5'er µl olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Sonuç olarak, kuyucukların içerisine 125 µg ipek fibroini ve 0,5 µg BSA yüklenmiştir. Daha sonra yürütme işlemi güç kaynağının 15 mA'de sabit tutulması ile 10 °C'de 120-150 dk süreyle tamamlanmıştır.



Şekil 10. SDS-PAGE (a) numunelerin yüklenmesi ve (b) yürütme işlemi

Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından çeşme suyu ile yice yıkılarak dikkatli bir şekilde çıkarılan jel, boyama işlemi öncesinde içerisinde kalan SDS'in uzaklaştırılması için 3 tur 10'ar dk yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra jel, kolloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyama işlemine tabi tutulmuştur. Boyanın hazırlanması için Tablo 7'de belirtilen prosedür kullanılmıştır. İlk olarak, ultra saf su içerisinde alüminyum sülfat-(14-18)-hidrat homojen bir karışım elde edilecek şekilde çözdürülmüş ve ardından etanol eklenmiştir. Devamlı karışmakta olan homojen çözelti içerisine Coomassie Brilliant Blue G250 boyası (toz formda) dikkatli bir şekilde eklenmiş ve tamamen çözünene kadar karışmaya bırakılmıştır. Tamamen çözünmesinin ardından çivit mavi renkte elde edilen karışım üzerine ortofosforik asitin eklenmesinin ardından çözelti içerisinde kolloidal parçacıklar oluşmuş ve petrol yeşilimsi mavi renkte bir nihai çözelti elde edilmiştir. Son hacim için ultra saf su eklenmesinin ardından boya çözeltisi hazır hale gelmiştir. Yıkama işlemi tamamlanan jel boya çözeltisi içerisine alındıktan sonra gece boyunca oda sıcaklığında boyanmaya bırakılmıştır. Daha sonra boya çözeltisinden çıkarılan jel 10'ar dk

2 kez saf su içerisinde yıkanmış ve ardından boya uzaklaştırma çözeltisi içerisine alınıp 1 saat boyunca boya uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Tablo 7’de verilen prosedür dikkate alınarak hazırlanan boya çıkarma çözeltisi protein bantların belirginleştirilmesi ve jel üzerine tutunan boyaların uzaklaştırılmasıyla kontrastın artırılması amacıyla kullanılmaktadır. Son olarak tekrar 10’ar dk 2 kez saf su ile yıkanan jel görüntüleme için hazır hale gelmiştir. Biorad görüntüleme cihazı (Gel Doc XR+, ABD) kullanılarak nihai jel görüntüleri elde edilmiştir.

Tablo 7

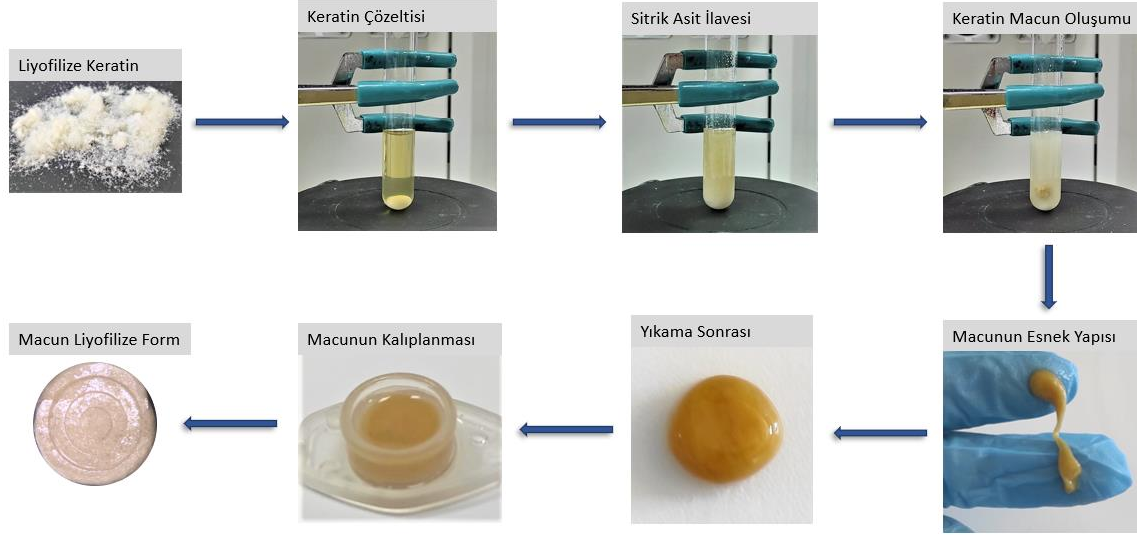
Kolloidal Coomassie boya çözeltisi ve boya uzaklaştırma çözeltisi hazırlama protokolü

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

3.2.6. Keratin Macun Kriyojellerinin Üretimi

Keratin macun (KP) kriyojellerin üretimi için öncelikle toz formdaki koyun yünü keratini %5 (w/v) konsantrasyonunda 5 ml ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra çözelti karışmaya bırakılmış ve 175 mg sitrik asit tartılmıştır. Tartılan katı haldeki sitrik asit karışmakta olan çözelti içerisine dikkatli bir şekilde ve yavaşça ilave edilmiştir. Çözeltinin bulanıklaşmasının ardından sitrik asidin tamamen karışması ve çökeltilerin bir araya toplanması için bir süre karışmaya bırakılmıştır. Bir araya gelerek çökelti oluşturan keratin macunlar toplanmış ve ardından saf su içerisinde 3 kez 5’er dk yıkama işlemine tabi

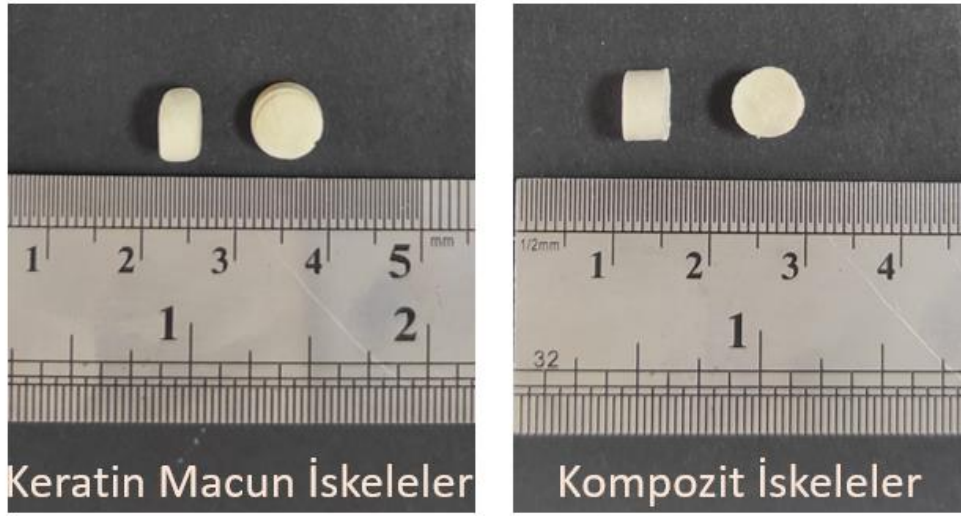
tutulmuştur. Keratin macunlar dikkatle kalıplandıktan sonra -26 °C’de gece boyunca dondurulmuş ve ardından liyofilize edilerek kriyojeller elde edilmiştir.



Şekil 11. Keratin macun kriyojellerin üretimi

3.2.7. Keratin Macun – İpek Fibroini Kompozit İskelelerin İmalatı

Kompozit iskelelerin üretimi için ilk olarak keratin macun kriyojelleri dikkatli bir şekilde ezilerek ince toz haline getirilmiştir. Daha sonra tartılan 50 mg keratin macun tozu iskele kalıbının içerisine eklenmiştir. Konsantrasyonu daha önceden %5 olarak ayarlanan 150 µl ipek fibroini çözeltisi kalıp içerisinde bulunan keratin macun tozu üzerine eklenmiştir. Eklenen bileşenler kalıp içerisinde köpürmemesine dikkat edilerek karıştırılmış ve viskoz, yapışkan bir karışım elde edilmiştir. Hazırlanan karışım -26 °C’de gece boyunca dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemiyle üç boyutlu, gözenekli iskeleler elde edilmiştir. Elde edilen keratin macun-ipek fibroini (KPSF) kompozit iskeleler yapısal bütünlüğün iyileştirilmesi için metanol muamelesine tabi tutulmuştur (Puerta vd., 2020). Metanol muamelesinin süresi 15 dk olarak optimize edilmiştir. Son olarak, metanol içerisinde çıkarılan iskeleler 3 kez 5’er dk saf su içerisinde yıkanmış ve tekrar liyofilizasyonun ardından nihai KPSF kompozit iskeleler elde edilmiştir.



Şekil 12. Keratin macun ve kompozit iskelelerin görüntüsü

3.2.8. KP ve KPSF Kriyojellerin Fizikokimyasal Karakterizasyonları

İzole proteinler, KP ve KPSF kemik dolgu malzemelerinin yapısal karakterizasyonları Fourier transform-infrared (FT-IR) spektroskopisi, X-ışını kırınımı (XRD) ve termogravimetrik analiz (TGA) analizleri kullanılarak derinlemesine incelenmiştir.

FTIR spektrumları, dalga sayısı aralığı $4000-500\text{ cm}^{-1}$ ve her numune için 2 cm^{-1} çözünürlüğe sahip zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) spektrofotometresi Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak toplandı.

İzole edilmiş proteinlerin, KP ve KPSF kriyojellerinin amorf doğasının karakterizasyonları XRD kullanılarak incelenmiştir. Cu K α radyasyonuna ($\lambda = 1,54056\text{ \AA}$, 45 kV ve 40 mA) maruz bırakılan numunelerden $2\theta = 5-70^\circ$ aralığında yansıyan ışınlar $0,02^\circ/\text{dk}$ tarama hızında kaydedilmiştir. Tüm verilerin işlenmesi için X'Pert High Score Plus yazılımı kullanılmıştır.

Numunelerin termal kararlılığı TGA 8000 (Perkin ELMER) kullanılarak incelenmiştir. Numunelerin ince tozu, $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında ve $30-700\text{ }^\circ\text{C}$ tarama aralığında analiz edilmiştir.

Malzemelerin (JEOL JSM-7100-F) yüzey morfolojisini ve gözenekli yapısını incelemek için SEM mikrografları farklı büyütme oranlarında 10kV prob akımı altında alınmıştır.

3.2.9. İskelelerin Mikromekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Malzemelerin mekanik dayanımları UniVert (CellScale Biomaterials Testing, Canada) kullanılarak basma testi ile incelenmiştir. Her bir numune 200N yük hücresi altında, 0,025 mm/sn hızında, 120 sn boyunca rampa modunda sıkıştırılmıştır. Test sonucu her iki numune için de doğrusal olmayan gerilim-gerinim eğrileri elde edilmiştir. Numunelerin sıkıştırma modülleri düşük ve yüksek gerinim değerlerinde, ilk ve son lineer bölgelerin eğimleri olarak ayrı ayrı hesaplanmıştır (Cholas vd., 2016).



Şekil 13. KP ve KPSF kriyojellerin basma testi sırasındaki görüntüleri

3.2.10. Enzimatik *in vitro* Biyobozunurluk Testi

KP ve KPSF numunelerin biyobozunurlukları proteaz muamelesiyle incelenmiştir. İlk olarak Tris-HCl tamponu (0,02M, pH 8.0) hazırlanmış ve içerisine Proteinaz K (0,01%, w/v) eklenmiştir. Numunelerin inkübasyonu sırasında mikrobiyal kontaminasyonların oluşumunu engellemek için sodyum azit (0,01%) çözelti içerisine eklenmiştir. Enzim çözeltisi eklenmeden önce numuneler tartılmış (m_i) ve kuru ağırlıkları not edilmiştir. Her bir numune üzerine hazırlanan çözeltilerden 500 μ l eklenerek 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Numunelerin bozunma oranları 3-10 gün olmak üzere iki zaman noktasında incelenmiştir. Belirlenen zaman noktalarında dikkatlice enzim çözeltisi uzaklaştırılan numuneler liyofilize edilip tartılmıştır (m_s). Numunelerin ağırlık değişimlerinin aşağıda

verilen denklem yardımıyla hesaplanmasıyla bozunma yüzdeleri belirlenmiştir (Tamburaci vd., 2019; Yamauchi vd., 2008).

$$\text{Toplam Kütle kaybı (\%)} = [(m_i) - (m_s) / (m_i)] \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.11. KP ve KPSF İskelelerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

İskelelerin anjiyogenez aktivitelerinin değerlendirilmesi *in ovo* testleriyle yapılmıştır. Temizlenip 37 °C, %60 bağıl nemde döndürme fonksiyonlarına sahip bir kuluçka makinesine yerleştirilen yumurtalar 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. İlk inkübasyonun ardından yumurta kabuğu üzerinde dikkatlice yuvarlak bir pencere açılıp üzerleri parafilm ile kapatılmıştır ve döndürme fonksiyonları kapatılarak aynı koşullar altında inkübasyona 9. güne kadar devam edilmiştir. KP-KPSF iskelelerin implantasyonları 9. günde gerçekleştirilmiş ve deneyler 13. günde sonlandırılmıştır. İskelelerin sem mikrograftlarının değerlendirilmesi ve histolojik analizlerinin gerçekleştirilmesi için sırasıyla PBS içerisinde hazırlanan %2,5 glutraldehit ve %10 formalin kullanılarak fiksasyonları gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri için hazırlanan örnekler fiksasyonun ardından artan alkol serilerinden geçirilerek kurutulmuştur.

Vasküler yoğunlukların hesaplanmasında ImageJ programı (1.53t, National Institutes of Health, USA), yazılıma ait vascular density ve vessel analysis eklentileri kullanılarak görüntüler işlenmiştir. Vasküler indeks hesabı eksplantasyondan hemen önceki damar yoğunluğunun implantasyonun hemen ardından ölçülen damar yoğunluğuna oranı olarak hesaplanmıştır. Damar yoğunlukları her bir örnek için, örneğin çapından 1mm daha büyük çapa sahip merkezi çemberi çevreleyen 1 mm genişlikteki halkasal bölgede kaydedilmiştir.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

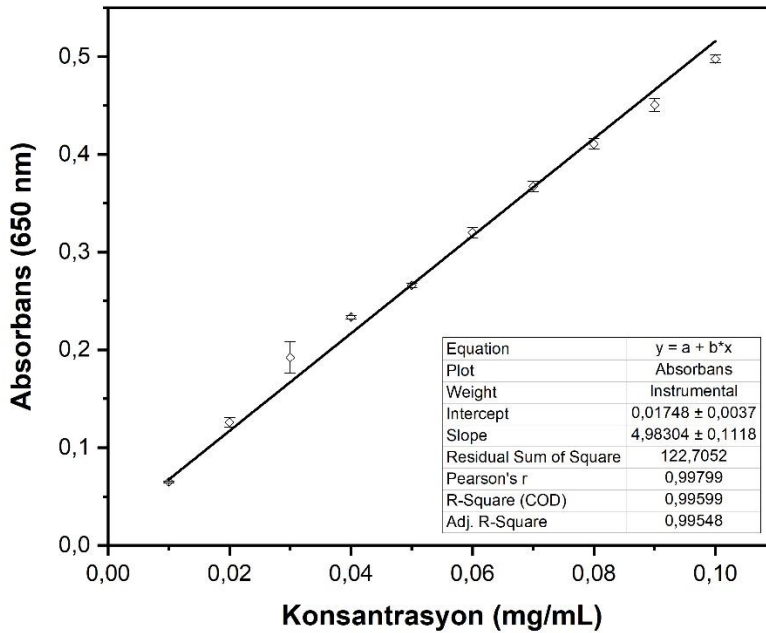
DeneySEL süreçlerde elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kantitatif analizler için tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Deney setlerinde gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, Origin Pro8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey testi ile belirlenmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıklar p değeri <0.05 için anlamlı kabul edilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu

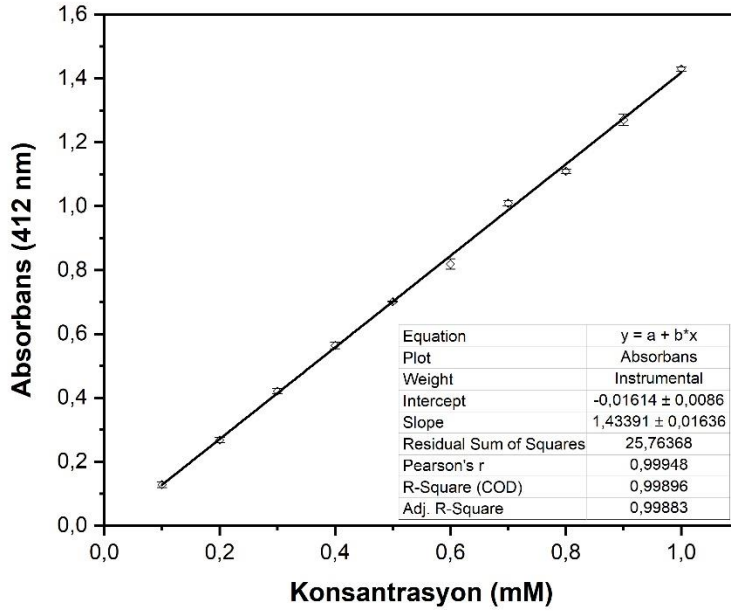
Bu çalışmada koyun yününden keratin ekstraksiyonu Cal 2021'in tezinde ayrıntılı olarak açıklanan prosedüre göre sülfitoliz reaksiyonu kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çeşitli BSA konsantrasyonlarının modifiye Lowry metodu sonucu ölçülen absorban değerleri dikkate alınarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla nihai diyalizat konsantrasyonu $8,31 \pm 0,46$ mg/ml olarak tespit edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası elde edilen keratin tozlarının ağırlığının başlangıçta kullanılan koyun yünü miktarına oranıyla belirlenen ekstraksiyon verimi $\% 50,52 \pm 0,16$ şeklindedir. Literatürde çeşitli sülfitoliz reaksiyonları sonucu hidrolize keratinin yaklaşık $\% 40$ 'tan $\% 60$ ' a kadar verimle elde edilebildiği rapor edilmiştir (Giteru vd., 2023). Bu nedenle bu çalışmada elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir çalışmalarla tutarlı olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 14. Lowry metodu ile oluşturulan BSA kalibrasyon grafiği

4.2. Serbest Sülfidril Grupları Tayini

Disülfid bağ ağı, yün keratinin kararlı üç boyutlu konformasyonuna önemli bir katkı sağlar. Yün keratini ekstraksiyonu sırasında kullanılan çözücüler disülfid bağ ağına zarar verebilir. Sülfidlerin keratin ekstraksiyonundaki rolü sistein kalıntılarıyla girdikleri tersinir reaksiyonda onları S-sülfonat anyonu ve sistein tiyollerine dönüştürmektir (Silva vd., 2014; Z. Zhang vd., 2017). Bu nedenle, indirgenmiş keratinlerin içeriğindeki serbest sülfidril grupları Ellman's reaktifi kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucu spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. L-sistein kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak serbest SH grubu miktarı $0,068 \pm 0,011$ mmol SH/ mg keratin olarak bulundu.



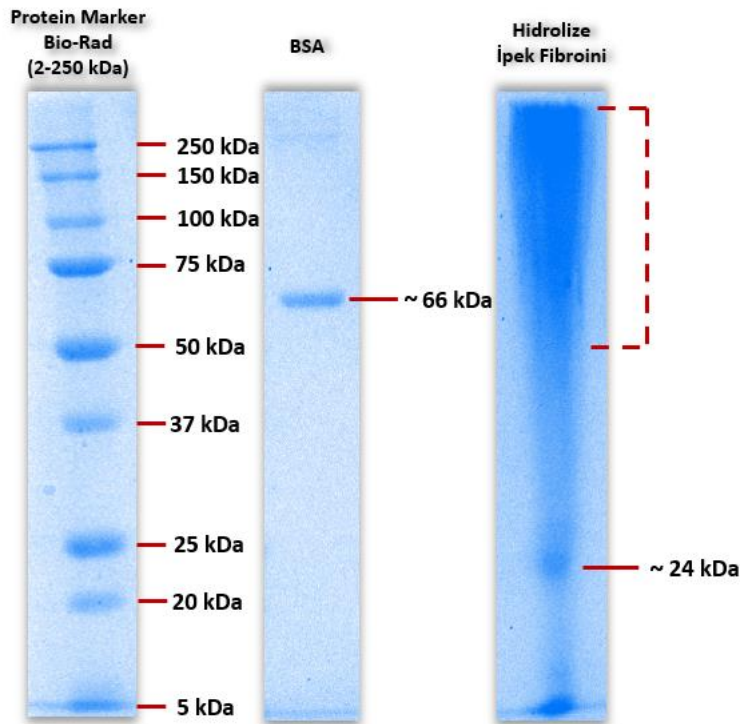
Şekil 15. L-sistein standardı ile çizdirilen kalibrasyon grafiği

4.3. İpek Böceği Kozalarından Hidrolize İpek Fibroini Eldesi

Hidrolize ipek fibroini, serisininen arındırılmış ipek kozalarının yoğun miktarda LiBr tuzu içeren ortamda $60 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklığa maruz bırakılarak çözdürülmesiyle elde edilmiştir. İpek fibroini hidrolizatlarının konsantrasyonu diyalizattan alınan 1 ml çözeltinin liyofilize edilip tartılmasının ardından yaklaşık 68 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen konsantrasyon,

uygulanan protokolde belirtilen nihai konsantrasyonla doğru orantılıdır (Rockwood vd., 2011).

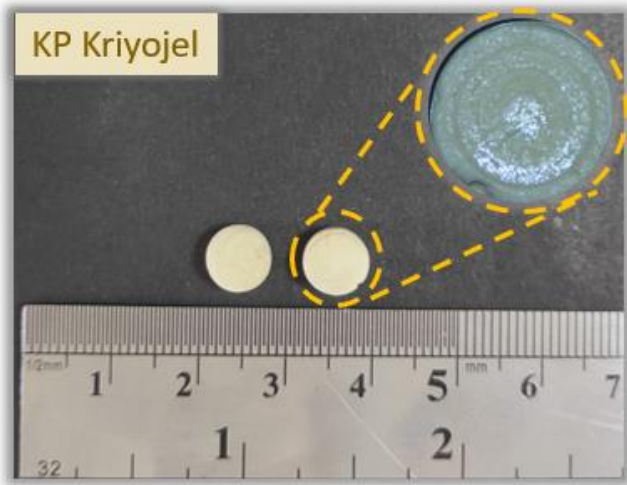
Rejenere sıvı SF'in moleküler kütle dağılımlarını incelemek için gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 16' da gösterilmiştir. Jel görselinde kullanılan protein marker ve içeriğindeki farklı moleküler ağırlıklara tekabül eden bantlar görülmektedir. İpek fibroini ekstraktları jel üzerine pozitif kontrol olarak yüklenirken negatif kontrol olarak BSA kullanılmıştır. Zambak giderilmiş fibroin liflerinin çapı yaklaşık 10-25 µm'dir ve esas olarak 391 kDa ağır zincir ve 26 kDa hafif zincirden oluşur (Y.-Q. Zhang, 2018). Jel görüntüleri incelendiğinde hidrolize ipek fibroininin yaklaşık 24 kDa civarında hafif zincirlere ait belirgin bir banda sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra yaklaşık 50-250 kDa aralığında ve 250 kDa üzerinde yoğunluk gösteren ve ağır zincirlere karşılık gelen geniş leke yapışkan serisin proteininin uzaklaştırılması için gerçekleştirilen Na₂CO₃ ile kaynatma işlemi sırasında SF peptit zincirlerinde ciddi hasarlar meydana getirdiğini göstermektedir (H. Y. Wang & Zhang, 2013; Z. Wang vd., 2019). Öte yandan BSA yaklaşık 66 kDa civarında spesifik bir bant göstermiş ve sonuçların literatürle örtüştüğü görülmüştür (Xia & Pack, 2014).



Şekil 16. İpek fibroini SDS-PAGE jel görüntüsü

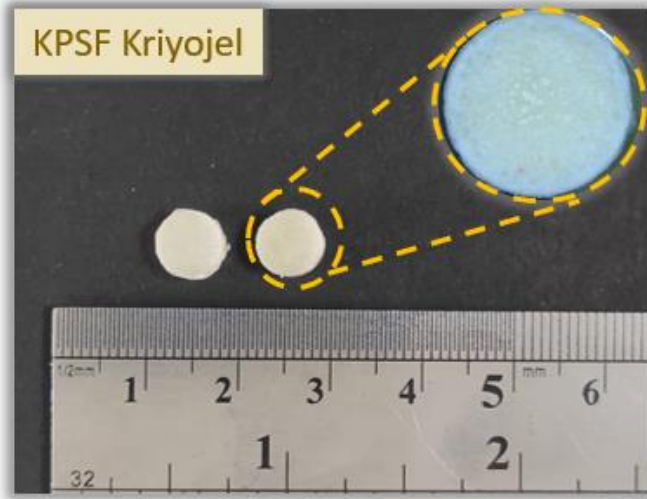
4.4. KP ve KPSF Kriyojellerinin Optimizasyonları

Keratin macun geliştirilmesi aşamasında bazı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve kullanılacak konsantrasyonlara karar verilmiştir. Macunun üretimi için öncelikle liyofilize toz keratin ultra saf su içerisinde çözdürülmüş ve oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Ardından karışmakta olan çözeltinin üzerine sitrik asit eklenmiş ve bir süre daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Önce bulanıklaşıp ardından agrega olmaya başlayan keratinler toplanmış ve esnek yapışkan kıvamlı suda çözünmeyen keratin macun elde edilmiştir. Keratin macunun optimizasyon aşamalarında sitrik asit oranları sabit tutularak farklı keratin konsantrasyonları denendiğinde elde edilen malzemenin miktarının değiştiği gözlemlenmiştir. Keratin konsantrasyonları kalıplama için yeterli boyutta macun elde edilecek şekilde optimize edilmiş ve ağırlıkça %5 keratin içeren 5 ml çözeltilerle reaksiyonların gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür. Bir diğer parametre olan sitrik asitin optimizasyonu için de çözeltideki keratin miktarı sabit tutularak farklı sitrik asit konsantrasyonları denenmiştir. Sitrik asit konsantrasyonları azaldıkça reaksiyon veriminin düştüğü, macunun esnek ve yapışkan kıvamının da azaldığı gözlemlenmiştir. Öte yandan konsantrasyonların artması da giderek yüzey hidrofobikliğin artmasına sebebiyet verdi. Hücre yapışması ve beslenmesi için malzemenin belirli düzeyde hidrofilik olması gerekmektedir. Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda da nihai sitrik asit konsantrasyonu ağırlıkça %3,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 17. Keratin macun kriyojellerin boyutları ve stereo mikroskop görüntüsü

Öte yandan kompozit iskelelerin optimizasyonları için keratin macun tozları, ipek fibroini sıvı çözelti miktarı ve kullanılan ipek fibroini çözeltisinin konsantrasyonları değiştirilerek denemeler gerçekleştirilmiştir. İpek fibroini çözelti konsantrasyonlarının artırılması malzemelerin homojen olarak karışması ile ilgili sorun teşkil etmiştir. Çünkü ipek fibroini çözeltisi oldukça viskoz olarak elde edilmektedir. Öte yandan konsantrasyonların %5'in altına düşürülmesi hem yapının yapışkan macun kıvamından uzaklaşmasına sebep olmuş hem de yapıya katılan ipek fibroini miktarının düşmesi nedeniyle gözenekliliği olumsuz yönde etkilemiştir. İpek fibroini çözeltisinde kullanılacak oran %5 olarak belirlendikten sonra keratin macun miktarı ve ipek fibroini çözeltisi miktarı ile ilgili konsantrasyon denemeleri benzer şekilde yapının macun kıvamına yakın bir kıvamda olmasına ve yeterli gözenekliliği sağlayabilecek şekilde oranlanmasına dikkat edilerek optimize edildi. Bütün bunların ardından kompozit iskeleler için metanol muamelesi süreleri optimize edildi. İskelelerin metanol ile muamele edilme süreleri arttıkça yapının sağlamlaştığı ancak diğer yandan yapının daha dens bir hale geldiği görülmüştür. Yapısal bütünlüğün korunması ve ideal densite için metanol muamelesi 15 dk olarak optimize edilmiştir.



Şekil 18. Keratin macun – ipek fibroini kompozit kriyojellerin boyutları ve stereomikroskop görüntüsü

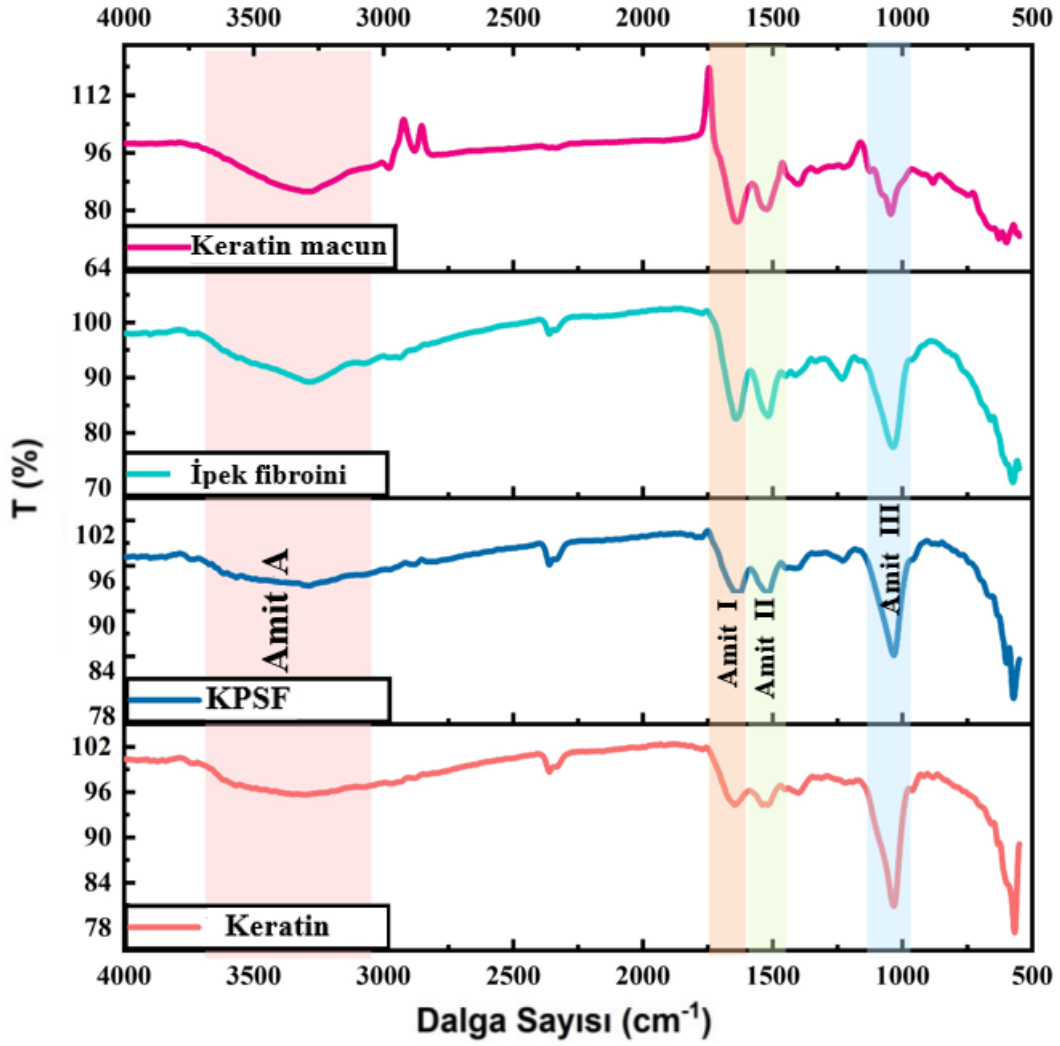
4.5. Geliştirilen Kemik Dolgu Malzemelerinin Fizikokimyasal Karakterizasyonları: FTIR, XRD

Spektrumlar esas olarak peptit bağlarının piklerini sergilemişlerdir (Şekil 19). Literatüre göre 3200 – 3400 cm^{-1} arasındaki geniş bant Amit A olarak adlandırılan N-H gerilme titreşimlerine atfedilmektedir. Başka bir karakteristik amit zirvesi olan ve C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan Amit1, 1700-1600 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Amit2 ile ilgili N-H bükülme ve C-H esneme bantları 1500-1600 cm^{-1} tespit edilmiştir. 1200-1300 cm^{-1} aralığındaki Amit3 bantları ise C-N ve C-C gerilme absorpsiyonları olarak ifade edilebilir (Ramirez vd., 2017; Tian vd., 2021).

Peptit bağlarının gösterdiği karakteristik zirvelerin aynı zamanda inter veya intramoleküler hidrojen bağları ve yan grupların doğasına da bağlı olduğu bilinmektedir (Jackson & Mantsch, 1995).

Spektrumlar incelendiğinde aralarında yalnızca absorbands değerlerinin farklılık gösterdiği açıkça görülmektedir. Bu bilgilerin ışığında İpek fibroini ve Koyun yünü keratini spektrumları arasındaki absorbands farklılıkları malzemelerin doğal yapılarındaki bağların ve yan grupların farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak kompozit biyoiskelenin de her iki proteini yapısında bulundurduğu, sinyal şiddetleri arasındaki farklılık sayesinde doğrulanmıştır.

Öte yandan üç karboksil grubu içeren sitrik asit, kuvvetli hidrojen bağları oluşturabilme yeteneğiyle bilinmektedir (Ghanbarzadeh vd., 2011). Keratin macunun absorbands değerlerinin yün keratinine göre artış göstermesinin ise yapıda bulunan hidrojen bağlarının artışından kaynaklandığı düşünülmektedir.

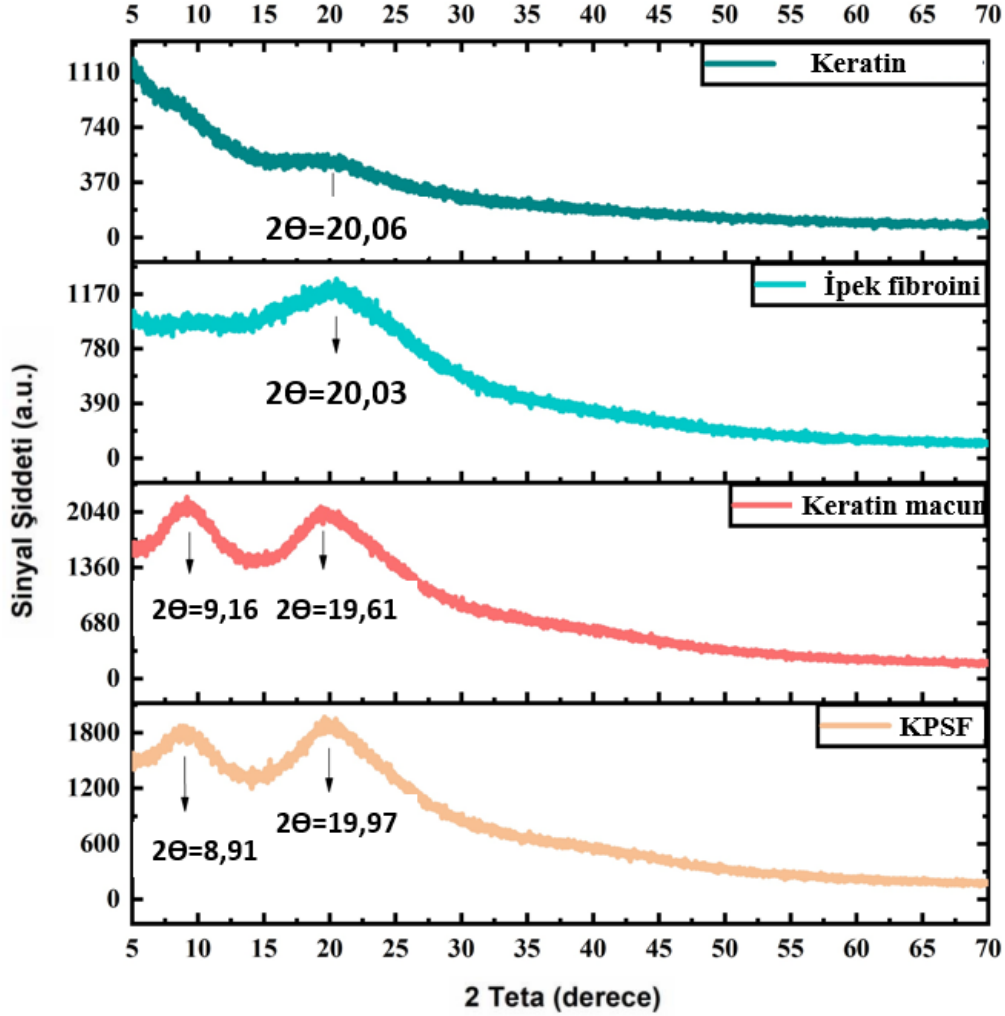


Şekil 19. Keratin macun, ipek fibroini, KPSF kompozit iskele ve toz keratinlerin FTIR spektrumları

XRD'nin sonucu keratin ve ipek fibroini polipeptitlerinin esas olarak kristal form yerine amorf formda olduklarını göstermiştir (Şekil 20).

Yün keratini tozlarının spektrumlarında $2\theta = 20^\circ$ civarındaki tepe noktasının β tabakalı yapıdan kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak alkali hidroliz sırasında parçalanmaları sebebiyle 9° civarında alfa heliks yapılarını karşılayan tepe noktasının kaybolduğu görülmüştür (Abou Taleb vd., 2022). Buna karşın keratin macununun XRD spektrumları incelendiğinde $2\theta = 9^\circ$ civarında elde edilen tepe noktası sitrik asitin oluşturduğu hidrojen bağları sayesinde alfa heliks yapılarının tekrar bir araya geldiğini gösterebilir.

Öte yandan İpek fibroini için $2\theta = 20-21^\circ$ arasındaki kırınım tepe noktası, ipeğin ikincil yapısının β tabaka formlarını gösterdiği bilinmektedir (Narita vd., 2020). Kompozit iskelelerin spektrumlarının ise hem pik yoğunluklarının yapısındaki malzemelerin yoğunluklarına nazaran değişkenlik göstermesi hem de her iki pik noktasını sergilemesi kompozit malzemenin her iki proteini içerdiğini kanıtlar niteliktedir.

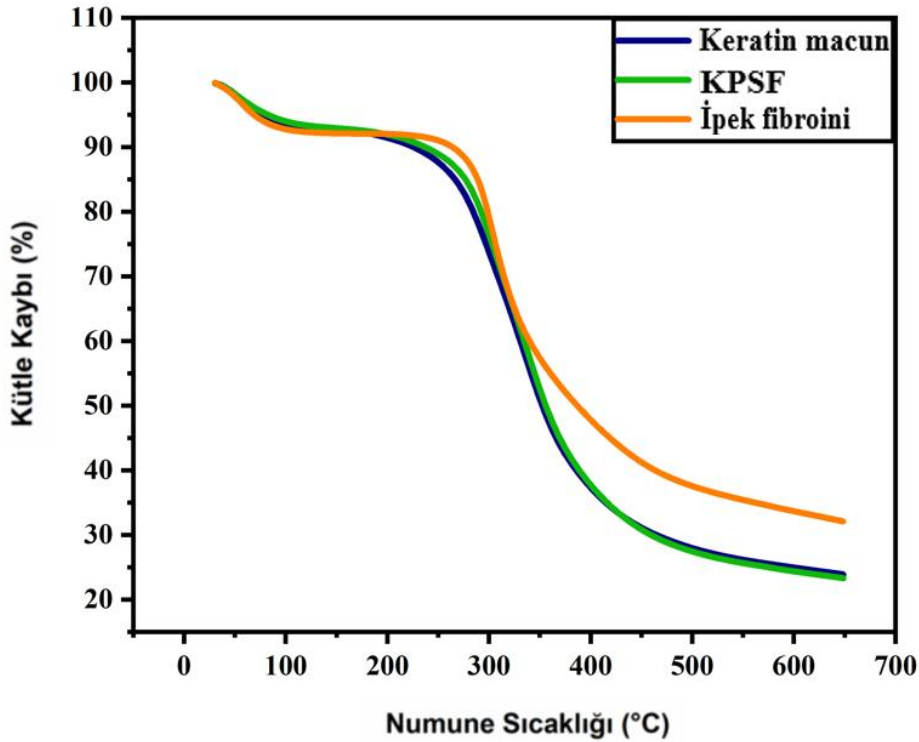


Şekil 20. Keratin tozları, ipek fibroini, keratin macun ve KPSF kompozit iskelelerin XRD spektrumları

4.6. Termal Karakterizasyon : TGA

TGA eğrileri her üç numune için iki aşamada belirgin kütle kaybı göstermiştir (Şekil 21). KP, SF ve KPSF örnekleri için $120\text{ }^\circ\text{C}$ ' ye kadar gerçekleşen ilk ve yavaş kütle kaybı, esasen numunelerde bulunan suyun buharlaşmasına atfedilmektedir. Esas olarak protein

degradasyonunun gerçekleştiği ikinci aşamada, 200-500 °C aralığında hızlı bir kütle kaybı gözlenmiştir. Önceki raporlara göre disülfid bağlarının kırılması nedeniyle 230 ile 250 °C arasında kükürt dioksit ve hidrojen sülfür salınımı meydana gelmektedir (Feroz vd., 2022). İpek fibroini için daha yüksek olan termal kararlılığın, yapıdaki daha yüksek miktarda beta tabaka konformasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Öte yandan kompozit örneğin termal stabilitesinin keratin macununkine yakın olması, kütlece ipek fibroini miktarının yapıdaki keratin macun tozları oranına nazaran oldukça az olmalarından kaynaklanmaktadır.

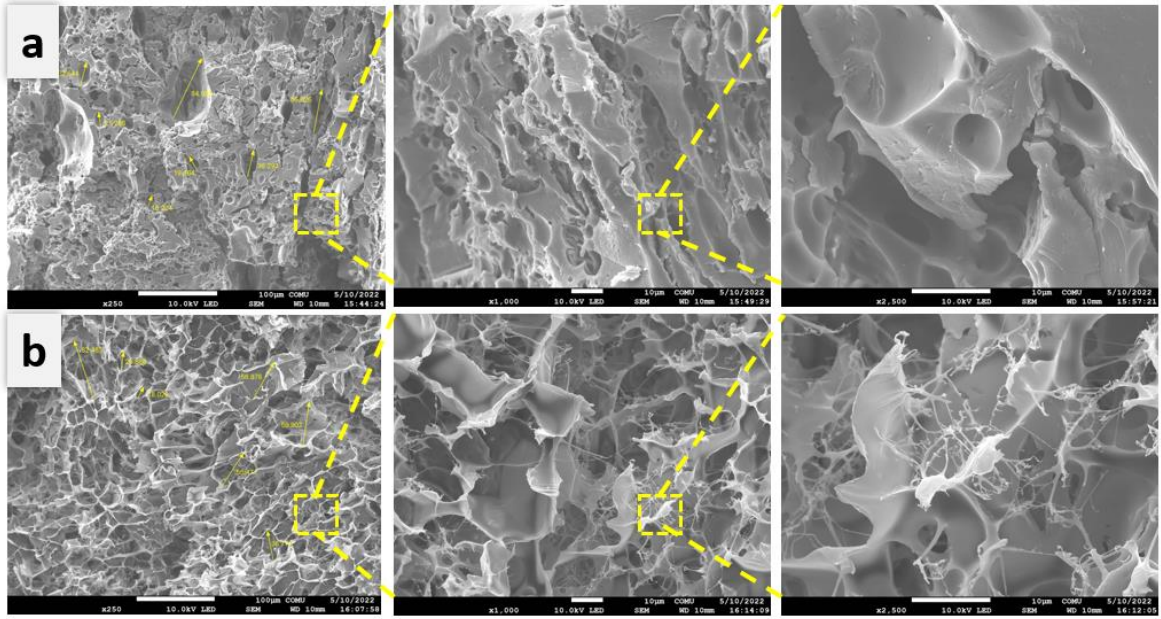


Şekil 21. Keratin macun, KPSF kompozit iskele ve ipek fibroini TGA eğrileri

4.7. Yapısal Gözeneklilik ve Morfolojinin Değerlendirilmesi : SEM

KP ve KPSF kriyojellerin SEM mikrografları incelendiğinde, malzemelerin mikroyapılarının belirgin bir şekilde gözeneklilik sergilediği ortaya konmuştur. KP iskelelerin gözenek boyutları yaklaşık olarak 15-84 µm arasında ve KPSF iskelelerin gözenek boyutları 18-82 µm arasında değiştiği kaydedilmiştir. Osteoblast hücrelerinin boyutlarının 10-50 µm aralığında olduğu bilinmektedir (Abbasi vd., 2020). Önceki bazı çalışmalarda 10-100 µm arasında değişkenlik gösteren gözenek boyutlarına sahip biyoiskelelerin kemik doku onarımı için uygun malzemeler olduğu rapor edilmiştir (Gundu

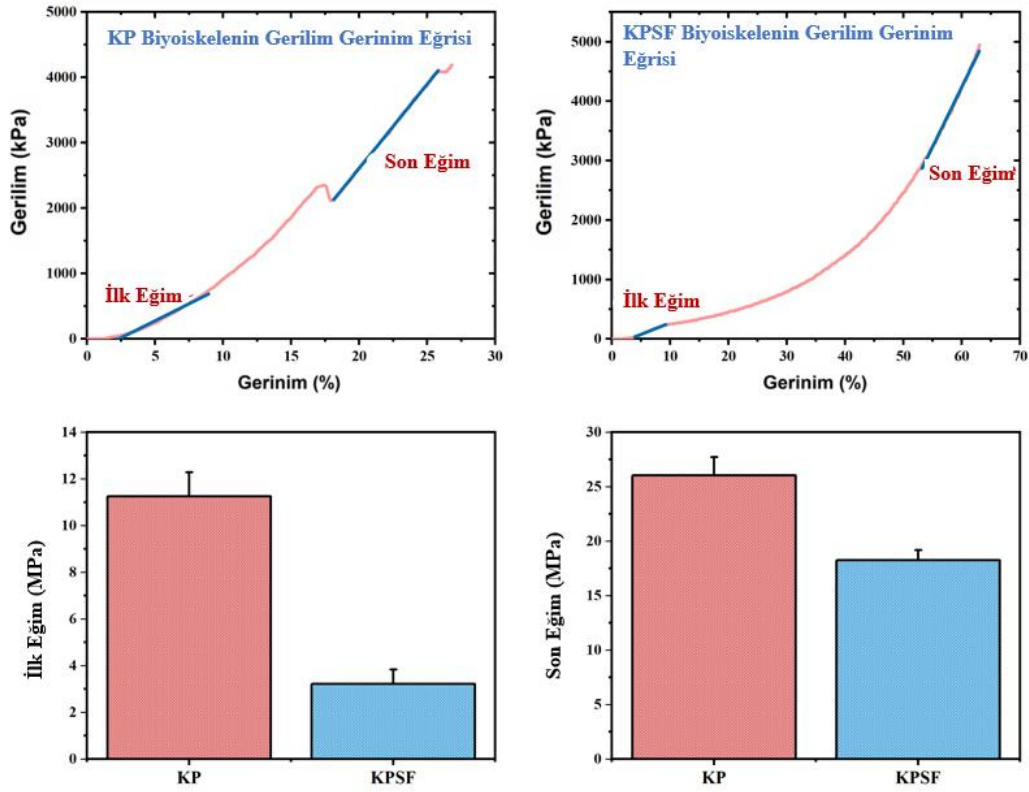
vd., 2022; Tao & Liu, 2023). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda geliştirilen kemik dolgu malzemelerinin hücre tutunması, vaskülarizasyon ve kemik doku yenilenmesi için uygun ortam sağlayabileceği doğrulanmıştır. Ayrıca doku yenilenmesi sürecinin sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesi için gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı olmaları da oldukça önemli bir parametredir (Mour vd., 2010). Bu bağlamda iskelelerin mikroyapıları incelendiğinde, KPSF iskelelerin daha homojen bir dağılım gösteren birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir ağ sergilediği gözlenmiştir. Bu nedenle, KPSF iskelelerin KP iskelelere nazaran kemik doku yenilenme süreci açısından daha elverişli olabileceği ifade edilebilir.



Şekil 22. KP (a) ve KPSF (b) kriyojellerin SEM mikrografileri

4.8. Mikromekanik Özelliklerin Belirlenmesi

KP ve KPSF kriyojellerin gerilim-gerinim eğrileri ve düşük/yüksek gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri Şekil 23’de verilmiştir.



Şekil 23. KP ve KPSF iskelelerin gerilim-gerinim eğrileri, düşük ve yüksek gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri

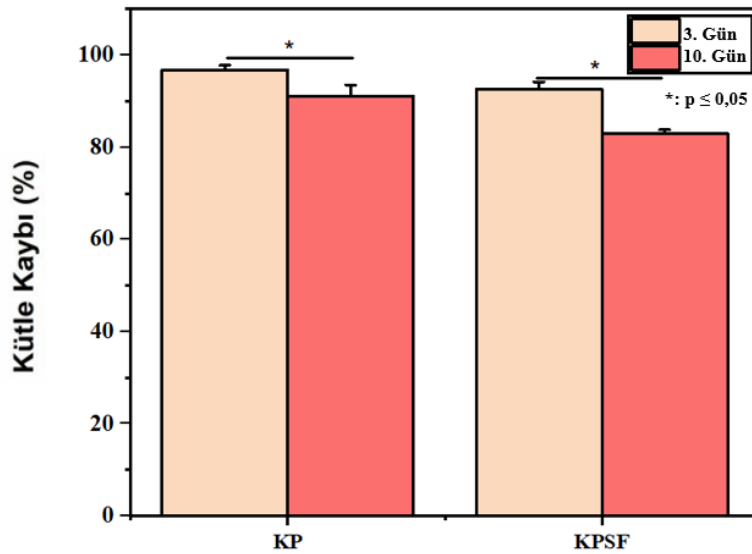
KP ve KPSF yapı iskelelerinin düşük gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri sırasıyla $11,25 \pm 1,04$ MPa ve $3,22 \pm 0,62$ MPa olarak, yüksek gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri ise sırasıyla $26,05 \pm 1,69$ MPa ve $18,25 \pm 0,93$ MPa olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte KP iskelenin düşük ve yüksek gerinim değerlerinde sıkıştırma modüllerinin, KPSF iskelenin gerilim değerlerine oranları sırasıyla 3,5 ve 1,4 kat olarak hesaplanmıştır.

Mekanik özellikler arasında görülen bu farkın iskelelerin yapısal olarak gözenek dağılımlarının farklılık göstermesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Tian vd., 2021). Yapısında daha fazla birbirine bağlı gözenek barındıran kompozit iskelelerin mekanik dayanımı oldukça dens bir yapıya sahip olan keratin macuna nazaran düşüktür. Bunun yanı sıra KPSF iskelelerin düşük ve yüksek gerinim değerlerindeki sıkıştırma modülleri arasında görülen yüksek farkın malzemenin sıkıştırılmasıyla kapanan gözeneklere bağlı olduğu düşünülebilir. Literatürle karşılaştırıldığında, her iki yapı iskelesinin de mekanik

dayanımları keratin ve keratin/ipek iskelelerinden daha yüksektir (X. Cui vd., 2019; Placone vd., 2017).

4.9. KP ve KPSF İskelelerin Enzimatik Biyobozunurluklarının Değerlendirilmesi

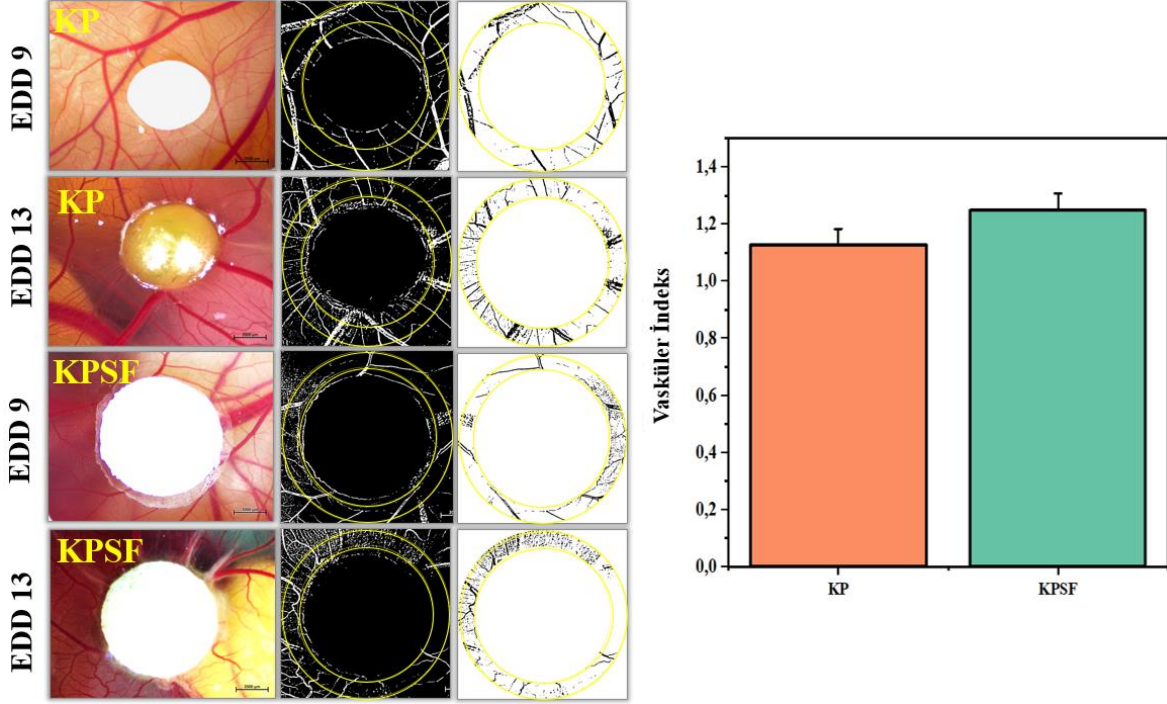
Biyobozunurluk, doku onarımı için bir indükleyici olarak kullanılan biyomalzemelerin değerlendirilmesinde önemli parametrelerden biridir. Etkili bir onarım için doku rejenerasyonu ve biyodegradasyon doğru orantılı olmalıdır (Y. Wang vd., 2020). Bu kapsamda, iskelelerin bozunma özelliklerini incelemek için proteaz aktivitesi gerçekleştirilmiş ve ağırlık kaybı yüzdesi değerlendirilmiştir. Üç günlük inkübasyonun ardından KP ve KPSF yapı iskelelerinin ağırlıklarının sırasıyla $3,29 \pm 1,09$ ve $8,82 \pm 1,63$ 'ünü kaybettiği görülmüştür. On günlük inkübasyonun gerçekleştirildiği başka bir deney setinde, KP iskeleleri ağırlıklarının $7,44 \pm 2,40$ 'ını, KPSF iskeleleri ise $16,96 \pm 0,78$ 'ini kaybettiği kaydedilmiştir. Hesaplanan kütle kaybı değerleri her iki iskele için de 3 ve 10 günlük inkübasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir. Elde edilen verilere göre KP ve KPSF yapı iskelelerinin enzimatik biyobozunurlukları karşılaştırıldığında, kompozit biyoiskelenin parçalanabilirliğinin nispeten daha yüksek olduğu görülmüştür. Kompozit yapı iskelesinin daha hızlı bozunmasının, enzim çözeltisinin birbirine daha bağlı gözenekleri nedeniyle yapı iskelesine daha iyi nüfuz etmesi ve böylece proteaz aktivitesinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Luo vd., 2015).



Şekil 24. İskelelerin 3 ve 10 günlük periyotlarda kaydedilen bozunma oranları

4.10. KP ve KPSF İskelelerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

DeneySEL süreçte araştırılan vasküler ağların temsili anjiyogramları ve ImageJ algoritmaları tarafından belirlenen vasküler yoğunluklardan elde edilen indeksler Şekil 25’ de gösterilmektedir.

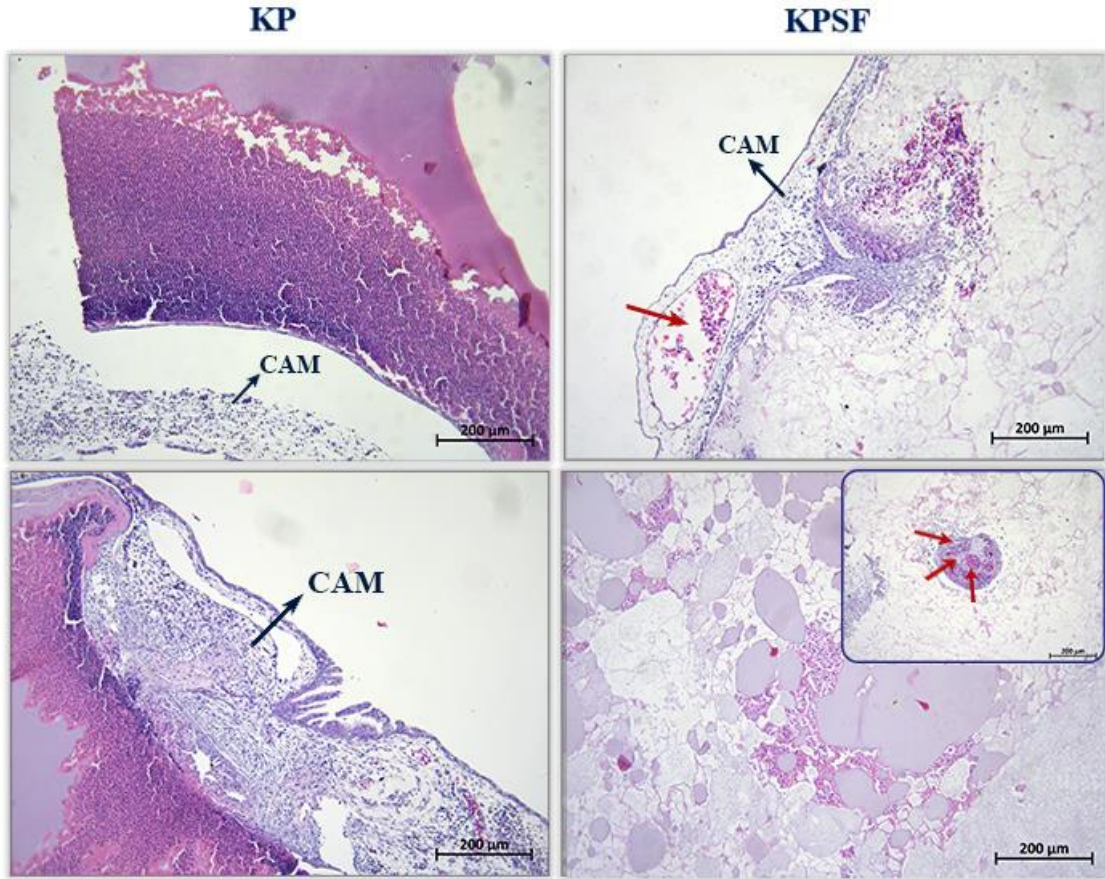


Şekil 25. İskelelerin implantasyon sonrası ve eksplantasyon öncesi kaydedilen görüntüleri, vaskülerizasyonun değerlendirilmesi için işlenmiş görseller ve vasküler indeksler

Vasküler yoğunluk miktar değişimlerini sergileyen indeksler KP örneği için $1,13 \pm 0,05$ ve KPSF için $1,25 \pm 0,06$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar KPSF kriyojellerinin KP kriyojellere oranla daha yüksek pro-anjiyojenik etki gösterdiğini sergilemiştir.

CAM esasen allantoik epitel, mesoderm ve karyonik epitel olmak üzere üç alt katmandan oluşur. Bahsedilen alt katmanların tümü embriyonik inkübasyonun 11 ve 15 günleri arasında gerçekleşen karmaşık bir süreçte ilerleyen hücre tipi farklılaşmaları sayesinde kayda değer morfolojik gelişimler gösterir. Bu süreçte farklılaşmaya başlamış bazı hücreler üçgen şekilli ve microvillus içeren hücrelerdir ki bunlara tip 1 hücreler denir, yuvarlak şekle sahip olan bazı hücreler tip 2 hücreler olarak adlandırılır ve son olarak beşgen veya altıgen şekle sahip olan tip 3 hücreleri şeklinde sınıflandırılabilir. Tip 3 hücrelerin (6-

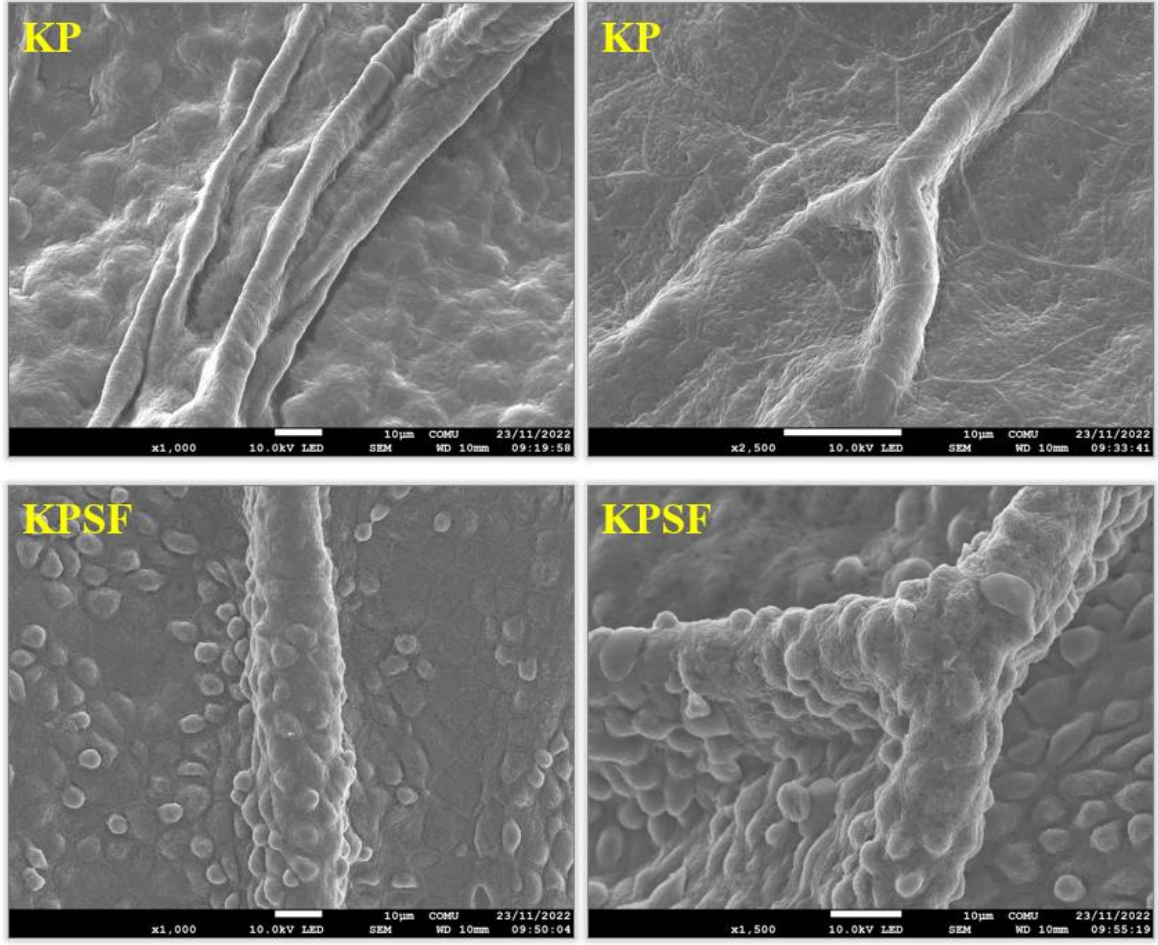
7 adet) tip 2 hücrenin etrafını sarmasıyla çiçek benzeri motifler oluşmaktadır (Halgrain vd., 2022).



Şekil 26. İn ovo CAM testi sonucu iskelelerden elde edilen histogramlar

Cam tahlili ardından sabitlenerek korunan numunelerden alınan kesitler Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyandı ve histoloji kesitleri elde edildi (Şekil 26). Histogramlar her iki örneğin yüzeyinde çoğunlukla tip 2 hücrelerin varlığını göstermiştir. Daha yüksek gözenekliliğe sahip olan KPSF iskelelerde hücrelerin numune ile etkileşimleri daha fazla olup derin kesitlerle de hücrelerin iskele içerisine nüfuz ettiği doğrulanmıştır.

Aynı zamanda her iki silindirik iskelenin kenarlarından hücrelerin iskele içine doğru göçlerinin gözlemlenmesi malzemelerin çevre dokularla etkileşimlerinin iyi olduğu sonucunu verebilir (Kocak vd., 2020). Bunlara ek olarak KP iskelelerin aksine KPSF iskelelerde kan damarlarının iskele içerisine sızdığı da histogramların değerlendirilmesiyle tespit edilmiştir.



Şekil 27. İn ovo CAM testi sonrası iskelelerin SEM görüntüleri

Örneklerin sabitlenmesi ve oda sıcaklığında kurutulmasının ardından alınan SEM mikrografileri incelendiğinde malzemelerin yüzeylerinde kılcal damarların varlığı açıkça görüntülenmiştir. Bunun yanı sıra her iki malzemenin yüzeyinde çeşitli kan hücrelerine rastlanmasının malzemelerin eksplantasyonu sırasında gerçekleşen kanamalardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Prue Talbot, 2011). Ayrıca numune yüzeylerindeki tip 2 hücrelerinin varlığının SEM mikrografileriyle kanıtlanması histoloji analizlerini destekler niteliktedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik kaybının genel olarak hastanın yaşam kalitesi üzerinde önemli etkileri vardır. Günümüzde kemikle ilgili tıbbi tedaviler ve bu tedavilere yönelik maliyetler artmaktadır. Ayrıca, uzayan yaşam süresi ve yaşlanan dünya nüfusu nedeniyle kırıklar, bel ağrıları, skolyoz, osteoporoz, kemik enfeksiyonu veya tümörleri, doğumsal kusurlar ve ağız ve çene-yüz patolojileri gibi kas-iskelet sistemi patolojilerinde hızlı bir artış görülmektedir.

Kandan sonra en sık nakledilen doku kemiktir; bununla birlikte, klinik ortamda on yılı aşkın bir süredir kullanılmasına rağmen, kemik greftleri tedavide uygulamalarını sınırlayan bazı dezavantajlar sergilemektedir. Mevcut altın standardı temsil eden otogreft tekniğinin (vaskülarize olsun ya da olmasın) dezavantajları şunlardır: tedarik sınırlaması, değişken rezorpsiyon, donör saha morbidite riski, belirli bölgelerde yüksek başarısızlık oranı ve ikinci bir ameliyat ihtiyacı. Demineralize Kemik Matriksi ve ksenogreftler (hayvan kaynaklı) gibi allogreftlerle (insan kadavralarından veya canlı donörlerden) ilişkili problemler, alıcının vücudu tarafından patojen iletimi ve reddi olabilir. Şu anda eklem artroplastileri ve uzun kemik ve vertebral kırıklar için mekanik ve yapısal destek sağlamak amacıyla kullanılan eklem protezleri, plakalar ve vidalar gibi metal implant stratejileri (titanyum alaşımları ve paslanmaz çelik), bozulmazlık, yüksek sertlik, yorgunluk, kırılma, konakçı dokuya entegrasyon eksikliği, ekstrüzyon ve enfeksiyon nedeniyle sınırlamalar sunar.

Günümüzde, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, geleneksel tekniklerle ilişkili komplikasyonların üstesinden gelme amacıyla, kemik rekonstrüksiyonu için umut verici stratejiler olarak ortaya konmuştur. Son zamanlarda, organ nakli için sürekli artan talep ve aynı zamanda donör mevcudiyetinin ciddi bir eksikliği nedeniyle rolleri daha stratejik hale gelmiştir. Bu sorunları çözmek için potansiyel bir çözüm, yapı iskeleleri, hücreler veya mekanik faktörlerin kombinasyonu yoluyla mühendislik yapılarının geliştirilmesidir.

Şu anda kemik doku mühendisliği uygulamaları için kullanılan yapı iskelelerinin çoğu polimerler, biyoaktif seramikler ve kompozit yapıdalardır. İskele üretimi için kullanılan polimerler doğal veya sentetik olabilir. Keratin, ipek fibroini, hyaluronik asit , kitosan ve kollajen gibi doğal olarak türetilen polimerler, iyi biyoyumluluk, osteokondüktivite ve düşük immünojenisite sergilerler. Bununla birlikte, dezavantajları, kontrol edilmesi zor bir

bozunma oranı ve düşük mekanik stabilite ile temsil edilmektedir. Polianhidrit, polipropilen fumarat (PPF), polikaprolakton (PCL), polifosfazen, polilaktik asit (PLA), polieter eter keton gibi sentetik polimerler(PEEK) ve poli(glikolik asit) (PGA), kontrollü bir bozunma oranı, kemik mekanik özelliklerini tasarlama veya ayarlama, karmaşık şekiller üretme olasılığı, hücre eki iyileştirmesi ve çözünebilir moleküller verme potansiyeli gösterir. Ayrıca, bu tip polimerler düşük maliyetlerle, büyük üniform miktarlarda üretilebilir ve uzun bir raf ömrüne sahiptir. Kritik bir dezavantaj , içsel doğaları nedeniyle daha iyi biyoaktif özellikler gösteren doğal polimerlere kıyasla hücrelerle etkileşime girme yeteneğinin daha düşük olmasıdır. Yapılan araştırmalar doğal polimerlerin doğal hücre dışı matrisini taklit edebilmeleri ve biyolojik olarak aktiflikleri sebebiyle doku yenilenmesinde kullanımlarının daha avantajlı olduklarını ortaya koymuştur.

Tez çalışması kapsamında, yenilikçi kemik dolgu malzemelerinin geliştirilmesi için keratin ve ipek fibroini doğal polimerleri kullanılmıştır. Her iki polimer herhangi bir toksisiteye sebep olmamaları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, sürdürülebilirlikleri ve hücre tutunması, çoğalması, doku yenilenmesi için uygun bir ortam oluşturabilmeleri nedeniyle tercih edilmiştir. Bu çalışmada keratin macun ve keratin macun/ipek fibroini kompozit iskeleleri toksik kimyasallar kullanarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmeden üretilmiştir. Keratin macun üretimi için sitrik asit ile muamele sonucu bir çökeltme işlemi gerçekleştirilirken hazırlanan kompozit iskeleler liyofilizasyon işlemi ardından metanol muamelesiyle yapısal olarak sağlamlaştırılmıştır. Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere tasarlanan her iki malzemenin fizikokimyasal, mekanik ve anjiyojenik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kriyojellerin karakterizasyonları için ATR-FTIR, XRD, TGA, mekanik basma testi, SEM görüntüleme, enzimatik *in vitro* biyobozunurluk ve *in ovo* CAM analizleri gerçekleştirilmiştir. Kriyojellerin analiz sonuçları genel olarak karşılaştırıldığında artan gözeneklilik ile doğru orantılı olarak kompozit iskelelerin mekanik ve termal dayanıklılıklarının daha yüksek olduğu ve histolojik görüntüler incelendiğinde benzer zamanda daha fazla hücre göçüne izin verdiği görülmüştür.

Geliştirilen her iki malzemenin ileri aşamalarda hücre kültürü çalışmalarının ve *in vivo* değerlendirmelerinin gerçekleştirilmesi doku onarımı mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve açıklanabilmesi açısından faydalı olacaktır. Sonuç olarak KP ve KPSF kemik dolgu malzemelerinin kemik doku rejenerasyonlarında kullanım için uygun materyaller oldukları,

malzemelerin geliştirilebilirlik açısından uygun oldukları ve sunulan tez çalışmasının doku mühendisliği alanında yenilikçi çalışmalara öncülük edebileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKÇA

- Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N. T. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>
- Abdelaziz, A. G., Nageh, H., Abdo, S. M., Abdalla, M. S., Amer, A. A., Abdal-hay, A., & Barhoum, A. (2023). A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges. *Bioengineering*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020204>
- Abou Taleb, M., Mowafi, S., Vineis, C., Varesano, A., Sanchez Ramirez, D. O., Tonetti, C., & El-Sayed, H. (2022). Effect of Alkali Metals and Alkaline Earth Metals Hydroxides on the Structure of Wool Fibers. *Journal of Natural Fibers*, 19(9), 3351–3364. <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1846659>
- Ahmed Nahian; Pradip R. Chauhan. (2022). Histology, Periosteum And Endosteum. İçinde *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557584/>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5), 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>
- Ansari, M. (2019). Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*, 8(4), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Atrian, M., Kharaziha, M., Javidan, H., Alihosseini, F., & Emadi, R. (2022). Zwitterionic keratin coating on silk-Laponite fibrous membranes for guided bone regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(11), 1019–1031. <https://doi.org/10.1002/term.3350>
- Battafarano, G., Rossi, M., De Martino, V., Marampon, F., Borro, L., Secinaro, A., & Fattore, A. Del. (2021). Strategies for bone regeneration: From graft to tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031128>
- Biswal, T. (2019). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, 41, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.628>

- Bloise, N., Patrucco, A., Bruni, G., Montagna, G., Caringella, R., Fassina, L., Tonin, C., & Visai, L. (2020). In vitro production of calcified bone matrix onto wool keratin scaffolds via osteogenic factors and electromagnetic stimulus. *Materials*, *13*(14). <https://doi.org/10.3390/ma13143052>
- Cal, F., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., Kiran, F., Cengiz, U., & Arslan, Y. E. (2021). Synthesis of Silica-Based Boron-Incorporated Collagen/Human Hair Keratin Hybrid Cryogels with the Potential Bone Formation Capability. *ACS Applied Bio Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00805>
- Cheng, Y.-L., Lee, C.-Y., Huang, Y.-L., Buckner, C. A., Lafrenie, R. M., Dénomée, J. A., Caswell, J. M., Want, D. A., Gan, G. G., Leong, Y. C., Bee, P. C., Chin, E., Teh, A. K. H., Picco, S., Villegas, L., Tonelli, F., Merlo, M., Rigau, J., Diaz, D., ... Mathijssen, R. H. J. (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech*, *11*(tourism), 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Chilakamarry, C. R., Mahmood, S., Saffe, S. N. B. M., Arifin, M. A. Bin, Gupta, A., Sikkandar, M. Y., Begum, S. S., & Narasaiah, B. (2021). Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech*, *11*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02734-7>
- Chocholata, P., Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Cholas, R., Kunjalukkal Padmanabhan, S., Gervaso, F., Udayan, G., Monaco, G., Sannino, A., & Licciulli, A. (2016). Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Materials Science and Engineering C*, *63*, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.022>
- Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, *31*(21). <https://doi.org/10.1002/adfm.202010609>
- Cui, W., Santos, H. A., Zhang, B., & Zhang, Y. S. (2022). Functional biomaterials. *APL*

Bioengineering, 6(1), 2020–2022. <https://doi.org/10.1063/5.0078930>

- Cui, X., Xu, S., Su, W., Sun, Z., Yi, Z., Ma, X., Chen, G., Chen, X., Guo, B., & Li, X. (2019). Freeze–thaw cycles for biocompatible, mechanically robust scaffolds of human hair keratins. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107(5), 1452–1461. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34237>
- de Guzman, R. C., Saul, J. M., Ellenburg, M. D., Merrill, M. R., Coan, H. B., Smith, T. L., & Van Dyke, M. E. (2013). Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds. *Biomaterials*, 34(6), 1644–1656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.002>
- Dias, G. J., Mahoney, P., Swain, M., Kelly, R. J., Smith, R. A., & Ali, M. A. (2010). Keratin-hydroxyapatite composites: Biocompatibility, osseointegration, and physical properties in an ovine model. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 95(4), 1084–1095. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32908>
- Dias, G. J., Ramesh, N., Neilson, L., Cornwall, J., Kelly, R. J., & Anderson, G. (2020). The adaptive immune response to porous regenerated keratin as a bone graft substitute in an ovine model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.133>
- Ding, X., Huang, Y., Li, X., Liu, S., Tian, F., Niu, X., Chu, Z., Chen, D., Liu, H., & Fan, Y. (2021). Three-dimensional silk fibroin scaffolds incorporated with graphene for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 109(4), 515–523. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37034>
- Ding, Z., Cheng, W., Mia, M. S., & Lu, Q. (2021). Silk Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, 21(8), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100153>
- Ebhodaghe, S. O. (2021). Natural Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(16), 2144–2194. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1958185>
- Esparza, Y., Ullah, A., Boluk, Y., & Wu, J. (2017). Preparation and characterization of thermally crosslinked poly(vinyl alcohol)/feather keratin nanofiber scaffolds. *Materials and Design*, 133, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.07.052>

- Fan, J., Abedi-Dorcheh, K., Vaziri, A. S., Kazemi-Aghdam, F., Rafieyan, S., Sohrabinejad, M., Ghorbani, M., Adib, F. R., Ghasemi, Z., Klavins, K., & Jahed, V. (2022). A Review of Recent Advances in Natural Polymer-Based Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Polymers*, *14*(10). <https://doi.org/10.3390/polym14102097>
- Farokhi, M., Mottaghitlab, F., Samani, S., Shokrgozar, M. A., Kundu, S. C., Reis, R. L., Fatahi, Y., & Kaplan, D. L. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 68–91. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.001>
- Fattore1, A. Del, Teti2, A., & Nadia Rucci2. (2012). Table of contents 1. *Frontiers in Bioscience*, 1–11. <https://doi.org/10.1109/epqu.2011.6128966>
- Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., & Biggs, M. J. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *84*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>
- Feroz, S., & Dias, G. (2021). Hydroxypropylmethyl Cellulose (Hpmc) Crosslinked Keratin/Hydroxyapatite (Ha) Scaffold Fabrication, Characterization And In Vitro Biocompatibility Assessment As A Bone Graft For Alveolar Bone Regeneration. *Heliyon*, *7*(11), e08294. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08294>
- Feroz, S., Muhammad, N., Dias, G., & Alsaiani, M. A. (2022). Extraction of keratin from sheep wool fibres using aqueous ionic liquids assisted probe sonication technology. *Journal of Molecular Liquids*, *350*, 118595. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118595>
- Feroz, S., Muhammad, N., Ranayake, J., & Dias, G. (2020). Keratin - Based materials for biomedical applications. *Bioactive Materials*, *5*(3), 496–509. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007>
- Gambari, L., Amore, E., Raggio, R., Bonani, W., Barone, M., Lisignoli, G., Grigolo, B., Motta, A., & Grassi, F. (2019). Hydrogen sulfide-releasing silk fibroin scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *102*(April), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.039>
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., & Entezami, A. A. (2011). Improving the barrier and

- mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.016>
- Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Archives of Bone and Joint Surgery*, 6(2), 90–99. <https://doi.org/10.22038/abjs.2018.26340.1713>
- Giteru, S. G., Ramsey, D. H., Hou, Y., Cong, L., Mohan, A., & Bekhit, A. E. D. A. (2023). Wool keratin as a novel alternative protein: A comprehensive review of extraction, purification, nutrition, safety, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 643–687. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13087>
- Gundu, S., Sahi, A. K., Varshney, N., Varghese, J., K. Vishwakarma, N., & Mahto, S. K. (2022). Fabrication and in vitro characterization of luffa-based composite scaffolds incorporated with gelatin, hydroxyapatite and psyllium husk for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(17), 2220–2248. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2101415>
- Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., Li, C., & Qiu, H. (2021). The role of natural polymers in bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 338(July), 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.055>
- Halgrain, M., Georgeault, S., Bernardet, N., Hincke, M. T., & Réhault-Godbert, S. (2022). Concomitant Morphological Modifications of the Avian Eggshell, Eggshell Membranes and the Chorioallantoic Membrane During Embryonic Development. *Frontiers in Physiology*, 13(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.838013>
- Hamasaki, S., Tachibana, A., Tada, D., Yamauchi, K., & Tanabe, T. (2008). Fabrication of highly porous keratin sponges by freeze-drying in the presence of calcium alginate beads. *Materials Science and Engineering C*, 28(8), 1250–1254. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.11.008>
- Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F., & Perale, G. (2019). Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, 46(S21), 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>

- Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I. C., Choong, P. F. M., Schuetz, M. A., & Hutmacher, Di. W. (2013). Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective. *Bone Research*, *1*, 216–248. <https://doi.org/10.4248/BR201303002>
- Hines, D. J., & Kaplan, D. L. (2011). Mechanisms of controlled release from silk fibroin films. *Biomacromolecules*, *12*(3), 804–812. <https://doi.org/10.1021/bm101421r>
- Islam, M. T., Laing, R. M., Wilson, C. A., McConnell, M., & Ali, M. A. (2022). Fabrication and characterization of 3-dimensional electrospun poly(vinyl alcohol)/keratin/chitosan nanofibrous scaffold. *Carbohydrate Polymers*, *275*(July 2021), 118682. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118682>
- Jackson, M., & Mantsch, H. H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *30*(2), 95–120. <https://doi.org/10.3109/10409239509085140>
- Kashte, S., Jaiswal, A. K., & Kadam, S. (2017). Artificial Bone via Bone Tissue Engineering: Current Scenario and Challenges. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13770-016-0001-6>
- Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G., & Laurencin, C. T. (2008). Tissue engineering of bone: Material and matrix considerations. *Journal of Bone and Joint Surgery*, *90*(SUPPL. 1), 36–42. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01260>
- Kocak, F. Z., Talari, A. C. S., Yar, M., & Rehman, I. U. (2020). In-situ forming pH and thermosensitive injectable hydrogels to stimulate angiogenesis: Potential candidates for fast bone regeneration applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051633>
- Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, *5*(8), 584–603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
- Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C., & Wang, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(4), 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>
- Le, B. Q., Nurcombe, V., Cool, S. M. K., van Blitterswijk, C. A., de Boer, J., & LaPointe,

- V. L. S. (2017). The Components of bone and what they can teach us about regeneration. *Materials*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma11010014>
- Li, G., & Sun, S. (2022). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092757>
- Li, J. J., Ebied, M., Xu, J., & Zreiqat, H. (2018). Current Approaches to Bone Tissue Engineering: The Interface between Biology and Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 7(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701061>
- Liu, Y., Luo, D., & Wang, T. (2016). Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12(34), 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/sml.201600626>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, Q., Huang, Y., Li, M., Zuo, B., Lu, S., Wang, J., Zhu, H., & Kaplan, D. L. (2011). Silk fibroin electrogelation mechanisms. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2394–2400. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.032>
- Luo, Z., Zhang, Q., Shi, M., Zhang, Y., Tao, W., & Li, M. (2015). Effect of pore size on the biodegradation rate of silk fibroin scaffolds. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/315397>
- Ma, D., Wang, Y., & Dai, W. (2018). Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 89(23), 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.062>
- Maia, F. R., Bastos, A. R., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., & Reis, R. L. (2022). Recent approaches towards bone tissue engineering. *Bone*, 154(June 2021), 116256. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116256>
- Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., & Hofmann, S. (2016). Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 31, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005>
- Mour, M., Das, D., Winkler, T., Hoenig, E., Mielke, G., Morlock, M. M., & Schilling, A. F.

- (2010). Advances in porous biomaterials for dental and orthopaedic applications. *Materials*, 3(5), 2947–2974. <https://doi.org/10.3390/ma3052947>
- Muir, V. G., & Burdick, J. A. (2021). Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels. *Chemical Reviews*, 121(18), 10908–10949. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00923>
- Naderi, P., Zarei, M., Karbasi, S., & Salehi, H. (2020). Evaluation of the effects of keratin on physical, mechanical and biological properties of poly (3-hydroxybutyrate) electrospun scaffold: Potential application in bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 124(January), 109502. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109502>
- Narita, C., Okahisa, Y., Wataoka, I., & Yamada, K. (2020). Characterization of ground silk fibroin through comparison of nanofibroin and higher order structures. *ACS Omega*, 5(36), 22786–22792. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01750>
- Ozdil, D., & Aydin, H. M. (2014). Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(12), 1793–1810. <https://doi.org/10.1002/jctb.4505>
- Pirosa, A., Gottardi, R., Alexander, P. G., & Tuan, R. S. (2018). Engineering in-vitro stem cell-based vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0847-8>
- Placone, J. K., Navarro, J., Laslo, G. W., Lerman, M. J., Gabard, A. R., Herendeen, G. J., Falco, E. E., Tomblyn, S., Burnett, L., & Fisher, J. P. (2017). Development and Characterization of a 3D Printed, Keratin-Based Hydrogel. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 237–248. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1621-7>
- Pramanik, S., Kharche, S., More, N., Ranglani, D., & Kapusetti, G. (2022). Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review. *Engineered Regeneration*, 4(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.12.002>
- Prue Talbot, G. M. (2011). *Gallus gallus domesticu, blood cell*. CIL. Dataset. <https://doi.org/https://doi.org/doi:10.7295/W9CIL12621>
- Puerta, M., Peresin, M. S., & Restrepo-Osorio, A. (2020). Effects of Chemical Post-treatments on Structural and Physicochemical Properties of Silk Fibroin Films Obtained

- From Silk Fibrous Waste. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.523949>
- Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, 9(45), 26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>
- Rajabi, M., Ali, A., McConnell, M., & Cabral, J. (2020). Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 110(January), 110612. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110612>
- Ramirez, D. O. S., Carletto, R. A., Tonetti, C., Giachet, F. T., Varesano, A., & Vineis, C. (2017). Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12(April), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.004>
- Ranjit, E., Hamlet, S., George, R., Sharma, A., & Love, R. M. (2022). Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7(1), 100398. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.10.001>
- Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and P. S. C. (2015). Physiology of bone tissue. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 7(6), 17–24.
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*, 6(10), 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C*, 78, 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
- Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2), 999–1014. <https://doi.org/10.3390/ma3020999>
- Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>

- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Garg, K., McCool, J. M., Rodriguez, I. A., & Bowlin, G. L. (2010). The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*, 2(4), 522–553. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>
- Shi, C., Yuan, Z., Han, F., Zhu, C., & Li, B. (2016). Polymeric biomaterials for bone regeneration. *Annals of Joint*, 1, 27–27. <https://doi.org/10.21037/aoj.2016.11.02>
- Silva, R., Singh, R., Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Juhasz, J. A., Roether, J. A., Cicha, I., Kaschta, J., Schubert, D. W., Chrissafis, K., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2014). Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(33), 5441–5451. <https://doi.org/10.1039/c4tb00776j>
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11(5), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70086-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5)
- Sun, W., Gregory, D. A., Tomeh, M. A., & Zhao, X. (2021). Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>
- Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., & Selvamurugan, N. (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015>
- Tamburaci, S., Cecen, B., Ustun, O., Ergur, B. U., Havitcioglu, H., & Tihminlioglu, F. (2019). Production and Characterization of a Novel Bilayer Nanocomposite Scaffold Composed of Chitosan/Si-nHap and Zein/POSS Structures for Osteochondral Tissue Regeneration. *ACS Applied Bio Materials*, 2(4), 1440–1455. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00700>
- Tang, D., Tare, R. S., Yang, L. Y., Williams, D. F., Ou, K. L., & Oreffo, R. O. C. (2016). Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, 83, 363–382. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.024>
- Tao, Y., & Liu, S. (2023). Design and Development of Tissue Engineering Materials based on Imine Bonds. *Journal of Physics: Conference Series*, 2468(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2468/1/012095>

- Tian, Y., Wu, Q., Li, F., Zhou, Y., Huang, D., Xie, R., Wang, X., Zheng, Z., & Li, G. (2021a). A flexible and biocompatible bombyx mori silk fibroin/wool keratin composite scaffold with interconnective porous structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208(April), 112080. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112080>
- Tian, Y., Wu, Q., Li, F., Zhou, Y., Huang, D., Xie, R., Wang, X., Zheng, Z., & Li, G. (2021b). A flexible and biocompatible bombyx mori silk fibroin/wool keratin composite scaffold with interconnective porous structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208(April), 112080. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112080>
- Vasconcelos, A., Freddi, G., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*, 9(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.1021/bm7012789>
- Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A., & Garzón-Alvarado, D. A. (2015). Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/729076>
- Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Marine Drugs*, 8(8), 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
- Vu, T., Xue, Y., Vuong, T., Erbe, M., Bennet, C., Palazzo, B., Popielski, L., Rodriguez, N., & Hu, X. (2016). Comparative study of ultrasonication-induced and naturally self-assembled silk fibroin-wool keratin hydrogel biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17091497>
- Wang, H. Y., & Zhang, Y. Q. (2013). Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization. *Soft Matter*, 9(1), 138–145. <https://doi.org/10.1039/c2sm26945g>
- Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., Qian, M., Brandt, M., & Xie, Y. M. (2016). Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*, 83, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>
- Wang, Y., Fan, S., Li, Y., Niu, C., Li, X., Guo, Y., Zhang, J., Shi, J., & Wang, X. (2020). Silk fibroin/sodium alginate composite porous materials with controllable degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1314–1322.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.141>

- Wang, Z., Yang, H., Li, W., & Li, C. (2019). Effect of silk degumming on the structure and properties of silk fibroin. *Journal of the Textile Institute*, *110*(1), 134–140. <https://doi.org/10.1080/00405000.2018.1473074>
- Wei, S., Ma, J. X., Xu, L., Gu, X. S., & Ma, X. L. (2020). 可降解的骨再生材料. *Military Medical Research*, *7*(1), 1–25.
- Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *80*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>
- Xia, Y., & Pack, D. W. (2014). Pulsatile protein release from monodisperse liquid-core microcapsules of controllable shell thickness. *Pharmaceutical Research*, *31*(11), 3201–3210. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1412-5>
- Yamauchi, C., Okazaki, W., Yoshida, T., & Karasawa, A. (2008). Enzymatic degradation of keratin films and keratin fibers prepared from human hair. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(5), 994–997. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.994>
- Yan, R. R., Gong, J. S., Su, C., Liu, Y. L., Qian, J. Y., Xu, Z. H., & Shi, J. S. (2022). Preparation and applications of keratin biomaterials from natural keratin wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(7), 2349–2366. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11882-6>
- Zhang, X. Y., Fang, G., & Zhou, J. (2017). Additively manufactured scaffolds for bone tissue engineering and the prediction of their mechanical behavior: A review. *Materials*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/ma10010050>
- Zhang, Y.-Q. (2018). SDS-PAGE for Silk Fibroin Protein. *Bio-Protocol*, *8*(20). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3054>
- Zhang, Z., Nie, Y., Zhang, Q., Liu, X., Tu, W., Zhang, X., & Zhang, S. (2017). Quantitative Change in Disulfide Bonds and Microstructure Variation of Regenerated Wool Keratin from Various Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *5*(3), 2614–2622. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02963>
- Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., & Fu, J. (2013). Degradable natural polymer hydrogels

for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(3), 327–339. <https://doi.org/10.1002/jctb.3970>

Zhao, X., Lui, Y. S., Choo, C. K. C., Sow, W. T., Huang, C. L., Ng, K. W., Tan, L. P., & Loo, J. S. C. (2015). Calcium phosphate coated Keratin–PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 746–753. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.01.084>

Zhu, G., Zhang, T., Chen, M., Yao, K., Huang, X., Zhang, B., Li, Y., Liu, J., Wang, Y., & Zhao, Z. (2021). Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, 6(11), 4110–4140. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.043>

