



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARDA KULLANILMAK
ÜZERE KİTİN VE BİYOSİLİKA TEMELLİ ÜÇ BOYUTLU
İSKELE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Bahar AKYÜZ YILMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2023

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192362001 numaralı Doktora öğrencisi **Bahar AKYÜZ YILMAZ** tarafından hazırlanan “**BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARDA KULLANILMAK ÜZERE KİTİN VE BİYOSİLİKA TEMELLİ ÜÇ BOYUTLU İSKELE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER

Marmara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç. Dr. Aylin ZİYLAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN YEŞİLDAL

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 05/09/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduđum bu çalıřmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűőecek bir yol ve yardıma bařvurmaksızın yazdıđımı, yararlandıđım eserlerin kaynakçada gűőerilenlerden olduđuunu, çalıřmamda kullandıđım verilerin orijinalliđini ve her tűrlű intihalden uzak olduđuunu beyan ederim.

Enstitű tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tűm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Bahar AKYűZ YILMAZ

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında katkılarını esirgemeyen, yüksek lisans sürecimden itibaren bilgi birikimini benimle paylaşan, bilimsel vizyon kazandırarak kendimi geliştirmemi hep destekleyen, kendi ayaklarımın üzerinde durmamı önemseyen danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez çalışmamın belli bir kısmını birlikte yapma fırsatı bulduğum, bu süreçte bana bilgi birikimini aktaran, AFM cihazını kullanmamı sağlayan, çalışma disiplini ve karakteriyle kendime örnek aldığım saygıdeğer hocam Dr. Arzu ÇOLAK'a çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitemde yer alan, tezimin hücre çalışmaları için bana laboratuvarını ve ekibini açan ve tez izlemelerde yapmış olduğu yönlendirmeler ile tezimin iyileşmesi için elinden geleni yapan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER'e ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a teşekkür ederim. Tez Savunma Jürimde yer alan tez çalışmama farklı bir vizyon katan, bilgi birikimi ve yönlendirmesinin yanında bana laboratuvarını açan tüm herşeyin iyi olması için uğraşan, bana her türlü desteği veren, hiçbir zaman hakkını ödeyemeyeceğim saygıdeğer hocam Doç. Dr. Aylin ZİYYLAN'a en içten teşekkür ederim. Tez Savunma Jürimin bir diğer üyesi değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN YEŞİLDAL'a yardımları için teşekkür ederim. Doktora çalışmamda ağır metal giderimi çalışmalarını yapmam için laboratuvarını ve ekibini açan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Silvana ANDREESCU'ya teşekkür ederim. Clarkson Üniversitesi, Gelişmiş Malzeme İşleme Merkezi (CAMP)'nde doktora tez çalışmamın analizlerinin yapılmasında yardımcı olan ve birçok cihazın kullanımını öğreten Uzman Hubert BİLÂN'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmamın hücre kültürü deneyleri kısmında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Merve ERGİNER HASKÖYLÜ'ye teşekkür ederim. Ağır metal giderimi çalışmaları kısmında bana yardımcı olan Prof. Dr. Daniel ANDREESCU, Dr. Onur UYGUN ve Oluwatosin Solomon POPOOLA' ya çok teşekkür ederim. Doktora tezimin son aşamalarını birlikte geçirdiğim, her türlü sıkıntım da yanımda olan, tüm güzelliklere birlikte ulaşacağımız canım dostum Mehtap AĞIRSOY'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bu günlere gelmemi sağlayan aileme çok teşekkür ederim. Tüm süreçlerde desteğini hep kalbimde hissettiğim, her neresi olursa olsun benimle her yere gelen, tüm yoğunluğuma, çalışmalarına saygı duyan, onun varlığıyla güç aldığım sevgili eşim Hasan YILMAZ'a ve BİRİCİK kızım ALMİLA'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin belli bir bölümünü Clarkson Üniversitesi'nde gerçekleşmesinde 1059B142100551 proje numaralı 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı kurumuna çok teşekkür ederim.

Bahar AKYÜZ YILMAZ

AKSARAY, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Biyomalzeme Türleri	3
2.1.1 Metaller.....	3
2.1.2 Polimerler	3
2.1.2.1 Doğal polimerler.....	3
2.1.2.2 Sentetik polimerler.....	4
2.1.3 Biyoseramikler.....	4
2.1.4 Kompozitler	4
2.2 Hidrojel İskeleler	5
2.3 Hidrojel İskelelerin Üretim Teknikleri	6
2.3.1 Dondurarak-kurutma.....	6
2.3.2 Elektro-eğirme	6
2.3.3 Solvent dökümü/partikül liçi	7
2.3.4 Termal olarak indüklenen faz ayırma tekniği	7
2.3.5 Gaz köpürtme tekniği.....	8
2.4 Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları	8
2.4.1 Doku mühendisliği.....	9
2.4.1.1 Osteokondral doku hasarları ve güncel tedavi yaklaşımlar.....	9
2.4.2 Ağır metal giderimi ve insan sağlığına etkisi	10
2.5 Çalışmada Hidrojel İskeleler Üretilirken Kullanılan Malzemeler	11
2.5.1 Biyosilika.....	11
2.5.2 <i>Geoida macandrewii</i>	12
2.5.3 β -kitin.....	12
2.5.4 Deniz faresi (<i>Aphrodita aculeata</i>)	13
2.5.5 Karboksimetil kitosan	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	16
3.1 Örneklerin ve Kimyasalların Temin Edilmesi	16
3.2 Kullanılan Malzemelerin İzolasyonu.....	16
3.2.1 <i>Geoida macandrewii</i> süngerinden biyosilika fiber izolasyonu.....	16
3.2.2 Deniz faresinden β -kitin nanofiber izolasyonu	17
3.3 Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu	18
3.3.1 Biyosilika fiberin karakterizasyonu	18
3.3.1.1 FTIR analizi	18
3.3.1.2 SEM analizi.....	18
3.3.2 Doğal β -kitin nanofiberlerin karakterizasyonu	18
3.3.2.1 FTIR analizi	18
3.3.2.2 SEM analizi.....	18
3.3.2.3 Termal analiz	19
3.3.2.4 XRD analizi	19
3.3.2.5 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi	19
3.4 Hidrojel İskelelerinin Tasarımı	20
3.4.1 Karboksimetil kitosan çözeltisinin hazırlanması	20
3.4.2 İki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelelerinin üretimi	20
3.4.3 β -Kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskele üretimi	22

3.5 Hidrojel İskelelerinin Karakterizasyonu	23
3.5.1 İki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	23
3.5.1.1 FTIR analizi	23
3.5.1.2 SEM analizi.....	23
3.5.1.3 TGA analizi.....	23
3.5.1.4 XRD analizi	23
3.5.2 β -kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskele karakterizasyonu...	23
3.5.2.1 FTIR analizi	23
3.5.2.2 SEM analizi.....	24
3.6 Üretilen Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Uygulamaları	24
3.6.1 İki fazlı kompozit hidrojel doku iskelelerinin <i>in vitro</i> hücre kültürü çalışması...	24
3.6.1.1 Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) temini ve farklılaşma analizi.....	24
3.6.1.2 Biyouyumluluk analizleri	25
3.6.2 β -kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskelelerin ağır metal giderimi	26
3.6.2.1 Ağır metal adsorpsiyon çalışmaları	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	27
4.1 Hidrojel İskelelerin Karakterizasyon Sonuçları.....	27
4.1.1 İki fazlı 3D kompozit hidrojel kompozit doku iskeleleri.....	27
4.1.1.1 FTIR karakterizasyonu	27
4.1.1.2 SEM karakterizasyonu.....	30
4.1.1.3 Termal karakterizasyon.....	33
4.1.1.4 XRD karakterizasyonu.....	34
4.1.2 Doğal β -kitin nanofiber ve nanofiber takviye edilmiş iskele	35
4.1.2.1 FTIR karakterizasyonu	36
4.1.2.2 SEM karakterizasyonu.....	37
4.1.2.3 Termal karakterizasyon.....	41
4.1.2.4 XRD karakterizasyonu.....	42
4.1.2.5 AFM karakterizasyonu	43
4.2 Üretilen Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Uygulama Sonuçları	45
4.2.1 İki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelesinin biyouyumluluk analizleri	45
4.2.1.1 Canlılık analizi (WST-1)	46
4.2.1.2 ALP analizi	46
4.2.1.3 GAG analizi	47
4.2.2.4 SEM görüntüleri	47
4.2.2 β -Kitin nanofiber ile takviye edilmiş SMC2/CMChT hidrojel iskelesinin ağır metal giderimi	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ.....	69

DOKTORA TEZİ

BIYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARDA KULLANILMAK ÜZERE KİTİN VE BİYOSİLİKA TEMELLİ ÜÇ BOYUTLU İSKELE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Bahar AKYÜZ YILMAZ

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

ÖZET

Biyopolimerik malzemeler biyoteknolojik alanlarda son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle, sentetik polimerlerin kullanımı çok daha kolay ve maliyeti düşük olsada biyoyumumlulukları ve biyobozunurluklarının düşük olması nedeniyle doğal biyopolimerlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı özellikle doku mühendisliği, filtre membran malzemeleri üzerine çalışan araştırmacılar doğal biyomalzemelerden yararlanarak yeni biyokompozit malzemeler tasarlanmaya odaklanmıştır. Biz de planlamış olduğumuz çalışmada, doğal biyomalzemeler ile kemik, kırık doku için doku iskelesi ve ağır metal gideriminde şişme ve adsorbe kabiliyeti yüksek yapı iskeleleri üretimi amaçladık. İlk aşamada denizel *Geoida macandrewii* süngerinin iç yapısında izole edilen biyosilika fiberin iskele içerisinde kullanım oranı belirlenerek doku mühendisliği alanında kullanımı incelenmiştir. İkinci aşamada ise doğal biyosilika fiber katkılı karboksimetil kitosan temelli iki fazlı hidrojel doku iskelesini dondurarak-kurutma yöntemi ile üretimi sağlanmıştır. Üretilmiş olan iskelelerin kimyasal kompozisyonu FTIR analiziyle, genel morfolojik özellikleri SEM cihazı kullanılarak araştırılmıştır. Malzeme karakterizasyonları tamamlandıktan sonra ise sterilize edilen iskelelerin biyoyumumluluk analizleri canlılık, proliferasyon, ALP aktivitesi ve GAG miktarı ölçülerek tamamlanmıştır. İkinci iskele için, Annelida şubesinde yer alan ve deniz fareleri olarak bilinen *Aphrodita aculeata*'nın saç benzeri setae yapılarından β -kitin nanofiber üretimi yapılmış ve CMCh polimeri içerisinde eklenerek kompozit hidrojel doku iskelesi üretilmiştir. Elde edilen iskelerin fizikokimyasal karakterizasyonları yapılmış ve ağır metal giderimi çalışmaları yapılmıştır. β -kitin nanofiber takviye edilmiş CMCh temelli hidrojel yapı iskelesi için bakır giderimi çalışmaları atomik absorpsiyon spektroskopisi ile yapılmış ve sonuçlarına bakıldığında maksimum adsorpsiyon kapasitesinin yaklaşık %28 (2 saat, 100 ppm) olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, iskelerin Cu (II) giderimi için kullanılabilecek alternatif, etkili, tekrar kullanılabilir, yenilikçi ve çevre dostu bir filtre ürünü olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak doğadan izole edilen biyomalzemelerin biyoteknolojik alanlarda kullanılabilir olduğu ve ileri ki çalışmaların önünü açacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyomalzemeler, Doku Mühendisliği, Ağır Metal Giderimi, İskele Tasarımı.

Eylül, 2023; 69 sayfa

Ph.D. THESIS

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD BASED ON CHITIN AND BIOSILICA FOR USE IN BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Bahar AKYÜZ YILMAZ

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA

ABSTRACT

Biopolymeric materials have been widely used in the field of biotechnology in recent years. Although the use of synthetic polymers is generally easier and more cost-effective, the need for natural biopolymers arises due to their lower biocompatibility and biodegradability. Consequently, researchers focusing on tissue engineering, filter membrane materials have turned their attention to designing new biocomposite materials using natural biomaterials. In our planned study, we aimed to produce scaffolds with high swelling and adsorption capabilities using natural biomaterials for bone and cartilage tissue engineering and heavy metal removal. In the initial phase, the usage ratio of biogenic silica fibers isolated from the marine sponge *Geodia macandrewii* within the scaffold was determined, and their potential for use in tissue engineering was examined. In the second phase, a two-phase hydrogel scaffold, incorporating natural biogenic silica fibers and carboxymethyl chitosan, was produced through freeze-drying. The chemical composition (FTIR), surface morphology (SEM) of the produced scaffolds were investigated. After material characterization, the biocompatibility analyses of sterilized scaffolds were completed through measurements of viability, proliferation, ALP activity, and GAG content. Nanofibers of β -chitin were produced from the hair-like setae structures of *Aphrodita aculeata*, commonly known as sea mouse, within the Annelida Phylum. These nanofibers were incorporated into a composite hydrogel scaffold with CMChT polymer. Physicochemical characterizations of the obtained scaffolds were performed, and studies on heavy metal removal were conducted. Copper removal studies for the CMChT-based hydrogel scaffold reinforced with β -chitin nanofibers were carried out using atomic absorption spectroscopy, revealing a maximum adsorption capacity of approximately 28% (2 h, 100 ppm). This study demonstrated that the hydrogel scaffold could be an alternative, effective, reusable, innovative, and environmentally friendly filtering product for Cu (II) removal. In conclusion, it is anticipated that naturally derived biomaterials are applicable in biotechnological fields and that further exploration in various applications will be promising for future studies.

Keywords: Biomaterials, Tissue Engineering, Heavy Metal Removal, Scaffold Design.

September, 2023; 69 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kitosan ve karboksimetil kitosan (CMChT) türevlerinin kimyasal yapıları (Shariatnia, 2018)	15
Şekil 3.1. <i>G. macandrewii</i> süngerinden biyosilika fiber izolasyonunun genel işleyişi	17
Şekil 3.2. Farklı oranlarda Biyosilika fiber/karboksimetil kitosan içeren 3D hidrojel doku iskele üretimi için projenin genel işleyişi	21
Şekil 3.3. CMChT/Kontrol, CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis 3D hidrojel doku iskelerinin üretimi (BG=0.05g).....	21
Şekil 4.1. FTIR spektrumları a) <i>G. macandrewii</i> süngerinin iç yapısından izole edilen BG, b) CMChT/Kontrol doku iskele c) CMChT/BG katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (alt), d) CMChT/BG katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (üst), e) CMChT/BG/Nis katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (alt faz), f) CMChT/BG/Nis katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (üst faz).....	30
Şekil 4.2. CMChT/Kontrol doku iskelesi SEM görüntüleri.....	31
Şekil 4.3. CMChT/BG doku iskelesi SEM görüntüleri.....	32
Şekil 4.4. CMChT/BG/Nis doku iskelesi SEM görüntüleri	32
Şekil 4.5. TGA/DTA diyagramları; a) <i>G. macandrewii</i> süngerinin iç yapısından izole edilen BG fiber, b) CMChT/Kontrol doku iskelesi, c) CMChT/BG doku iskelesi, d) CMChT/BG/Nis doku iskelesi.....	34
Şekil 4.6. XRD sonuçları a) <i>G. macandrewii</i> süngerinin iç yapısından izole edilen BG fiber, b) CMChT/Kontrol iskele c) CMChT/BG katkılı iki fazlı doku iskelesi, d) CMChT/BG/Nis katkılı iki fazlı doku iskelelerin kristaliniteleri	35
Şekil 4.7. a, b) Deniz faresi (<i>Aphrodita aculeata</i>)’ nin orijinal kamera çekimi, c, d) Saç benzeri yapılarından (setae) ile izole edilen kitinin ışık mikroskobu görüntüsü.....	36
Şekil 4.8. <i>A. aculeata</i> satealarından izole edilen kitinin FTIR spektrumu.	37
Şekil 4.9. <i>A. aculeata</i> satealarından izole edilen kitinin a, b, c) ışık mikroskobu görüntüleri ve d, e, f) SEM görüntüleri	38
Şekil 4.10. CMChT/Kontrol doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a) Üst yüzey 500x, b) Kesit 500x, c) Alt yüzey 500x, d) Üst yüzey 1000x, e) Kesit 1000x ve f) Alt yüzey 1000x büyütme.....	39
Şekil 4.11. 200x büyütme ile SEM görüntülerinin üst yüzey a) SMC1/CMChT, b) SMC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri, 400x büyütme ile üst yüzey SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri	40
Şekil 4.12. 200x büyütme ile kesit SEM görüntüleri a) SMC1/CMChT, b) MC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri ve 400x büyütme ile kesit SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri	40
Şekil 4.13. 200x büyütme ile alt yüzey SEM görüntülerinin a) SMC1/CMChT, b) SMC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri ve 400x büyütme ile alt yüzey SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri.....	41
Şekil 4.14. <i>A. aculeata</i> satealarından izole edilen kitinin TGA diyagramı.....	42
Şekil 4.15. <i>A. aculeata</i> satealarından izole edilen kitinin XRD diyagramı.	43

Şekil 4.16. SEM görüntüleri (a, b), SMC nanolifin yüzey AFM topoğrafyası (c) ve Young modülünün dağılımını gösteren histogram eğrisi (d).	44
Şekil 4.17. 1, 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen canlılık analizi sonuçları..	45
Şekil 4.18. 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen ALP analizi sonuçları.....	45
Şekil 4.19. 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen GAG analizi sonuçları.....	46
Şekil 4.20. BGN grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.....	48
Şekil 4.21. BG grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.	49
Şekil 4.22. KON grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.....	49
Şekil 4.23. CMChT polimeri ve beta kitinin amin ve hidroksil grupları aracılığıyla halka açılmasıyla çapraz bağlanma reaksiyonunun şeması. SMC2/CMChT hidrojelinin oluşumu ve bakır bağlanmasının şematik gösterimi.....	50
Şekil 4.24. a) 1000 ppm bakır solüsyonu, b) SMC2/CMChT hidrojel iskelesi manyetik karıştırıcı kullanılarak 1 saat boyunca bakır çözeltisi içinde ve c) 1 saat sonra SMC2/CMChT hidrojel iskelesinin renk değişimi ...	50
Şekil 4.25. SMC2/CMChT iskelenin 1, 10 ve 100 ppm bakır çözeltisi içinde ve dışında ki görüntüleri	51
Şekil 4.26. SMC2/CMChT iskelelerin 1, 10 ve 100 ppm bakır çözeltisinde a) 1 saat, b) 2 saat, c) 5 saat ve d) 48 saat sonrası görüntüleri	51
Şekil 4.27. SMC2/CMChT iskelelerin 1, 10 ve 100 ppm için bakır gideriminin atomik absorpsiyon spektroskopisi sonuçları.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. β -Kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit doku iskelelerinin adlandırılması.....	23
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACI	Otolog Kondrosit Implantasyonu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALP	Alkalen Fosfataz
BG	Biyosilika
CMCh	Karboksimetil Kitosan
CMCh/BG	Biyosilika Fiber Katkılı İki Fazlı Doku İskelesi
CMCh/BG/Nis	Biyosilika Fiber Nisin Katkılı İki Fazlı Doku İskelesi
CMCh/Kontrol	Karboksimetil Kitosan Kontrol İskele
CO₂	Karbondioksit
COOH	Karboksil Grubu
COVID-19	Corona Virüs
dH₂O	Saf Su
ECM	Hücre Dışı Matrisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan
H₂O	Su
HCl	Hidroklorik Asit
HFIP	1,1,1,3,3,3-Heksafloroizopropanol
MACI	Matris-Temelli Kondrosit Implantasyonu
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nis	Nisin
Nm	Nanometre
PE	Polietilen
PEGDE	Poli(Etilen Glikol) Diglisidil Eter
PET	Polietilentereftalat
PS	Polistiren
PU	Poliüretan
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SMC	Deniz Faresi Kitini
TGA	Termogravimetrik Analiz
TIPS	Termal Olarak İndüklenen Faz Ayırma Tekniği
XRD	X-Işını Difraksiyonu
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
pH	Hidrojen Potansiyeli
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
3D	Üç Boyutlu
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

1. GİRİŞ

Çeşitli uygulamalar için uygun ileri biyoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesi, genellikle kontrol edilebilir yapılara sahip modern biyokompozit malzemelerin üretimini gerektirmektedir. Gelişmiş biyomalzemelerin kullanımı için doğadan ilham alınarak üretilen ve kullanım alanına uygun olarak tasarlanan iskelelere ilgi artmıştır. Doğa, malzeme sentezi için geleneksel yaklaşımlar yerine, son derece yumuşak koşullar altında olağanüstü fiziksel ve mekanik özelliklere sahip çok çeşitli biyomalzemeler üretmek iyi bir kaynak oluşturmaktadır.

Çalışmamızda biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere doku mühendisliği ve ağır metal giderim çalışmalarında kullanılmak üzere iki farklı özelliklere sahip 3D iskele tasarımı ve karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Tezde üretilen iskelelerden ilki için iki fazlı morfolojiye sahip olmasına dikkat edilmiştir. Çünkü osteokondral dokularda hem kemik hem de kıkırdak dokunun morfolojisine uygun olması önem kazanmaktadır. Bundan dolayı, osteokondral dokularda kullanılmak üzere gözenekli morfolojiye sahip 3D iskele üretimi için yaygın olarak tercih edilen dondurarak-kurutma yönteminin kullanılmıştır. Doku iskelelerinin morfolojileri ve yapı içerisindeki cam fiber dağılımı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Sonrasında doku iskelelerinin biyoyumumluluğunu araştırmak için *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Diğer iskele ise doğaya biyoteknolojik bir bakış açısıyla yaklaşarak elektrospinleme cihazı ve hiçbir kimyasal çözücü kullanmadan *A. aculeata*'nın saç benzeri setae yapılarından β -kitin nanofiber üretimi yapılmıştır. β -kitin nanofiberler CMCh polimeri içerisinde karıştırılmasının ardından PEGDE ile çapraz bağlanması sağlanarak kompozit hidrojel doku iskelesi üretilmiştir. Sonuç olarak, gerçekleştirilen iskelerden karakterizasyonların sonucunda yüzey morfolojisi en uygun iskele seçilerek ağır metal giderimi çalışmaları yapılmıştır.

Çalışma gerçekleştirilirken Covid-19 pandemisinden dolayı malzeme temin sürelerinin uzaması ve laboratuvarların bir süreliğine kapatılmasından dolayı tez için yapılması planlanan çalışmalarda aksaklıklar olmuştur. Tüm bu zorluklar değerlendirildiğinde, yaşanan pandeminin bütçe üzerinde de etkileri düşünülerek iskelenin birinden vazgeçilerek iki farklı iskele tasarımına bunlardan birinin doku

mühendisliğinde diğerinin ise ağır metal giderimi çalışmalarında kullanımın araştırılmasına jüri üyeleri ile ortak karar alınmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyomalzeme Türleri

Biyomalzemeler, insan vücudunda hücreler ve dokular gibi biyolojik sistemlerle etkileşime giren malzeme sınıfıdır. Bu malzemeler, kullanıldıkları yer ile uyumlu olması ve vücutta çeşitli işlevleri yerine getirmeleri için destek sağlaması gibi özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanmaktadır. Biyomalzemeler, tıpta, biyoteknolojide, ilaç taşınımında, filtre membran sistemlerinde, sensör üretiminde, hasarlı doku tamirinde, hastalıkların teşhis ve araştırma amaçları için kullanılabilecek diğer alanlarda çok önemli bir rol oynamaktadır (Wong ve Bronzino, 2007). Yaygın olarak kullanılan biyomalzeme türleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

2.1.1 Metaller

Biyomalzeme sınıfından biri olarak metaller, özellikle yük taşıyan implantlar, eklem ve kalça protezlerinin yerini alabilen en yaygın olarak kullanılan yapı iskelesi olmaktadır. Çoğu metalik biyomalzemeler, korozyona dirençli olmalı, biyouyumlu olmalı, kullanılacak yere göre yeterli mekanik destek sağlamalı ve kolay bulunabilir olması beklenmektedir. Her metalik biyomalzemenin tüm bu özellikleri bir arada taşınması mümkün olmayabilir (Ping, 2014). Bu nedenlerden dolayı metalik biyomalzemeler özelliklerine göre farklı bölgelerde kullanılmaktadır. Titanyum, paslanmaz çelik ve diğer metaller, sağlamlıkları, dayanıklılıkları ve insan vücudu ile uyumlu olmaları nedeniyle ortopedik implantlarda, dişçilik ve kardiyovasküler cihazlarda kullanılmaktadır.

2.1.2 Polimerler

Tıp ve biyoteknoloji alanında çeşitli polimerler kullanılmaktadır. Polimerik biyomalzemeler, doğal ve sentetik polimerlerden üretilmesine karşılık bunların medikal ve çevresel uygulamalar için kullanımı için ürünler geliştirilmektedir.

2.1.2.1 Doğal polimerler

Doğal biyopolimerler genellikle kitin, kitosan, alginat, jelatin, nişasta, ipek gibi canlı organizmalardan meydana gelen moleküllerdir. Bu polimerler, çeşitli biyolojik süreçler ile oluşur ve biyouyumluluk, biyobozunabilirlik gibi önemli özellikleri

sayesinde son yıllarda canlı organizmalara malzeme tasarımı konusunda ilgi artmıştır (Klein ve Poverenov, 2020).

2.1.2.2 Sentetik polimerler

Sentetik biyopolimerler, kullanıldıkları alana göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bazı sentetik biyopolimerler tek kullanımlık bazıları ise uzun süreli kullanıma imkânı vermektedir. Genellikle kullanılan sentetik polimerler; polistiren (PS), polietilentereftalat (PET), poliüretan (PU), polietilen (PE) gibi malzemelerdir. Ayrıca, yaygın olarak poli (glidikolik asit), poli (laktik asit) ve bunların kopolimeri poli (laktik asit-ko-glikolik asit) iskele üretiminde kullanılmaktadır (Sachlos ve Czernuszka, 2003).

2.1.3 Biyoseramikler

Biyoseramikler, biyoinert (Alümina, zirkonya), gözenekli (hidroksiapatit kaplı gözenekli metaller), biyoaktif (biyoaktif camlar, hidroksiapatit) ve biyobozunur (kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat) seramikler olarak 4 gruba ayrılmıştır. Biyoinert seramik ile doku arasında ne kimyasal ne de biyolojik bir bağlantı olmadığı için ileriiki dönemlerde sorun yaşanmaktadır (Höland vd., 2008). Gözenekli seramiklerde ise biyolojik bağlantı söz konusudur, gözenekli yapı sayesinde yüzey alan artar ve canlı dokunun bağlanması için iyi bir yüzey oluşturur. Biyoaktif seramikler ise doku ile malzeme arasında spesifik bağlanma yapar. Biyoaktif cam, cam-seramik ve hidroksiapatit gibi malzemelerin her biri farklı bağlanma oranı, mukavveti ve etkisi farklılık gösterebilmektedir.

2.1.4 Kompozitler

Kompozit biyomalzemeler, farklı özelliklere sahip iki ve/veya daha fazla farklı malzeme türünün bir araya getirilerek oluşturulan ve her bir bileşenin güçlü yönlerini ön planda tutarak bir kombinasyon oluşturmayı amaçlayan malzemelerdir. Kompozit biyomateryalleri kullanmanın amacı genellikle tek başına kullanılan biyomalzemelerin dezavantajlarının üstesinden gelmek veya tek bir materyalde eksik olan spesifik özelliklerin iyileştirmesini sağlamaktır (Katz ve Willner, 2004). Bu bağlamda kompozit malzemeler, kullanılacak materyale uygun mekanik mukavemet, yüksek biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüzey morfolojisi gibi daha iyi doku

entegrasyonu ya da yüksek adsorbe kabiliyeti sağlayan filtre membranı gibi çok çeşitli özellikler sergileyecek şekilde tasarlanabilmektedir. Kompozit biyomalzemeler; polimer-seramik kompozitler, hidrojel kompozitler, metal-polimer kompozitler, fiber takviye edilmiş kompozitler, ilaç yüklenmiş kompozitler, nanokompozitler ve doğal polimer kompozitler oluşturularak uygun uygulama alanlarına göre biyokompozit malzemeler tasarlanabilmektedir (Aaliya vd., 2021; Park vd., 2017).

2.2 Hidrojel İskeleler

Hidrojeller, sulu ortamlarda yüksek şişme kapasitesine sahip polimer zincirlerinden oluşan üç boyutlu malzemelerdir. Hidrojeller, yapısında bulunan polimer zincirler ile çapraz bağlanarak çözünmeye karşı direnç kazanarak yapısal bütünlüklerini korur. Bu benzersiz özellik, onları tıp, tarım, biyoteknoloji ve malzeme bilimi dahil olmak üzere çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesinde kullanımını ön plana çıkarmıştır. Nanopartiküller, fiberler veya diğer malzemeler birleştirilerek, hidrojellerin yapısal özelliklerinde iyileştirme yapılabilir. Bu iyileştirmeler kullanım alanına göre belirlenebilmektedir (Spicer, 2020). Hidrojeller, kendi ağırlıklarının birkaç katı kadar su emebilir ve tutabilir, bu özellikleri sayesinde kontrollü salınım gerektiren uygulamalarda kullanışlı olmaktadır. Ayrıca biyopolimerler ile üretilen hidrojeller biyolojik olarak uyumludur bu sayede biyolojik sistemlerle etkileşime girebilir, bu da tıp, medical ve farmasötik uygulamalarda kullanmak için uygun hale getirir. Yumuşak ve esnek bir dokusu bulunduğu için yapısal olarak doğal dokulara benzerlik gösterir, bu sayede biyolojik ortamları taklit etmeyi sağlar.

Hidrojel iskeleler üretilirken, kullanılan polimer, çapraz bağlayıcı ajan ve yoğunluğu, biyolojik bozunma, mekanik dayanıklılık ve uyaranlara kimyasal ve biyolojik tepki gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip iskeleler tasarlanabilir ve sentezlenebilir.

Ayrıca hidrojeller fiziksel ve kimyasal özellikleri kullanım alanına göre değiştirilebilir, kullanılan polimer, çapraz bağlayıcı ajan ve diğer faktörler ile belirlenebilmektedir (Nezhad-Mokhtari vd., 2019; Jeong vd., 2017).

2.3 Hidrojel İskelelerin Üretim Teknikleri

Biyomalzemelerin doku mühendisliğinde nanopartikül, nanofiber, nanokompozit, hidrojel ve gözenekli sünger gibi çeşitli yapılarda kullanımı oldukça dikkat çekmektedir (Zhu vd., 2020). Gözenekli ve/veya fiberli hidrojel iskeleler üretmek için yaygın olarak; elektroegirme (Ding vd., 2020; Tan ve Zhou, 2020), dondurarak-kurutma (Fereshteh, 2018; Khoramgah vd., 2020), Solvent dökümü/partikül liçi (Kaur vd., 2016), faz ayırma (Mabrouk vd., 2020) ve gaz köpürmesi (Haleem vd., 2020) gibi teknikler kullanılmaktadır (Kim vd., 2003; Seyednejad vd., 2012; Mirtaghavi vd., 2020; Spicer, 2020; Tan ve Zhou, 2020).

2.3.1 Dondurarak-kurutma

Dondurarak-kurutma yöntemi, birbirine bağlı ve hücre büyümesi için uygun gözeneklere sahip üç boyutlu (3D) yapıları inşa etme kabiliyeti nedeniyle hücre dışı matrisi (ECM) taklit eden mimari yapı iskeleleri üretmek için umut verici bir tekniktir (Fereshteh, Z., 2018). Bu teknikte yapı iskelelerinin gözenekliliği, liyofilizasyon yoluyla üretilir, burada çözücünün buz kristallerinin çözeltideki donma sıcaklığı ve polimer ağırlık oranını kontrol ederek elde edilebilmektedir. Burada su partikülleri vakum altında, düşük basınçta buharlaştırılır ve 3D iskele kurutulmuş formda elde edilir (Liu ve Webster, 2007; Sughanthy vd., 2015). Bu teknikle üretilen iskelelerin gözenekli sünger yapısı, simüle edilmiş vücut sıvısına daldırıldıktan sonra bile korunur. Doğal veya sentetik polimerlerden ve bunların hidroksi apatit ve biyoaktif cam gibi inorganik biyomalzemelerle kompozitlerinden çeşitli 3 boyutlu yapılar hazırlamak için liyofilizasyon tekniği kullanılarak yapılmıştır (Bao vd., 2019).

2.3.2 Elektro-egirme

Nanofiber üretimi için en fazla kullanılan yöntem elektrospinleme yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan cihazın kurulumu, kullanımı basit ve ucuz olmasından dolayı tercih edilmektedir. Elektrospin ile nanofiber üretimini etkileyen faktörler (i) çevresel faktörler (moleküler ağırlık, viskozite, iletkenlik, yüzey gerilim kuvveti, dielektrik sabiti), (ii) işlem parametreleri (akış hızı, uygulanan voltaj, çözelti sıcaklığı, iğne tabanlık arası mesafe), (iii) çevre koşulları (nem, sıcaklık, basınç,

atmosfer cinsi)'dır (İbrahim ve Klingner, 2020). Bu parametrelerin her birinin optimizasyonlarının zor olmasından dolayı elektrospinlemede kullanılan fiberlerin tekrarlı üretimlerinde aynı şartların sağlanması oldukça zordur. Elektrospinleme ile elde edilen fiberler eşit boyutlarda elde edilemediği gibi yapıda kırıkların ve boncukların oluşumu da gerçekleşmektedir. Bu sorunlara çözüm getirebilmek için ek kimyasallar ile kompozit oluşturularak nanofiberler elde edilmiştir (Gutierrez-Gonzalez vd., 2020; Tan ve Zhou, 2020; Saatchi vd., 2021; Xing vd., 2021). Çeşitli polimerler kullanılarak elde edilen nanofiberler çok büyük bir yüzey alan/hacim oranı ve küçük por boyutları ile yüksek gözeneklilik gibi özelliklere sahiptir.

2.3.3 Solvent dökümü/partikül liçi

Bu tekniğin basitliği ve fabrikasyon iskelelerin porojenlerin miktarı ve boyutu yoluyla gözenekliliği üzerindeki kontrolü çekici olmasına rağmen, Solvent dökümü/partikül liçi tekniğinde polimer çözeltisi boyunca tuz partiküllerinin muntazam düzeni yoktur. Bu dezavantaj, tuzun ve polimerin farklı yoğunluğundan kaynaklanmaktadır (El-Kady vd., 2012). Diğer bir dezavantajı ise polimer ve porojenlerin, polimer solüsyonu tarafından tamamen etrafını sarldığında polimer ve porojenlerin karışması ve bunun da tuz partiküllerinin su ile uzaklaştırılmasının zor olmasıdır. Ayrıca yapı iskelesi malzemesi polimer solvent tipinden dolayı çözünlebilmesi gibi dezavantajı vardır.

2.3.4 Termal olarak indüklenen faz-ayırma tekniği

Doku için gözenekli iskeleler imal etmek için faz ayırma teknikleri kullanılmıştır. Termal olarak indüklenen faz ayırma tekniği (TIPS), faz ayrılmasını başlatmak için termal enerjiyi kullanarak istenen homojen gözenekli yapıya sahip yapı iskelelerini üretebilmektedir. Polimer açısından fakir ve polimer açısından zengin fazlar içeren çok fazlı bir sisteme indükleyen termodinamik olarak dengesizliğe yol açan homojen polimer çözeltisinin soğutulmasından oluşturur (Sampath vd., 2016). Daha sonra, polimer açısından zengin faz katılarak bir matris oluşturur ve polimer açısından fakir faz, çözücünün çıkarılmasının bir sonucu olarak gözeneklere dönüşür.

2.3.5 Gaz köpürtme tekniği

Bu teknik, gaz köpürtme tekniği olarak bilinir çünkü polimere sodyum bikarbonat gibi köpürtücü bir madde kullanılmaktadır. Polimer disklerine, tabi tutulan madde içinde gaz artışını ve gelişimini hızlandırmak için yüksek basınçlı gaz uygulanmaktadır (Liao vd., 2012; Wang vd., 2006). Daha sonra numuneler liyofilize edilerek, yaklaşık 100 µm'lik gözenek çapları ve gaz çıkışı üzerine %93'e kadar gözenekliliğe sahip yapı iskelesi elde edilmektedir.

2.4 Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları

Hidrojeller çeşitli uygulamalar için farklı özelliklerle tasarlanabilme yeteneklerinden dolayı geniş kullanım alanlarına sahiptir. Hidrojeller; biyomedikal uygulamalar, doku mühendisliği, ziraat, biyosensör, hijyenik ürünler, yara örtüsü, ilaç taşınım sistemleri, atık su giderimi, gıda gibi birçok alanda kullanılabilmektedir (Ahmed, 2015). Biyomedikal uygulamalar da ilaç taşınım sistemlerinde, yara örtüsü olarak, kontakt lenslerin üretiminde kullanılmıştır (Hamidi vd., 2008; Shantha ve Harding, 2002). Doku mühendisliğinde tedavi amaçlı biyoaktif moleküllerin veya ilaçların kontrollü salınımını sağlayabilmektedir ve doku hasarını gidermek için hücreler ve dokular için yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır (Kashyap vd., 2005; Stamatialis vd., 2008). Hidrojellerin yüksek su tutma kapasiteleri nedeniyle çocuk bezi, hijyenik kadın pedi, yara bakım sargısı gibi ürünlerde de kullanılmıştır (Sun vd., 2002). Tarım da ise, toprakta su tutulmasını ve besin iletimini iyileştirerek bitki büyümesini artırabilmekte ve su kullanımını azaltabilmektedir. Gıda endüstrisinde ise, gıda bileşenlerini kapsüllemek, nem içeriğini kontrol etmek ve iyileştirmek için kullanılmıştır. Hidrojellerin su emici özelliklerinden dolayı bir diğer kullanım alanı kirleticileri sudan ve topraktan emmek ve uzaklaştırmak için çevresel iyileştirme malzemeleri olarak kullanılmıştır (Sharma ve Tiwari, 2020; Van Tran vd., 2018). Sensörlerde ise sıcaklık, pH veya belirli iyonlar gibi çevresel koşullardaki değişikliklere yanıt olarak şişen veya küçülen duyarlı hidrojeller kullanılmaktadır (Tavakoli ve Tang, 2017). Kozmetik alanında ise nemlendirici ve cildi yatıştırıcı özellikleri nedeniyle kozmetik ve cilt bakım ürünlerinde kullanılabilmektedir (Mitura vd., 2020; Stanisław vd., 2020).

2.4.1 Doku mühendisliği

Doku mühendisliği araştırmalarında iskele tasarımı için en önemli faktörlerden biri malzeme seçimidir. Tasarımı yapılacak iskelenin formu, fonksiyonu ve işlevsel özelliklerinin kullanılacak bölge için uygun özelliklere sahip olması gerekmektedir. Uzun yıllar doku mühendisliği çalışmalarında çeşitli doğal (kitosan, selüloz, jelatin, kollajen, fibroin, ipek, aljinat vb.), sentetik (poliüretan, polietilen oksit, polivinil alkol vb.) polimerik ve inorganik (biyoseramik, biyoaktifcamlar vb.) malzemeler yapı iskelesi olarak kullanılmıştır (Nooeaid vd., 2012). Sentetik malzemelerden yapılan iskelelerin kimyasal, mekanik ve yapısal özellikleri kontrol edilebilmesine rağmen biyoaktiviteden yoksun olmaları önemli bir dezavantajdır (Zhao vd., 2018). Doğal biyopolimerlerin yüksek biyouyumlulukları, biyoaktiviteleri, doğal büyüme faktörlerini uyarma ve spesifik hücre yüzey reseptörleri ile etkileşmeleri nedeniyle iskele malzemesi olarak sıklıkla tercih edilmelerine rağmen mekanik özellikleri yeterli olamamaktadır. Bu nedenle üretilen iskelelerin, yüksek biyouyumluluklarını korurken aynı zamanda yeterli mekanik özellikleri sağlayacak şekilde tasarlanması önem kazanmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelmek için kompozit yapı iskelelerin tasarlanmasına ilgi artmıştır (Korpayev vd., 2020; Zhang vd., 2020; Liu vd., 2021; Oliveira vd., 2021; Oudadesse vd., 2021).

2.4.1.1 Osteokondral doku hasarları ve güncel tedavi yaklaşımları

Osteokondral hasarlar, genel olarak hastalık, travma, yaşlılık veya kıkırdak dejenerasyonu sonucu ortaya çıkan, her yaşta sakatlığa sebep olabilen ve hastaların yaşam kalitesini etkileyen yaygın bir eklem hastalığıdır (Savage-Elliott vd., 2014; Qiao vd., 2021). Osteokondral dokuda farklı iyileşme kapasitesine, fizyolojisine ve morfolojisine sahip dokuların bir arada bulunması (eklem kıkırdağı, kalsifiye kıkırdak fazı ve subkondral kemik) ve bu dokuların aynı anda hasar görmüş olması tedavide karşılaşılan en önemli zorluklardandır. Bu sebeple, osteokondral hasarların tedavileri karmaşıktır. Uygun tedavi yapılamadığı için, genellikle eklem fonksiyonunu ve yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen osteoartrit gibi dejeneratif eklem hastalıkları gelişebilmektedir. Osteokondral lezyonların iyileştirilmesine ekonomik açıdan bakıldığında yüksek maliyetler harcandığı ve bunun sonucunda tam iyileşmenin de gerçekleşmediği görülmektedir (Mandl, 2019; Tamaddon vd., 2020). Osteokondral defektlerde kullanılan mevcut klinik yöntemler; mikro kırık

(mezenkimal kök hücrelerin hasarlı bölgeye göçü), otogreft transplantasyon/mozaikplasti (hastanın kendisinden alınan), allogreft transplantasyon (başka bir bireyden alınan) ve otolog kondrosit implantasyonu (ACI) ve matris-temelli kondrosit implantasyonu (MACI) olarak örneklendirilebilmektedir (Kon vd., 2012; Thorp vd., 2021). Örneğin, mikrokirik prosedürü sırasında kemik iliği stimülasyonu ile hiyalin kıkırdaktan ziyade fibröz doku oluşumu, kıkırdak ile karşılaştırıldığında çok daha düşük biyolojik ve mekanik özelliklerle sonuçlanmaktadır (Krych vd., 2012; Gobbi vd., 2020). Osteokondral otogreftler veya mozaikplasti genellikle daha iyi sonuçlara sahip olsa da bu prosedürlerin donör doku mevcudiyeti, topoloji uyumsuzluğu ve donör bölgesi morbiditesi uygulanabilirliğinde sınırlayıcı faktörlerdendir (Grayson vd., 2008). ACI ve MACI, uzun vadede olumlu sonuçlar gösteren hücre bazlı tedavi yöntemleri olsalar da doğal dokunun özelliklerini tam olarak yeniden üretemedikleri yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Harris vd., 2011; Gobbi ve Whyte, 2019). Ayrıca klinikte kullanılan FDA onaylı bir diğer yöntem olan kemik morfogenetik proteinler, yüksek maliyet, yüksek doz ihtiyacı ve olumsuz yan etkiler nedeniyle kullanımlarını sınırlamaktadır. Mevcut, klinikte kullanılan bir diğer yöntem olan hyaluronik asit temelli kıkırdak yamalarının uzun sürede iyileşme ve kondrosit olgunlaşmasının uzun sürmesi gibi zorlukları bulunmaktadır (McNickle vd., 2008). Tüm tedavi yöntemlerinde karşılaşılan zorlukların üstesinden gelmek için osteokondral hasarların tedavisinde, dokunun karmaşıklığını taklit edebilen biyomalzemelerin bir araya gelmesiyle dokuların rejenerasyonu sağlayabilecek iskelelerinin tasarlanması son yıllarda önem kazanmıştır (Ding vd., 2020).

2.4.2 Ağır metal giderimi ve insan sağlığına etkisi

Sanayileşme ve kentleşmenin neden olduğu su kirliliği, modern toplumun karşı karşıya olduğu başlıca çevre sorunlarından biridir (De Gisi vd., 2016). Evsel atıkların sızması ve endüstriyel atık sulardan kaynaklanan ağır metal kirliliği, su kirliliğinin önde gelen kaynaklarından biridir. En yaygın kirleticiler Çinko, Kadmiyum, Kurşun, Krom, Bakır, Nikel, Vanadyum, Gümüş, Platinum, Kalay ve Titanyum olmaktadır (Kim vd., 2019; Jaishankar vd., 2014; Ali vd., 2019). Ağır metaller oldukça zehirlidir, uzun süre kalır ve doğal ortamlarda kolayca bozunmazlar. Bundan dolayı çeşitli hastalıklara yol açar, insan yaşamı ve çevre için büyük bir tehdit

oluşturmaktadırlar (Daniel vd., 2021; Rahman vd., 2018). Bu sorunun önüne geçmek için ağır metal içeren atık suların hızlı ve etkili bir şekilde arıtılması, dünya çapında hükümetler ve araştırmacılar için önemli bir konu haline gelmiştir (Abbas vd., 2016). Ağır metal kirliliği için modern endüstriyel arıtma yöntemleri arasında kimyasal arıtma, adsorpsiyon, iyon değişimi, elektroliz ve mikrobiyal absorpsiyon yer alır (Viosin vd., 2017; Ungureanu vd., 2015; Jain vd., 2016). Bunların arasında adsorpsiyon şu anda en popüler yöntem olmaktadır. Bu yöntemde adsorban, adsorpsiyon sürecinde belirleyici faktördür. Bu nedenle, verimli, çevre dostu ve ekonomik adsorbanlar arayışı, su kirliliğinin adsorpsiyon yöntemleriyle arıtılmasının anahtarı haline gelmiştir.

2.5 Çalışmada Hidrojel İskeleler Üretilirken Kullanılan Malzemeler

2.5.1 Biyosilika

Silika, kemik ve kıkırdak dokularının büyümesi ve oluşumu için silisyum içeren önemli bir kimyasal bileşiktir (Sripanyakorn vd., 2005). Biyosilika, organik bir matrise gömülüdür ve memeli hücreler için toksik değildir. Biyolojik uyumlarından dolayı doku mühendisliğinde kullanımları ön plana çıkarmaktadır. Deniz süngerlerinden elde edilen biyosilikalar, biyomedikal yaklaşımlar, kemik yer değiştirme ve rejenerasyon stratejileri için, kemik oluşumunu uyarmada önemli bir rol oynayan silika iyonları içerdiklerinden dolayı önemlidir. Ayrıca biyosilikanın, hidroksiapatit oluşumu için gerekli kalsiyum fosfatı biriktirerek mineralleşmeyi artırdığı ve bunun sonucunda insan kemik dokularının rejenerasyonu için yeni biyomateriyallerin geliştirilmesinde kullanılmasına ilham verdiği bildirilmiştir (Müller vd., 2007; Tamburaci ve Tihminlioglu, 2018). Biyolojik olarak aktif silika camları, silika jel tabakası oluşturarak kemik dokusuyla bağlanmakta ve entegre olmaktadır, bu da osteoprogenitör hücrelerinin çoğalmasını ve osteoblastlara farklılaşmasını uyarak kemik organik matris ve mineralizasyonun sentezini ve birikimini başlatmaktadır. Biyosilikalar doğası gereği düşük mukavemete sahip olmasına rağmen biyouyumlu olması, kemik dokusu yapıcı genlerin ekspresyonunu aktive etmesi ve damarlaşmayı teşvik etmesi gibi eşsiz özelliklere sahip olmasından dolayı doku mühendisliği için iyi bir iskele malzemesi olduğu düşünülmektedir (Shkarina vd., 2018; Naruphontjirakul vd., 2019; Shi vd., 2020).

2.5.2 *Geodia macandrewii*

Geodiidae, 340' ten fazla tür içerir. Dünya çapında sığ ve derin sularda bulunurlar (Antarktika hariç). *Geodia*, 163 tür ve düzinelerce tanımlanmamış tür ile en büyük grubu temsil etmektedir (Van Soest vd., 2020). Bir metreden daha büyük devasa hayvanlar olabilirler (Santucci, 1922; Cárdenas vd., 2010). Altı *Geodia* türü özellikle bol miktarda bulunur ve bu nedenle Kuzey Atlantik derin deniz ekosistemleri için önemlidir (Cárdenas vd., 2013). Geodiidae, yıldız şeklindeki mikro küreciklerin ve tetratinal megasklerelerin aynı anda bulunmasıyla karakterize edilen bir takım olan Astrophorida'ya ait demospongelardır. Atlantic Geodiidae, sert ve kalın bir kabuk yapıya sahip ve iç kısmında spiküllerden oluşan bir mimariye sahiptir ve çakıl/kum gibi yumuşak diplerde büyüyen derin su türleridir. Özellikle 100 ila 400 m arasında değişen derinliklerde, kıtasal platoda ve kuzeydoğu Atlantik'in yamaçlarında bol miktarda bulunurlar (Cárdenas vd., 2010). Bununla birlikte, Norveç kıyılarında, ailede üç tür vardır: *Geodia simplicissima* (Burton 1931); *Geodia barretti* (Bowerbank 1858); *Pachymatisma normani* (Sollas 1888); *Geodia* sp. ise bazen sığ derinliklerde (<40 m) kaydedilmiştir. Porifera türlerinden biri olan *Geodia barretti* gibi Kuzey Atlantik deniz sünger türlerinin önemli hasarlardan sonra vücut duvarının kendini olağanüstü bir şekilde rejenere etme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Murillo vd., 2012). Bu rejenerasyon kapasitesi göz önünde bulundurularak biyomimetik stratejilerin gelişmesine, hiyerarşik düzenlerinin ve ürettikleri bileşiklerin detaylı olarak araştırılmasına, geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

2.5.3 β -kitin

Polisakkaritler, çeşitli uygulamalarda sentetik polimerlerin yerini alabilecek eşsiz özelliklere sahip ve bol miktarda bulunan doğal malzemelerdir (Kumar vd., 2013; Pakravan vd., 2011; Wu vd., 2016). Kitin özellikle $\beta(1 \rightarrow 4)$ -bağlı 2-asetoamido-2-deoksi- β -D-glukozdan oluşan lineer bir polisakkarittir ve selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polisakarittir (Dutta vd., 2014; Liu vd., 2013; Min vd., 2004 ; Rolandi ve Rolandi, 2014). Ayrıca sınırlı bir çözünürlüğe ve düşük kimyasal reaktiviteye sahip olmasına rağmen, biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama, yara iyileştirme aktivitesi, anti-inflamatuar etki, mekanik olarak sağlamlık ve adsorpsiyon gibi mükemmel özelliklere sahiptir (Kumar, 2000). Kitin, yengeç, karides ve diğer böcekler gibi çeşitli eklembacaklıların dış iskeletinde ve ayrıca

mantarların hücre duvarında bulunur. Kitin, kaynağına bağlı olarak, esas olarak kalsiyum karbonatlarla ilişkili hiyerarşik bir yapıda bulunur (Lavall vd., 2007). Kitinin üç tip kristal formu olduğu bilinmektedir: α -, β - ve γ -formu. En bol ve kolay erişilebilir form, moleküler zincirlerin antiparalel bir düzenlemede hizalandığı α -kitindir. Bu moleküler düzenleme, en kararlı biçimini gösteren güçlü moleküller arası hidrojen bağı oluşturmak için uygundur. β -kitin ise, içindeki moleküler zincirler, daha zayıf moleküller arası kuvvetlere yol açan paralel bir düzende dizilmiştir. Bu nedenle β -kitin, α -kitin'den daha az kararlıdır. γ -kitin, α - ve β -formlarının bir karışımını gösteren hem paralel hem de antiparalel düzenlemelere sahiptir (Kumar vd., 2013; Lavall vd., 2007). Kitin çok sınırlı bir çözünürlüğe ve düşük kimyasal reaktiviteye sahip olmasına rağmen, biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama, antioksidan, anti inflamatuvar etki, yara iyileştirme aktivitesi, mekanik olarak sağlamlık ve adsorpsiyon aktivitesi gibi eşsiz özelliklere sahiptir (Rinaudo, 2006). Kitinin üç kristalin formu olduğu bilinmektedir; α , β ve γ . α -kitin, bu formların çoğu organik çözücülerde çözünmemekte, bu da nanofiberlerin kullanımında sınırlı uygulanabilirliğe neden olmaktadır. α -kitin, sadece asetik asit, trifloroasetik asit, formik asit, süksinik asit ve 1,1,1,3,3,3-Heksafloroizopropanol (HFIP) gibi bazı toksik çözücülerde, β -kitin ise formik asitte çözünmektedir (Shalumon vd., 2015; Shrestha vd., 2016).

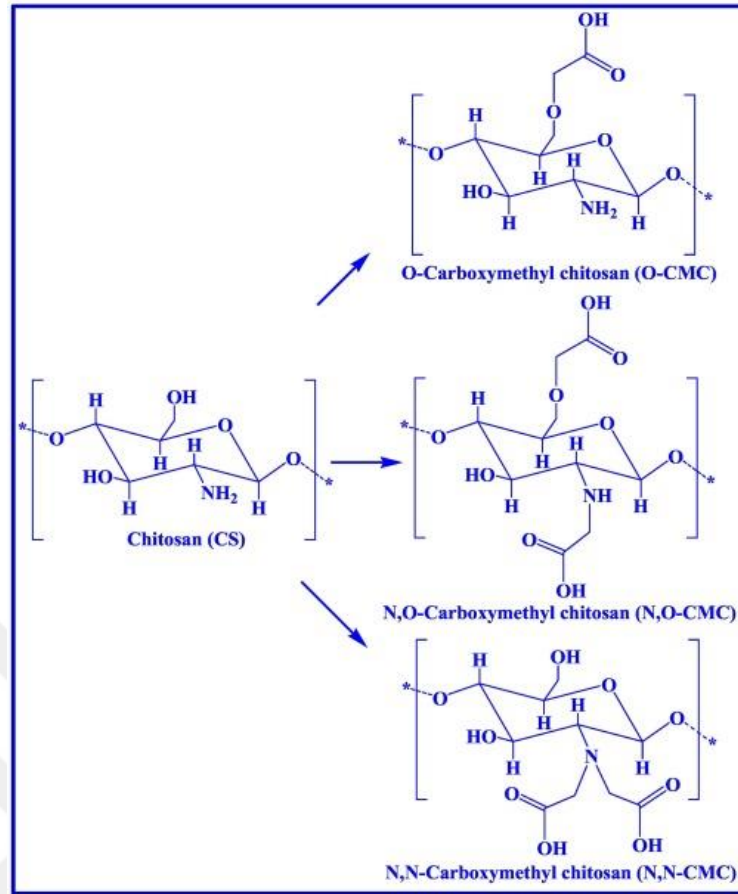
2.5.4 Deniz faresi (*Aphrodita aculeata*)

Annelida şubesinde yer alan ve deniz fareleri olarak bilinen *Aphrodita aculeata*, 7,5-15 cm uzunluğunda deniz habitatlarında özellikle Kuzey Atlantik, Kuzey Denizi, Baltık Denizi ve Akdeniz'de yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılarında kitin ve proteinden oluştuğu bilinen 'setae' denilen saç benzeri yapıları ve dikenleri bulunmaktadır (Tyler-Walters ve Hughes, 2007). Deniz farelerinin dikenlerinde bulunan oldukça düzenli mikro ve nano kitin-protein halka yapılarından dolayı yanardöner bir yapıya sahip olduğu belirlenmiş ve bu yapı fotonik çalışmalar için dikkat çekmiştir (McPhedran vd., 2001; Parker vd., 2001). Doğal olarak canlının yapısında bulunan bu dikenlerin çapı 500 nm ve değişen iç çaplara (50-400nm) sahip olan kitin-protein içeren nanotüpler içerdiği bilinmektedir (Parker ve Townley, 2007). Ayrıca, bu saç benzeri yapıları ve dikenlerin β -kitin olduğu basit yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (Mumm vd., 2010). Deniz faresinin milyonlarca yıldır

üretmiş olduğu mikro ve nano boyuta sahip diken ve saç benzeri yapıların teknolojik bir kullanımı söz konusu olmamıştır.

2.5.5 Karboksimetil kitosan

Kitosan, kitinden kısmi kimyasal veya enzimatik deasetilasyon yoluyla ekstrakte edilen doğal bir biyopolimerdir. Ayrıca biyouyumluluk, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antimikrobiyal aktivite gibi çeşitli biyolojik özellikleri nedeniyle bbiyoteknolojik alanlarda kullanım için ideal bir malzeme olarak gösterilmektedir (Liu vd., 2018). β -(1,4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukoz birimlerinden oluşan bir amino polisakkarit olarak bilinen çok işlevli ve çevre dostu bir üründür (Kou vd., 2021). Kitosan, çeşitli işlemlerde etkili kullanımını sınırlayan sert kristal yapısının bir sonucu olarak suda zayıf bir çözünürlüğe sahiptir. Bu problemten dolayı suda çözünür türevleri ön plana çıkmaktadır. Yapısında fonksiyonel gruplarının (hidroksil ve amino grupları) varlığı, fiziksel çözünürlüğünü ve elektrik yükünü iyileştirmek için kimyasal modifikasyonları kolaylıkla yapılabilmektedir (Mourya vd., 2010). Kitosanın özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan modifikasyonlar, antimikrobiyal aktiviteyi ve hücresel dokuyu alımını ve birçok özelliğini iyileştirebilmektedir. En basit kuaternizasyon yöntemi olması nedeniyle genellikle kitosan amino gruplarının trimetilasyonu yapılmaktadır (El-Sherbiny vd., 2016). Ayrıca, kitosan çözünürlüğü, yara iyileşmesi, biyo-görüntüleme, doku mühendisliği ve ilaç/gen iletimi gibi çok sayıda biyomedikal uygulamaya sahip olan karboksimetil kitosan (CMChT) elde etmek için hidrofilik bir modifikasyon olarak karboksimetilasyon ile yapılabilmektedir. Kitosan ve CMChT bileşiklerinin kimyasal yapıları Şekil 2.1' de gösterilmektedir. Suda çözünür CMChT'nin özellikle biyomedikal ve farmasötik alanlardaki uygulamalarına yönelik kullanımına bir ilgi vardır (Shariatinia, 2018).



Şekil 2.1. Kitosan ve karboksimetil kitosan (CMCh) türevlerinin kimyasal yapıları (Shariatnia, 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Örneklerin ve Kimyasalların Temin Edilmesi

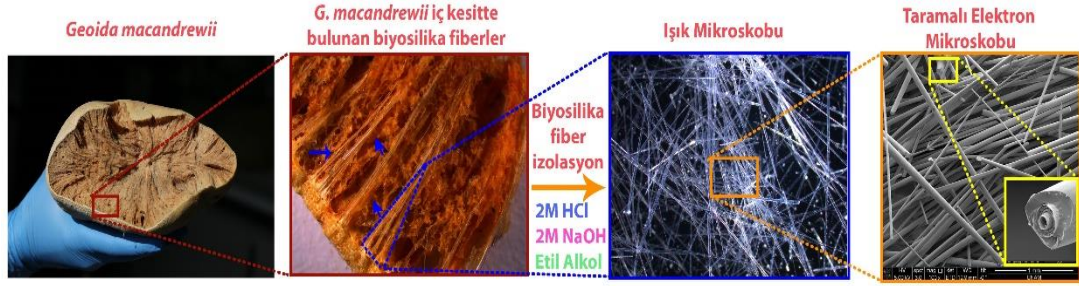
Projede kullanılan *Geodia macandrewii* süngeri, daha önce Danimarka Doğa Tarihi Müzesi'nden izin ile alınmıştır ve şu an laboratuvarımızda bol miktarda bulunmaktadır. Doğadan herhangi bir canlı toplanmayacaktır. Bu nedenle herhangi bir yasal izine gerek duyulmamaktadır. Süngerden biyosilika fiber izolasyonunda herhangi bir etik problem bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan *Aphrodita aculeata*, daha önce (7 Aralık 2020) Naturalis Biyoçeşitlilik Merkezi (Hollanda Ulusal Doğa Tarihi Müzesi)'nden izinle alınmıştır. Doğadan herhangi bir canlı toplanmayacaktır. Bu nedenle herhangi bir yasal izine gerek duyulmamaktadır. *A. aculeata* setaelarından kitin nanofiber izolasyonunda herhangi bir etik problem bulunmamaktadır. Ayrıca, *A. aculeata* örnekleri Ward's Science firmasından 20 adet satın alınmıştır.

3.2 Kullanılan Malzemelerin İzolasyonu

3.2.1 *Geodia macandrewii* süngerinden biyosilika fiber izolasyonu

G. macandrewii süngerinin iç kısmında bol bulunan cam fiberleri izole etmek için daha önce yapılan çalışmada kullanılan metodun hafif modifiye edilmiş hali kullanılmıştır (Kaya vd., 2021). Süngerin yapısında bulunan silika dışındaki minerallerin uzaklaştırılması için 2M HCl ile 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından saf su ile nötral pH'ya ulaşıncaya kadar yıkama yapılmıştır. 2M NaOH çözeltisi ile 100 °C de 2 saat inkübe edilerek sonrasında pH nötr oluncaya dek yıkama yapılmıştır. Yapıda kalan diğer bileşenleri uzaklaştırmak için etil alkol kullanılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 48 saat inkübasyona bırakılarak saf bir şekilde biyosilika cam fiberlerin elde edilmiştir. Şekil 3.1' de elde edilmiş biyosilika fiberlerin görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 3.1. *G. macandrewii* süngerinden biyosilika fiber izolasyonunun genel işleyişi.

3.2.2 Deniz faresinden β -kitin nanofiber izolasyonu

Literatüre bakıldığında kitin izolasyonu için genel prosedür ve bunların modifiye halleri bulunmaktadır. Bu proje kapsamında, Kaya vd. (2016) tarafından yapılan metodun hafif modifiye hali kullanılmıştır. Annelida şubesinde yer alan deniz faresi *Aphrodita aculeata* türünden kitin nanofiber izolasyonu için aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla uygulanmıştır:

Demineralizasyon, Deniz faresinin yapısında bulunan minerallerin uzaklaştırılması amacıyla 1 M HCl ile 50°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından örnekler saf su ile yıkama yapılmıştır. Bu yıkama işlemi nötral pH’ ya ulaşınca kadar tekrarlanmıştır.

Deproteinizasyon için, demineralize olmuş örneklerden proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 1M NaOH çözeltisi ile 150 °C’ de 5 saat manyetik karıştırıcı ile ısıtılmıştır. Ardından saf su ile yıkama yapılacak ve nötral pH ya gelene kadar yıkamaya devam edilmiştir. Bu aşamada canlının yapısında bulunan diken ve setae yapılarının farklı fiziksel özelliklere sahip olması sayesinde mikroskop altında birbirinden ayrılmıştır.

Deproteinizasyon işleminden sonra örneklerin yapısında bulunan kitin nanofiber örnekleri mikroskop altında bir pens yardımıyla birbirlerinden ayrıldıktan sonra etüvde 60 °C’ de 48 saat kurutulmaya bırakılmıştır. Deniz faresinin setae yapılarından başarılı bir şekilde kitin nanofiberler elde edilmiştir. *A. aculeata*’ nın orijinal yapısı ve setaelarından elde edilen nanofiber gösterilmiştir. Elde edilen nanofiberler, uzun olmaları yönüyle de ayrıca dikkat çekmiştir.

3.3 Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu

3.3.1 Biyosilika fiberin karakterizasyonu

G. macandrewii süngerinin iç kısmında bol bulunan cam fiberlerden elde edilen biyosilika fiberlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yüzey morfolojisi ve yapısı zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) ile kimyasal yapısı belirlenmiştir.

3.3.1.1 FTIR analizi

Moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçerek moleküldeki kimyasal bağlar hakkında bilgi veren analizdir. İzole edilen biyosilika fiberlerin FTIR analizleri (Perkin Elmer Spectrum BX), 4000–650 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 25 tarama ile yapılmıştır.

3.3.1.2 SEM analizi

Süngerden izole edilen biyosilika fiberlere ilk olarak altın kaplama yapılarak, Quanta FEG 250 Science Scanning Electron Microscopy cihazı ile 500- 50.000X aralığında farklı büyütmelelerde görüntüler alınmış ve yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3.2 Doğal β -kitin nanofiberlerin karakterizasyonu

Aphrodita aculeata türünden elde edilen β -kitin nanofiberlerin FTIR, SEM, Termogravimetrik Analiz (TGA), X-ışını difraksiyonu (XRD) ve Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizleri yapılmıştır.

3.3.2.1 FTIR analizi

FTIR cihazı ile dalga numarası 4000–625 cm^{-1} aralığında deniz faresinden elde edilen β -kitin nanofiber örneklerinin analiz işlemi gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 25 tarama ile alınmıştır.

3.3.2.2 SEM analizi

Deniz faresinden elde edilen β -kitin nanofiber örneklerine altın/palyadyum kaplama

yapılarak, SEM cihazı ile 500- 50.000X aralığında farklı büyütmelemlerde alınan görüntüler β -kitin nanofiberinin yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3.2.3 Termal analiz

Termogravimetrik analiz ile artan sıcaklığa göre numunenin kütle kaybının ölçümü gerçekleştirilmiştir. β -kitin nanofiber örnekleri Shimadzu DTG-60H cihazı ile 10°C/dk ısıtma hızında 30°C den 650°C ye kadar ısıtılarak termal kararlılığı, yapısındaki su ve kül içeriği belirlenmiştir.

3.3.2.4 XRD analizi

Elde edilen numunenin kristal yapısı ve % kristalliliği XRD analizi Rigaku, D/Max 2200 cihazı ile belirlenmiştir. Kristallik indeksini hesaplamak için aşağıdaki ifade kullanılmıştır:

$$CrI110=[(I110-I_{am})/I110]\times 100 \quad (3.1)$$

burada, I110, 2θ 20°'deki maksimum yoğunluktur; I_{am} , 2θ 13°'de amorf tepenin maksimum yoğunluğudur.

3.3.2.5 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Nanometre boyutundaki penetrasyon derinliklerinde çok düşük kuvvetleri ölçme yeteneği ve operasyonel çok yönlülüğü ve yerinde görüntüleme yapabilmesi nedeniyle, AFM, uygulanan çeşitli uygulamalar için konsolun yük-yer değiştirme tepkisini kaydederek nanomalzemelerin nanomekanik özelliklerini araştırmak için kullanılan bir tekniktir. Son zamanlarda, nanomalzemelerin mekanik özelliklerini belirlemek için bir teknik olarak AFM'nin kullanılması ön plana çıkmaktadır (Gauvin vd., 2015). Çolak vd. (2017) tarafından yapılan metodun nanomalzemeler üzerine etkili olmasından dolayı bu projede elde edilecek β -kitin nanofiber örneklerinin mekanik özellikleri de bu yöntem kullanılarak Bruker MM8 marka AFM cihazı ile detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

3.4 Hidrojel İskelelerinin Tasarımı

Bu tez çalışmasında iki farklı hidrojel iskele üretimi yapılmıştır. İlk olarak deniz süngerinden (*G. macandrewii*) izole edilen biyosilika fiber katkılı iki fazlı 3D hidrojel kompozit doku iskelesi tasarımı yapılmıştır. İkinci iskele olarak, deniz faresi (*A. Aculeata*)'nin satealarından izole edilen β -kitin nanofiber takviyeli karboksimetil kitosan temelli hidrojel kompozit iskele tasarımı yapılmıştır. 3D hidrojel iskeleler, dondurarak-kurutma metodu ile üretilmiştir.

3.4.1 Karboksimetil kitosan çözeltisinin hazırlanması

1.25 g karboksimetil kitosan 50 ml saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak, oda sıcaklığında karboksimetil kitosan (CMChT) homojen çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır (Gunes vd., 2020).

3.4.2 İki fazlı 3D hidrojel kompozit doku iskelelerinin üretimi

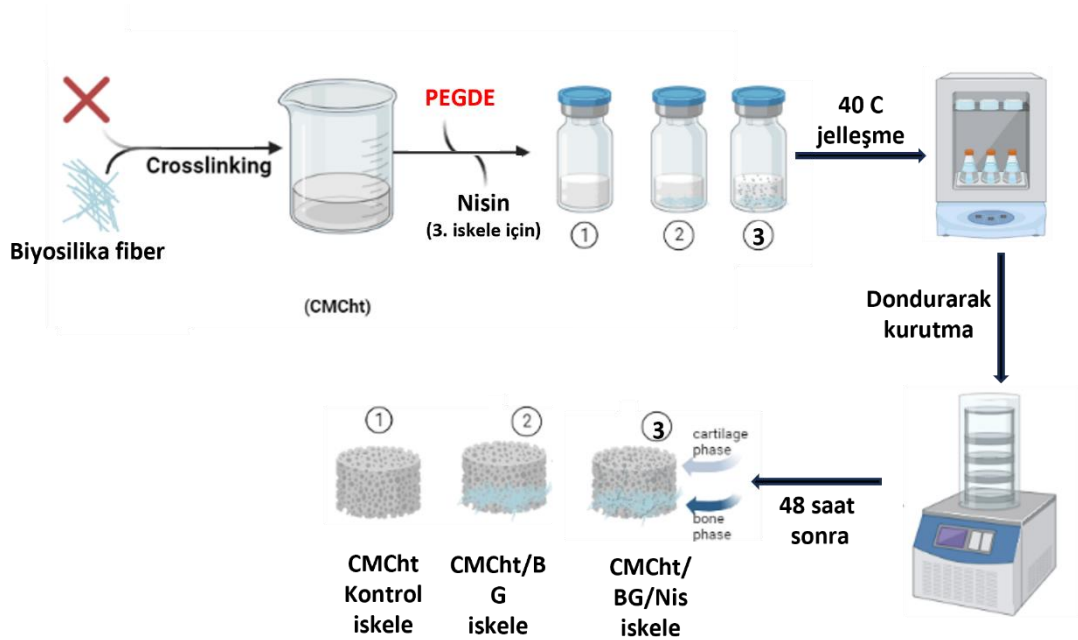
Biyosilika fiber (BG) takviye edilmiş CMChT temelli hidrojel kompozit doku iskelelerin hazırlanması için, ilk olarak farklı oranlarda (0, 0.01, 0.02 ve 0.05 g) biyosilika fiberler tartılmıştır. Hazırlanan karboksimetil kitosan çözeltisinden 4'er ml alınarak farklı miktarlarda tartılan biyosilika fiberler üzerine ilave edilmiştir. Ardından, 0.05 g poli(etilen glikol) diglisidil eter (PEGDE) eklenerek, 40 °C' de etüvde jelleşmeye bırakılmıştır. Jelleşme süresi kontrol edilecek ve tamamlanıncaya dek 48 saat örnekler etüvde bekletilmiştir. Jelleşme süresince biyosilika fiberlerin alt fazda toplanması ile iki fazlı yapı sağlanmıştır. Jelleşme gerçekleştikten sonra oluşan hidrojeller donmaları için buzluğa yerleştirilerek gece boyunca bekletildikten sonra, 0.1 mbar basınç altında 25 °C' de 2 gün süreyle dondurularak kurutulmuştur (TELSTAR-LyoQuest 85). Dondurarak-kurutma yöntemi ile başarılı bir şekilde açık gözenkli 3D hidrojel doku iskelesi üretimi sağlanabildiği için tercih edilmiştir (Gunes vd., 2020). Ayrıca 0.05g biyosilika fiberler takviyeli hidrojel kompozit doku iskelesine farklı olarak çapraz bağlama adımında, 0,2 M asetik asit içindeki 5 mg/ml nisin çözeltileri gece boyunca kompozit yapıları emdirildikten sonra dondurularak kurutulmuştur. Sonrasında etanol ile yıkanıp ve kurutulmuştur. Burada nisin kullanımı doku iskelesinin antimikrobiyal etkinliğinin artırılması ve biyoyuyluluk sonuçlarında nasıl bir etkinin göstereceğinin belirlenmesi için amaçlanmıştır.

Hidrojel yapıyı elde etmek için PEGDE kullanılarak kimyasal çapraz bağlanma sağlanmıştır. Ön çalışmalarımız doğrultusunda 0.05g PEGDE ilavesinin malzemede boyutsal kararlılığı bozmadan çapraz bağlanma için yeterli olduğu görülmüştür. Biyosilika fiber takviyeli CMChT doku iskelelerin hazırlanması ve projenin genel işleyişi hakkında akış şeması Şekil 3.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı oranlarda biyosilika fiber/karboksimetil kitosan içeren 3D hidrojel doku iskele üretimi için projenin genel işleyişi.

CMChT/Kontrol, CMChT/ BG ve CMChT/BG/Nis temelli iki fazlı 3 boyutlu doku iskelelerin üretiminde kullanılan yöntem Şekil 2.3’te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. CMChT/Kontrol, CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis 3D hidrojel doku iskelelerinin üretimi (BG=0.05g).

3.4.3 β -Kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskele üretimi

Üç boyutlu ve gözenekli deniz faresi kitin (SMC) nanolif takviyeli CMChT hidrojel kompozit doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemiyle üretilmiştir. Kısaca, öncelikle CMChT çözeltisi (%2.5 (w/v)) CMChT distile su içinde, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile çözülerek hazırlanmıştır. Ardından farklı oranlarda (0.25, 0.50 ve 0.75 g) ıslak ağırlıkları ölçülmüş SMC nanolifler, 5 ml %2.5 (w/v) CMChT çözeltisine 0.05 g PEGDE ile birlikte eklenmiştir. Çözelti içerisindeki SMC nanoliflerin, hafifçe çalkalayarak süspansiyon haline gelmesi sağlanmıştır. Elde edilen kompozit çözeltiler 40°C'lik bir etüvde jel oluşturmak için bırakılmıştır. Hidrojeller oluşana kadar inkübatörde yaklaşık 48 saat bırakılmıştır. Oluşan hidrojeller bir gece boyunca -18 °C'de buzdolabında dondurulmuştur. Son olarak, hidrojeller -25 °C'de ve 0.1 mbar basınç altında 48 saat boyunca dondurma-kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kontrol olarak, SMC nanolif takviyesi olmadan CMChT hidrojel iskeleleri de üretilmiştir. Üretilen hidrojel iskelelerin etiketleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kısaca, 0.25 g SMC nanolif ile takviye edilmiş CMChT hidrojeli SMC1/CMChT olarak, 0.50 g SMC nanolif ile takviye edilmiş CMChT hidrojeli SMC2/CMChT olarak ve 0.75 g SMC nanolif ile takviye edilmiş CMChT hidrojeli SMC3/CMChT olarak adlandırılmıştır. Farklı SMC oranlarında elde edilen iskelelerin SEM görüntülerine bakılarak en iyi iskele tercih edilmiştir.

Çizelge 3.1. β -Kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit doku iskelelerinin adlandırılması.

Doku iskelelerinin adlandırılması	SMC nanofiber miktarı (gram)
CMChT Kontrol	0
SMC1/CMChT	0.25
SMC2/CMChT	0.50
SMC3/CMChT	0.75

3.5 Hidrojel İskelelerinin Karakterizasyonu

3.5.1 İki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelelerinin karakterizasyonu

3.5.1.1 FTIR analizi

ATR-FTIR cihazı ile bir yüzeyi biyosilika, diğer yüzeyi CMChT içeren iki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelesi örneklerini $4000\text{--}625\text{ cm}^{-1}$ de dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 25 tarama ile FTIR analiz işlemi gerçekleştirilmiştir. Fonsiyonel gruplarına bakılarak iki fazlı iskelenin başarılı bir şekilde üretilip üretilmediği kontrol edilmiştir.

3.5.1.2 SEM analizi

İskelelerin yüzey morfolojilerinin görüntülenmesinde kullanılmıştır. Deniz faresinde elde edilecek kitin nanofiber örneklerine altın kaplama yapılarak, JOEL marka SEM cihazı ile 500X- 50.000X aralığında farklı büyütmelemlerde alınan görüntüler yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.5.1.3 TGA analizi

İki fazlı 3D kompozit hidrojel doku iskelelerinin termal karakterizasyonu TGA cihazı kullanılarak (Shimadzu DTG-60H) azot gazı altında yapılmıştır. Elde edilen iskelelerin 30°C ' den 900°C ' ye kadar dakikada 10°C ısıtılarak termal kararlılığı, yapısındaki su ve kül içeriği belirlenmiştir.

3.5.1.4 XRD analizi

Elde edilen iskelelerin kristal yapısı ve % kristallığı XRD analizi ile belirlenmiştir. Kristallik indeksini hesaplamak için Denklem 3.1 kullanılmıştır.

3.5.2 β -kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskele karakterizasyonu

3.5.2.1 FTIR analizi

β -kitin nanofiber takviyeli hidrojel CMChT kompozit iskelelerin kimyasal yapıları ATR-FTIR (Perkin Elmer Spectrum BX) ile belirlenmiştir. Her bir spektrum, 4000--

650 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükle ve her bir örnek için 25 kez taranarak elde edilmiştir.

3.5.2.2 SEM analizi

β-kitin nanofiber takviyeli hidrojel CMChT kompozit iskelelerin kesit morfolojik analizi SEM (JEOL JSM-7900F) ile 5 kV hızlandırılmış voltajda gerçekleştirilmiştir. Tüm iskeleler analiz öncesinde ince bir altın/palyadyum tabakasıyla kaplanmıştır. SMC nanoliflerinin ortalama çapı, her bir örnek üzerinde 25 farklı noktadan SEM görüntüleri alındıktan sonra 200x ve 400x büyütmelelerdeki SEM görüntülerinden Image J görüntü analiz programı kullanılarak ölçülmüştür.

3.6 Üretilen Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Uygulamaları

3.6.1 İki fazlı kompozit hidrojel doku iskelelerinin *in-vitro* hücre kültürü çalışması

Üretilen iki fazlı hidrojel kompozit doku iskelelerin *in vitro* biyoyumluluk testleri Marmara Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı bünyesinde yer alan Hücre Kültürü Laboratuvarında aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir

3.5.1.1 Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) temini ve farklılaşma analizi

Bu çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Biyomekanik Anabilim Dalı'ndan, etik kurul izinleri alınmış olan bir başka çalışmadan izole edilerek çoğaltılan MKH'lerin dondurulması yöntemi ile insan MKH hücre hattı temin edilmiştir. Bu hücreler, “*density gradient ayrılama*” yöntemi olarak adlandırılan bir yöntem ile kök hücre izolasyon sürecine tabii tutulmuştur. Ficoll-Paque üzerinde tabakalandırılan kemik iliği aspiratı 20 dakika, 1650 rpm'de santrifüj edilerek plasma ve buffy coat tabakaları ayrılarak farklı falkona alınıp yıkama yapılmıştır. Bu sayede eritrositlerin uzaklaştırılarak hücre kültür flasklarına ekimleri yapılmıştır. İki pasaj boyunca her gün taze besiyeri (MKH media) değiştirilerek devam edilmiş ve bu aşamada hücreler DMSO ile dondurularak saklanmıştır. Hücre ekimi amacıyla açılan hücre hattının flasklara açılmasının ardından gerekli kök hücre karakterizasyonları hücre hattı aldığımız çalışma grubu tarafından gerçekleştirilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrisi ile analizinde insan MKH özgü pozitif ekspresyon yapabilen ve sıçana reaktif olan CD29 ve CD73 antikorlarına karşın, negatif CD45 ve HLA-DR antikorlarından yararlanılmıştır.

Kemik iliğinden izole edilen hücrelerin MKH olup olmadığını doğrulayabilmek için akım sitometrisine ek olarak kullanılan bir diğer yöntem de çeşitli somatik hücrelere farklılaşma potansiyelinin ölçülmesidir. Çeşitli büyüme faktörleri ve kimyasallar yardımıyla hücre ortamları 21 gün boyunca, 3-4 günde bir yenilenerek kültüre edilen hücreler %4 formalin ile fikse edilip saf su ile yıkandıktan sonra izole edilen MKH'lerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik özellikleri olup olmadığını belirlemek için sırasıyla; Oil Red O, Alcian Blue ve Alizarin Red S ile boyanıp mikroskop altında incelenmiştir.

3.6.1.2 Biyouyumluluk analizleri

Çalışılması planlanan her analiz için gerekli sayıda, uygun boyutlarda kesilmiş ve etilen oksit ile sterilize edilerek havalandırılmış doku iskeleleri ayrı ayrı plakalara yerleştirilmiştir. Tamamen şişebilmeleri ve ön yıkama olması amacıyla hücre ekiminden bir gece öncesinde üzerlerine eşit miktarda hücre besiyeri eklenmiş ve inkübe edilmeleri sağlanmıştır.

Doku iskelesini oluşturan matrislerin kemik dokuyu mu kıkırdak dokuyu mu tetiklediğinin araştırılabilmesi hedeflendiği için bu analizler kemik iliği kökenli MKH'ler ile gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi ve thoma lamı ile hücre sayımı yapılan ve basitçe canlılığı ölçülen hücrelerin yaklaşık 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. Tutunmaları sağlandıktan sonra üzerini geçecek kadar eşit hacimde besiyeri eklenerek 28 gün boyunca, gün aşırı besiyeri tazelenerek inkübe edilmişlerdir.

Doku iskelelerinde; 1, 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerde canlılık ölçümü amacıyla WST-1 analizi yapılırken; 7, 14, 21 ve 28. günlerde ELISA kitleri yardımıyla GAG ve ALP miktarları da kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca, hücre tutunmasının gösterilebilmesi için 7, 14, 21 ve 28. günlerde SEM analizi de gerçekleştirilmiştir.

3.6.2 β -kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskelelerin ağır metal giderimi

Üretilen β -kitin nanofiber takviyeli CMChT hidrojel kompozit iskelelerin iskelelerin ağır metal giderimi çalışmaları Clarkson Üniversitesi (Amerika), Kimya ve Biyomoleküler Bölümü, BIOSEM Araştırma grubu laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.6.2.1 Ağır metal adsorpsiyon çalışmaları

Tüm iskeleler için adsorpsiyon çalışmaları, 25°C'de bir inkübatör karıştırıcısı içinde 20 mL'lik cam şişede gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bakır çözeltilerine yaklaşık 20 mg iskele eklenerek iskelelerin bakır giderme potansiyeli belirlenmiştir (1, 10 ve 100 ppm). Örnekler, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 5 saat aralıklarla çözeltiden alınmıştır. Bakır kalıntı konsantrasyonu tüm örneklerde atomik emisyon mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Hidrojel İskelelerin Karakterizasyon Sonuçları

Elde edilen iki farklı iskelede kullanılan biyomalzemelerin ve iskelelerin ayrı ayrı fizikokimyasal karakterizasyonları yapılmış ve sonuçları tartışılarak detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1.1 İki fazlı 3D kompozit hidrojel kompozit doku iskeleleri

4.1.1.1 FTIR karakterizasyonu

G. macandrewii süngerinin iç yapısından izole edilen biyosilika fiberlerinin (BG), ve iki fazlı 3 boyutlu karboksimetil kitosan/Kontrol (CMCht/Kontrol) hidrojel, karboksimetil kitosan-biyosilika fiber (CMCht/BG) iki fazlı 3 boyutlu iskele ve karboksimetil kitosan-biyosilika fiber-Nisin (CMCht/BG/Nis) FTIR spektrumları Şekil 4.1’de verilmiştir. *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG spektrumunda gözlenen 1057 cm^{-1} ’ de ki pik karakteristik Si-O-Si gerilme titreşimine aittir (Şekil 4.1a). Gözlenen diğer keskin pik ise 780 cm^{-1} Si-O titreşimine atfedilmektedir (Greeley vd., 1998). Literatüre bakıldığında silisyum oksit için karakteristik FTIR spektrumları ile elde edilen sonuçların uyumlu olduğunu ve izole edilen fiberlerin biyosilikadan oluştuğu açıkça göstermektedir (Rickert vd., 2002; Sprynskyy vd., 2017). Aynı süngerin dış kabuğunda bulunan boncukların silisyum oksitten oluştuğu ve FTIR spektrumunda 1090 ve 800 cm^{-1} ’ de iki keskin pik verdiğini bildirmişlerdir (Kaya vd., 2021).

FTIR analizinde genel olarak kitosan ve CMCht spektrumlarının benzer pikler gösterdiği bilinmektedir (Kurniasih vd., 2018; Song vd., 2011). Kitosan için, $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ’ deki geniş bant O-H gerilme ve N-H gerilme titreşimlerini, yaklaşık olarak 2900 cm^{-1} ’deki bant ise C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ ’ de gözlenen pik ise glikozidik şeker halkasına atfedilmektedir. CMCht’nin FTIR spektrumunda, kitosana benzer şekilde $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ’de ortaya çıkan geniş bant hem O-H hem de N-H gerilme titreşimlerine işaret etmektedir. C-H gerilme titreşimi de $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ ’ de yer almaktadır. ~ 1587 ve $\sim 1410\text{ cm}^{-1}$ ’deki pikler sırasıyla karboksil grubunun asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine atanmıştır. Ayrıca amin grubunun N-H bükülme titreşimi, karboksil grubunun asimetrik titreşimi ile

örtüşmektedir. Ayrıca C-O gerilme bantı $\sim 1053 \text{ cm}^{-1}$ 'de yer almaktadır. Gunes vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada karboksimetil kitosanın IR spektrumları ile sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür.

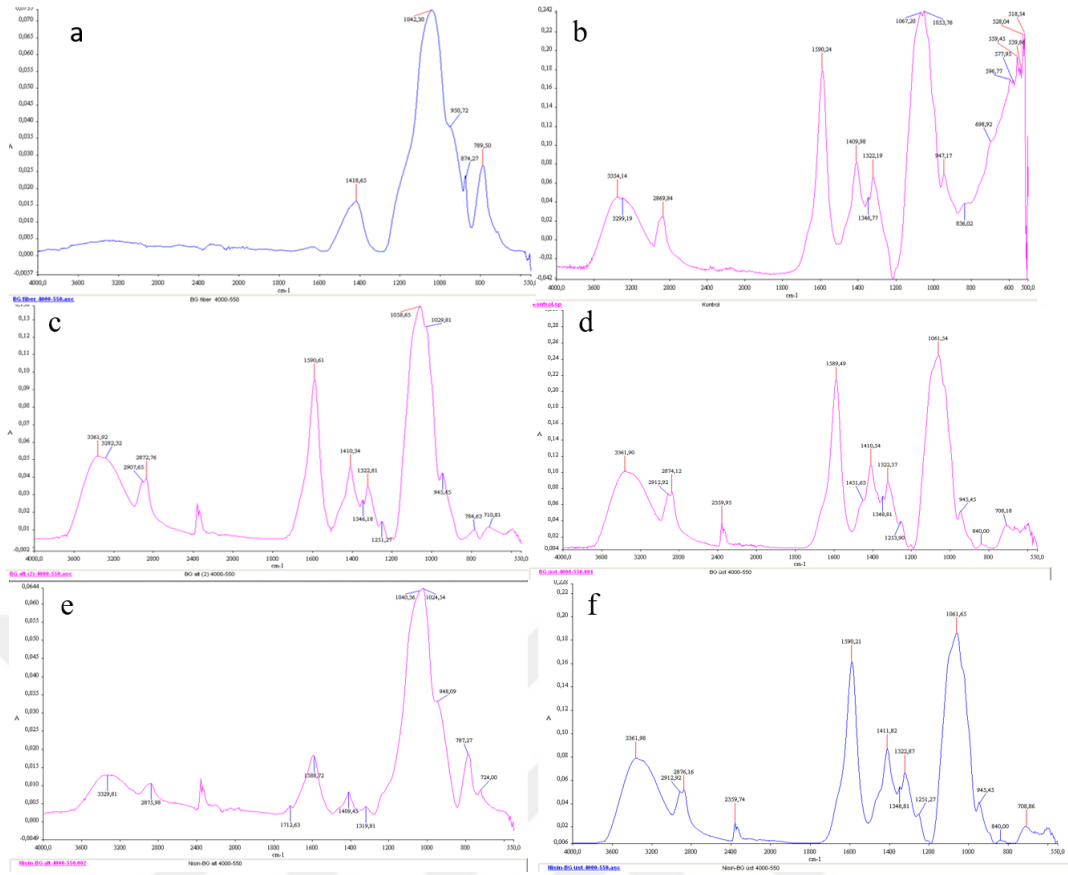
PEGDE' nin FTIR spektrumunda, 3500 cm^{-1} civarında O-H grubunun küçük absorbsiyon bandı görülmektedir. 3050 cm^{-1} de gözlenen zayıf pik ise epoksi halkasında bulunan metilen grubunun C-H titreşimine atfedilmektedir (Achilias vd., 2012; Gonzalez vd., 2012). 2900 cm^{-1} de C-H gerilme, $\sim 1456 \text{ cm}^{-1}$ de C-H eğmeve $\sim 1095 \text{ cm}^{-1}$ de C-O gerilme titreşimleri gözlenmektedir. PEGDE için karakteristik olan diğer pikler ise 911 ve 850 cm^{-1} de epoksi grubuna ait titreşimlerden dolayı ortaya çıkmaktadır.

Şekil 4.1b'de, CMCh'tnin PEGDE polimeri ile çapraz bağlandıktan sonra dondurarak kurutma işlemi sonrası elde edilen CMCh/Kontrol doku iskelesinin FTIR spektrumu yer almaktadır. CMCh ve PEGDE arasında gerçekleşen çapraz bağlanma nedeniyle O-H ve N-H gerilme piklerinde değişiklik meydana gelmiştir. Çapraz bağlanma reaksiyonunda, epoksi halkasının açılmasından dolayı yeni hidroksil gruplar ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde daha geniş bant gözlenmiştir. Ayrıca epoksi halkasının CMCh'den amin grubuyla açılmasının sonucu olarak yeni sekonder amin bağlarının oluşumu $1180\text{-}1130 \text{ cm}^{-1}$ aralığında beklenmektedir. Karboksimetil kitosanın hidroksil grupları ve PEGDE' nin epoksi grubu arasındaki çapraz bağlanmada C-O bant şiddetinin artmasını sağlayacaktır. 1053 cm^{-1} de absorbsiyon pikinin 1060 cm^{-1} 'e kayarak genişlemesi çapraz bağlanmanın gerçekleştiğinin bir işareti olarak değerlendirilebilir (Gamiz Gonzalez vd., 2017). Epoksitin halka açma reaksiyonu sonucunda (hidroksil grupları ve epoksi halkaları arasındaki eter bağlantılarından dolayı) 911 ve 854 cm^{-1} 'de epoksi grubu titreşim piklerinin şiddetlerinde azalma meydana gelmelidir. İki pik de hidrojel yapıda belirgin değildir. Bu sonuçlara bakıldığında karboksimetil kitosan ile PEGDE çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda amin ve eter bağlantılarıyla bağlanarak polimer ağı oluşturmuşlardır.

İki fazlı BG katkılı CMCh/BG hidrojel doku iskelerinin hem alt faz (BG içeren) hem de üst faz (CMCh içeren)'ın ayrı ayrı FTIR spektrumları çekilmiştir (Şekil 4.1c, d). İlk olarak üst fazın FTIR spektrumuna bakıldığında CMCh/Kontrol iskelesi ile benzer spektrum verdiği gözlenmiştir. Alt fazda ise hem CMCh'nin hem de BG'nin

karakteristik pikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında iki fazdan oluşan iskelenin başarılı bir şekilde elde edildiği söylenebilmektedir. Ayrıca CMChT/BG doku iskelesinin iki fazlı yapıya sahip olduğu SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir (Şekil 4.1c, d).

Literatüre bakıldığında nisin için karakteristik FTIR pikleri; 3288 cm^{-1} ' de O-H asimetrik gerilme, 3001 cm^{-1} ' de C-H simetrik gerilme, 1650 cm^{-1} ' de amid I ve 1522 cm^{-1} ' de amid II olarak verilmektedir (Niaz vd., 2018a, 2018b; Sami vd., 2021). CMChT/BG ve bu iskeleye nisin eklenmesi sonucunda elde edilen CMChT/BG/Nis iskelelerinin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, spektrumların birbirine çok benzer olduğu görülmektedir. Bunun sebebi kullanılan nisin miktarının düşük olması ve nisine ait karakteristik piklerinin CMChT ile örtüşmesidir. FTIR spektrumunda farklı bir pikin gözlenmemesi nisinin iskele bileşenleriyle kimyasal bir etkileşim yapmadığını, ayrıca CMChT ve BG yüzeyine fiziksel olarak tutunduğunu düşündürmektedir (Niaz vd., 2018a). Nisinin başarılı bir şekilde iskeleye eklendiği SEM ve XRD analiz sonuçlarıyla desteklenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.6).



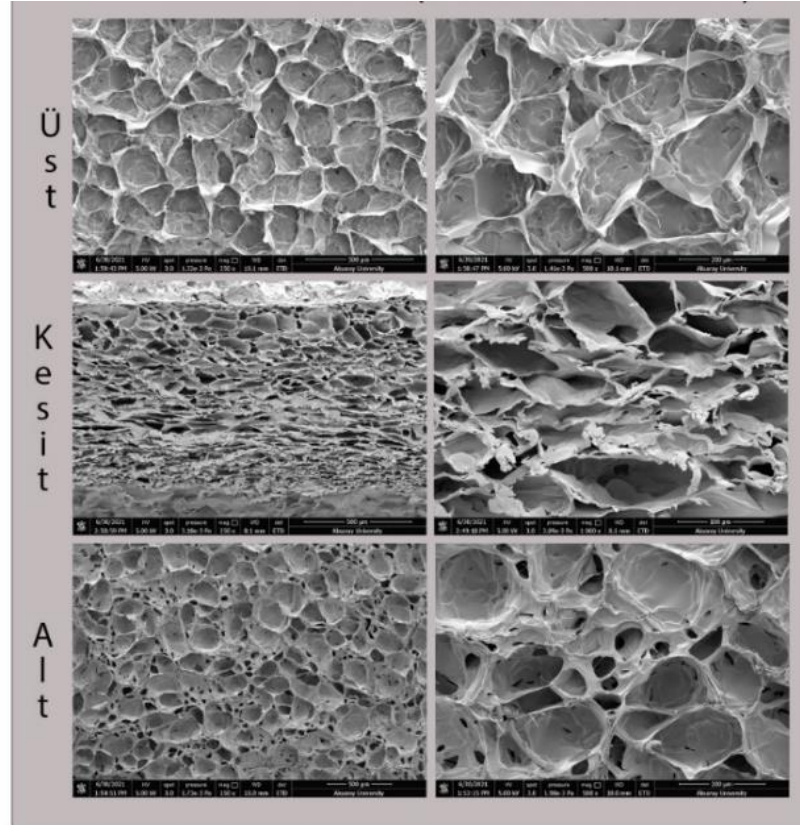
Şekil 4.1. FTIR spektrumları a) *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG, b) CMChT/Kontrol doku iskele c) CMChT/BG katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (alt), d) CMChT/BG katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (üst), e) CMChT/BG/Nis katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (alt faz), f) CMChT/BG/Nis katkılı iki fazlı hidrojel doku iskele (üst faz).

4.1.1.2 SEM karakterizasyonu

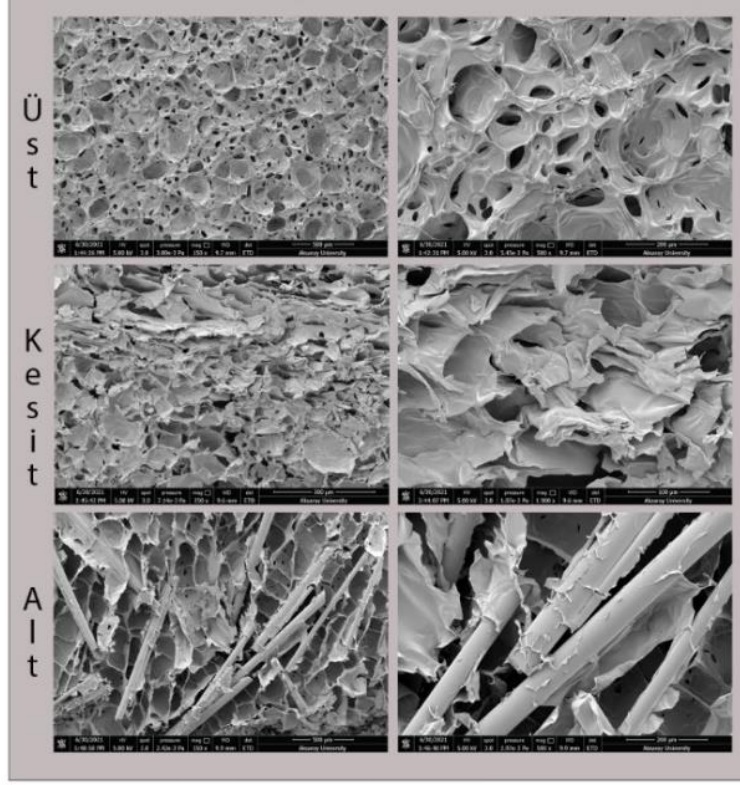
CMChT/Kontrol doku iskelesi ve iki fazlı CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis doku iskelelerinin alt, kesit ve üstten görüntüleri SEM görüntüleri sırasıyla; Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. CMChT/Kontrol iskelesinin görüntülerinden gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. İki fazlı BG katkılı CMChT/BG iskelenin ise üst kısmının sadece CMChT'den oluştuğu, kesit alınan görüntüde ise üst tarafın CMChT'den, alt tarafın ise ara ara BG fiberlerin yer aldığı gözlenmiştir. Alt kısmın görüntüsüne bakıldığında ise BG fiberlerin oldukça yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Nisin katkılı CMChT/BG/Nis doku iskelelerine ait görüntüler Şekil 4.4'de verilmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen iki fazlı üç boyutlu gözenekli CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis doku iskelelerinin osteokondral dokuya uyumlu olabileceği

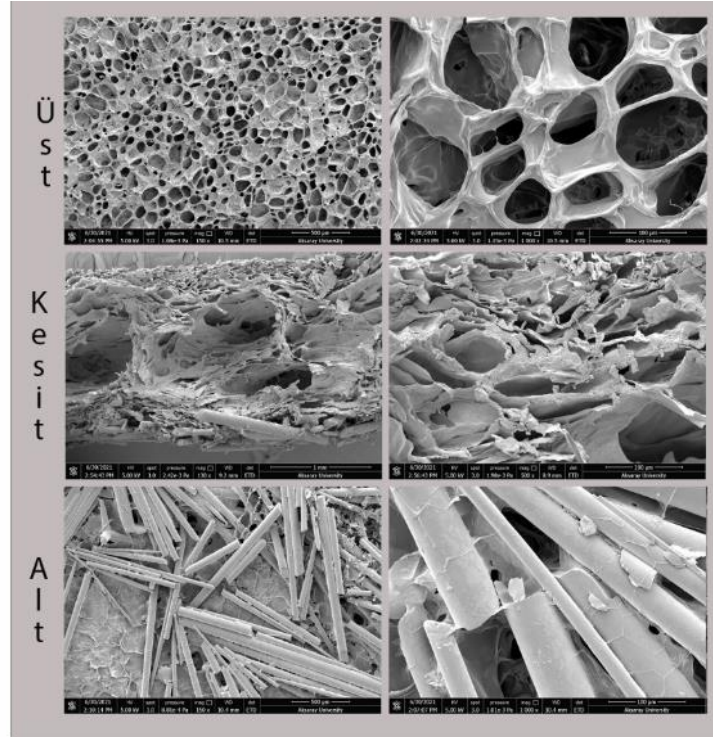
araştırılmıştır. Osteokondral doku yapısı gereği hem kıkırdak hem de kemik katmanlarından oluşmaktadır. İki fazlı üretmekte ki amacımız ise, karboksimetil kitosan hidrojeli içeren üst fazın kıkırdak, BG fiber içeren alt kısmın ise kemik katmanına uygun olmasıdır. Ayrıca nisin katkısının biyoyumluluğa etkisi incelenmiştir. Dondurarak-kurutma sonrası elde ettiğimiz iki fazlı üç boyutlu gözenekli bu iskeleler yapısal olarak amacımıza ulaştığımızı görülmektedir.



Şekil 4.2. CMCh/Kontrol doku iskelesi SEM görüntüleri.



Şekil 4.3. CMChT/BG doku iskelesi SEM görüntüleri.



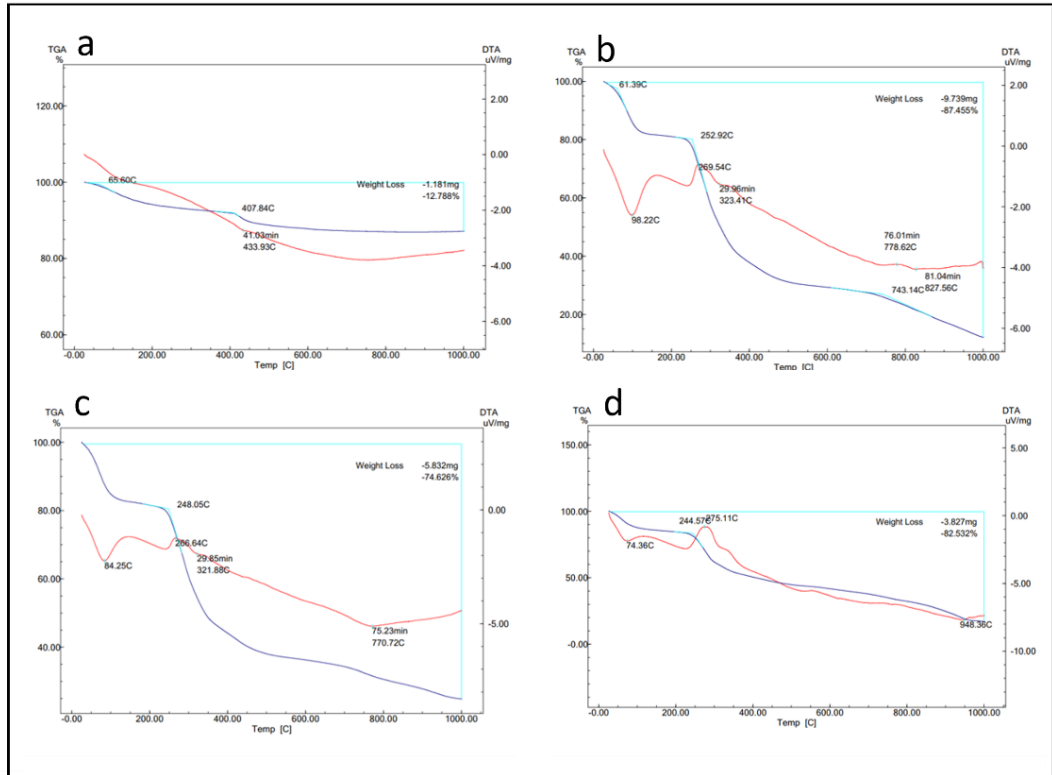
Şekil 4.4. CMChT/BG/Nis doku iskelesi SEM görüntüleri.

4.1.1.3 Termal karakterizasyon

Şekil 4.5'te *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG fiberlerin ve üretilen doku iskelelerinin TGA ve DTA eğrileri verilmiştir. Literatürde BG fiberlerin üç basamakta termal bozunduğu gözlenmiştir. İlk basamakta 30-110°C aralığında yaklaşık %4 kütle kaybı biyosilikaya fiziksel olarak bağlanmış suyun serbest bırakılmasına karşılık gelmektedir. Dehidrasyon işlemi, DTG tepe noktası ve DTA eğrisi üzerindeki endotermik etki ile görülmüştür. İkinci basamakta ise yaklaşık olarak %3 kütle kaybı 200-550 °C sıcaklık aralığında ortaya çıkmıştır. Bu aşamada BG fiberlerin dehidroksilasyon işleminin ilk aşamasını ve kalıntı organik maddelerin ayrışmasını göstermektedir. Dehidroksilasyon işleminin ilk aşaması hidrojen bağları yoluyla bağlanan komşu hidroksil gruplarının biyosilika yüzeyinden desorpsiyonuna atıfta bulunabilir (Zhuravlev, 2000). Üçüncü basamakta gözlenen endotermik etki yaklaşık olarak %1 kütle kaybı ile 550-850°C arasında gerçekleşmektedir. Bu basamakta BG fiberin iç kısmında bulunan boşlukta bulunan serbest hidroksil gruplarının kaybına karşılık gelen dehidroksilasyon işlemlerinin ikinci aşamasına atfedilebilir. Dehidroksilasyon işleminde DTA eğrisi geniş bir endotermik etki gözlenmiştir. TGA eğrisinde elde edilen biyosilika fiberin yaklaşık 850°C' de toplam kütle kaybı %12.8 olduğu belirlenmiştir. Daha önce biyosilika için termal analizi yapılan çalışmalara bakıldığında sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür (Pandis vd., 2014; Sprynskyy vd., 2017; Kaya vd., 2021).

CMChT/Kontrol, CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis doku iskelelerinin bozunması üç ana basamaktan oluşmaktadır. TGA eğrilerinde ilk basamakta 65-120°C arasında gerçekleşen endotermik pik absorbe edilen suyun buharlaşmasına atfedilmiştir. Literatüre bakıldığında CMChT'nin başlangıç bozunma sıcaklığı 210-310°C aralığında gerçekleşirken PEGDE' nin termal bozunması 325-425°C aralığında gerçekleşmektedir (Gamiz Gonzalez vd., 2017). Nis için bozunma sıcaklığının ise 286°C' de olduğu bildirilmiştir (Meira vd., 2014; Gruskiene vd., 2021). 230-280°C aralığında gerçekleşen ekzotermik reaksiyonda özellikle CMChT'nin bozunması gerçekleşmektedir. CMChT/Kontrol, CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis doku iskelelerinin maksimum bozunma sıcaklıkları sırasıyla; 269.92°C, 266.64°C ve 275.11°C olarak gözlenmiştir. Nisin eklenmesinin doku iskelelerinde termal kararlılığını az da olsa arttırdığı gözlenmiştir. Diğer ekzotermik bozunma ise 310-

425°C aralığında çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan PEGDE' nin bozunmasına atfedilmiştir. CMChT/Kontrol, CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis katkılı doku iskelelerinin ikinci maksimum bozunma sıcaklıkları sırasıyla; 323.41°C, 321.88°C ve 320.78°C olarak gözlenmiştir. Ayrıca, BG katkılı CMChT/BG ve CMChT/BG/Nis doku iskelelerinde sırasıyla 770°C ve 948°C'de gözlenen endotermik pikler BG fiberlerin dehidroksilasyon işlemine atfedilebilir. Sonuçlara bakıldığında, BG katkısının CMChT'nin termal kararlılığını etkilemezken, nisin eklenmesinin CMChT'nin termal kararlılığı arttırdığı belirlenmiştir.

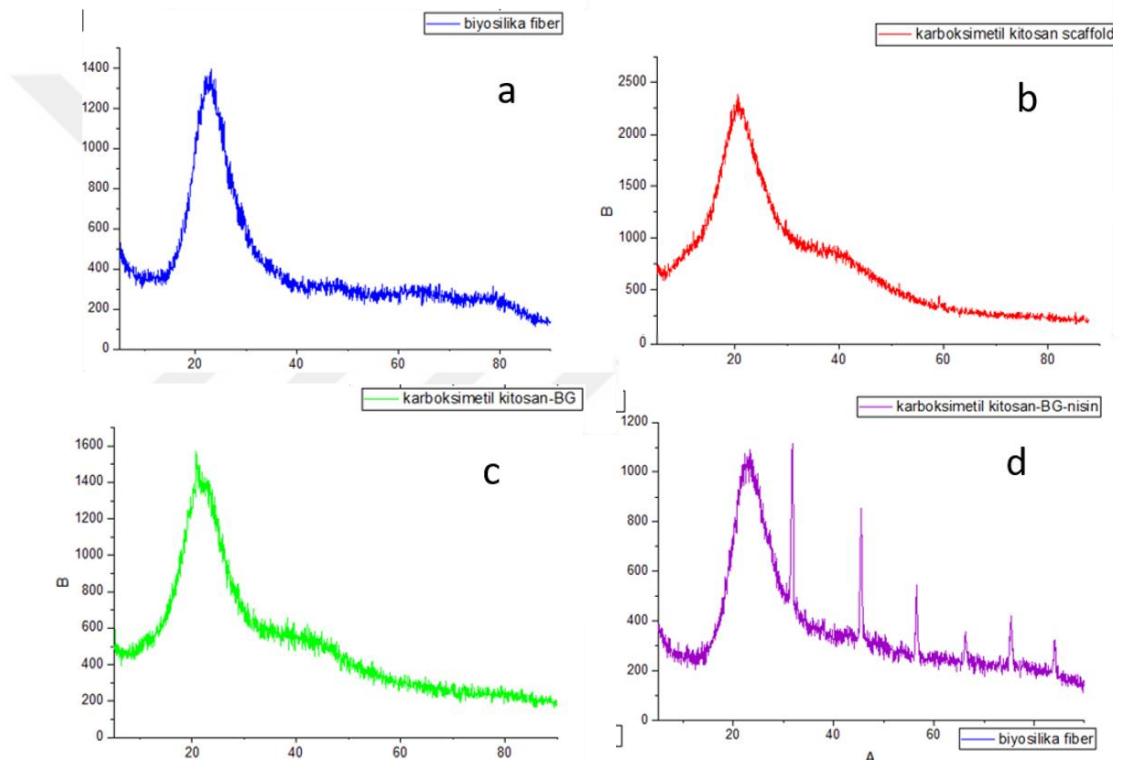


Şekil 4.5. TGA/DTA diyagramları; a) *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG fiber, b) CMChT/Kontrol doku iskelesi, c) CMChT/BG doku iskelesi, d) CMChT/BG/Nis doku iskelesi.

4.1.1.4 XRD karakterizasyonu

Şekil 4.6a' da *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG temelli fiberlerin X ışını kırınımı (XRD) deseni görülmektedir. Biyosilikanın amorf yapısını gösteren geniş tepe noktası 16-35° arasında ($2\theta=22.86^\circ$, maksimum yoğunluk) gözlenmiştir. Bu tip XRD modeli biyojenik amorf silikalar için karakteristiktir (DeMaster, 2003; Sprynskyy vd., 2017). Difraktogramda başka bir tepe noktasının olmaması elde edilen biyosilika fiberin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.

CMChT/Kontrol iskelesinde $2\theta=20.84^\circ$ 'de geniş bir pik gözlenmiştir (Şekil 4.6b). Bu pik CMChT için karakteristiktir (Sun vd., 2006). İki fazlı CMChT/BG katkılı doku iskelesi için her iki malzemenin karakteristik piklerini kapsayan geniş bir keskin pik ($2\theta=20.74^\circ-22.74^\circ$) gözlenmiştir (Şekil 4.6c). Literatüre bakıldığında nisin için karakteristik kırınım pikleri; $2\theta=27.48^\circ, 31.84^\circ, 45.56^\circ, 53.98^\circ, 56.58^\circ, 66.52^\circ$ ve 75.12° olarak bildirilmiştir (Qian vd., 2021). Elde edilen iki fazlı CMChT/BG/Nis doku iskelesinin difraktogramına bakıldığında ise nisin'e ait karakteristik pikler ($2\theta=31.72^\circ, 45.48^\circ, 56.58^\circ, 66.22^\circ, 75.36^\circ$ ve 84.10°) keskin olarak gözlenmiştir (Şekil 4.6d). Bu sonuç göstermiştir ki, iskeleye nisin başarılı bir şekilde eklenmiştir.

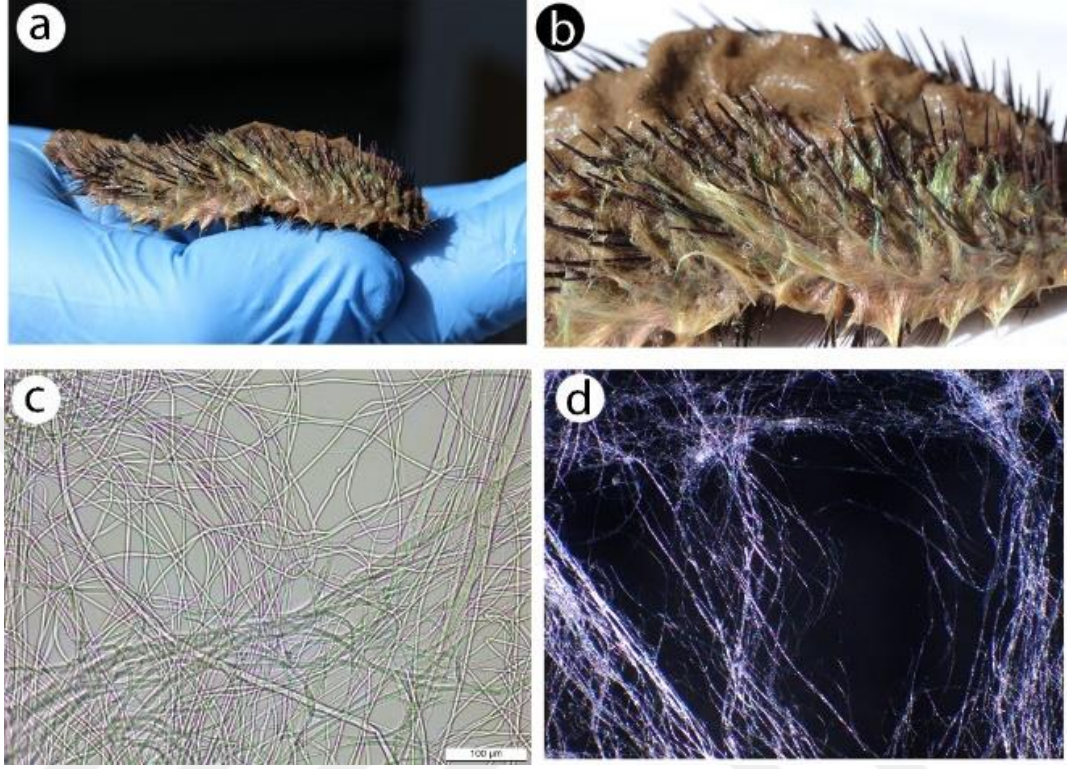


Şekil 4.6. XRD sonuçları a) *G. macandrewii* süngerinin iç yapısından izole edilen BG fiber, b) CMChT/Kontrol doku iskelesi c) iki fazlı CMChT/BG doku iskelesi, d) iki fazlı CMChT/BG/Nis doku iskelelerin kristaliniteleri.

4.1.2 Doğal β -kitin nanofiber ve nanofiber takviye edilmiş iskele

Şekil 4.7a,b' de deniz faresi (*A. aculeata*)'nin orijinal çekimi ve Şekil 4.7c,d' de saç benzeri (setae) yapılarından izole edilen kitinin ışık mikroskobu görüntüsü bulunmaktadır. Elde edilen kitinin nano fiber yapıda olduğu gözlenmektedir. Literatüre bakıldığında *A. aculeata* fotonik özellikleri bakımından bilim insanları tarafından dikkat çekmiştir. Diken yapılarının içerisinde de nano boyutta kitin-

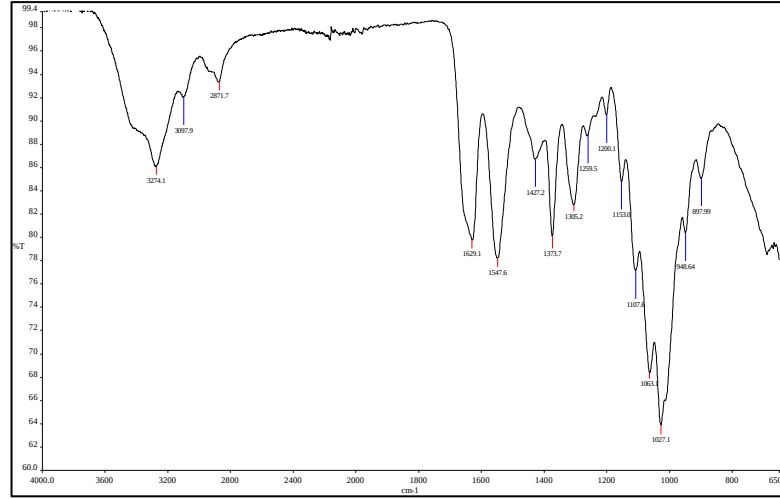
protein kompleksten oluşan fibrillerin bulunduğu bildirilmiştir. Fakat satea yapılarından izole edilen kitin nanofiberler ve karakterizasyonu hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 4.7. a, b) Deniz faresi (*Aphrodita aculeata*)’ nin orijinal kamera çekimi; c, d) Saç benzeri yapılarından (setae) ile izole edilen kitinin ışık mikroskobu görüntüsü.

4.1.2.1 FTIR karakterizasyonu

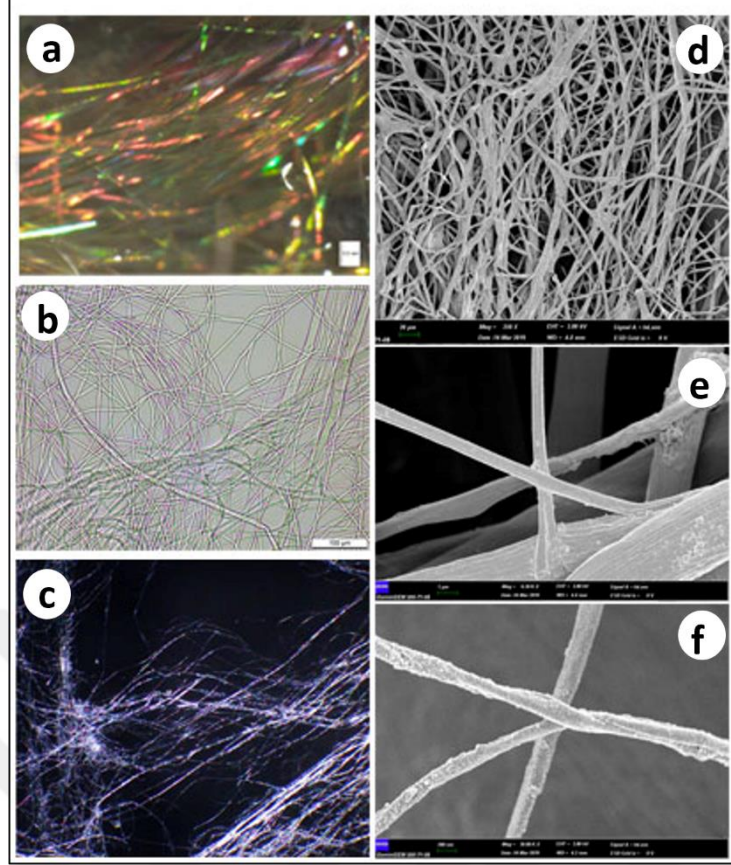
Kitinin α , β ve γ olmak üzere üç farklı allomorfik formu vardır. Kitinin allomorfik yapısını belirlemek için FTIR spektroskopisi kullanılan tekniklerden biridir. α ve β kitinin FTIR spektrumuna bakıldığında, α formun amid I bandı 1660 ve 1620 cm^{-1} ’de iki keskin pik verirken, β formda sadece 1640 cm^{-1} ’civarında tek bir bant gözlenmektedir. Bu da iki formun belirlenmesinde kullanılan en önemli belirteçlerden biridir. γ kitin de ise Amid I bandında kısmen iki pik gözlenmektedir. 1654 cm^{-1} ’de zayıf ve belirsiz bölünme gözlenirken, 1621 cm^{-1} ’de keskin pik gözlenmektedir (Kaya vd., 2017). Elde edilen spektrumda 1629 cm^{-1} ’de tek bir bantın yer alması izolasyon sonrasında elde edilen kitinin β formda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *A. aculeata* satealarından izole edilen kitinin FTIR spektrumu.

4.1.2.2 SEM karakterizasyonu

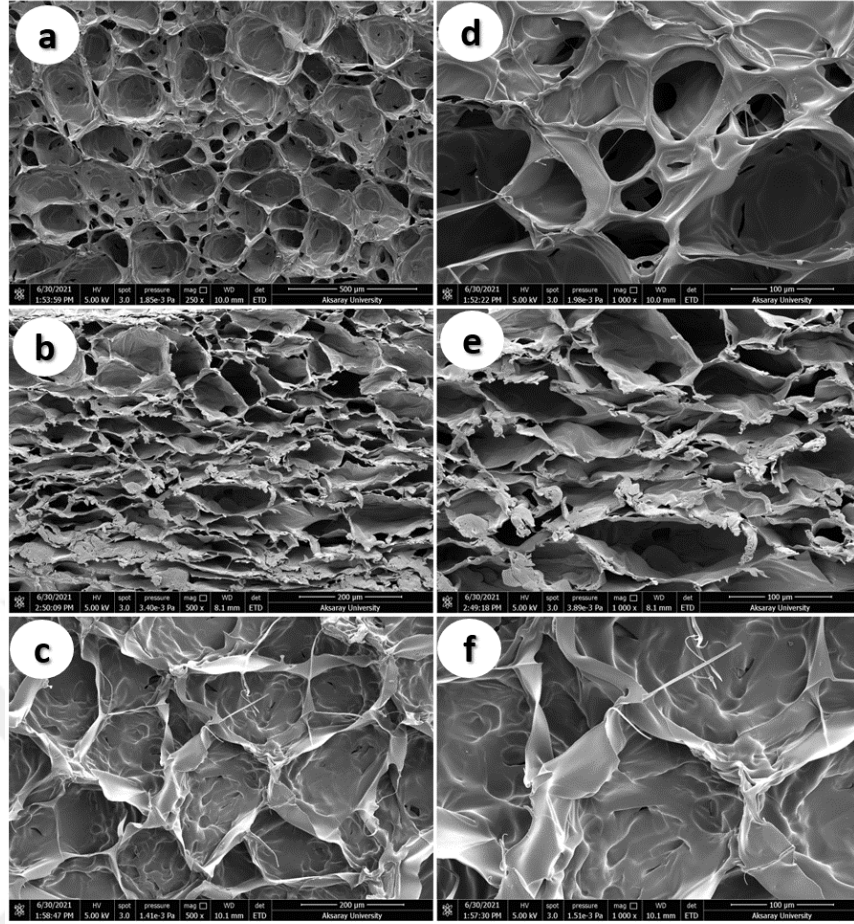
A. aculeata satealarından izole edilen beta kitin nanofibrillerin SEM görüntüleri Şekil 4.9’ da verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında elektrospindleme cihazı gerekmeden canlının doğal yapısının nanofiber ağ örgüsü yaptığı görülmüştür. Yaklaşık olarak, 260-220 nm boyutuna sahip nanofiberlere sahip olduğu gözlenmiştir. Normalde elektrospindleme cihazı ile beta kitin nanofiber elde etmek zordur. Tek başına elde edilememektedir, bundan dolayı başka bir kolay eğrilebilir polimer ile karıştırılarak elde edilebilmektedir. Bu yönüyle de hiçbir kimyasal işleme tabi tutmadan deniz faresinden beta kitin nanofiberlerin elde edilmesi önem arz etmektedir.



Şekil 4.9. *A. aculeata* satealarından izole edilen kitinin a, b, c) ışık mikroskobu görüntüleri ve d, e, f) SEM görüntüleri.

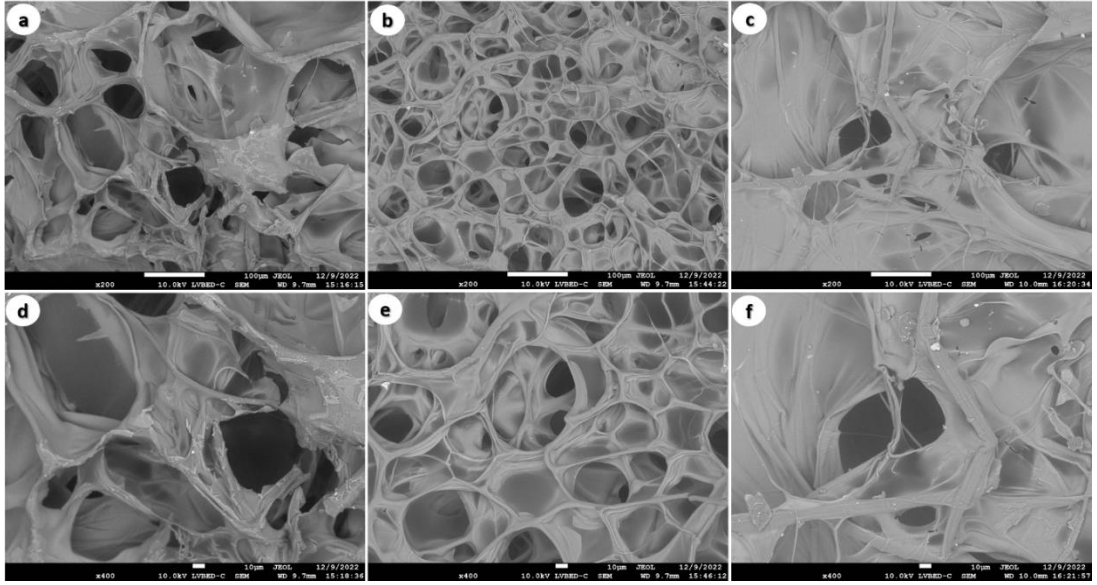
A. aculeata satealarından izole edilen doğal β -kitin nanofiber ile takviye edilmiş 3D iskele için ilk olarak farklı oranlarda β -kitin nanofiberleri içeren doku iskelesi üretimleri yapılmıştır. SEM görüntülerine bakılarak en iyi yüzey morfolojisine sahip olan iskele ile çalışmalara devam edilmesine tez izleme komitesi ile karar verilmiştir.

Şekil 4.10, CMCh/Kontrol doku iskelelerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Bu iskeleler, CMCh (2.5% (w/v)) ile PEGDE'nin (5% (w/v)) 40°C'de kimyasal olarak çapraz bağlanarak jel oluşturması ve ardından 48 saat boyunca dondurularak-kurutulmasıyla elde edilmiştir. İskelelerin üç boyutlu bağlantılı gözenekli yapısı, ağır metaller ile CMCh arasındaki etkileşimi sağlamak için geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır.

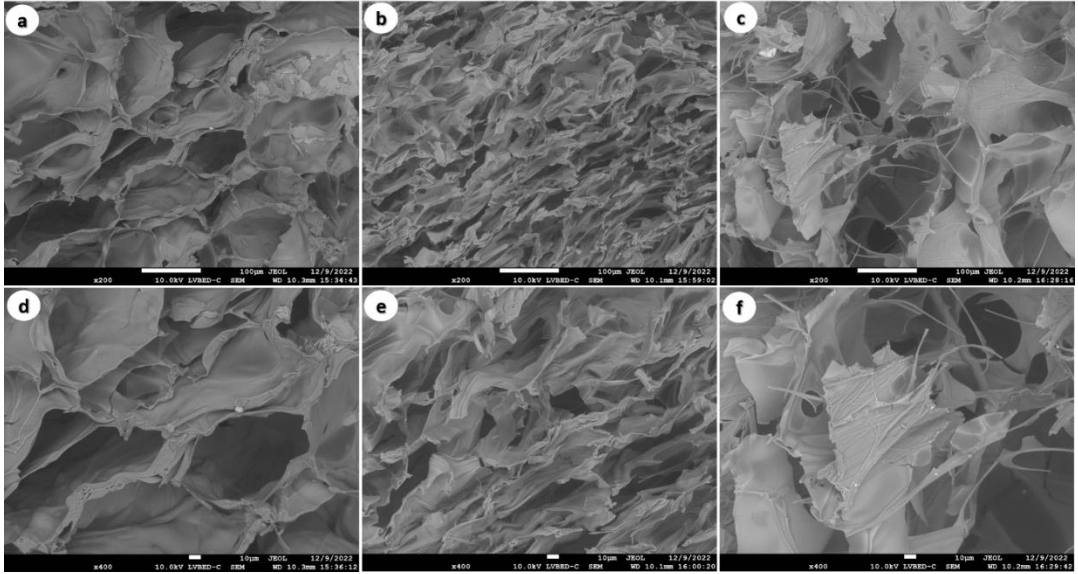


Şekil 4.10. CMChT/Kontrol doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a) Üst yüzey 500x, b) Kesit 500x, c) Alt yüzey 500x, d) Üst yüzey 1000x, e) Kesit 1000x ve f) Alt yüzey 1000x büyütme.

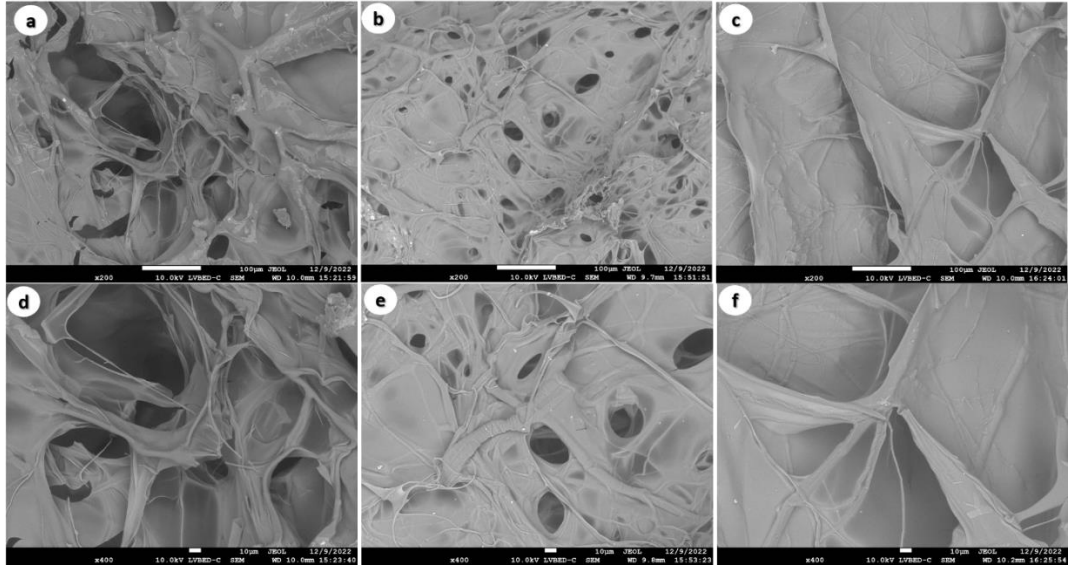
Deniz faresinden izole edilen β -kitin (SMC) nanofiberler ile takviye edilmiş, PEGDE ile çapraz bağlı CMChT iskelelerin üst yüzey, kesit ve alt yüzey morfolojileri 200x ve 400x büyütme oranlarında incelenmiştir. Tüm iskelelerin üst yüzlerinin SEM görüntüleri (SMC1/CMChT, SMC2/CMChT ve SMC3/CMChT) Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Tüm iskelelerin kesitsel ve alt yüzlerinin SEM görüntüleri 200x ve 400x büyütmeyle sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmektedir. Tüm iskeleler, dondurarak kurutma yöntemiyle oluşan üç boyutlu bağlantılı mikro gözenekli bir yapı sergilemiştir. Öte yandan, SMC nanolif ile takviye edilmiş hidrojel iskelelerde, nanolif oranı arttıkça yoğunluk artmıştır. Üst taraftan elde edilen iskelelerin gözeneklerinin ortalama çapı CMChT/Kontrol, SMC1/CMChT, SMC2/CMChT ve SMC3/CMChT için sırasıyla 139 ± 51 , 71 ± 33 , 56 ± 24 ve 50 ± 18 μm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. 200x büyütme ile SEM görüntülerinin üst yüzey a) SMC1/CMChT, b) SMC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri, 400x büyütme ile üst yüzey SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri.



Şekil 4.12. 200x büyütme ile kesit SEM görüntüleri a) SMC1/CMChT, b) SMC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri ve 400x büyütme ile kesit SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri.



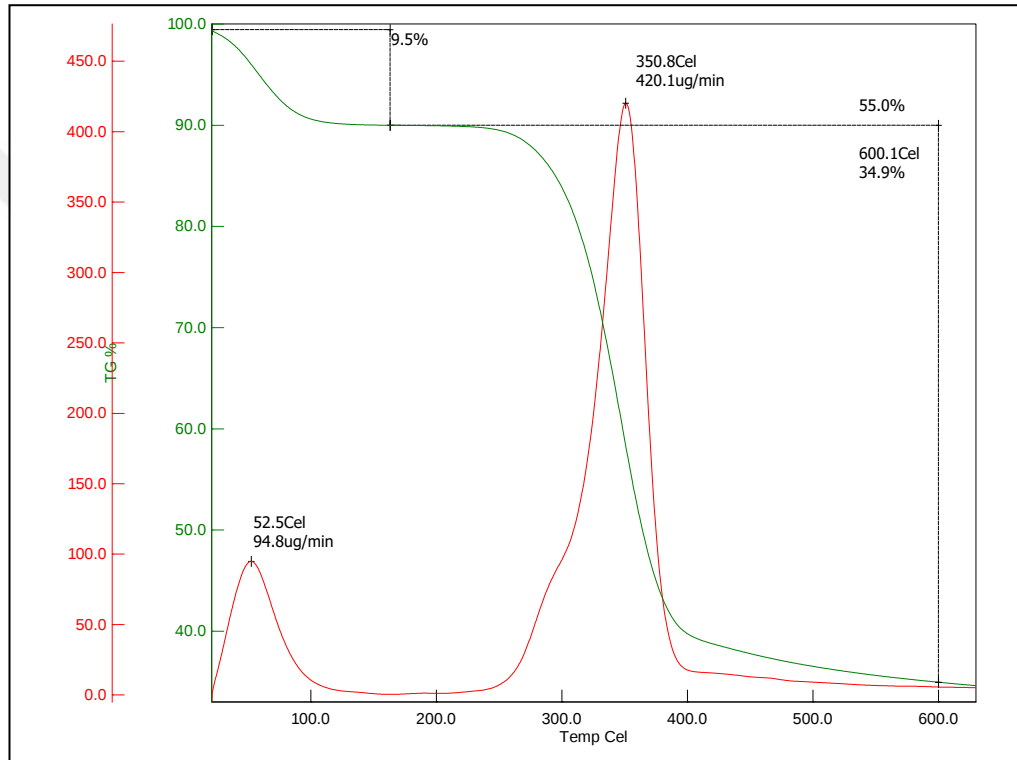
Şekil 4.13. 200x büyütme ile alt yüzey SEM görüntülerinin a) SMC1/CMChT, b) SMC2/CMChT ve c) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri ve 400x büyütme ile alt yüzey SEM görüntüleri d) SMC1/CMChT, e) SMC2/CMChT ve f) SMC3/CMChT hidrojel iskeleleri.

SMC nanofiber ile takviye edilmiş yapı iskelelerin içindeki makro gözenekler, metal iyonları ile CMChT ve SMC nanolifler arasındaki etkileşim için geniş bir yüzey alanı sağlar. SEM görüntülerinde de görüldüğü gibi, SMC nanoliflerin oranı arttıkça nanolifler etkin bir şekilde gözenek duvarlarına entegre olmuştur. Kesitsel SEM görüntülerinden elde edilen ortalama nanolif çapları, SMC1/CMChT için $1,60 \pm 0,6 \mu\text{m}$, SMC2/CMChT için $0,47 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ve SMC3/CMChT için $0,60 \pm 0,1 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. SMC3/CMChT iskelesinde, artan SMC nanolif yoğunluğu bazı gözeneklerin kapanmasına neden olmuştur. Bundan dolayı SMC2/CMChT iskelesinin hem porlu hem de fiber içeriği bakımından diğer iki iskeleden daha iyi morfolojiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı ağır metal giderme çalışmasında SMC2/CMChT iskelesinin metal iyonu giderme açısından performansı belirleme çalışmaları yapılmıştır.

4.1.2.3 Termal karakterizasyon

TG ve DTG eğrileri, termal stabilite ve bozunma derecesine göre termogravimetrik profillerini değerlendirmek için deniz faresinden elde edilen β -kitin nanofiberler için oluşturulmuştur (Şekil 4.14). Kitinin bozunma aşamaları ile ilgili önceki literatür raporlarına uygun olarak β - kitinin bozunması iki farklı aşamada gözlemlenmiştir (Al Shagger vd., 2009; Ifuku vd., 2010). β - kitin nanofiber için ilk ağırlık kaybı yaklaşık

olarak 52.5°C’ de kaydedilmiştir ve β - kitin zincirlerindeki hidrofilik gruplara adsorbe olmuş suyun buharlaşmasından kaynaklanmıştır (Jang vd., 2004). İkinci kütle kaybı, polimerik yapının bozulmasına, yani sakkarit halkasının dehidrasyonuna ve asetillenmiş kitin birimlerinin bozulmasına karşılık gelmektedir (Paulino vd., 2006). β -kitin nanofiberlerin ikinci kütle kaybı için DTG max değeri 350.8°C (%92.56) olarak kaydedilmiştir. Önceki raporlarda, β -kitin için termal stabilitesinin 250–350°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Chen vd, 2004; Maeda vd., 2008; Peesan vd., 2003).

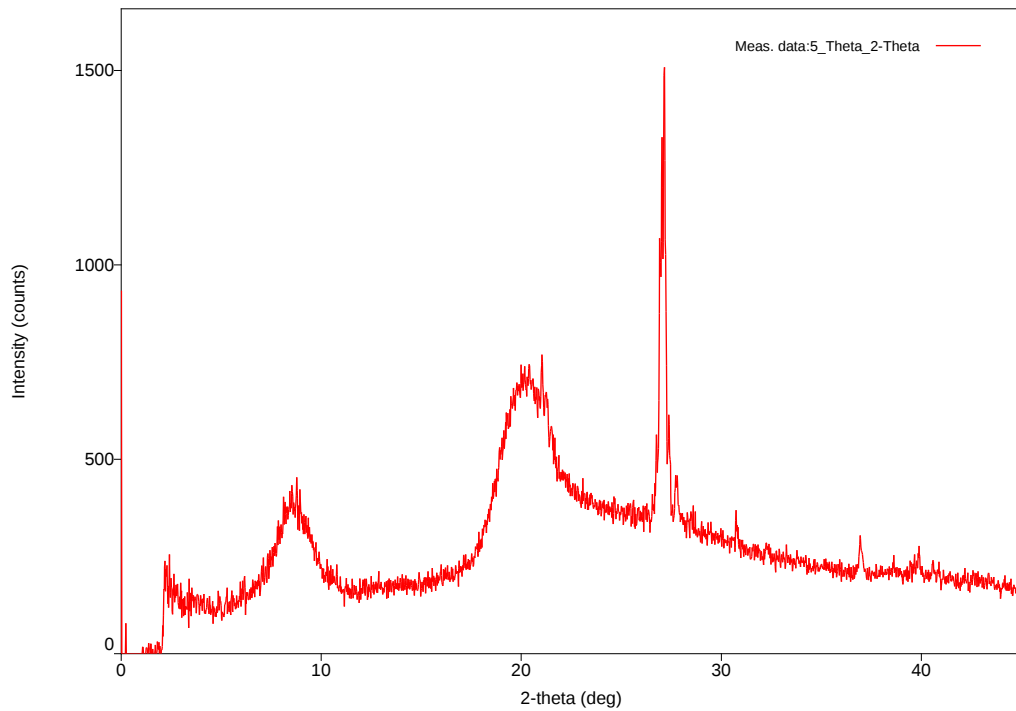


Şekil 4.14. *A. aculeata* satealarından izole edilen kitinin TGA diyagramı.

4.1.2.4 XRD karakterizasyonu

XRD analizi, izole edilmiş kitinin kristalinitesini değerlendirmek ve üç farklı allomorfik formu (α -, β - ve γ -kitin) ayırt etmek için kullanılmaktadır (Cárdenas vd., 2004). *A. aculeata* satealarından izole edilen β - kitin nanofiberlerin XRD desenleri, 2θ aralığında iki keskin tepe ve dört keskin olmayan yansıma göstermiştir (Şekil 4.15). *A. aculeata* satealarından izole edilen β - kitin nanofiberler için I_{020} kristal yansıma değeri 8.59°'de gözlenmiştir. β -kitin nanofiberler için ikinci yansıma zirvesi 21.02° olarak kaydedilmiştir. Kitinin farklı allomorfik formlarının XRD analizi

üzerine önceki raporlara göre, mevcut çalışmada gözlenen sonuçlarla neredeyse uyumlu olduğu belirlenmiştir (Cardenas vd., 2004). Literatüre bakıldığında XRD analizi sonucunda, α -kitin için 9.6, 19.6, 21.1 ve 23.7°de, β -kitin için 9.1° ve 20.3°de ve γ -kitin için 9.6 ve 19.8°de kristal yansımalar gözlenmektedir (Jang vd., 2004). Ayrıca kalamar iskeletinden elde edilen β -kitin için 9.8° ve 19.3°de kristal pikleri bildirilmiştir (Fan vd., 2008). Bu sonuçlara bakıldığında *A. aculeata* satealarından başarılı bir şekilde β - kitin nanofiber izole edilmiştir. Ayrıca yaklaşık olarak 26°de Keskin pik gözlenmiştir, bu cihaz kaynaklı bir Cu Ka1 radyasyonu elektromanyetik dalgaların yansıması olduğu düşünülmektedir (Hölzer vd., 1997).

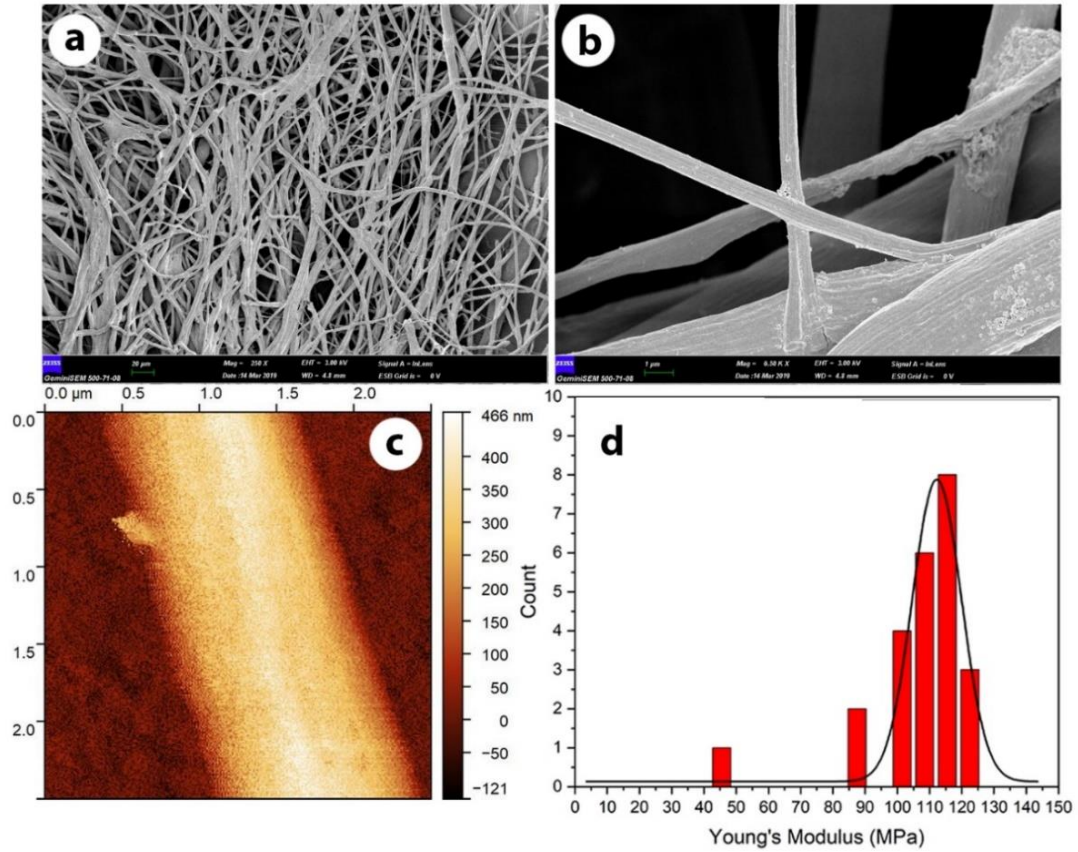


Şekil 4.15. *A. aculeata* satealarından izole edilen kitinin XRD diyagramı.

4.1.2.5 AFM karakterizasyonu

Nanometre boyutundaki penetrasyon derinliklerinde çok düşük kuvvetleri ölçme yeteneği ve operasyonel çok yönlülüğü ve yerinde görüntüleme yapabilmesi nedeniyle, AFM, çeşitli uygulamalar için konsolun yük-yer değiştirme tepkisini kaydederek nanomalzemelerin nano mekanik özelliklerini araştırmak için kullanılan bir tekniktir. Son zamanlarda, nanomalzemelerin mekanik özelliklerini belirlemek için bir teknik olarak AFM'nin kullanılması ön plana çıkmaktadır (Gauvin vd., 2015).

Çolak vd. (2017) tarafından yapılan metodun nanomalzemeler üzerine etkili olmasından dolayı bu projede elde edilecek β -kitin nanofiber örneklerinin mekanik özellikleri de bu yöntem kullanılarak detaylı bir şekilde araştırılmıştır. AFM ile karakterize edilen SMC nanofiberin yüzey morfolojisi ve mekanik özellikleri Şekil 4.16' da gösterilmektedir. 2,5 μm x 2,5 μm taramalar kullanılarak (Şekil 4.16c) yaklaşık 300 nm çapındaki tekli nanofiber üzerinden ölçüm alınmıştır. Burada tek nanofiber üzerinden ölçüm alınmasına dikkat edilmiştir. AFM nanoindentasyonu ile elde edilen SMC nanofiberin Young's modülü dağılımı Şekil 4.16d'de gösterilmiştir. Genel histograma bir Gauss fonksiyonu yerleştirilmesiyle SMC nanofiberin dış yüzeyinde Young's modülü 110-120 MPa aralığında belirlenmiştir.

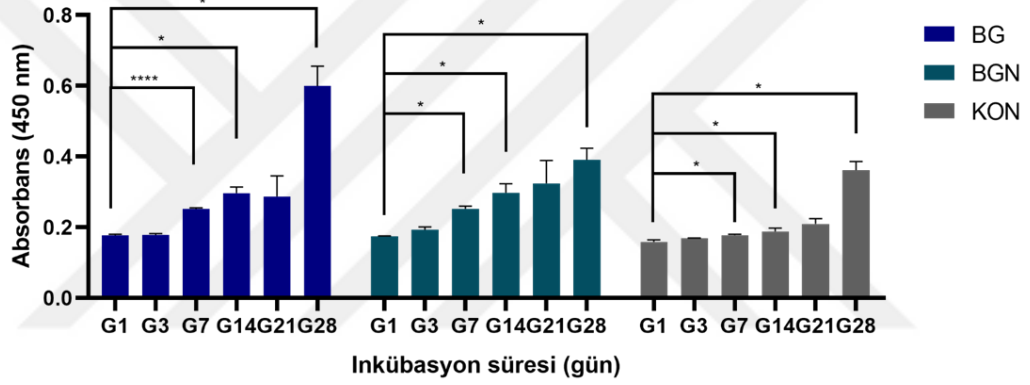


Şekil 4.16. SEM görüntüleri (a, b), SMC nanolifin yüzey AFM topoğrafyası (c) ve Young modülünün dağılımını gösteren histogram eğrisi (d).

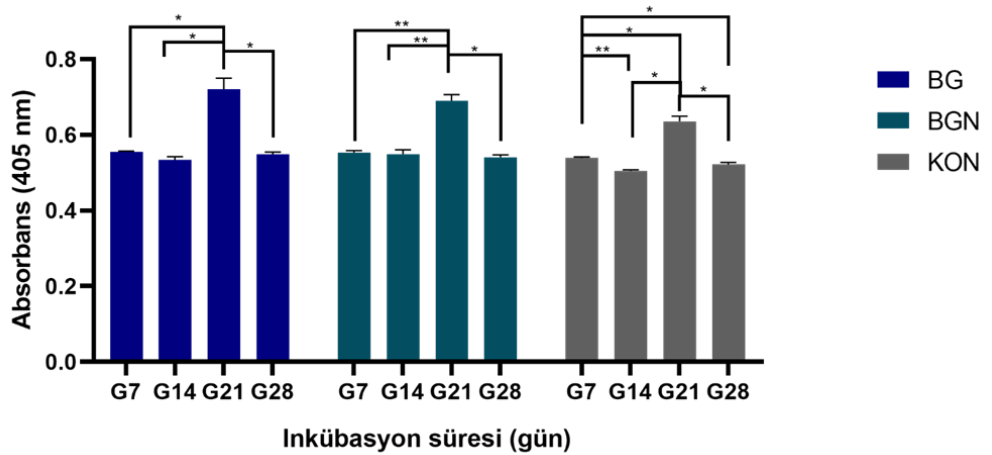
4.2 Üretilen Hidrojel İskelelerin Biyoteknolojik Uygulama Sonuçları

4.2.1 İki fazlı 3D hidrojel doku iskelesinin biyoyumluluk analizleri

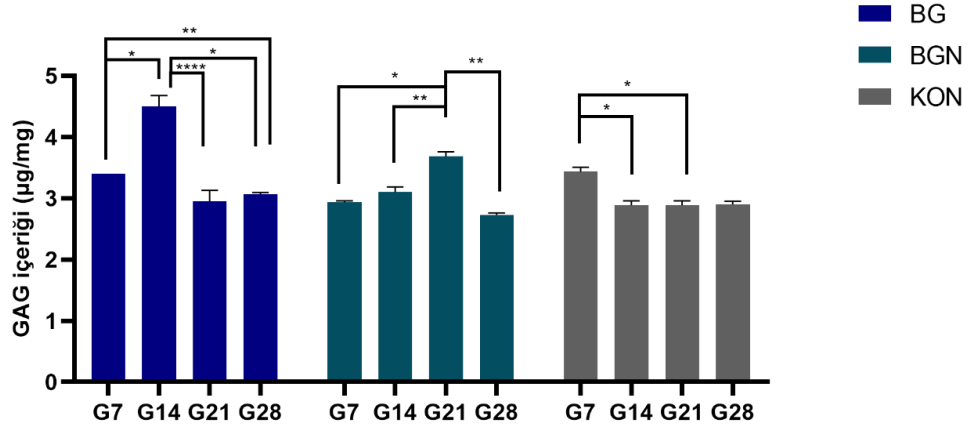
Hidrojel yapıdaki doku iskeleleri için MKH ile 28 günlük biyoyumluluk analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sırasıyla WST-1 ile canlılık, ALP ile osteojenik aktivite ve GAG ile kondrojenik aktivite ölçümleri yapılarak grafikleri Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19'da verilmektedir. Kullanılan polimer matrisinin hem kemik hem de kıkırdak dokusuna uygun olduğu, ayrıca toksik özellik göstermediği görülmektedir. Buna ek olarak hücre tutunmasının gösterilebilmesi amacıyla SEM analizleri yapılarak elde edilen görüntüler Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22' de sunulmaktadır.



Şekil 4.17. 1, 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen canlılık analizi sonuçları.



Şekil 4.18. 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen ALP analizi sonuçları.



Şekil 4.19. 7, 14, 21 ve 28. günlerde gerçekleştirilen GAG analizi sonuçları.

4.2.1.1 Canlılık analizi (WST-1)

Ekilen MKH'lerin 28 gün boyunca canlılığını koruyup koruyamayacağı ve herhangi bir sitotoksikite gösterip göstermeyeceğini belirleyebilmek amacıyla 1, 3, 7, 14, 21 ve 28. inkübasyon günlerinde ölçümler gerçekleştirdik. Bu test ile hücre yoğunluğunun inkübasyonun sonuna doğru arttığı tüm polimer matrisleri için de gösterilmektedir. Bu artış ilk inkübasyon gününe göre istatistiksel olarak tüm gruplarda anlamlıdır. Ayrıca, KON grubunda absorbans değerleri 21 gün boyunca neredeyse stabil sayılabilecek durumda seyrederken BG ve BGN grubu iskelelerde parabolik bir artış söz konusudur. Hatta BG grubunda inkübasyonun 28. gününde diğerlerine göre çok daha yüksek bir absorbans değeri elde edilmiştir. Bu analizlerin sonucunda üretilen iskelelerin hücre canlılığı üzerine herhangi olumsuz bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak kemik doku mühendisliği için bir doku iskelesi tasarlamış ve kemik iliği kökenli MKH ile farklılaşma ve proliferasyon etkisi bu iskeleler üzerinde çalışılmıştır. Bu bilgilerin doğrultusunda kendi verilerimizi değerlendirdiğimizde, ilk günlerde proliferasyon absorbansının düşük olup sonrasında artmasının sebebinin doku iskelelerine ekilen MKH'lerin farklılaşmaya başlaması olduğu da düşünülmektedir. Ancak, detaylı olarak gerçekleştirilen biyokimyasal analizler ve histolojik incelemeler ile bu hipotez değerlendirilebilir.

4.2.1.2 ALP analizi

Tüm gruplarda özellikle 21. inkübasyon gününde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Bu artış BG ve BGN grubu iskelelerin absorbans değerinde KON grubuna göre daha fazladır. Bu durum osteojenik hücrelerin artışı ile doğrudan

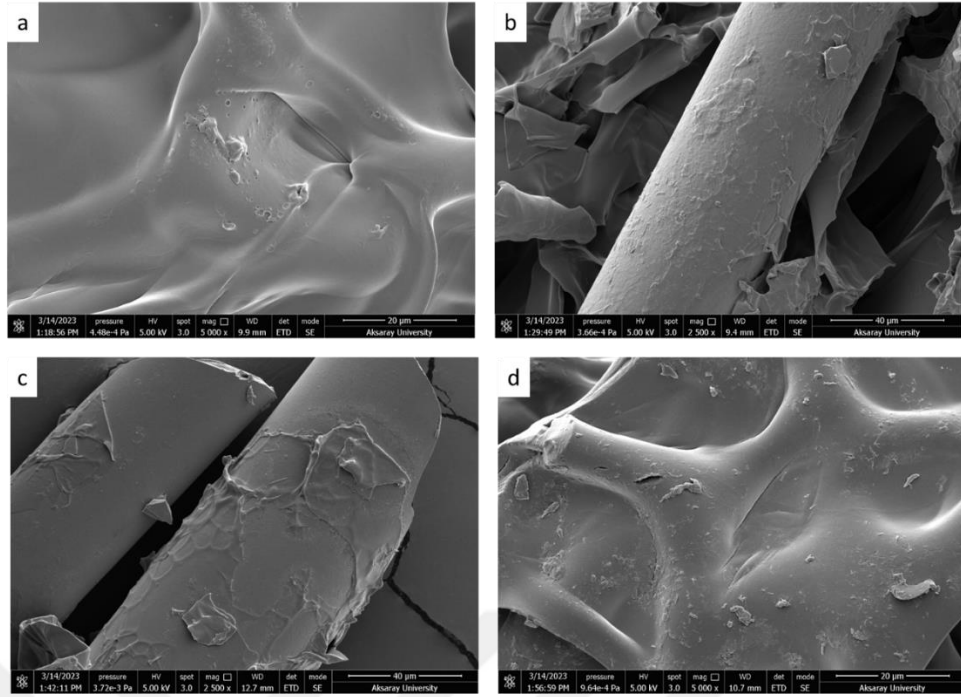
ilişkilidir ve iskelelerin kemik dokusuna uyumlu olduklarını göstermektedir. Sonuçlar literatür ile uyumludur.

4.2.1.3 GAG analizi

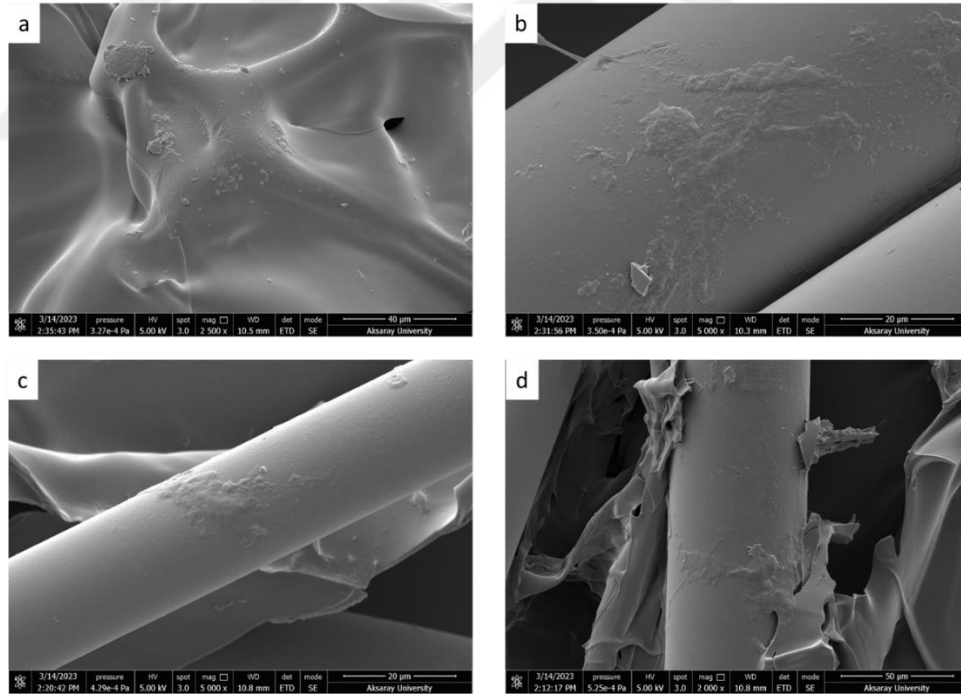
Kıkırdak doku mühendisliği için geliştirilecek doku iskelelerinin GAG oluşumunu desteklemesi gerekmektedir. Çalışmamızda, MKH ile hücrelendirilen iskelelerin kondrojenik hücrelere farklılaşıp farklılaşmadığını belirleyebilmek için DMMB tayini ile GAG ölçümü gerçekleştirilmiştir. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında özellikle 14. inkübasyon gününde BG grubu iskeleler GAG oluşumunu en yüksek oranda göstermektedir. Ayrıca hem BG hem de BGN grubu KON grubuna göre daha yüksek GAG ölçümü gösterse de sonuçlar birbirine çok yakın oranlardadır. Son olarak literatür ile kıyasladığımızda GAG miktarları kitosan katkılı iskeleler ile benzer oranlarda çıkmaktadır. Ancak bu değerler insan kıkırdak dokusu için yetersiz kalmaktadır.

4.2.1.4 SEM görüntüleri

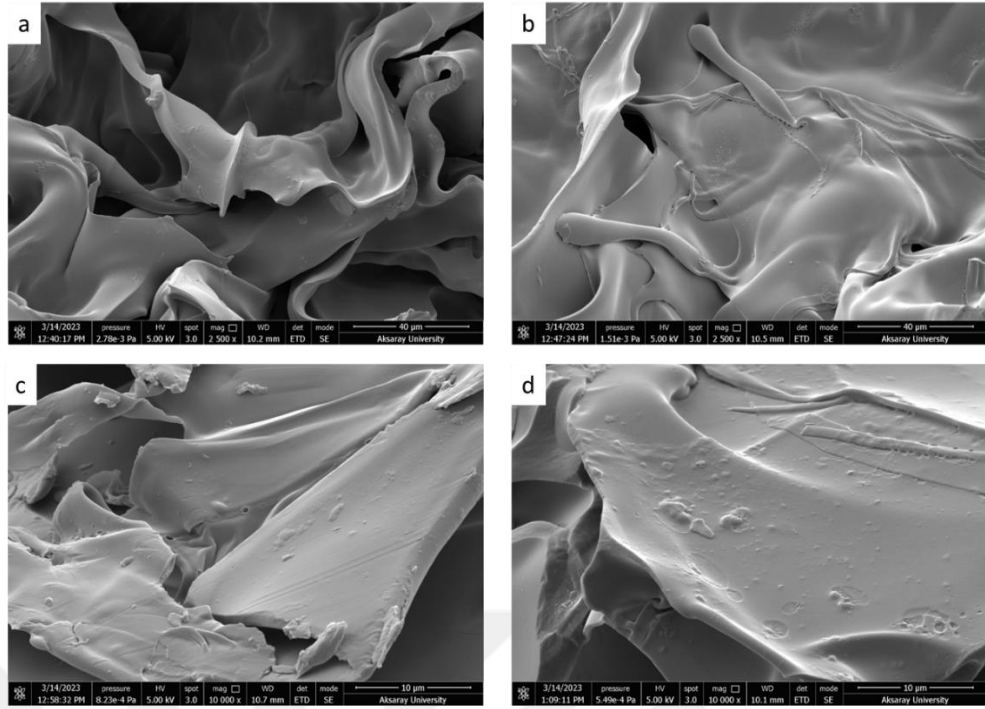
Doku iskelelerinin MKH ile hücrelendirilmesinden sonra hücrelerin başarılı bir şekilde her üç polimer matrisi ile üretilen doku iskelelerinde de yüzeye tutunduğu görülmüştür (Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22). Literatürle kıyaslandığında, mezenkimal kök hücrelerin ilk günlerde küçük hücre kümeleri şeklinde yüzeye tutunduğu, ardından kümelerin yapıda özellikle fibriler bölgelere yayıldığı ve hücre uzantılarının da gözeneklere yayıldığı görülmektedir. 28. günde ise hücrelerin gitgide yayılarak yüzeyi çarşaf gibi kaplamaya başladığı görülmektedir. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur.



Şekil 4.20. BGN grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.



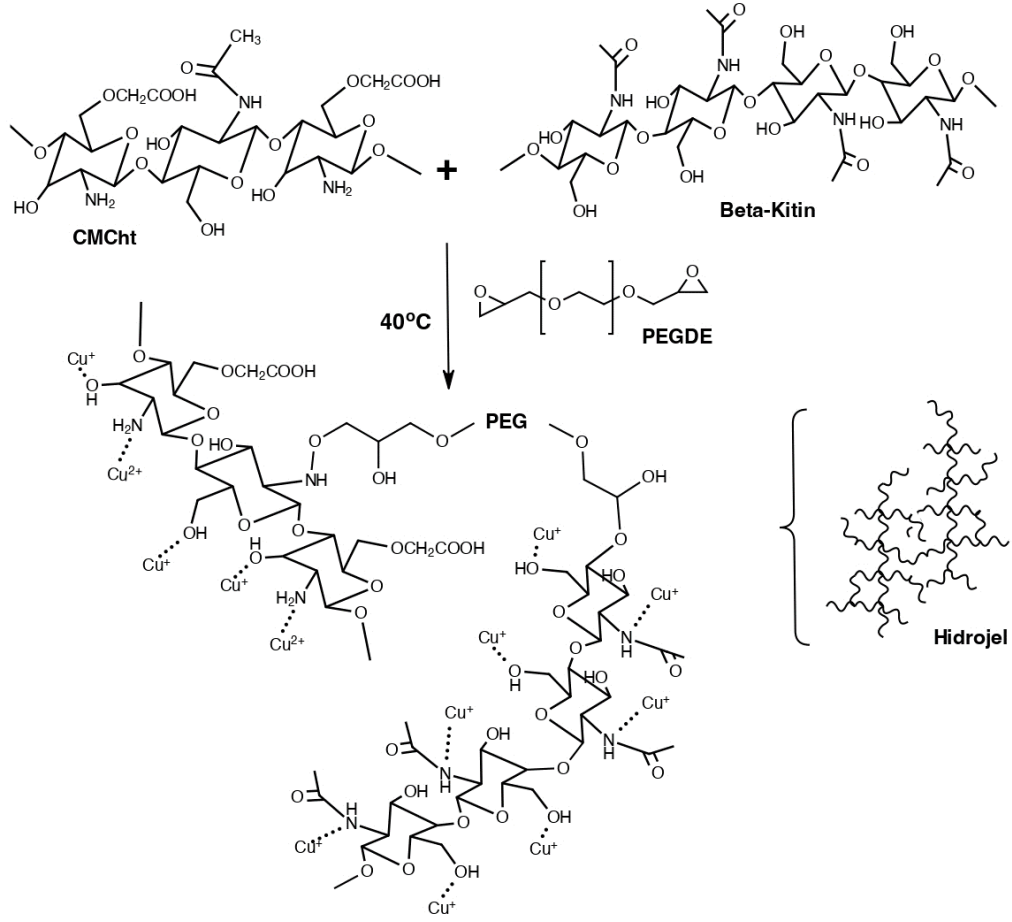
Şekil 4.21. BG grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.



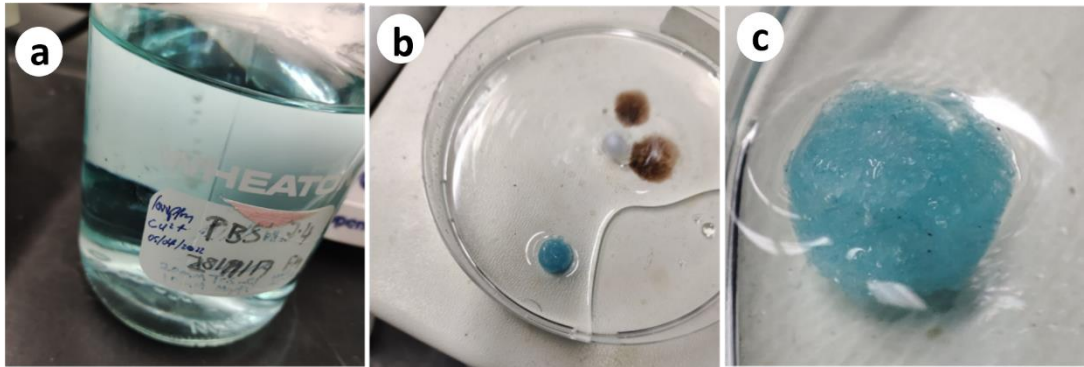
Şekil 4.22. KON grubu iskeleleri için (a) 7, (b) 14, (c) 21 ve (d) 28. günlerde SEM görüntülemesi.

4.2.2 β -Kitin nanofiber ile takviye edilmiş SMC2/CMCht hidrojel iskelesinin ağır metal giderimi

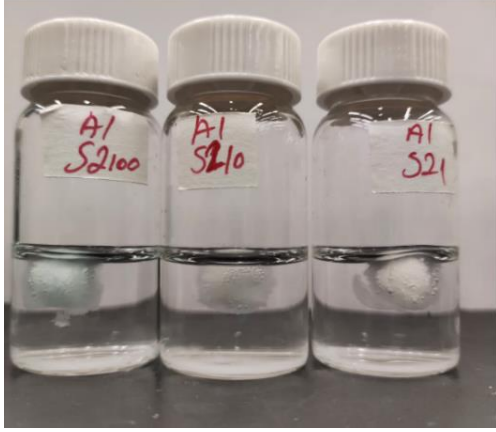
SMC2/CMCht iskelesi 1 saat 1000 ppm bakır çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. İlk izlenimlere göre; SMC2/CMCht iskelesi, yüksek şişme özelliği ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi göstermiş ve iskele yapısı dağılmadan stabil kalmıştır (Şekil 4.24). Bu sonuçlara bakıldığında iyi bir bakır yakalayıcısı olarak filtre membran malzemesi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür ve ağır metal giderimi çalışmaları için test edilmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). CMCht ile SMC beta kitinin amin ve hidroksil gruplarının PEGDE ile halka açılmasıyla çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 4.23’de gösterilmiştir. SMC2/CMCht hidrojel iskelesinin oluşumu ve bakır bağlanmasının şematik gösterimi verilmiştir.



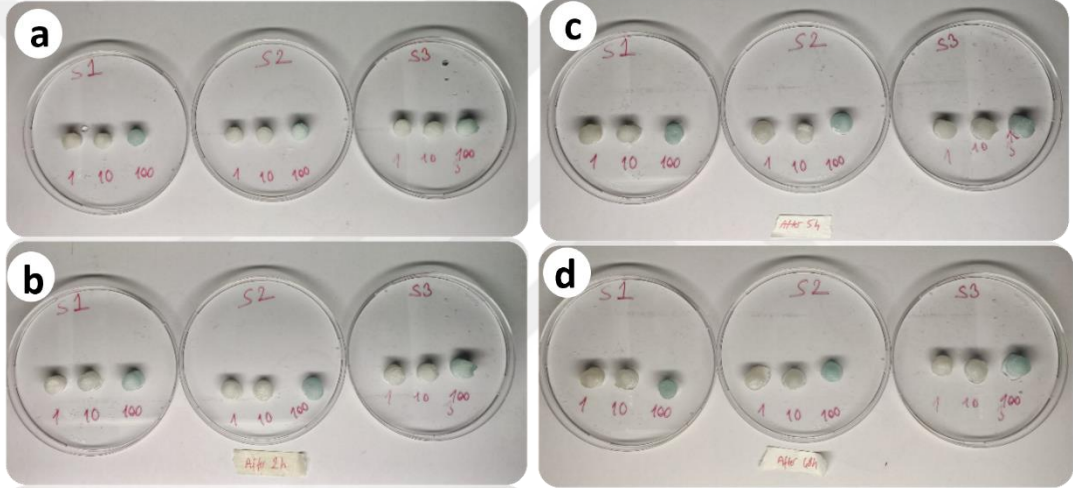
Şekil 4.23. CMChT polimeri ve beta kitinin amin ve hidroksil grupları aracılığıyla halka açılmasıyla çapraz bağlanma reaksiyonunun şeması. SMC2/CMChT hidrojelinin oluşumu ve bakır bağlanmasının şematik gösterimi.



Şekil 4.24. a) 1000 ppm bakır solüsyonu, b) SMC2/CMChT hidrojel iskelesi manyetik karıştırıcı kullanılarak 1 saat boyunca bakır çözeltisi içinde ve c) 1 saat sonra SMC2/CMChT hidrojel iskelesinin renk değişimi.

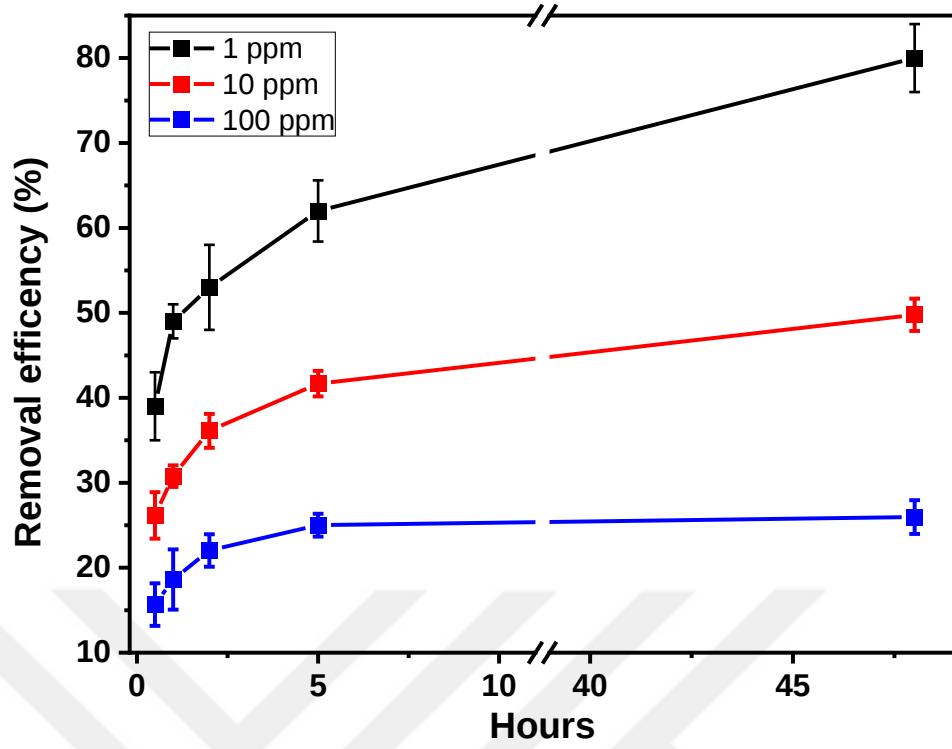


Şekil 4.25. SMC2/CMCht iskeletonin 1, 10 ve 100 ppm bakır çözeltisi içinde ve dışındaki görüntüleri.



Şekil 4.26. SMC2/CMCht iskelelerin 1, 10 ve 100 ppm bakır çözeltisinde a) 1 saat, b) 2 saat, c) 5 saat ve d) 48 saat sonrası görüntüleri.

SMC nanolif ile takviye edilmiş CMCht hidrojel kompozit iskeleler için 2 saat, 100 ppm için maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık olarak %28 olarak bulunmuştur (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. SMC2/CMChT iskelelerin 1, 10 ve 100 ppm için bakır gideriminin atomik absorpsiyon spektroskopisi sonuçları.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında elde edilen 2 farklı iskelenin hem doku mühendisliğinde (BG katkılandırılarak) hem de ağır metal giderimi çalışmalarında (deniz faresi nanofiberleri katkılandırılarak) etkili olduğu belirlenmiştir.

Tez başlangıcında 3 malzeme ile çalışılması planlanmıştır. Fakat Covid-19 sebebi ve bazı maddi yetersizlikler dolayısıyla bu 3 malzeme yerine 2 ayrı iskele tasarımı yapılabilmektedir. Ayrıca, yaşanan Covid-19 salgını nedeniyle farklı üniversiteler (Dokuz Eylül Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi) ile yürütülen bu tez çalışmasının diğer üniversitelere giriş sıkıntısı çekilmesinden dolayı 3. iskele olan selüloz temelli iskelenin çalışmalarına başlanamamıştır. Yaşanılan bu olumsuz koşullardan dolayı tik toplantısında jüri üyeleri ile ortak karar alınıp bu iskelenin tez çalışması kapsamında çıkarılması uygun görülmüştür.

Tez sürecinde Tübitak 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında Amerika da bulunduğum da yeni iş birlikleri ile üretilen SMC nanofiber katkılı iskelenin ağır metal giderimine bakılmıştır. Tez Jürisinin de kararıyla farklı bir uygulama ile tez güçlendirilmiştir.

Deniz süngerinden biyosilika fiber ve deniz faresinden ise β -kitin fiber izolasyonundan sonra FTIR analizleri ile saf bir şekilde elde ettiğimiz gösterilmiştir. Ardından izole edilen bu malzemelerin CMChT temelli iskelelerin polimer yapısına başarılı bir şekilde entegre edildiği SEM ve FTIR analizleri ile gösterilmiştir.

Tasarlanan iskelelerde çapraz bağlayıcı ajan olarak PEGDE kullanılmıştır. Her iki iskelede de PEGDE oranı aynı (0.05g) kullanılmıştır. Diğer oranlar da denenmiş fakat iskele yapısında kırılma oluştuğu için en iyi 0.05g olduğu belirlenerek iskele üretimine devam edilmiştir.

İki fazlı doku iskelesi üretiminde farklı BG oranları denenmiş ve optimum BG miktarı 0.05g olarak belirlenmiştir. BG miktarı arttıkça yüzeye tutunma oranı düşmektedir, miktar azaldıkça ise dipte yeterli BG gözlenmemiştir. Bundan dolayı optimum BG miktarı belirlenerek deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

Biyosilika fiber, β -kitin nanofiber ve üretilen BG katkılı iki fazlı 3D hidrojel doku iskelesi ve β -kitin nanofiber ile takviye edilmiş CMChT temelli hidrojel iskelelerin; yüzey morfolojileri SEM cihazı, termal davranışı termogravimetrik analiz ile gösterilmiştir.

İki fazlı 3D doku iskelelerine nisin eklenerek doku ile iskele arasındaki etkileşimin artırılması düşünülmüştür ve biyouyumluluk testleri yapılmıştır. FTIR analizi sonucunda nisinin fonksiyonel gruplarının CMChT ile benzer olmasından dolayı çok fazla bir değişiklik görülmesi de XRD analizinde çok net bir şekilde iskelerin yapısında olduğu gösterilmiştir.

BG katkılı iki fazlı 3D doku iskelesinin hücre kültürü deneyleri kısmında ilk olarak üretilen kondrosit ve osteoblast hücrelerinin üzerindeki etkisine bakılması planlanmıştır. Fakat, Dokuz Eylül Üniversitesi ile yapılan iş birliği ile mezenkimal kök hücreler temin edilip, iskelelerin biyouyumluluklarına bakılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Biyoyumluluk çalışmalarına baktığımızda ilk günlerde hücreler iskelelere tam bir uyum sağlayamasa da yaklaşık 14. günden itibaren iskele üzerinde proliferasyona başlamışlardır. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında özellikle 14. inkübasyon gününde BG grubu iskeleler GAG oluşumunu en yüksek oranda göstermektedir. Ayrıca hem BG hem de BG/N grubu KONTROL grubuna göre daha yüksek GAG ölçümü gösterse de sonuçlar birbirine çok yakın oranlardadır.

SEM Görüntüleri incelendiğinde; doku iskelelerinin MKH ile hücrelendirilmesinden sonra hücrelerin başarılı bir şekilde her üç polimer matrisi (BG, KON ve BGN) ile üretilen doku iskelelerinde de yüzeye tutunduğu görülmüştür.

Mezenkimal kök hücrelerin; ilk günlerde küçük hücre kümeleri şeklinde yüzeye tutunduğu, ardından kümelerin yapıda özellikle BG fiberler üzerinde ve gözenekler içerisine doğru, özellikle 28. Günde, hücrelerin gitgide yayılarak yüzeyi çarşaf gibi kaplamaya başladığı görülmektedir.

TÜBİTAK, 2214-A Doktora Sırasında Araştırma Bursu kapsamında 21 Ekim 2022 tarihinde Clarkson Üniversitesi'nde çalışmalara başlamak için öncesinde Laboratuvar

güvenliği eğitimleri ve CAMP merkezinde cihazları kullanabilmek için eğitimler alınıp tüm analizler bireysel yapılmış ve tamamlanmıştır.

Ağır metal giderimi için doğadan esinlenerek biyouyumlu, doğa dostu bir iskele tasarlanmıştır. SMC nanofiber ile takviye edilmiş CMChT hidrojel iskelesi için maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık %28 olarak bulunmuştur (2 saat, 100 ppm için).

β -kitin nanofiber ile takviye edilmiş CMChT hidrojel iskelelerin yapılarının Cu (II) giderimi için alternatif, etkili, tekrar kullanılabilir, yenilikçi ve çevre dostu bir filtre ürünü olabileceğini göstermektedir.

Yapılan bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen veriler, tasarlanan iki farklı iskelenin biyoteknolojik uygulamalarda başarılı olacağını ortaya koymuştur. Bu durum doğal kaynaklardan izole edilen biyomalzemeler ile kompozit iskeleler üretilmesini ve farklı alanlarda kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aaliya, B., Sunooj, K. V. ve Lackner, M., 2021. Biopolymer composites: A review, *International Journal of Biobased Plastics*, 3, 1, 40-84.
- Abbas, A., Al-Amer, A.M., Laoui, T., Al-Marri, M.J., Nasser, M.S., Khraisheh, M. ve Atieh, M.A., 2016. Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: critical review of adsorption applications, *Separation and Purification Technology*, 157, 141-161.
- Ahmed, E. M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of advanced research*, 6, 2, 105-121.
- Aizenberg, J., Weaver, J.C., Thanawala, M.S., Sundar, V.C., Morse, D.E. ve Fratzl, P., 2005. Skeleton of *Euplectella* sp.: structural hierarchy from the nanoscale to the macroscale, *Science*, 309, 5732, 275-278.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. ve Elsabee, M. Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate polymers*, 77, 2, 410-419.
- Ali, H., Khan, E. ve Ilahi, I., 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation, *Journal of chemistry*, 2019.
- Bao, Z., Xian, C., Yuan, Q., Liu, G. ve Wu, J., 2019. Natural polymer-based hydrogels with enhanced mechanical performances: preparation, structure, and property, *Advanced Healthcare Materials*, 8, 17, 1900670.
- Blackstone, B.N., Gallentine, S.C. ve Powell, H.M., 2021. Collagen-based electrospun materials for tissue engineering: a systematic review, *Bioengineering*, 8, 3, 39.
- Boccardi, E., Belova, I., Murch, G., Boccaccini, A. ve Fiedler, T., 2015. Oxygen diffusion in marine-derived tissue engineering scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 6, 1-9.
- Budiraharjo, R., Neoh, K.G. ve Kang, E.T., 2012. Hydroxyapatite-coated carboxymethyl chitosan scaffolds for promoting osteoblast and stem cell differentiation, *Journal of colloid and interface science*, 366, 1, 224-232.
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E. ve Miranda, S. P., 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 4, 1876-1885.
- Cárdenas, P., Rapp, H. T., Klitgaard, A. B., Best, M., Tholleson, M. ve Tendal, O. S., 2013. Taxonomy, biogeography and DNA barcodes of *Geodia* species (Porifera, Demospongiae, Tetractinellida) in the Atlantic boreo-arctic region, *Zool. J. Linn. Soc.*, 169, 251–311.

- Cárdenas, P., Rapp, H. T., Schander, C. ve Tendal, O. S., 2010. Molecular taxonomy and phylogeny of the Geodiidae (Porifera, Demospongiae, Astrophorida) — combining phylogenetic and Linnaean classification, *Zool. Scripta* 39, 89–106.
- Chen, C. H., Wang, F. Y. ve Ou, Z. P., 2004. Deacetylation of β -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 5, 2416-2422.
- Clarke, J., 2003. The occurrence and significance of biogenic opal in the regolith, *Earth-Science Reviews*, 60, 3, 175-194.
- Clarke, S., Choi, S., McKechnie, M., Burke, G., Dunne, N., Walker, G., Cunningham, E. ve Buchanan, F., 2016. Osteogenic cell response to 3-D hydroxyapatite scaffolds developed via replication of natural marine sponges, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27, 2, 22.
- Çolak, A., Wei, J., Arfaoui, I. ve Pileni, M.P., 2017. Coating agent-induced mechanical behavior of 3D self-assembled nanocrystals, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, 35, 23887-23897.
- Daniel, A.B., Zahir, E. ve Asghar, M.A., 2021. Remediation of vanadium (V) and chromium (III) ions from aqueous media by modified nanocellulose obtained from coconut coir, *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 60, 7, 500-520.
- De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M. ve Notarnicola, M., 2016. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review, *Sustainable Materials and Technologies*, 9, 10-40.
- Deepthi, S., Venkatesan, J., Kim, S.-K., Bumgardner, J.D. ve Jayakumar, R., 2016. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering, *International journal of biological macromolecules*, 93, 1338-1353.
- DeMaster, D.J., 2003. The diagenesis of biogenic silica: chemical transformations occurring in the water column, seabed, and crust, 7, 407.
- Ding, H., Cheng, Y., Niu, X. ve Hu, Y., 2020. Application of Electrospun Nanofibers in Bone, Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-26.
- El-Kady, A. M., Rizk, R. A., Abd El-Hady, B. M., Shafaa, M. W. ve Ahmed, M.M., 2012. Characterization, and antibacterial properties of novel silver releasing nanocomposite scaffolds fabricated by the gas foaming/salt-leaching technique, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10, 2, 229-238.
- El-Sherbiny, I., Salih, E. ve Reicha, F., 2016. New trimethyl chitosan-based composite nanoparticles as promising antibacterial agents, *Drug development and industrial pharmacy*, 42, 5, 720-729.

- Fan, Y., Saito, T. ve Isogai, A., 2008. Preparation of chitin nanofibers from squid pen β -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions, *Biomacromolecules*, 9, 7, 1919-1923.
- Fereshteh, Z., 2018. Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. In: *Functional 3D tissue engineering scaffolds*, Eds: Elsevier, 151-174.
- Gamiz Gonzalez, M.A., Edlund, U., Vidaurre, A. ve Gomez Ribelles, J.L., 2017. Synthesis of highly swellable hydrogels of water-soluble carboxymethyl chitosan and poly (ethylene glycol), *Polymer International*, 66, 11, 1624-1632.
- Gauvin, M., Yang, N., Barthel, E., Arfaoui, I., Yang, J., Albouy, P. ve Pileni, M., 2015. Morphology, nanocrystallinity, and elastic properties of single domain ϵ -Co supracrystals, *The Journal of Physical Chemistry C*, 119, 13, 7483-7490.
- Gobbi, A. ve Whyte, G.P., 2019. Long-term clinical outcomes of one-stage cartilage repair in the knee with hyaluronic acid-based scaffold embedded with mesenchymal stem cells sourced from bone marrow aspirate concentrate, *The American journal of sports medicine*, 47, 7, 1621-1628.
- Gobbi, A., Lane, J.G. ve Dallo, I., 2020. Editorial Commentary: Cartilage Restoration—What Is Currently Available, Elsevier.
- González, M. G., Cabanelas, J. C. ve Baselga, J., 2012. Applications of FTIR on epoxy resins-identification, monitoring the curing process, phase separation and water uptake. *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*, 2, 261-284.
- Granito, R.N., Custodio, M.R. ve Rennó, A.C.M., 2017. Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105, 6, 1717-1727.
- Grayson, W.L., Chao, P.-H.G., Marolt, D., Kaplan, D.L. ve Vunjak-Novakovic, G., 2008. Engineering custom-designed osteochondral tissue grafts, *Trends in biotechnology*, 26, 4, 181-189.
- Greeley, J. N., Meeuwenberg, L. M. ve Banaszak Holl, M.M., 1998. Surface infrared studies of silicon/silicon oxide interfaces derived from hydridosilsesquioxane clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 31, 7776-7782.
- Gruskiene, R., Kavleiskaja, T., Staneviciene, R., Kikionis, S., Ioannou, E., Serviene, E., Roussis, V. ve Sereikaite, J., 2021. Nisin-loaded ulvan particles: Preparation and characterization, *Foods*, 10, 5, 1007.
- Gunes, O.C., Albayrak, A.Z., Tasdemir, S. ve Sendemir, A., 2020. Wet-electrospun PHBV nanofiber reinforced carboxymethyl chitosan-silk hydrogel composite scaffolds for articular cartilage repair, *Journal of Biomaterials Applications*, 35, 4, 515-531.

- Gutierrez-Gonzalez, J., Garcia-Cela, E., Magan, N. ve Rahatekar, S.S., 2020. Electrospinning Alginate/Polyethylene oxide and curcumin composite nanofibers, *Materials Letters*, 270, 127662.
- Haleem, A., Javaid, M., Khan, R.H. ve Suman, R. 2020., 3D printing applications in bone tissue engineering, *Journal of clinical orthopaedics and trauma*, 11, 118-124.
- Hamidi, M., Azadi, A. ve Rafiei, P., 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 60, 15, 1638-1649.
- Harris, J.D., Siston, R., Brophy, R., Lattermann, C., Carey, J. ve Flanigan, D., 2011. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation—a systematic review, *Osteoarthritis and cartilage*, 19, 7, 779-791.
- Hokmabad, V.R., Davaran, S., Aghazadeh, M., Alizadeh, E., Salehi, R. ve Ramazani, A., 2018. A comparison of the effects of silica and hydroxyapatite nanoparticles on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone)/chitosan Nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering, *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15, 6, 735-750.
- Höland, W., Schweiger, M., Watzke, R., Peschke, A. ve Kappert, H., 2008. Ceramics as biomaterials for dental restoration, *Expert review of medical devices*, 5, 6, 729-745.
- Hölzer, G., Fritsch, M., Deutsch, M., Härtwig, J. ve Förster, E., 1997. $K \alpha 1, 2$ and $K \beta 1, 3$ x-ray emission lines of the 3 d transition metals, *Physical Review A*, 56, 6, 4554.
- Hurler, J., Engesland, A., Poorahmary Kermany, B. ve Škalko-Basnet, N., 2012. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness, *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 1, 180-188.
- Ibrahim, H.M. ve Klingner, A., 2020. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications, *Polymer Testing*, 106647.
- Ifuku, S., Nogi, M., Yoshioka, M., Morimoto, M., Yano, H. ve Saimoto, H., 2010. Fibrillation of dried chitin into 10–20 nm nanofibers by a simple grinding method under acidic conditions, *Carbohydrate Polymers*, 81, 1, 134-139.
- Jain, C.K., Malik, D.S. ve Yadav, A.K., 2016. Applicability of plant based biosorbents in the removal of heavy metals: a review, *Environmental Processes*, 3, 495-523.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B. ve Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism, and health effects of some heavy metals, *Interdisciplinary toxicology*, 7, 2, 60.

- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H. ve Nah, J. W., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 14, 3423-3432.
- Jeong, K.H., Park, D. ve Lee, Y.C., 2017. Polymer-based hydrogel scaffolds for skin tissue engineering applications: a mini-review, *Journal of Polymer Research*, 24, 1-10.
- Jung, H.-S., Kim, M.H., Shin, J.Y., Park, S.R., Jung, J.-Y. ve Park, W.H., 2018. Electrospinning and wound healing activity of β -chitin extracted from cuttlefish bone, *Carbohydrate polymers*, 193, 205-211.
- Kashyap, N., Kumar, N. ve Kumar, M.N.V.R., 2005. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22, 2, 107-150.
- Katz E. ve Willner I., 2004. Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications, *Angewandte Chemie International Edition*. 43, 45, 6042-6108.
- Kaur, G., Pickrell, G., Sriranganathan, N., Kumar, V. ve Homa, D., 2016. Review and the state of the art: sol–gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104, 6, 1248-1275.
- Kaya, M., Bilican, I., Mujtaba, M., Sargin, I., Haskoylu, M.E., Oner, E.T., Zheng, K., Boccaccini, A.R., Cansaran-Duman, D. ve Onses, M.S., 2021. Sponge-derived natural bioactive glass microspheres with self-assembled surface channel arrays opening into a hollow core for bone tissue and controlled drug release applications, *Chemical Engineering Journal*, 407, 126667.
- Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Tomruk, M.N., Gevrek, S., Karatoprak, I., Colak, N., Sak, Y.G. ve Bulut, E., 2016. Comparison of bovine serum albumin adsorption capacities of α -chitin isolated from an insect and β -chitin from cuttlebone, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38, 146-156.
- Khoramgah, M.S., Ranjbari, J., Abbaszadeh, H.-A., Mirakabad, F.S.T., Hatami, S., Hosseinzadeh, S. ve Ghanbarian, H., 2020. Freeze-dried multiscale porous nanofibrous three dimensional scaffolds for bone regenerations, *BioImpacts: BI*, 10, 2, 73.
- Kim, J.J., Kim, Y.S. ve Kumar, V., 2019. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies, *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 54, 226-231.
- Klein, M. ve Poverenov, E., 2020. Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 6, 2337-2347.

- Kokubo, T. ve Takadama, H., 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, 27, 15, 2907-2915.
- Kon, E., Filardo, G., Di Martino, A. ve Marcacci, M., 2012. ACI and MACI, The journal of knee surgery, 25, 1, 017-022.
- Korpayev, S., Kaygusuz, G., Şen, M., Orhan, K., Oto, Ç. ve Karakeçili, A., 2020. Chitosan/collagen based biomimetic osteochondral tissue constructs: a growth factor-free approach, *International journal of biological macromolecules*, 156, 681-690.
- Kou, S. G., Peters, L. M. ve Mucalo, M.R., 2021. Chitosan: A review of sources and preparation Methods, *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85-94.
- Krych, A.J., Harnly, H.W., Rodeo, S.A. ve Williams III, R.J., 2012. Activity levels are higher after osteochondral autograft transfer mosaicplasty than after microfracture for articular cartilage defects of the knee: a retrospective comparative study, *JBJS*, 94, 11, 971-978.
- Kurniasih, M., Cahyati, T. ve Dewi, R.S., 2018. Carboxymethyl chitosan as an antifungal agent on gauze. *International journal of biological macromolecules*, 119, 166-171.
- Liao, X., Zhang, H. ve He, T., 2012. Preparation of porous biodegradable polymer and its nanocomposites by supercritical CO₂ foaming for tissue engineering, *Journal of Nanomaterials*, 2012, 6-6.
- Liu, H. ve Webster, T.J., 2007. Bioinspired nanocomposites for orthopedic applications, In *Nanotechnology for the regeneration of hard and soft tissues*, 1-51.
- Liu, J., Fang, Q., Yu, X., Wan, Y. ve Xiao, B., 2018. Chitosan-based nanofibrous membrane unit with gradient compositional and structural features for mimicking calcified layer in osteochondral matrix, *International journal of molecular sciences*, 19, 8, 2330.
- Liu, P., Li, M., Yu, H., Fang, H., Yin, J., Zhu, D., Yang, Q., Ke, Q., Huang, Y. ve Guo, Y., 2021. Biphasic CK2. 1-coated β -glycerophosphate chitosan/LL37-modified layered double hydroxide chitosan composite scaffolds enhance coordinated hyaline cartilage and subchondral bone regeneration, *Chemical Engineering Journal*, 418, 129531.
- Lopes, N. A., Pinilla, C. M. B. ve Brandelli, A., 2017. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. *Food Hydrocolloids*, 70, 1-7.
- Ma, X., Wu, G., Dai, F., Li, D., Li, H., Zhang, L. ve Deng, H., 2021. Chitosan/polydopamine layer by layer self-assembled silk fibroin nanofibers for biomedical applications, *Carbohydrate Polymers*, 251, 117058.

- Mabrouk, M., Beherei, H.H. ve Das, D.B., 2020. Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110716.
- Maeda, Y., Jayakumar, R., Nagahama, H., Furuike, T. ve Tamura, H., 2008. Synthesis, characterization and bioactivity studies of novel β -chitin scaffolds for tissue-engineering applications, *International journal of biological macromolecules*, 42, 5, 463-467.
- Mandl, L., 2019. Osteoarthritis year in review 2018: clinical, *Osteoarthritis and cartilage*, 27, 3, 359-364.
- Martins, E., Rapp, H.T., Xavier, J.R., Diogo, G.S., Reis, R.L. ve Silva, T.H., 2021. Macro and microstructural characteristics of north Atlantic deep-sea sponges as bioinspired models for tissue engineering scaffolding, *Frontiers in Marine Science*, 7, 613647.
- McNickle, A.G., Provencher, M.T. ve Cole, B.J., 2008. Overview of existing cartilage repair technology, *Sports medicine and arthroscopy review*, 16, 4, 196-201.
- McPhedran, R., Nicorovici, N., McKenzie, D., Botten, L., Parker, A. ve Rouse, G., 2001. The sea mouse and the photonic crystal, *Australian journal of chemistry*, 54, 4, 241-244.
- Meira, S.M.M., Zehetmeyer, G., Jardim, A.I., Scheibel, J.M., de Oliveira, R.V.B. ve Brandelli, A., 2014. Polypropylene/montmorillonite nanocomposites containing nisin as antimicrobial food packaging, *Food and bioprocess technology*, 7, 11, 3349-3357.
- Mitura, S., Sionkowska, A. ve Jaiswal, A., 2020. Biopolymers for hydrogels in cosmetics, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31, 1-14.
- Moohan, J., Stewart, S.A., Espinosa, E., Rosal, A., Rodríguez, A., Larrañeta, E., Donnelly, R.F. ve Domínguez-Robles, J., 2020. Cellulose nanofibers and other biopolymers for biomedical applications. A review, *Applied Sciences*, 10, 1, 65.
- Mourya, V. K., Inamdar, N. N. ve Tiwari, A., 2010. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters*, 1, 1, 11-33.
- Mourya, V. K., Inamdara, N. ve Ashutosh Tiwari, N., 2010. Carboxymethyl chitosan and its applications, *Advanced Materials Letters*, 1, 1, 11-33.
- Mumm, F., Kemell, M., Leskelä, M. ve Sikorski, P., 2010. A bio-originated porous template for the fabrication of very long, inorganic nanotubes and nanowires, *Bioinspiration & biomimetics*, 5, 2, 026005.
- Murillo, F.J., Muñoz, P.D., Cristobo, J., Ríos, P., Gonzalez, C., Kenchington, E. ve Serrano, A., 2012. Deep-sea sponge grounds of the Flemish Cap, Flemish Pass

and the Grand Banks of Newfoundland (Northwest Atlantic Ocean): distribution and species composition, *Marine Biology Research*, 8, 9, 842-854.

Müller, W.E., Boreiko, A., Wang, X., Krasko, A., Geurtsen, W., Custódio, M.R., Winkler, T., Lukić-Bilela, L., Link, T. ve Schröder, H.C., 2007. Morphogenetic activity of silica and bio-silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells, *Calcified tissue international*, 81, 5, 382-393.

Naruphontjirakul, P., Tsigkou, O., Li, S., Porter, A.E. ve Jones, J.R., 2019. Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles, *Acta biomaterialia*, 90, 373-392.

Naruphontjirakul, P., Tsigkou, O., Li, S., Porter, A.E. ve Jones, J.R., 2019. Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles, *Acta biomaterialia*, 90, 373-392.

Nezhad-Mokhtari, P., Ghorbani, M., Roshangar, L. ve Rad, J.S., 2019. A review on the construction of hydrogel scaffolds by various chemically techniques for tissue engineering, *European Polymer Journal*, 117, 64-76.

Niaz, T., Shabbir, S., Noor, T., Abbasi, R., Raza, Z. A. ve Imran, M., 2018b. Polyelectrolyte multicomponent colloidosomes loaded with nisin Z for enhanced antimicrobial activity against foodborne resistant pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 2700.

Niaz, T., Shabbir, S., Noor, T., Rahman, A., Bokhari, H. ve Imran, M., 2018a. Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against foodborne pathogens. *Lwt*, 96, 98-110.

Nooeaid, P., Salih, V., Beier, J.P. ve Boccaccini, A.R., 2012. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications, *Journal of cellular and molecular medicine*, 16, 10, 2247-2270.

Oliveira, J.M., Ribeiro, V.P. ve Reis, R.L., 2021. Advances on gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering, *Progress in Biomedical Engineering*, 3, 3, 033001.

Oudadesse, H., Najem, S., Mosbahi, S., Rocton, N., Refifi, J., El Feki, H. ve Lefeuvre, B., 2021. Development of hybrid scaffold: Bioactive glass nanoparticles/chitosan for tissue engineering applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109, 5, 590-599.

Pandis, C., Trujillo, S., Roganowicz, M. ve Gómez Ribelles, J.L., 2014. Hybrid Polycaprolactone/Silica Porous Membranes Produced by Sol-Gel, *Macromolecular Symposia*, 34-44.

- Parham, S., Kharazi, A.Z., Bakhsheshi-Rad, H.R., Ghayour, H., Ismail, A.F., Nur, H. ve Berto, F., 2020. Electrospun nano-fibers for biomedical and tissue engineering applications: A comprehensive review, *Materials*, 13, 9, 2153.
- Park, S. B., Lih, E., Park, K. S., Joung, Y. K. ve Han, D. K., 2017. Biopolymer-based functional composites for medical applications, *Progress in Polymer Science*, 68, 77-105.
- Parker, A.R. ve Townley, H.E., 2007. Biomimetics of photonic nanostructures, *Nature nanotechnology*, 2, 6, 347-353.
- Parker, A.R., McPhedran, R.C., McKenzie, D.R., Botten, L.C. ve Nicorovici, N.-A.P., 2001. Aphrodite's iridescence, *Nature*, 409, 6816, 36-37.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C. ve Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 1, 98-103.
- Peesan, M., Rujiravanit, R. ve Supaphol, P., 2003. Characterisation of beta-chitin/poly (vinyl alcohol) blend films, *Polymer testing*, 22, 4, 381-387.
- Petrova, V.A., Golovkin, A.S., Mishanin, A.I., Romanov, D.P., Chernyakov, D.D., Poshina, D.N. ve Skorik, Y.A., 2020. Cytocompatibility of Bilayer Scaffolds Electrospun from Chitosan/Alginate-Chitin Nanowhiskers, *Biomedicines*, 8, 9, 305.
- Ping, D., 2014. Review on ω phase in body-centered cubic metals and alloys, *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, 27, 1-11.
- Qian, J., Chen, Y., Wang, Q., Zhao, X., Yang, H., Gong, F. ve Guo, H., 2021. Preparation and antimicrobial activity of pectin-chitosan embedding nisin microcapsules. *European Polymer Journal*, 157, 110676.
- Qiao, Z., Lian, M., Han, Y., Sun, B., Zhang, X., Jiang, W., Li, H., Hao, Y. ve Dai, K., 2021. Bioinspired stratified electrowritten fiber-reinforced hydrogel constructs with layer-specific induction capacity for functional osteochondral regeneration, *Biomaterials*, 266, 120385.
- Quintero, F., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., Riveiro, A., Mann, A.B., Hill, R.G., Wu, Z.Y. ve Jones, J.R., 2009. Laser spinning of bioactive glass nanofibers, *Advanced Functional Materials*, 19, 19, 3084-3090.
- Rahman, M. L., Sarkar, S. M., Farid, E. M., Arshad, S. E., Sarjadi, M. S. ve Wid, N., 2018. Synthesis of tapioca cellulose-based poly (amidoxime) ligand for removal of heavy metal ions, *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 57, 2, 83-99.
- Rickert, D., Schlüter, M. ve Wallmann, K., 2002. Dissolution kinetics of biogenic silica from the water column to the sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 3, 439-455.

- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in polymer science*, 31, 7, 603-632.
- Riveiro, A., Amorim, S., Solanki, A., Costa, D.S., Pires, R.A., Quintero, F., del Val, J., Comesaña, R., Badaoui, A. ve Lusquiños, F., 2021. Hyaluronic acid hydrogels reinforced with laser spun bioactive glass micro-and nanofibres doped with lithium, *Materials Science and Engineering: C*, 112124.
- Saatchi, A., Arani, A.R., Moghanian, A. ve Mozafari, M., 2021. Synthesis and characterization of electrospun cerium-doped bioactive glass/chitosan/polyethylene oxide composite scaffolds for tissue engineering applications, *Ceramics International*, 47, 1, 260-271.
- Sachlos, E. ve Czernuszka, J., 2003. Making tissue engineering scaffold work: review on the application of SFF technology to the production of tissue engineer scaffolds, *European Cells and Materials*, 5, 29-40.
- Sami, R., Khojah, E., Elhakem, A., Benajiba, N., Helal, M., Alhuthal, N. ve Chavali, M., 2021. Performance study of nano/SiO₂ films and the antimicrobial application on cantaloupe fruit shelf-life. *Applied Sciences*, 11, 9, 3879.
- Sampath, U. G. T., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Sabariah, J. J. ve Lin, P.C., 2016. Fabrication of porous materials from natural/synthetic biopolymers and their composites, *Materials*, 9, 12, 991.
- Santucci, R., 1922. La Geodia cydonium come centro di associazione biologica, *Mem. Comitato Talassografico Italiano*, 103, 5-19.
- Savage-Elliott, I., Ross, K.A., Smyth, N.A., Murawski, C.D. ve Kennedy, J.G., 2014. Osteochondral lesions of the talus: a current concepts review and evidence-based treatment paradigm, *Foot & ankle specialist*, 7, 5, 414-422.
- Schubert, M., Binnewerg, B., Voronkina, A., Muzychka, L., Wysokowski, M., Petrenko, I., Kovalchuk, V., Tsurkan, M., Martinovic, R. ve Bechmann, N., 2019. Naturally prefabricated marine biomaterials: isolation and applications of flat chitinous 3D scaffolds from *Ianthella labyrinthus* (Demospongiae: Verongiida), *International journal of molecular sciences*, 20, 20, 5105.
- Shalumon, K., Lai, G.-J., Chen, C.-H. ve Chen, J.-P., 2015. Modulation of bone-specific tissue regeneration by incorporating bone morphogenetic protein and controlling the shell thickness of silk fibroin/chitosan/nanohydroxyapatite core-shell nanofibrous membranes, *ACS applied materials & interfaces*, 7, 38, 21170-21181.
- Shantha, K.L. ve Harding, D.R.K., 2002. Synthesis and evaluation of sucrose-containing polymeric hydrogels for oral drug delivery, *Journal of applied polymer science*, 84, 14, 2597-2604.

- Shariatnia, Z., 2018. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications, *International journal of biological macromolecules*, 120, 1406-1419.
- Sharifi, F., Atyabi, S.M., Norouzian, D., Zandi, M., Irani, S. ve Bakhshi, H., 2018. Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering application, *International journal of biological macromolecules*, 115, 243-248.
- Sharma, S. ve Tiwari, S., 2020. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications, *International journal of biological macromolecules*, 162, 737-747.
- Shi, X., Nommeots-Nomm, A., Todd, N.M., Devlin-Mullin, A., Geng, H., Lee, P.D., Mitchell, C.A. ve Jones, J.R., 2020. Bioactive glass scaffold architectures regulate patterning of bone regeneration in vivo, *Applied Materials Today*, 20, 100770.
- Shi, X., Nommeots-Nomm, A., Todd, N.M., Devlin-Mullin, A., Geng, H., Lee, P.D., Mitchell, C.A. ve Jones, J.R., 2020. Bioactive glass scaffold architectures regulate patterning of bone regeneration in vivo, *Applied Materials Today*, 20, 100770.
- Shkarina, S., Shkarin, R., Weinhardt, V., Melnik, E., Vacun, G., Kluger, P.J., Loza, K., Eppler, M., Ivlev, S.I. ve Baumbach, T., 2018. 3D biodegradable scaffolds of polycaprolactone with silicate-containing hydroxyapatite microparticles for bone tissue engineering: High-resolution tomography and in vitro study, *Scientific reports*, 8, 1, 1-13.
- Shrestha, B.K., Mousa, H.M., Tiwari, A.P., Ko, S.W., Park, C.H. ve Kim, C.S., 2016. Development of polyamide-6, 6/chitosan electrospun hybrid nanofibrous scaffolds for tissue engineering application, *Carbohydrate polymers*, 148, 107-114.
- Song, Q., Zhang, Z., Gao, J. ve Ding, C., 2011. Synthesis and property studies of N-carboxymethyl chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 119, 6, 3282-3285.
- Spicer, C.D., 2020. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: The importance of polymer choice, *Polymer Chemistry*, 11, 2, 184-219.
- Sprynskyy, M., Pomastowski, P., Hornowska, M., Król, A., Rafińska, K. ve Buszewski, B., 2017. Naturally organic functionalized 3D biosilica from diatom microalgae. *Materials & Design*, 132, 22-29.
- Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Thompson, R.P. ve Powell, J.J., 2005. Dietary silicon and bone health, *Nutrition Bulletin*, 30, 3, 222-230.
- Stamatialis, D. F., Papenburg, B. J., Gironés, M., Saiful, S., Bettahalli, S. N., Schmitmeier, S. ve Wessling, M., 2008. Medical applications of membranes:

- Drug delivery, artificial organs and tissue engineering, *Journal of Membrane Science*, 308, 1, 1-34.
- Stanisław, M., Alina, S. ve Amit, J., 2020. Biopolymers for hydrogels in cosmetics, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31, 6.
- Sughanthy, A. P., Ansari, M. N. M. N. M., Siva, A. ve Ansari, M.N.M.N.M., 2015. A review on bone scaffold fabrication Methods, *Int. Res. J. Eng. Technol*, 2, 6, 1232-1238.
- Sun, L. P., Du, Y. M., Shi, X. W., Chen, X., Yang, J. H. ve Xu, Y.M., 2006. A new approach to chemically modified carboxymethyl chitosan and study of its moisture-absorption and moisture-retention abilities. *Journal of applied polymer science*, 102, 2, 1303-1309.
- Sun, X., Zhang, G., Shi, Q., Tang, B. ve Wu, Z.J., 2002. Preparation and characterization of water-swelling natural rubbers, *J Appl Polym Sci*, 86, 3212-717.
- Tamaddon, M., Gilja, H., Wang, L., Oliveira, J.M., Sun, X., Tan, R. ve Liu, C., 2020. Osteochondral scaffolds for early treatment of cartilage defects in osteoarthritic joints: from bench to clinic, *Biomaterials Translational*, 1, 1, 3-17.
- Tamburaci, S. ve Tihminlioglu, F., 2018. Biosilica incorporated 3D porous scaffolds for bone tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, 91, 274-291.
- Tan, G.Z. ve Zhou, Y., 2020. Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69, 15, 947-960.
- Tao, F., Cheng, Y., Shi, X., Zheng, H., Du, Y., Xiang, W. ve Deng, H., 2020. Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering, *Carbohydrate Polymers*, 230, 115658.
- Tavakoli, J. ve Tang, Y., 2017. Hydrogel based sensors for biomedical applications: An updated review. *Polymers*, 9, 8, 364.
- Thorp, H., Kim, K., Kondo, M., Maak, T., Grainger, D.W. ve Okano, T., 2021. Trends in Articular Cartilage Tissue Engineering: 3D Mesenchymal Stem Cell Sheets as Candidates for Engineered Hyaline-Like Cartilage, *Cells*, 10, 3, 643.
- Tyler-Walters, H. ve Hughes, J., 2007. *Aphrodita aculeata*. Sea mouse.
- Ungureanu, G., Santos, S., Boaventura, R. ve Botelho, C., 2015. Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption, *Journal of environmental management*, 151, 326-342.

- Van Soest, R. W. M., Meesters, E. H. ve Becking, L. E. Z., 2014. Deep-water sponges (Porifera) from bonaire and klein curaao, Southern Caribbean, *Zootaxa* 3878, 401–443.
- Van Tran, V., Park, D. ve Lee, Y.C., 2018. Hydrogel applications for adsorption of contaminants in water and wastewater treatment, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 24569-24599.
- Voisin, H., Bergström, L., Liu, P. ve Mathew, A.P., 2017. Nanocellulose-based materials for water purification, *Nanomaterials*, 7, 3, 57.
- Wang, D., Romer, F., Connell, L., Walter, C., Saiz, E., Yue, S., Lee, P.D., McPhail, D.S., Hanna, J.V. ve Jones, J.R., 2015. Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 38, 7560-7576.
- Wang, X., Li, W. ve Kumar, V., 2006. A method for solvent-free fabrication of porous polymer using solid-state foaming and ultrasound for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27, 9, 1924-1929.
- Wong, J. Y. ve Bronzino, J.D., 2007. *Biomaterials*, CRC press.
- Xing, G., Shao, L., Du, Y., Tao, H. ve Qi, C., 2021. Citric acid crosslinked chitosan/poly (ethylene oxide) composite nanofibers fabricated by electrospinning and thermal treatment for controlled drug release, *Cellulose*, 28, 2, 961-971.
- Zhang W, Zhang F, Shi H, Tan R, Han S, Ye G., 2014. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro, *PLoS One*, 9, 2.
- Zhang, B., Huang, J. ve Narayan, R.J., 2020. Gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering and regeneration, *Journal of Materials Chemistry B*, 8, 36, 8149-8170.
- Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J. ve Turng, L., 2018. Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review, *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13, 1, 107-119.
- Zhao, X., Zhou, L., Li, Q., Zou, Q. ve Du, C., 2018. Biomimetic mineralization of carboxymethyl chitosan nanofibers with improved osteogenic activity in vitro and in vivo, *Carbohydrate polymers*, 195, 225-234.
- Zhu, L., Luo, D. ve Liu, Y., 2020. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration, *International journal of oral science*, 12, 1, 1-15.
- Zhuravlev, L.T., 2000. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173, 1, 1-38.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Bahar AKYÜZ YILMAZ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Cumhuriyet Ün., Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2010-2014

Yüksek Lisans : Aksaray Ün., Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, 2014-2017

Doktora : Aksaray Ün., Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Aksaray Üniversitesi / Araştırma Görevlisi (2019-)
2. TÜSİAD- “Bu Geçenlikte İş Var!”, 2018- Üçüncülük
3. Erciyes TTO- “Benim İşim Girişim”, 2018- Birincilik

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Akyuz Yilmaz, B. ve Kaya M., 2023. Denizel Doğal Süngerlerden Elde Edilen Biyosilikanın Doku Mühendisliğinde Kullanımı. Aksaray University Journal of Science and Engineering, 7 (2), 62-66. DOI: 10.29002/asujse.1314603

Poster

1. Akyuz Yilmaz, B., Andreescu, D., Kaya, M., Colak, A. and Andreescu, S., 2023. Fabrication and Characterization of Sea Mouse Chitin (SMC) Nanofiber Reinforced CMChit- based 3D Hydrogel Scaffolds for Heavy Metal Removal, “RAPS Research and Project Showcase 2023, Clarkson University”, Postdam/NY, USA.