



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



PERİODONTAL DOKU REJENERASYONU İÇİN

AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJİ/DESELÜLERİZE KEMİK

KAYNAKLI ÇİFT KATLI BİYOİSKELELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Burak KARACA

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

Not: Tez kapağı yüksek lisans tezlerinde “Turkuaz”, doktora tezlerinde “Mavi” dir. (Tez basımı aşamasında bu sayfa basılmayacaktır. Tez dış kapak örneğidir)

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PERİODONTAL DOKU REJENERASYONU İÇİN AYVA
ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJİ/DESELÜLERİZE KEMİK
KAYNAKLI ÇİFT KATLI BİYOİSKELELERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Burak KARACA

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **23/01/2020**

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

Burak KARACA tarafından Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **23/01/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Periodontal Doku Rejenerasyonu için Ayva Çekirdeği Müsilajı/Deselülerize Kemik Kaynaklı Çift Katlı Biyoiskelelerin Geliştirilmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇETİN GENÇ

Üye

Doç. Dr. Fadime KIRAN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Burak KARACA

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve tecrübesiyle hem özel hem de çalışma hayatımda her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'a ve bu süreçte bana her daim yardımcı olan, çalışmalarım için desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇETİN GENÇ'e,

Tez çalışmam boyunca fikirleri ve yardımlarıyla bana güç veren değerli dostum Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU, Arş. Gör. Hilal YILMAZ, Fatma CAL, Ekin ŞİMŞEK ve Hazal KİBAR'a,

Tezin düzenlenmesinde değerli vaktini ve imkanlarını benimle paylaşan, her daim bana sabırla destek olan Evren ERTEN'e

Manevi destek ve yardımlarından dolayı Osman Fatih DAMNALI, Büke DEMİR, Aykut YILDIZ, Elif Beyza DEMİRAY, Tuğçe KURT ve İbrahim SAY' a,

Analiz ve testler için bilgi birikimini ve imkanlarını benimle paylaşan Sayın Doç. Dr. Uğur CENGİZ, Sayın Doç. Dr. Fadime KIRAN, Sayın Prof. Dr. Emin YILMAZ, Sayın Doç. Dr. Hüseyin AYVAZ, Dr. Simge BARAN, Arş. Gör. Abdullah EYİDOĞAN, Furkan GALATA ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Son olarak, hayatım boyunca destek ve güvenlerini benden eksik etmeyen, her zaman yanımda olan annem Öznur KARACA, babam Yılmaz KARACA ve canım kardeşim Berkay KARACA'ya canı gönülden teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Burak KARACA
Çanakkale, Ocak 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrat
°K	Kelvin
μCT	Mikro bilgisayarlı tomografi
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
3B	3 boyutlu
Å	Armstrong
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Aca	Asetik asit
AÇM	Ayva çekirdeği müsilağı
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ALP	Alkalin fosfataz
ASa	Askorbik asit
ATR-FTIR	Atenü toplam reflektans Fourier dönüşümlü kızılötesi
Au-Pd	Altın-Paladyum
BET	Brunauer, Emmet ve Teller
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
BSP	Kemik sialoprotein
Ca	Kalsiyum
CLSM	Konfokal lazer taramalı mikroskobu
cm ⁻¹	Dalga Sayısı
ÇKB	Çift katlı biyoiskeleleri
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DKM	Minerali alınmış kemik matriksi
DM	Doku mühendisliği
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetrisi
dsDNA	Çift sarmallı dna
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethylkarbodiimit hidroklorür
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EDX	Enerji kırınımı x-ışını

EtOH	Etil alkol
FBS	Fötal sığır serumu
FG	Basit dondurucu jelleştirme tekniği
GAG	Glikozaminoglikan
GBR	Kemik rejenerasyonu
GTR	Kemik greftlerinin kullanımı ve yönlendirilmiş doku
H&E	Hematoksilen Eozin
HA	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik asit
HDM	Hücre dışı matriksi
hES-MP	İnsan embriyonik kök hücre kaynaklı mezenkimal progenitörler
HKH	Hematopoetik kök hücreler
HP	Hidroksiprolin
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
iMKH	İnsan mezenkimal kök hücresi
iPDLF	İnsan periodontal ligament fibroblast
KCl	Potasyum klorür
KJT	Kemik jeli tabaka
kV	Kilovolt
LMW	Düşük moleküler ağırlıklı
M	Molar
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MES	2-(N-Morfolino) etansülfonik asit
mg	Miligram
MG63	İnsan osteosarkom hücreler
MKH	Mezenkimal kök hücreler
mM	Milimolar
MMW	Orta moleküler ağırlıklı
MTT	3- (4,5-Dimetiltiyazolil-2) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
MT	Müsilaj tabaka
n	Örnek sayısı
nBGC	Nano biyoaktif cam seramik partikül
ng	Nanogram

nHA	Nano hidroksiapatit
NHS	N-Hidroksi süksinimid
nm	Nanometre
OPG	Osteoprotegerin
P	Fosfor
PBS	Tuz içeren fosfat tamponu
PDL	Periodontal ligament
PDM	Periodontal doku mühendisliği
Pen./Strep	Penisilin/Streptomisin
pH	Hidrojenin gücü
PLGA	D, L-laktid-ko-glikolit asit
RANK	NF- κ b'nin alıcı etkinleştiricisi
RANKL	Faktör kappa-B ligandı
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SBF	Simüle vücut sıvısı
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
TG	Termogravimetrik
TGA	Termogravimetrik analiz
w/v	Kütle/hacim
XRD	X kırınımı difraksiyonu
YDR	Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu

ÖZET

PERİODONTAL DOKU REJENERASYONU İÇİN AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJI/DESELÜLERİZE KEMİK KAYNAKLI ÇİFT KATLI BİYOİSKELELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Burak KARACA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

23/01/2020, 75

Periodontal hastalıklar oldukça yaygındır ve dünya nüfusunun %90'ını etkiler. Bu çalışmada hem sert hem de yumuşak doku ile ilişkili periodontal dokunun yenilikçi çift katmanlı biyoiskele (ÇKB) ile rejenerasyonu amaçlanmıştır. Ayva çekirdeği müsilağı (AÇM) ekstraksiyon işlemi ile elde edilmiştir. Kemik dokusu, ticari olarak kesilmiş sığırlardan temin edilmiştir. Kemik dokusunun deselülerizasyonu Triton X-100 kullanılarak yapılmıştır. Ana matriks bileşenleri ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) miktarı, deselülerizasyon işleminden önce ve sonra belirlenmiştir. Bu amaçla, hidrokisprolin (HP), sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) analizleri ve çift sarmallı DNA (dsDNA) içerik analizi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen biyoiskeleler fizikokimyasal olarak atenüe toplam reflektans Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi, termogravimetrik analiz (TGA), Brunauer, Emmet ve Teller (BET) ve diferansiyel taramalı kalorimetrisi (DSC) ile karakterize edilmiştir. Biyoiskelelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji kırınımı X-ışını analizi (EDX) ile gözlemlenmiştir. Biyoiskelelerin ıslanabilirlik kapasitesi, şişme ve sıvı tutma testleri ile belirlenmiştir.

Ham ve hücreleştirilmiş kemik dokularının dsDNA içeriği sırasıyla 101.31 ± 8.13 ve 51.79 ± 11.87 (ng/mg kuru ağırlık, $n= 3$) olarak ölçülmüş ve hücreleştirme işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Biyoiskelelerin yüzey alanı $8,185 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Yüzey analizleri, biyoiskelelerin *in vitro* çalışmalar için uygun yüzey morfolojisine sahip olduğunu göstermiştir. Biyoiskelelerin şişme oranı $67,46 \pm 10,01$ ve sıvı tutma kapasitesi $35,46 \pm 0,75 \text{ } \mu\text{l}$ olarak belirlenmiştir. Mekanik test ile ÇKB'nin çekme dayanımı

belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda; insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücreleri kullanılmıştır. Hücre canlılık seviyeleri 1. ve 3. gün olacak şekilde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile belirlenmiştir. Hücrelerin biyoiskeleler üzerindeki davranışlarını tespit etmek amaçlı SEM ve histokimyasal analizler yapılmıştır.

Sonuç olarak, üretilen ÇKB'lerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yeni bir biyomateryal olarak kullanım potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Çift Katmalı Biyoiskele, Periodontal Doku Rejenerasyonu, Hücrelerinden Arındırma, Müsilaj, Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri, Doku Mühendisliği

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF QUINCE SEED MUCILAGE/DECELLULARIZED BONE-DERIVED BI-LAYERED BIOSCAFFOLDS FOR PERIODONTAL TISSUE REGENERATION

Burak KARACA

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Material Engineering

Advisor: Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

01/23/2020, 75

Periodontal diseases are prevalent and affect 90% of the world's population. This study has aimed to regenerate the periodontal tissue, which is associated with both hard and soft tissue, with innovative bilayer bioscaffold. Mucilage of quince seed was obtained by the extraction process. Bone tissue was obtained from commercially slaughtered cattle. Decellularization of the bone tissue was performed using Triton X-100. The major matrix components and the amount of DNA were determined before and after the decellularization process. In this purpose, hydroxyproline, sulfated glycosaminoglycan (GAG) assays, and double-stranded DNA (dsDNA) content analysis were performed.

The obtained bioscaffolds were physicochemically characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), Brunauer, Emmet and Teller (BET), and differential scanning calorimetry (DSC) tests. The surface morphology of the bioscaffolds was observed by scanning electron microscopy (SEM) and energy diffraction X-ray analysis (EDX). The wettability capacity of the bioscaffolds was determined by swelling and liquid retention tests.

The DNA content of raw and decellularized bone tissues was measured as 101.31 ± 8.13 and 51.79 ± 11.87 (ng/mg dry weight - n=3), respectively, and successfully purified from raw bone tissue cells. The surface area of the bioscaffolds was determined as $8,185 \text{ m}^2/\text{g}$. The surface analyses were showed that bioscaffolds had suitable surface morphology for in vitro studies. The swelling rate was 67.46 ± 10.01 , and the liquid holding capacity was $35.46 \pm 0.75 \text{ }\mu\text{l}$. The tensile strength of bi-layered bioscaffold was evaluated with the mechanical test. Human periodontal ligament fibroblast cells were utilized in in vitro studies.

Cell viability tests were determined in days 1 and 3 with the MTT test. In order to investigate the cell behaviors on the bioscaffolds scanning electron microscope and histochemical analyses were done.

As a result, it is thought that the produced bi-layered bioscaffolds may have the potential to be used as a novel biomaterial in tissue engineering and regenerative medicine applications.

Keywords: Bi-layered Bioscaffold, Periodontal Tissue Regeneration, Decellularization, Mucilage, Periodontal Ligament Fibroblast Cells, Tissue Engineering



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. İnsan Dişi Anatomisi.....	4
1.1.1. Periodontal Ligament	5
1.1.2. Periodontal Ligament Hücreleri	6
1.2. Kemik Anatomisi	6
1.2.1. Kemik Dokusunun Temel Kısımları	7
1.2.2. Kemik Matriksinin Bileşenleri	8
1.2.3. Kemiğin Hücresel Elemanları	9
1.3. Müsilajlar	10
1.3.1. Ayva Çekirdeği Müsilajı	10
1.4. Periodontal Doku Mühendisliği	11
1.4.1 Periodontal Rejenerasyonda Doku Mühendisliği Yaklaşımları	12
1.5. Periodontal Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler	14
1.5.1. Periodontal Rejenerasyon Uygulamaları İçin Bariyer Membranlar.....	15
1.5.2. Bozunmayan Bariyer Membranlar	15
1.5.3. Biyobozunur Bariyer Membranlar	16
1.5.4. Doğal Bozunur Bariyer Membranlar.....	16
1.5.5. Periodontal Doku Mühendisliği için Çok Katlı İskele Gereksinimleri	17
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal	24
3.2. Yöntem.....	24

3.2.1. Ayva Çekirdeklerinin Temin Edilmesi	24
3.2.2. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstrakte ve Liyofilize Edilmesi	24
3.2.3. Sığır Tibiasının Temin Edilmesi ve Trabeküler Kemiğin Uygun Boyutlarda Kesilmesi.....	25
3.2.4. Trabeküler Kemiğin Demineralize ve Deselülerize Edilmesi.....	26
3.2.5. DNA İçerik Analizi	27
3.2.6. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçeriğinin Belirlenmesi.....	27
3.2.7. Deselülerize Kemik Dokularının Jel Formuna Getirilmesi ve Nötralizasyonu...28	
3.2.8. Kollajen Tip I Çözeltisinin Hazırlanması.....	29
3.2.9. Ayva Çekirdeği Müsilajı/Deselülerize Kemik Kaynaklı Çift Katlı Biyoiskelelerin Üretilmesi, Çapraz Bağlanması ve İstenilen Boyutlarda Kesilmesi.....	30
3.2.10. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi.....	31
3.2.11. Brunauer, Emmet ve Teller (BET) Analizi	31
3.2.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX).....	32
3.2.13. Temas Açısı Belirleme Analizi	33
3.2.14. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	33
3.2.15. Termogravimetrik Analiz (TGA)	34
3.2.16. Şişme ve Sıvı Tutma Kapasitesi Belirleme Testleri.....	35
3.2.17. Mekanik Test Analizi	36
3.2.18. Biyobozunurluluk Testi.....	37
3.2.19. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu	38
3.2.20. Çift Katmanlı Biyoiskelelerin İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri ile Hücrelendirilmesi.....	39
3.2.21. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Çift Katmanlı Biyoiskeleler Üzerindeki Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi.....	39
3.2.22. Histokimyasal Analiz	40
3.2.23. Hücrelendirilmiş Çift Katmanlı Biyoiskelelerin SEM Analizi	41
3.2.24. İstatistiksel Analiz	41
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
4.1. Ayva Çekirdeği Müsilajının Elde Edilmesi	42
4.2. Trabeküler Kemiği İşleme Süreçlerinin Değerlendirilmesi	42
4.2.1. DNA İçerik Analizi Sonuçları.....	42
4.2.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçerik Analiz Sonuçları	43

4.3. Çift Katmanlı Biyoiskele Üretimi ve Karakterizasyonu	45
4.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	46
4.3.2. Brunauer, Emmet ve Teller (BET) Analizi Sonuçları.....	47
4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Enerji Yayımlı X-Işını Analizi (EDX) Sonuçları.....	48
4.3.4. Temas Açısı Belirleme Analizi Sonuçları	49
4.3.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları.....	50
4.3.6. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları.....	51
4.3.7. Şişme ve Sıvı Tutma Kapasitesi Belirleme Testi Sonuçları.....	52
4.3.8. Mekanik Test Analizi Sonuçları.....	54
4.3.9. Biyobozunurluluk Testi Sonuçları	55
4.4. Çift Katmanlı Biyoiskele ve Hücre Etkileşimleri	56
4.4.1. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu	57
4.4.2. Hücrelendirilmiş ÇKB'nin Sitotoksosite Açısından Değerlendirilmesi	58
4.4.3. iPDLF Hücrelerinin ÇKB Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi.....	58
4.4.4. Histokimyasal Analiz Sonuçları.....	60
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	65
EKLERİ	I
EK 1. T.C. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İzin Belgesi	II
ÖZGEÇMİŞ	III

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. İnsan dişinin dikine kesiti ve kısımları (Human Studio, 2020)	5
Şekil 2. Kemiğin Hiyerarşik Yapısı (Jiang ve Liu, 2016)	7
Şekil 3. Uzun Kemiklerin Temel Anatomisi (Kolb ve Bussard, 2019)	8
Şekil 4. Ayva Çekirdeği ve Müsilajı.....	11
Şekil 5. Klasik DM paradigması (Caddeo, Boffito, ve Sartori, 2017).....	12
Şekil 6. Periodontal defektler için mevcut alternatif tekniklerin diyagramı (F. M. Chen ve Jin, 2010)	13
Şekil 7. (A) Ayva meyvesinin temini (B) Prosedürde kullanılmak üzere ayıklanmış ayva çekirdekleri	24
Şekil 8. Ayva çekirdeklerinden müsilaj elde etme prosedürü (A) Müsilaj ekstraksiyonu (B) Müsilajın partiküllerden vakum altında süzülerek ayrıştırılması (C) Müsilajın liyofilize edilmesi	25
Şekil 9. Ham kemik dokusunun uygun boyutlarda kesilme aşamaları (A) Sığır tibiası (B) Ayrılmış trabeküler kemik (C) Uygun boyutlara getirilmiş trabeküler kemikler ..	26
Şekil 10. (A) Demineralize edilmiş kemik dokusu (B) Deselülüerize kemik dokusu	27
Şekil 11. (A) Deselülüerize kemik dokularının jel formuna getirilmesi (B) Deselülüerize kemik jeli	29
Şekil 12. (A) Sıçan kuyruğundan elde edilen kollajen lifleri (B) Kollajen tip I çözeltisi....	29
Şekil 13. ATR-FTIR cihazı.....	31
Şekil 14. (A) Degaz ünitesi (B) BET cihazı	32
Şekil 15. (A) Au-Pd kaplama işlemi (B) SEM üniteleri	33
Şekil 16. Temas açısı cihazı.....	33
Şekil 17. DSC cihazı	34
Şekil 18. TGA cihazı ve analiz işlemi	35
Şekil 19. Biyoiskelelere uygulanan şişme ve sıvı tutma testleri.....	36
Şekil 20. Biyoiskelelerin analiz esnasındaki görseli	37
Şekil 21. (A) Periodontal dokunun diş üzerinden kazınması, (B) Ayrılan periodontal dokunun kıyılma işlemi	39
Şekil 22. MTT testi kimyasal reaksiyonu (Kumar, Nagarajan, ve Uchil, 2018)	40
Şekil 23. DNA içerik analizi grafiği	43
Şekil 24. Hidroksiprolin içerik analizi grafiği	44
Şekil 25. GAG içerik analizi grafiği	45
Şekil 26. Çift Katmanlı Biyoiskele Üretimi; (A) ÇKB'nin kalıplanması, (B) ÇKB'nin çapraz bağlı ıslak formu, (C) Çapraz bağlı ÇKB'nin liyofilize edilmiş formu ve (D) İstenilen boyutlara kesilmiş ÇKB	46
Şekil 27. ATR-FTIR analizi grafiği	47
Şekil 28. Hücresiz ÇKB'nin SEM görüntüleri ve EDX analizi; (A) MT'nin SEM görüntüsü (500x), (B) KJT'nin SEM görüntüsü (500x), ÇKB kesitinin SEM görüntüsü (50x) ve (D) KJT'nin EDX analiz sonucu.....	49
Şekil 29. Temas açısı analizi; (A), (B), (C) KJT'nin su emme süreci, (D), (E), (F) MT'nin su emme süreci	50
Şekil 30. DSC analizi grafiği	51
Şekil 31. TGA analizi grafiği.....	52
Şekil 32. Şişme analizi grafiği	53
Şekil 33. PBS tutma analizi grafiği.....	54
Şekil 34. Mekanik test analizi grafiği	55
Şekil 35. Biyobozunurluluk testi grafiği	56

- Şekil 36. iPDLF hücrelerinin kültür esnasındaki mikroskopik görüntüleri (10x); 5. gün (A), 7. gün (B), 9. Gün (C) ve 14. gün (D) 57
- Şekil 37. iPDLF hücrelerinin 1. ve 3. günlerdeki canlılığı, iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerinde MTT reaktifi ile 1. gün (A) ve 3. gün (B) için boyanmış makro görselleri..... 58
- Şekil 38. iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerindeki davranışları gösteren SEM görüntüleri; 1. güne ait (A) ve (B) MT, (C) ve (D) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 3. güne ait (E) ve (F) MT, (G) ve (H) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 59
- Şekil 38'in devamı iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerindeki davranışları gösteren SEM görüntüleri; 1. güne ait (A) ve (B) MT, (C) ve (D) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 3. güne ait (E) ve (F) MT, (G) ve (H) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 60
- Şekil 39. H&E boyama yapılan kesitlerin görüntüleri (10x); (A) 1. güne ait ve (B) 3. güne ait ÇKB'ye tutunan iPDLF hücrelerinin görüntülerini temsil etmektedir. 61



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Periodontal Hastalıkların ve Koşulların Temel Sınıflandırması (Dietrich ve diğçerleri, 2019)	2
Tablo 2. Ayva çekirdeği müsilajının uygulama alanları (Hussain, Muhammad, Haseeb, ve Tahir, 2019)	11
Tablo 3. Klinik kullanım için ortak kollajen bazlı bariyer membranlar (Sheikh ve diğçerleri, 2017).....	17
Tablo 4. BET analizi sonuçları	48



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Periodontal doku ya da bir diğer adıyla periodonsiyum terimi, etimolojik olarak Yunanca *peri-* ve *-odons* kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşur ve dişin etrafını saran doku anlamına gelir. Dişin maksiller veya mandibular kemiğe bağlanmasını sağlayan periodontal doku, çiğneme ve çeşitli çene hareketleri gibi etkenlerle meydana gelen kuvvetlere karşı dayanım gösteren karmaşık bir yapıdır (Babo, Reis, ve Gomes, 2017). Bu yapı, diş destekleyen ve çeneye sabitleme işlevi gören ayrıca diş kökünü çevreleyen çok sayıda özel dokudan oluşur (Basu, Rothermund, Ahmed, ve Syed-Picard, 2019). Dişi, çeşitli oral mikroorganizmalara karşı savunma görevi de olan periodontal kompleks; sementum (diş kök yüzeyindeki mineralize tabaka), periodontal ligament (fibröz bağ dokusu) ve alveolar kemik (kuvvete duyarlı mineralize doku) gibi dişin bakımıyla veya korunmasıyla ilgili destekleyici yapılardan meydana gelmektedir (Park, Kim, Lee, ve Seol, 2016)

Periodontitis, ağız boşluğunda inflamatuvar sebeplerden dolayı plak biyofilminin oluşmasıyla meydana gelen en yaygın hastalıklardan biridir (Tablo 1). Bu hastalıklar, süreç içerisinde diş eti iltihabının periodontitise patolojik değişim göstermesi ve sonuç olarak diş kaybına neden olan diş destek dokusunun geri dönüşümsüz kaybı ile tanımlanır (Shimauchi, Nemoto, Ishihata, ve Shimomura, 2013). Ayrıca kronik periodontitisin, demans gelişimi açısından bir risk faktörü olabileceği ve bu hastalığın tedavi edilerek demans oluşumu üzerindeki etkisinin belirlenebileceği araştırmalar yapılması düşünülmektedir (Choi ve diğerleri, 2019). Periodontitis, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, obezite, diyabet ve kronik nefrit gibi çeşitli sistemik hastalıkların ortaya çıkması ve prognozu ile de yakından ilişkilidir. Periodontal hastalık prevalansı oranları 2005- 2015 yılları arasında %25,4 seviyesinde artış göstermiştir. Bu nedenlerden dolayı, kliniğe uygulanabilecek etkili ve güvenli periodontal tedavilerin araştırılması dünya çapında acil bir sağlık ihtiyacıdır (Xu ve diğerleri, 2019).

Tablo 1.

Periodontal Hastalıkların ve Koşulların Temel Sınıflandırması (Dietrich ve diğerleri, 2019)
PERİODONTAL SAĞLIK, DIŞ ETİ HASTALIKLARI ve KOŞULLARI

Periodontal sağlık
Bozulmamış periodonsiyum
Azaltılmış periodonsiyum
Diş eti iltihabı: diş biyofilmine bağlı
Bozulmamış periodonsiyum
Azaltılmış periodonsiyum
Diş eti hastalıkları ve koşulları: diş dışı biyofilm kaynaklı
PERİODONTİTİS
Nekrotizan periodontal hastalıklar
Periodontitis
Sistemik hastalığın bir belirtisi olarak periodontitis
PERİODONSİYUMU ETKİLEYEN DİĞER DURUMLAR
Periodontal destekleyici dokuları etkileyen sistemik hastalıklar veya durumlar
Periodontal apse ve endodontik-periodontal lezyonlar
Mukogingival deformateler ve koşullar
Travmatik oklüzal kuvvetler
Diş ve protezle ilgili faktörler

Doku mühendisliği (DM); dejeneratif hastalıklar, travma veya kronik zayıflatıcı durumlardan sonra vücudun rekonstrüksiyonunu sağlamak için farklı uygulamalar sunan multidisipliner yaklaşımdır (Williams, 2006). Bu yaklaşım üç temel unsuru içermektedir: **(1)** iskele, **(2)** hücreler ve **(3)** büyüme faktörleri. İskele, *in vitro* tohumlanan hücrede ve *in vivo* olarak hücre büyümesinde önemli bir rol oynar. Doku büyümesi için üç boyutlu gözenekli ve tamamen iç içe geçebilen bir alan sağlar, doku yapısının oluşumunu hızlandırır ve sonuçta tamamen doğal doku oluşturmak için yeni bir hücre dışı matriks yerine geçer (Peng ve diğerleri, 2006). DM yaklaşımlarıyla başarılı bir periodontal rejenerasyon, ele alınması gereken çok sayıda önemli prensibi gerektirir. Tasarlanan dokular; yeterli biyomekanik kuvvete, mimari özelliklere ve yeterli alan sağlama kabiliyetine sahip olmalıdır. Tasarlanmış dokunun, alveoler kemiğin büyümesi için yer oluşturması gerekir. Aynı zamanda da uzun bir kavşak epitelinin oluşumunu önlemek için epitelyal dokular açısından dışlayıcı özellikte olmalıdır. Ek olarak biyolojik fonksiyonlar: hücresel tutunma, çoğalma, vaskülarizasyon ve rejenerasyon için gerekli faktörlerin sağlanmasına uygun olmalıdır (P. M. Bartold ve diğerleri, 2016). Periodontal yapılar; dental ve kraniofasial (baş ve yüz) komplekslerdeki fizyolojik işlevlerin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için,

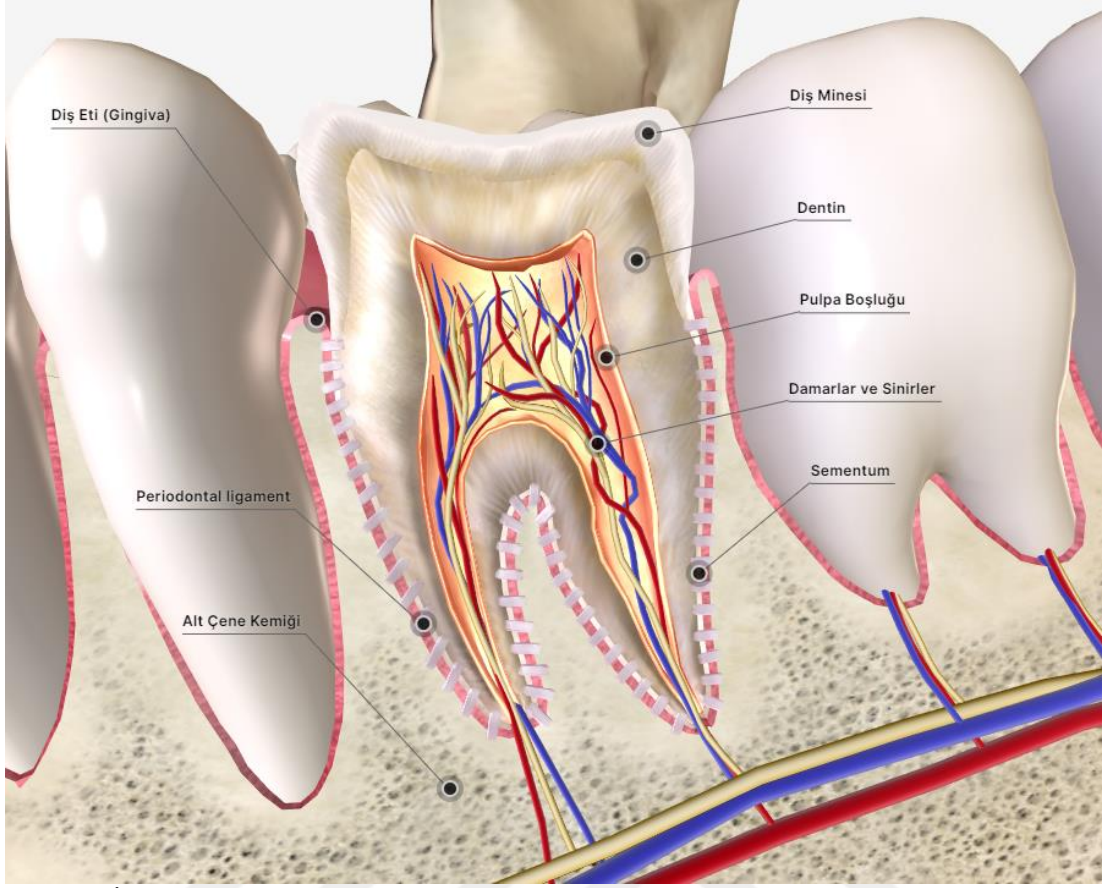
fibröz doku demetlerinin spesifik yönelimlerini, mineralize yüzeyler arasındaki kollajen lif entegrasyonunu ve bölümlendirilmiş doku tiplerinin zamansal ve mekânsal orkestrasyonunu bir arada gerçekleştirmelidir (Park, Kim, Lee, ve Seol, 2016). Kompleks periodontal şekli ve organizasyonu taklit eden yapı iskelelerinin tasarımı, rejeneratif periodontolojide önemli bir zorluktur. Her ne kadar ilave biyolojik üretim bu engelin üstesinden gelmeye yardımcı olsa da bu stratejilerin benimsenmesi ve uzun vadeli başarısı büyük ölçüde kullanılan biyomalzemelere dayanmaktadır (Carter ve diğerleri, 2017).

Yürütülen tez çalışmasında, periodontal doku hasarlarını rejenere etmek amaçlı AÇM ve deselülerize kemik kaynaklı jel kullanılarak ÇKB geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonra karakterize edilen ÇKB' nin DM açısından uygunluğu *in vitro* çalışmalar ile desteklenmiştir. Bu sebeple; ayva çekirdeklerine ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve müsülaj elde edilmiştir. Öte yandan sığır tibiasının trabeküler kemik kısmı hücrelerinden arındırılarak enzimatik sindirim ile jel formuna getirilmiştir. Hücrelerinden arındırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamak amaçlı jel formuna getirilmeden önce, hücrelerinden arındırılmış kemik hücre dışı matriksine (HDM) DNA içerik analizi uygulanmıştır. HP, kollajenin yapısında bulunan aminoasit yapılarıdır. GAG ise polisakkarit yapıda olup genellikle bağ dokularında ve çoğu hücre türünün yüzeyinde mevcuttur. Bu yüzden; hücrelerinden arındırma işleminin kemik HDM'sine olan etkisinin belirlenmesi amaçlı HP ve GAG analizleri gerçekleştirilmiştir. DNA içerik ve HP analizleri ticari kit prosedürü uygulanarak gerçekleştirilmiş; GAG analizi ise spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Geliştirilen ÇKB'leri karakterize etmek amaçlı yapısındaki fonksiyonel grupların tayini için ATR-FTIR, yüzey alanını belirlemek amaçlı BET, yüzey morfolojisini aydınlatmak için SEM, yapıda mevcut olan elementlerin nicel ve nitel tayini için EDX, termal özelliklerin belirlenmesi amaçlı TGA ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. ÇKB'nin ıslanabilirlik kapasiteleri ise şişme ve sıvı tutma testleri ile belirlenmiştir. ÇKB'lerin biyobozunurluğu Lizozim ve Proteinaz K enzimleri kullanılarak; çekme dayanımları ise mekanik çekme testi yapılarak belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar için insan dişinden izole edilen insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücreleri ÇKB'nin üzerine ekilmiştir ve hücre canlılığının takibi 1. ve 3. günler olmak üzere MTT testi ile belirlenmiştir. Hücrelerin biyoiskeleler üzerindeki varlığını gözlemlemek için SEM analizi, hematoxilin ve eozin (H&E) boyaması gerçekleştirilmiştir.

1.1. İnsan Dişı Anatomisi

Her diş mine, dentin, sementum ve pulpa dokularından oluşur. Bunların ilk üçü nispeten serttir çünkü önemli miktarda mineral özellikle de kalsiyum içerirler. Bu nedenle bu dokular aynı zamanda kalsifiye olarak tanımlanabilir. Bu dokulardan sadece mine ve sementum sağlıklı bir dişte görülebilir. Mine, dişin anatomik taç olarak bilinen kısmını; sementum ise dişin anatomik kök olarak bilinen kısmını kapsar. Dentin ve pulpa genellikle sağlıklı bir dişte görünür değildir.

Mine, anatomik kronun nispeten beyaz, koruyucu dış yüzey tabakasıdır. Oldukça kireçlenmiş veya mineralize olmuştur ve vücuttaki en sert maddedir. Mineral içeriği ise %95 kalsiyum hidroksiapatittir. Sementum, anatomik kökün donuk sarı dış tabakasıdır. Sementum, özellikle tacın kökle birleştiği kök kısmının yanında çok incedir. Kalınlığı, bir insan saç kalınlığı ile karşılaştırılabilir. Sementum %65 mineral içerir ve mine kadar olmasa da kemik kadar serttir. Dentin, mine ve sementumun altında yatan sert sarımsı dokudur. Her diş kronu ve kökü iç kısmındaki kütleyi oluşturur. Pulpa boşluğundan, mine veya sementum iç sınırına doğru uzanır. Olgun dentin, yaklaşık %70 mineralize kalsiyum hidroksiapatitten oluşur; bu da onu mineden daha az sert ve kırılğan hale getirir. Pulpa, taç ve kökteki boşlukta bulunan kan damarları ve sinirler bakımından zengin, yumuşak, mineralize olmayan bağ dokusudur. Pulpa boşluğu, apikal foramen adı verilen kök ucunun (apeks) yakınındaki bir delik (veya delikler) dışında dentin ile çevrilidir. Sinirler ve kan damarları pulpa kanallarına bu apikal foraminadan girer. Periodonsiyum, çevresindeki alveolar kemik, diş eti, periodontal ligament ve diş köklerinin dış tabakası dahil olmak üzere ağızdaki dişlerin destekleyici dokuları olarak tanımlanır. Alveolar kemik, dişlerin köklerini çevreleyen üst (maksiller) veya alt (mandibular) kemiklerdir. Diş eti, ağızdaki alveolar kemiği kaplayan dokudaki parçadır ve sağlıklı bir ağızda görülen periodonsiyumun tek kısmıdır. Ligament terimi en çok iki kemiği bağlayan sert bir lifli doku bandı olarak tanımlansada bir periodontal ligament bir dişi çevresindeki kemiğe bağlayan çok ince bir ligamenttir. Diş kökünün dış tabakasını her bir dişi çevreleyen yoğun alveolar kemiğe bağlayan birçok mikroskobik doku lifinden oluşur. Temsil edilen periodontal bağın lifleri büyük ölçüde genişler. Sağlıklı bir periodontal ligamentin kalınlığı ortalama sağlıklı bir insan saç çapından sadece bir kat daha fazladır (Scheid ve Weiss, 2017). İnsan dişinin kısımları şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan dişinin dikine kesiti ve kısımları (Human Studio, 2020)

1.1.1. Periodontal Ligament

Periodontal ligament (PDL), alveolar kemik ve sementum arasında yer alan ve çiğneme sırasında dişe uygulanan oklüzal kuvveti dağıtmada önemli bir rol oynayan oldukça vaskülarize bir bağ dokusudur. PDL ayrıca progenitör hücreleri besleyerek periodontal dokularda homeostazın korunmasında da rol oynar (Bright, Hynes, Gronthos, ve Bartold, 2015). Dişlerin sementi, diş eti ve alveolar kemiğe bağlayan kollajen bantlarından (çoğunlukla tip I kollajen) oluşur. Fibroblastlar, alveolar kemik ve sementumu oluşturan, koruyan ve onaran PDL'deki ana hücrelerdir. Ek olarak, PDL'deki sensörler proprioseptif girdi sağlar ve dişlere uygulanan basıncı tespit eder. PDL'nin morfolojisi, diş anatomisi ve hatta diş yüzeyine göre değişir. Örneğin, kökün ortasında daha incedir ve kök apeksinin ve alveolar kretin yakınında biraz daha geniştir. Bu da diş fizyolojik hareketinin dayanağının PDL'nin en ince bölgesinde bulunduğunu gösterir. PDL'nin normal genişliği, yaşla birlikte azalan 0,15 ila 0,21 milimetre (mm) arasında değişir (Mortazavi ve Baharvand, 2016).

1.1.2. Periodontal Ligament Hücreleri

PDL hücreleri, kök sementinin alveolar kemiğe bağlanmasını sağlamak ve periodontal ligamentin yaralanma sonrası yeniden oluşmasını sağlamak için PDL ve liflerini oluşturan kollajen gibi hücre dışı matriks bileşenleri üretir ve salgılar. PDL hücreleri yüksek bir kollajen üretimine sahiptir. Kollajen üretiminin yanı sıra, periodontal bağ hücreleri mineralize doku da üretebilir. iPDLF hücrelerinin yüksek seviyelerde alkalın fosfataz aktivitesi ve osteonektin gibi kemikle ilişkili proteinleri ifade ettiği ve bu hücrelerin osteojenik hücreler olduğunu düşündüren mineralize nodüller oluşturduğu gösterilmiştir. Ancak PDL hücreleri kalsitonin veya paratiroid hormonuna yanıt vermez ve osteoblastların aksine kemik sialoprotein 1 gibi diğer kemik işaretçi proteinlerini eksprese etmezler. PDL hücreleri klasik osteoblastlar gibi tam olarak davranmadığını kanıtlanmıştır. iPDLF hücreleri ve diş eti fibroblastları birçok fonksiyonel benzerlik gösterir, ancak aynı zamanda farklı fonksiyonel özelliklere de sahiptirler. Örneğin; PDL hücrelerinde yüksek alkalın fosfataz aktivitesi saptanır, ancak diş eti fibroblastlarında bu görülmez (Jönsson, Nebel, Bratthall, ve Nilsson, 2011).

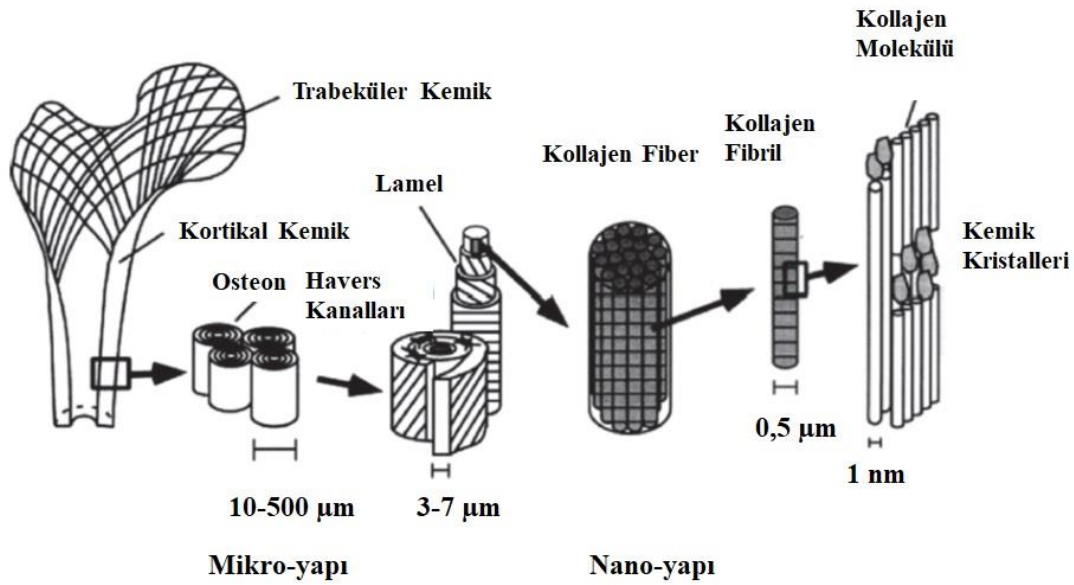
1.2. Kemik Anatomisi

Erişkin insan iskelet sistemi yaklaşık 206 kemikten oluşur ve vücuttaki diğer tüm organlar için katı bir destek sağlar. Beyin ve omurilik gibi bazı organlar, sırasıyla kafatası yapıları ve omurlar gibi kemik yapılarının içinde korunur. Kaslar gibi diğer organlar iskelete bağlanır. İskelet uyarlanabilir bir yapıdır ve çocukluktan itibaren vücudun geri kalanı onunla birlikte büyür. Yapı ve koruma sağlamanın yanı sıra, iskelet sistemi hareket için eklemler ve kaslarla iş birliği yapmaya çalışır. İskelet sisteminin diğer kritik fonksiyonları arasında kan hücresi üretimi, mineral depolaması ve endokrin düzenlenmesi bulunur (Le ve diğerleri, 2017). Dört genel kemik kategorisi mevcuttur. Bunlar:

- (1) uzun kemikler,
- (2) kısa kemikler,
- (3) düz kemikler,
- (4) düzensiz kemiklerdir.

Uzun kemikler klavikulalar, humeri, ulnalar, metakarplar, femurlar, tibialar, fibulalar, metatarsallar ve falanjları içerir. Kısa kemikler karpal ve tarsal kemikleri, patellaları ve sesamoid kemiklerini içerir. Düz kemikler arasında kafatası, çene kemiği, kürek kemiği, sternum ve kaburgalar bulunur. Düzensiz kemikler arasında omurlar, sakrum, koksiks ve hiyoid kemik bulunur. Düz kemikler membranöz kemik oluşumu ile oluşur, uzun kemikler

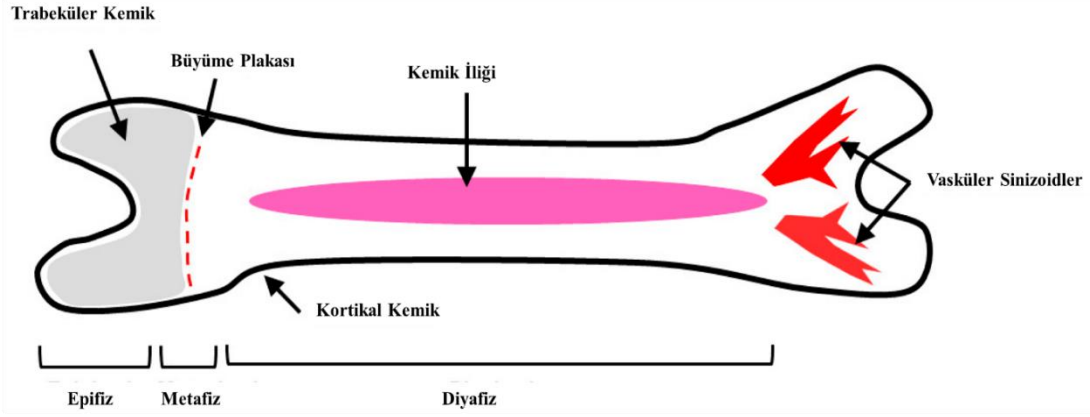
endokondral ve membranöz kemik oluşumu kombinasyonu ile oluşur. Yetişkin insan iskeleti %80 kortikal kemik ve toplam %20 trabeküler kemikten oluşur. Kemikler içindeki farklı kemikler ve iskelet bölgeleri, farklı kortikal-trabeküler kemik oranlarına sahiptir. Kortikal kemik yoğun ve katıdır. Bu kemikler kemik iliği çevresini sararken, trabeküler kemik, kemik iliği bölmesine serpiştirilmiş trabeküler plakalar ve çubuklardan oluşan petek benzeri bir ağdan oluşur. Hem kortikal hem de trabeküler kemik osteonlardan oluşur (Clarke, 2008). Kemik hiyerarşik görünümü şekilde belirtilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Kemik hiyerarşik yapısı (Jiang ve Liu, 2016)

1.2.1. Kemik Dokusunun Temel Kısımları

Kemik iki ana tipten oluşur: kortikal ve trabeküler kemik. Kortikal ve trabeküler kemik, her tipin mekanik yüklemeye nasıl tepki verdiğini etkileyen değişik yapısal özelliklere sahiptir. Kortikal ve trabeküler kemik arasındaki farklılıklar yoğunluk ve gözeneklilik ile belirlenir. Örneğin femur gibi uzun kemiklerin üç bölgesi vardır: epifiz, metafiz ve diyafiz. Uzun kemiklerin epifizlerde bulunan gözenekli, trabeküler kemiğin içi ve kortikal kemiğin sert dış kabuğu vardır. Metafiz ve diyafiz arasında, uzunlamasına kemik büyümesinin bir göstergesi olan epifiz plakası veya büyüme plakası bulunur. Uzun kemiklerin diyafizi sert, kortikal kemikle çevrili kemik iliğini içerir (Şekil 3) (Kolb ve Bussard, 2019).



Şekil 3. Uzun Kemiklerin Temel Anatomisi (Kolb ve Bussard, 2019)

1.2.2. Kemik Matriksinin Bileşenleri

Kemik matriksi, organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir malzemedir. Organik matriks, kemiğin ıslak ağırlığının ~%20'sini oluşturur ve esas olarak kollajenden oluşur. Kollajen, kemik matriksinin ana yapısal bileşenidir. Çoğunlukla tip I kollajendir (~%90). Daha az miktarlarda III, V, X ve XII kollajen mevcuttur. Kollajen, ~1000 amino asitten oluşan ve ~300 nm uzunluğunda, ip benzeri bir yapıya sahip lifli bir proteindir. Bir kollajen fibril, üçlü sarmal prokollajen molekülünü oluşturan osteoblastlar içinde sentezlenen iki $\alpha 1$ ve bir $\alpha 2$ polipeptit zincirinden oluşur. Prokollajen molekülü osteoblastlardan salgılanır ve sonra ayrı kollajen molekülleri kollajen fibrilleri oluşturmak için bir araya gelir. Bireysel kollajen fibrilleri daha sonra bir kollajen lifi oluşturmak için kendiliğinden gruplanır (Fuchs, Thompson, ve Warden, 2019).

Kollajene ek olarak; organik matriksin %10'u, dekorin ve biglikan gibi proteoglikanlarla birlikte fibronektin, osteopontin, osteokalsin ve kemik sialoprotein (BSP) gibi kollajenöz olmayan proteinlerden oluşur. BSP ve osteopontin, kemik matriksinde bulunan kollajenöz olmayan proteinlerin çoğunu oluşturur. Kollajenöz olmayan proteinler ve proteoglikanlar organik matriksin toplam kütlelerine sadece küçük bir miktar katkıda bulunurken, osteoblast farklılaşması, doku mineralizasyonu, hücre yapışması ve kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında birkaç önemli fonksiyona hizmet ederler (Gordon ve diğerleri, 2007; Roach, 1994).

İnorganik matriks, kemiğin ıslak ağırlığının ~%65-70'ine katkıda bulunur ve toplam vücut kalsiyumunun yaklaşık %99'unu, fosforun yaklaşık %85'ini ve vücudun sodyumunun ve magnezyumunun %40 ila %60'ını depolayan bir iyon rezervuarı olarak hizmet eder. Bu iyonlar, kemiğe sertliğinin çoğunu vermek için kollajen liflerini çevreleyen kristal yapıları oluşturur. Kemik kristalleri ~200Å'dır ve iskelette bulunan birincil mineral olan kalsiyum

hidroksiapatit [$Ca_{10}PO_4OH$] şeklindedir. Hidroksiapatit kristalleri hem yüzeyde bulunabilir hem de kollajen fibrillerinin boşluklarında bulunabilir (Landis, Hodgens, Arena, ve diğerleri, 1996; Landis, Hodgens, Song, ve diğerleri, 1996).

1.2.3. Kemığın Hücresel Elemanları

Hücresel elemanlar, iskeletin toplam kütesinin sadece küçük bir miktarına katkıda bulunur ve hematopoetik kök hücrelerden (HKH) veya mezenkimal kök hücrelerden (MKH) türetilir. HKH'ler ve MKH'ler, sırasıyla kemik rezorpsiyonuna (osteoklastlar) ve formasyona (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve kemik astar hücreleri dahil) aracılık eden ana hücrelere yol açar (Fuchs, Thompson, ve Warden, 2019).

a) Osteoklastlar: HKH soyunun mononükleer hücrelerinden kaynaklanan birçok faktörün etkisi altında terminal olarak farklılaşmış çok çekirdekli hücrelerdir. Bu faktörler arasına osteoprogenitör MKH'ler ve osteoblastlar tarafından salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanan RANK ligandı dahil edilmiştir. Bu faktörler birlikte transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve osteoklastlarda gen ekspresyonunu teşvik eder

b) Osteoblastlar: Toplam yerleşik kemik hücrelerinin %4-6'sını içeren kemik yüzeyi boyunca yer alan ve büyük ölçüde kemik oluşturma işlevleri ile bilinen küboidal hücrelerdir. Bu hücreler, endoplazmik retikulum ve önde gelen golgi aparatının yanı sıra çeşitli salgı vezikülleri içeren protein sentezleyici hücrelerin morfolojik özelliklerini gösterir. Polarize hücreler olarak osteoblastlar, osteoidi kemik matriksine doğru salgılar.

c) Osteositler: Toplam kemik hücrelerinin %90-95'ini oluşturan osteositler, 25 yıla kadar yaşam süresine sahip en bol bulunan ve uzun ömürlü hücrelerdir. Kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu sırasında ilgili fonksiyonları ile tanımlanan osteoblast ve osteoklastlardan farklı olarak; osteositler daha önce morfolojileri ve yerleri ile tanımlanmıştır. Osteositler mineralize kemik matriksi ile çevrili lakunaların içinde bulunur, burada bir dendritik morfoloji gösterirler.

d) Kemik Astar Hücreleri: Kemik astar hücreleri, kemik yüzeylerini kaplayan ne kemik rezorpsiyonunun ne de kemik oluşumunun meydana gelmediği, sakin yassı şekilli osteoblastlardır. Kemik astar hücrelerinin işlevleri tam olarak anlaşılammıştır. Ancak bu hücrelerin, kemik rezorpsiyonu meydana gelmemesi gerektiğinde osteoklastlar ve kemik matriksi arasındaki doğrudan etkileşimi engellediği ve ayrıca osteoprotegerin (OPG) ve faktör kappa-B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü üreten osteoklast farklılaşmasına katıldığı gösterilmiştir (Floresio-Silva ve diğerleri, 2015).

1.3. Müsilajlar

Müsilajlar; jelleştirici ajanlar, koyulaştırıcılar, stabilizatörler ve emülsifiye edici ajanlar olarak kullanılan çözünür besin lifleridir (Fuller, Beck, Salman, ve Tapsell, 2016). Müsilajlar, büyük şeker molekülleri ve glikozidik bağlarla bağlanan üronik asitlerin oluşturduğu polisakkaritlerdir. Bitki müsilajları; rizomlar, kökler ve tohum endospermeleri dâhil olmak üzere çeşitli bitki parçalarından ekstrakte edilebilir. Suda çözünmeyen müsilajlar büyük miktarlarda suda şişer ve suyu emer. Ancak sadece suda çözünen müsilajlar viskoz çözeltiler oluşturabilir (Ciudad-Mulero, Fernández-Ruiz, Matallana-González, ve Morales, 2019). Müsilaj esas olarak L-arabinoz, D-galaktoz, L-ramnoz, D-ksiloz ve galakturonik asidi içeren çeşitli dallarda yüksek dallanmış yapılara sahip karbohidratlardan oluşan kompleks bir polimerik maddedir. Aynı zamanda glikoproteinler ve tanenler, alkaloidler ve steroidler gibi diğer maddeleri de içerir (Monrroy, García, Ríos, ve García, 2017).

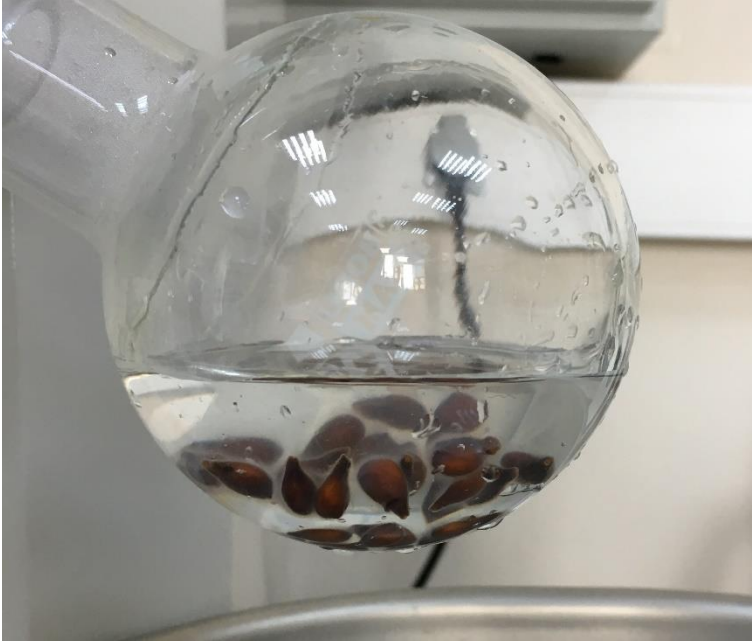
1.3.1. Ayva Çekirdeği Müsilajı

Biyopolimerler; sıcaklık, pH veya iyonik güç gibi dış uyaranları algılamak için yapısal bütünlük sağlayan fonksiyonel malzemelerdir. Bu nedenle, özellikle biyomedikal bilimlerde çeşitli teknolojik uygulamalar için ideal adaylardır. Glukuronik asit ve ksiloz (glukuronoksilan) bazlı biyomateryalden oluşan ayva çekirdeği müsilajı (AÇM), ayva (*Cydonia oblonga*) dâhil olmak üzere farklı bitkilerin tohumlarından ekstrakte edilen ucuz ve biyouyumlu bir polisakkarit hidrojelidir (Şekil 4). Suda çözünmez ve önemli ölçüde şişer. AÇM ayrıca sıcaklık, iyonik güç veya pH gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak farklı ilaçların sürekli salımı için matriks olarak işlev görebilen akıllı bir uyarana duyarlı biyomalzemedir. AÇM normalde su veya bazik tamponlarda şişer; asidik koşullar, organik çözücüler veya tuz çözeltileri altında çöker. Bu nedenle AÇM, diğer endüstriyel uygulamaların yanı sıra farklı biyomedikallerde kullanılacak potansiyel akıllı biyomateryal olarak nitelendirilir (Tablo 2). Ayrıca, AÇM'nin gıda, tıbbi ve farmasötik uygulamalar için akıllı uyaranlara duyarlı bir biyomateryal olarak kullanımı da mevcuttur (Hussain, Muhammad, Haseeb, ve Tahir, 2019).

Tablo 2.

Ayva çekirdeği müsilajının uygulama alanları (Hussain, Muhammad, Haseeb, ve Tahir, 2019)

Ayva Çekirdeği Müsilajının Uygulama Alanları
1. Eczacılık
2. Tıp
3. Kozmetik
4. Gıda Paketleme
5. Gıda Katkı Maddesi
6. Su Arıtma



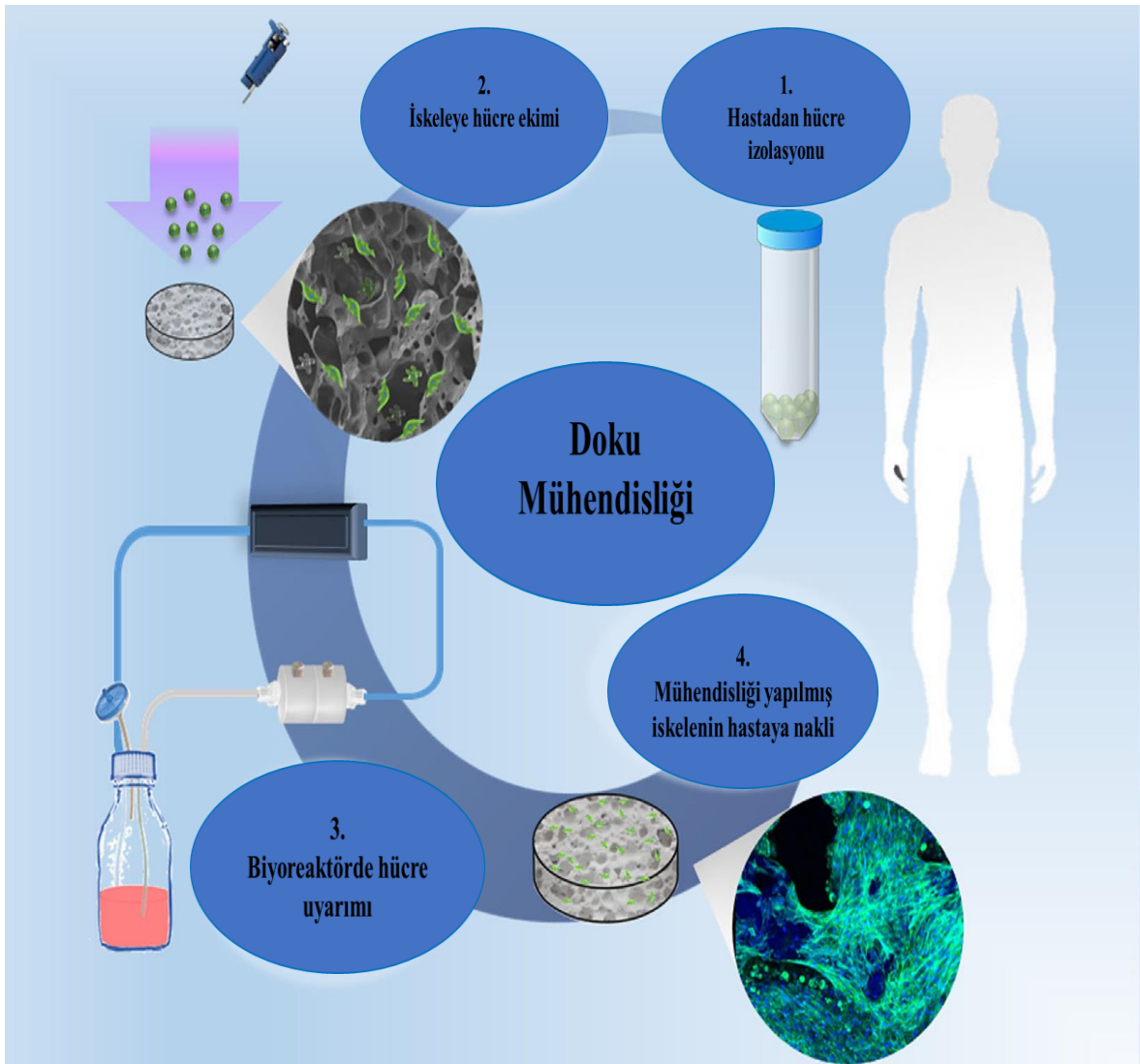
Şekil 4. Ayva Çekirdeği ve Müsilajı

1.4. Periodontal Doku Mühendisliği

DM, Langer ve Vacanti tarafından 90'lı yılların başında “mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerini doku işlevini geri yükleyen, sürdüren veya iyileştiren biyolojik ikamelerin gelişimine uygulayan disiplinlerarası bir alan” olarak tanımlandı. DM, dokuya özgü rejenerasyon süreçlerini indüklemeyi, böylece organ transplantasyonunun iyi bilinen dezavantajlarını (donör eksikliği, immünosüpresif tedavi ihtiyacı) aşmayı amaçlamaktadır (Şekil 5) (Caddeo, Boffito, ve Sartori, 2017). Periodontal doku rejenerasyonunu amaçlayan DM yaklaşımları, iyi tanımlanmış bir mimariye sahip materyaller kullanarak ve yeterli biyokimyasal uyaran sağlayan korunmuş periodontal dokunun endojen rejeneratif

potansiyelinin artırılmasına odaklanmaktadır. Güvenilir periodontal rejeneratif tedavilerin geliştirilmesi için ön şartlar:

- 1) Korunmuş dokudan ilk kasıtlı onarımı uyaran yeterli biyolojik ipuçları sağlamak,
- 2) Yumuşak diş eti dokusunun çökmesini önleyerek yeni doku büyümesi için form stabilitesi sağlamak
- 3) Hızlı çoğalan diş eti fibroblastlarından alanı tıkamak şeklinde sıralanabilir (Babo, Reis, ve Gomes, 2017).



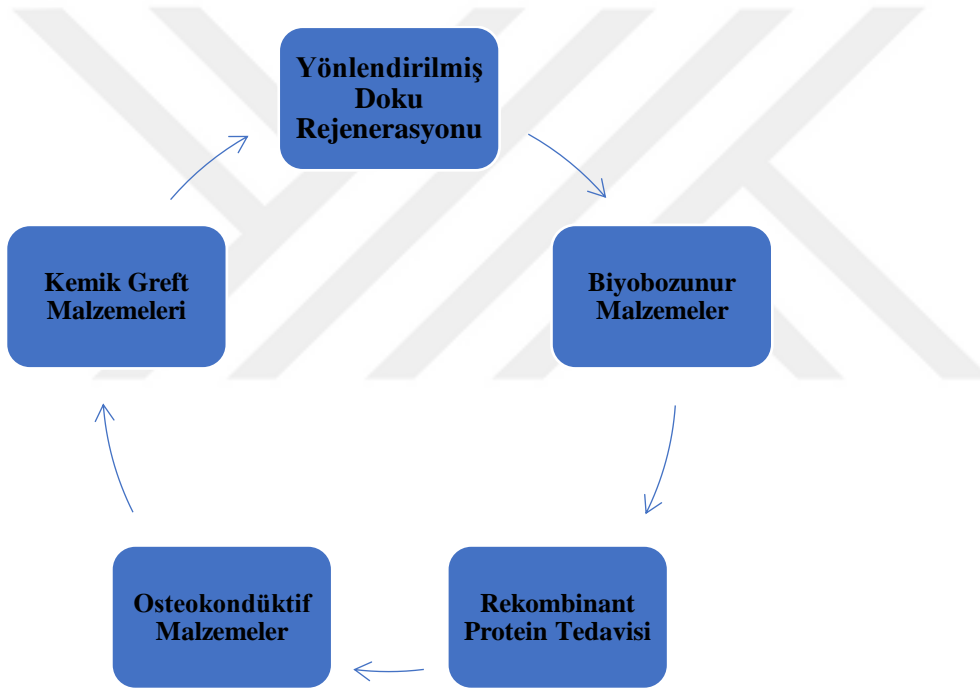
Şekil 5. Klasik DM paradigması (Caddeo, Boffito, ve Sartori, 2017)

1.4.1 Periodontal Rejenerasyonda Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Geleneksel cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedavinin periodonsiyumun orijinal fonksiyonunu ve yapısını yeniden oluşturmadığı uzun zamandır bilinmektedir. Bu, periodontal rejenerasyonun güvenilir ve öngörülebilir bir şekilde gerçekleştirilmesini

amaçlayan özel cerrahi tekniklerin geliştirilmesine yol açmıştır (Şekil 6). En yaygın olarak kullanılan yaklaşım, periodontal defektin (yani, alveolar kemik, periodontal bağ) yeniden oluşturulabilen hücreler tarafından periodontal defektin seçici repopülasyonunu teşvik etmek için bariyer membranları kullanan yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ilkesidir (S. Ivanovski ve diğerleri, 2014).

Periodontal rejenerasyon, diş kökü yüzeyine yeni oluşan sementumun yerleştirilmesini, yeni kemik oluşumunu ve bir PDL bağlantısının yeniden kurulmasını gerektirir. Bu, rejenerasyona ulaşmak için yüksek derecede koordine edilmiş bir uzamsal iyileştirme yanıtı gerektiren periodonsiyumun yüksek hiyerarşik mimarisi nedeniyle zor olduğunu kanıtlamıştır (Vaquette ve diğerleri, 2019).



Şekil 6. Periodontal defektler için mevcut alternatif tekniklerin diyagramı (F. M. Chen ve Jin, 2010)

İlk kez, YDR karmaşık periodontal yara iyileşme sürecini anlama ve manipüle etme; ayrıca yara stabilitesini artırma, yeni kemik ve periodontal bağlanma meydana gelmesi için gerekli alanı koruma ihtiyacını ele almıştır. Biyoaktif moleküllerin ve diş minesini matriks türevi, trombosit kaynaklı ve temel fibroblast (bFGF, FGF-2) gibi büyüme faktörlerinin uygulanmasında kullanılmıştır (Darby ve Morris, 2013; Esposito ve diğerleri, 2009; Murakami, 2011).

Bununla birlikte, YDR ve büyüme faktörlerinin kullanımına dayanan yaklaşımların, belirli bir periodontal defektlerde bir miktar rejenerasyonu teşvik ettiği gösterilmiş olsa da,

klirik sonuçlar tahmin edilemez ve tam rejenerasyon oldukça zordur (Saso Ivanovski, 2009). Ayrıca yara iyileşme süreci üzerinde uzamsal-kontrolün uygulanamaması oldukça büyük bir sorundur. Bu amaçla, doku mühendisliği yaklaşımları bir süredir bu sınırlamalara cevap verme kabiliyetine sahip olarak kabul edilmektedir (P. Mark Bartold, McCulloch, Narayanan, ve Pitaru, 2000).

Biyomalzemelerin cerrahi implantasyonu, kontrollü koşullar altında periodontal doku mühendisliği için 1. nesil yaklaşımdır. Klinik testlerde periodontal rejenerasyonun uzamsal ve geçici olarak yönlendirilmesi için çeşitli polimerler kullanılmıştır. Hücre terapisi ve biyoaktif moleküller içeren biyomalzemelerin kombinasyonu periodontal rejeneratif tıpta kullanılan 2. ve 3. jenerasyonun bir stratejisini temsil etmektedir. Mevcut klinik prosedürlere ek olarak, 4. ve 5. nesil tedaviler biyomühendislik periodontal doku analogları için, biyomateryaller ve hücre tabakaları veya genetik olarak modifiye edilmiş kök hücrelerin yapılarına dayanarak gelişmiştir (Seciu, Craciunescu, Stanciuc, ve Zarnescu, 2019).

Doku mühendisliğinin altında yatan temel kavram, yeterli kan kaynağı varlığında dokuların onarımını veya yenilenmesini destekleyen bir "doku mühendisliği yapısı" oluşturmak için bir iskeleyi canlı hücreler veya biyolojik olarak aktif moleküller ile birleştirmektir (P. M. Bartold ve diğerleri, 2016; P. Mark Bartold, McCulloch, Narayanan, ve Pitaru, 2000). Şimdiye kadar, birçok periodontal doku mühendisliği yaklaşımı, progenitör (kök) hücrelerin yeni periodontal bağlanmayı teşvik etme potansiyeline odaklanmıştır. Periodontal ligament kök hücreleri ve diğer mezenkimal kök hücreler umut verici sonuçlarla kullanılmıştır (Hynes, Menicanin, Gronthos, ve Bartold, 2012). Genel yaklaşım, bu hücreleri bir taşıyıcı ile birleştirmek ve periodontal defektlere sokmak olmuştur. Bu yaklaşımın dezavantajı, hücrelerin periodonsiyum içindeki belirli yerlere iletilmemesidir; bu nedenle, bu karmaşık yapının başarılı bir şekilde yenilenmesi için gereklilikleri tam olarak karşılamamaktadır. Bu bağlamda, hücre tabakalarının kullanımı periodontal defekt içinde daha kontrollü ve hedeflenmiş hücre iletimini kolaylaştırma potansiyeline sahiptir (Ishikawa ve diğerleri, 2009).

1.5. Periodontal Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler

DM'nin amacı yeni bir fonksiyonel doku geliştirmek ve bir cerrahi müdahale gerektiğinde hastalıkları tedavi etmek için *in vitro* veya *in vivo* dokuyu yeniden oluşturmaktır. Bu gibi durumlarda, 3B biyomalzeme iskeleleri yaralanmanın onarılmasında kritik bir rol oynar. Optimal fonksiyonel doku gelişiminde iskelenin hücresel bağlanma, çoğalma, büyüme ve mineral matriks birikimini sağlamak için herhangi bir olumsuz etkisi

olmayan hücrelerle etkileşime girmesi gerekir. Buna ek olarak, yapısal destek, doğal hücre dışı matrikse benzeyen bir tasarım, hücre-hücre iletişimini ve farklılaşmasını; ayrıca taşıma besinlerini teşvik etmek için uygun bir yüzey, gözeneklilik ve heterojen gözenek boyutları sağlamak önemlidir (Khan ve Tanaka, 2017).

1.5.1. Periodontal Rejenerasyon Uygulamaları İçin Bariyer Membranlar

Membran teknikleri ile periodontal rejenerasyon, fiziksel bariyerlerin cerrahi olarak yerleştirilmesi ile farklı dokuların ayrılması prensibine dayanır. Yumuşak doku oluşumu kemik ve periodontal doku oluşumundan daha hızlıdır. Bariyer membranların kullanılması, epitel hücreleri tarafından sızacak ve işgal edilecek olan dokuları yenilemek için kusur alanının korunmasına izin vermektedir. Kemik greftleri ile kombinasyon halinde kullanılırsa membranlar ayrıca greft materyallerini stabilize etmeye, içermeye ve korumaya yarar. Bu, aynı zamanda greft emilim oranını da düşürür. Periodontal YDR uygulamaları için sentezlenmiş çeşitli parçalanabilir ve parçalanmayan bariyer membranları vardır. Periodontal rejenerasyon amaçlı bariyer membranlar tasarlanırken dikkate alınması gereken genel özellikler şunlardır: **1) Biyouyumluluk, 2) Hücre tutunması 3) Boşluk bırakma yeteneği, 4) Doku entegrasyonu, 5) Bozunulabilirlik, 6) Mekanik özellikler ve 7) Klinik kullanım özellikleri** (Sheikh ve ark. 2017).

1.5.2. Bozunmayan Bariyer Membranlar

Selüloz asetat, silikon tabakalar ve genişletilmiş politetrafloroetilen laboratuvar filtreleri gibi malzemeler, rejeneratif tedavide bariyer membranları araştırmak için kullanılan ilk bozunmayan biyomateryallerdir (Dahlin, Linde, Gottlow, ve Nyman, 1988; Gottlow ve diğerleri, 1986). Bu materyaller bazı terapötik potansiyel göstermesine rağmen, materyallerde çevre doku ile bütünleşememe, kırılabilirlik ve belirli bir süre sonra bunları çıkarma ihtiyacı gibi kısıtlamalar gözlenmiştir. Bozunmayan membranların işlevi, yerleştirme sırasında yapısal bütünlüklerini korudukları ve daha sonra ameliyatla geri alındıkları için geçicidir. Bu, klinisyene membranın yerinde kalacağı süre boyunca daha fazla kontrol sağlamasına rağmen, geri alma prosedürü cerrahi alan morbiditesi riskini artırır ve rejenerasyon dokuları hasara ve ameliyat sonrası bakteriyel kontaminasyona duyarlı bırakır. İyileşme sırasında flep ayrışmasına bağlı membran maruziyeti de sıklıkla ameliyat sonrası bir komplikasyondur. Bununla birlikte, dental implantların yerleştirilmesinden önce alveoler sırt büyütme gibi durumlarda, yeterli iyileşmenin gerçekleşmesi için membranın yeterince uzun süre işlevini koruması ve daha sonra çıkarılması arzu edilebilir. Bu nedenle,

belirli durumlarda, parçalanamayan bir zar daha öngörülebilir bir performans sağlar (Hardwick, Hayes, ve Flynn, 1995; Tatakis, Promsudthi, ve Wikesjö, 1999).

1.5.3. Biyobozunur Bariyer Membranlar

Periodontal rejenerasyon uygulaması için bozunmayan bariyer membranları kullanmanın en büyük dezavantajlarından biri, çıkarılması için ikinci bir cerrahi prosedürün gerekmesidir. Bu nedenle, kapsamlı araştırmalar bozunabilir bariyer membranları geliştirmeye odaklanmıştır. 1990'ların başında yapılan klinik çalışmalar, YDR tedavisi için parçalanabilir zarların başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir (Mayfield, Nobréus, Attström, ve Linde, 1997). Bu amaç için hem doğal hem de sentetik polimerler araştırılmıştır. En çok araştırılan polimerler kollajen ve alifatik poliesterlerdir. Güvenliği ve bozunur membranların etkinliğini etkileyen ana faktörler bozunma sonundaki ürünleridir. Membran bozundukça yabancı cisim tepkisini ortaya çıkarabilecek parçacıklar veya fragmanlar üretir. Bu, membran malzemesinin biyoyumluluk profilinde bir değişiklik ile sonuçlanır, kemik oluşumunu önleyebilir ve kemik emilimiyle sonuçlanabilir (Suganuma, Alexander, Traub, ve Ricci, 1991). Bu nedenle, bozunur zarların tasarımının, yeterli bir iyileşme süresi için fonksiyonel özellikleri koruyacak şekilde olması önemlidir. Şu anda, en yaygın olarak kullanılan parçalanabilir membranlar kollajenen veya poliglitolit ve / veya polilaktit veya bunların kopolimerleri ile yapılır. Mevcut biyolojik olarak bozunabilir bariyer membranları, özellikle oral sıvılara ve/veya kana maruz kaldıklarında sertlik eksikliğinden dolayı kusur alanını kendi başlarına koruma konusunda yetersizdir. Bu nedenle bu membranlar sıklıkla takviye, destek vidaları ve pimleri ile veya bunlar olmadan otojen veya sentetik kemik greft ikameleri ile birlikte kullanılır (Sheikh ve diğerleri, 2017).

1.5.4. Doğal Bozunur Bariyer Membranlar

Kollajen biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan; hayvan bağırsaklarından, deriden ve tendonlardan elde edilen bir bileşendir (Ratner, Hoffman, Schoen, ve Lemons, 2004). Kollajen; düşük immünojenisiteye sahip olmak, dış eti fibroblast hücrelerini aktive etmek ve hemostatik olmak gibi çok sayıda biyolojik özelliğe sahiptir (Bunyaratavej ve Wang, 2001). Kollajen membranların fibroblast DNA sentezini uyardığı ve osteoblastların diğer bariyer membran yüzeylerine kıyasla kollajen membran yüzeylerine daha iyi yapışma sergilediği gösterilmiştir (Behring ve diğerleri, 2008). Kollajen liflerinin çapraz bağlanma derecesi, ters orantılı ilişki ile bozunma oranını doğrudan etkiler (C. R.

Lee, Grodzinsky, ve Spector, 2001). Bazı ticari kollajen bazlı bariyer membranlar tabloda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3.
Klinik kullanım için ortak kollajen bazlı bariyer membranlar (Sheikh ve diğerleri, 2017)

Membran	Yapı	Çapraz Bağlama Yöntemi	Doku Kaynakları	Rezorpsiyon süresi
BioGide	Tip I ve III kollajen	Yok	Domuz (dermis)	24 hafta
BioMend	Tip I kollajen	Formaldehit	Sığır (tendon)	6-8 hafta
BioMend-uzati	Tip I kollajen	Formaldehit	Sığır (tendon)	18 hafta
Doku Modeli	Atelokollajen + tendon kollajeni	HMDIC	Sığır (tendon + dermis)	4-8 hafta
BioBar	Tip I kollajen	N/A	Sığır (tendon)	24-32 hafta
Paroguide	Tip I kollajen (% 96) ve Kondroitin-4 sülfat (% 4)	DPPA	Dana derisi	4-8 hafta
Biostite	Tip I kollajen (% 9.5), Kondroitin-4 sülfat (% 2.5) ve HA (% 88)	DPPA	Dana derisi	4-8 hafta
Periogen	Tip I ve III kollajen	Gluteraldehit	Sığır (dermis)	4-8 hafta
AlloDerm Yenileyici Doku Matriksi (RTM)	Tip I kollajen	Yok	İnsan kadavrası (deri)	28-36 hafta
Sitoplast RTM	Tip I kollajen	N/A	Sığır (tendon)	26-38 hafta

1.5.5. Periodontal Doku Mühendisliği için Çok Katlı İskele Gereksinimleri

Birden fazla yumuşak ve sert dokunun karmaşık etkileşimi nedeniyle, uygun 3 boyutlu periodontal çoklu doku mühendisliği zordur. Periodontal dokuların hiyerarşik yapısı, nihayetinde anizotropik gözenek dağılımı, yapısal geometri ve bileşim üzerinde 3 boyutlu bir kontrol ile mikrodan makroya uzanan gözenek boyutlarının tasarımına izin veren, iskele hazırlığı için yöntemlerin geliştirilmesini gerektirir. Gözenekli ve tamamen birbirine bağlı

çok fazlı iskele mimarisinde yeni oluşan doku olgunlaştıkça bozunmadan kalan yapı iskeleleri geliştirmek ve sadece yenilenen dokunun yeniden modellenmesinden sonra bozunmasının başlamasına izin vermek önemlidir. Periodontal doku mühendisliği stratejilerinin, fizyolojik yükleme ve homeostazın restorasyonu da dahil olmak üzere, doku oluşumuna odaklanmadan doku fonksiyonuna vurgu yapmaya doğru ilerlemesi gerekir. Bu nedenle, çok katlı yapı iskelelerinin fonksiyonel biyotaklitle, özellikle periodontal ligament ve diş kökü arasındaki anahtar ara birime değinmesi gerektiği, fonksiyonel periodontal ligament liflerinin eklenmesi ile sementum oluşumunun gerekli olduğu vurgulanmalıdır. Ek gereksinimler, kemik rejenerasyonu için alan sağlanması ve kök yüzeyi boyunca epitel çökmenin önlenmesidir. Özellikle, çok katlı yapı iskeleleri, rejeneratif sonuçları optimize etmek için YDR ve biyoaktif moleküller gibi yerleşik periodontal rejeneratif yaklaşımların yanı sıra progenitör/kök hücre bazlı yaklaşımlarla birleştirilebilir. Özetle, periodontal doku mühendisliğinde çok fazlı yapı iskeleleri için kilit hususlar: **(1)** zamanla entegre bölümlere ayrılmış kemik ve periodontal bağ dokusu oluşumu, **(2)** kök yüzeyine sementum formasyonunun teşvik edilmesi ve **(3)** yeni oluşan kemik ve sementum içine yerleştirilen periodontal ligament liflerinin uygun şekilde oluşturulmasıdır (S. Ivanovski ve diğerleri, 2014).

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Peng ve ekibinin yürüttüğü çalışmada, farklı oranlarda gözenekli kitosan/kollajen yapı iskeleleri, ilgili çözeltilerin kontrollü dondurulması ve liyofilizasyonu ile hazırlanmıştır. İskeleler açıklık, gözeneklilik, şişme davranışı ve hücre aracılı büzülme testi ile incelenmiştir. Bu üç boyutlu iskelelerdeki insan periodontal ligament hücrelerinin morfolojisi ve dağılımı, SEM ve konfokal lazer taramalı mikroskopisi ile araştırılmıştır. Tek bileşenli bir iskele ile karşılaştırıldığında, kitosana kollajen ilavesinin ortalama açıklığı azalttığı, şişme yeteneğini arttırdığı ve kasılmayı azalttığı görülmüştür. Kitosan/kollajen yapı iskelelerinde kültürlenmiş insan periodontal ligament hücrelerinin yapışması ve büyümesi, tek kitosan veya kollajen yapı iskelelerinden daha iyi olduğu gözlenmiştir. Kitosan/kollajen kompozitlerinin periodontal doku mühendisliği için ümit verici iskele malzemeleri olduğu düşünülmektedir (Peng ve diğerleri, 2006).

Qasim ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, iki farklı çözücü sistem, asetik asit veya askorbik asit yoluyla basit dondurucu jelleştirme tekniği kullanılarak hidroksiapatit (HA) ile veya bunlar olmadan gözenekli kitosan membranları üretilmiştir. Membranlar; ultra-yapısal morfoloji, fizikokimyasal özellikler, su alımı, bozunma, mekanik özellikler açısından karakterize edilmiş, olgun ve progenitör osteojenik hücrelerle biyouyumlulukları değerlendirilmiştir. FTIR spektroskopisi ile HA varlığı ve kitosan ile etkileşimi doğrulanmıştır. Mikro bilgisayarlı tomografi analizi, membranların %85-77 oranında gözenekliliğe sahip olduğunu göstermiştir. Mekanik özelliklerin ve bozunma hızının, çözücü tipi ve HA mevcudiyetinden etkilendiği görülmüştür. İnsan osteosarkom ((MG-63) hücrelerinin ve insan embriyonik kök hücre kaynaklı mezenkimal progenitörlerin kültürü, tüm membranların hücre çoğalmasını desteklediğini ve uzun süreli matriks birikiminin HA içeren membranlarla desteklendiği sonucunu vermiştir. Bu kitosan ve HA kompozit membranları, periodontal lezyonlardaki uygulamaları için potansiyel kullanımlarını göstermektedir (Qasim ve diğerleri, 2015).

Varoni ve arkadaşlarının, periodontal rejenerasyonu sağlamak için yürüttüğü çalışmada, kitosan bazlı üç katmanlı gözenekli iskele sentezlenmiştir. Genipin ile orta moleküler ağırlıklı (MMW) veya düşük moleküler ağırlıklı (LMW) kitosani çapraz bağlayarak elde edilen bu iskelelerin dondurularak kurutulmasıyla kemik ve diş eti yenilenmesi için iki gözenekli katman üretilmiştir. Kitosan elektrokimyasal birikimi ile periodontal ligament (PDL) rejenerasyonu için üçüncü bir katman sentezlenerek; bu, PDL

lif büyümesini diş köküne doğru yönlendirmek için yaklaşık 450 um çapında yüksek odaklı mikrokannallar üretilmesini sağlamıştır. *In vitro* karakterizasyon, MMW-CH ve LMW-CH katmanları için hızlı denge su içeriği gösterdiği görülmüştür. (5 dakikadan sonra %85'ten fazla denge suyu içeriği). MMW-CH katmanı daha yavaş bir şekilde bozunmuştur. Kemik ve diş etinin fizyolojik iyileşme oranlarını ve mekanik özelliklerini eşleştirmek için gerektiği şekilde olduğu görülmüştür. ($34\% \pm 1\%$; 7.7 ± 0.8 kPa) İlgili kompartıman üzerinde test edilen tüm primer periodontal hücre popülasyonlarının %90'ından fazlası, alkalın fosfataz ve kollajen biriktirme deneylerinde aktif hücre metabolizmasını gösteren, sito-uyumluluk testleri sırasında hayatta kaldığı belirtilmiştir. *In vivo* testler; vahşi tip farelerde, doku büyümesinde ve yapı iskelesinde vaskülarizasyonda yüksek biyouyumluluk göstermiştir. Farelerde periodontal ektopik model kullanarak insan diş eti fibroblastları, osteoblastlar ve PDL fibroblastları ile iskele katmanları hazırlanmıştır ve MMWCH bölgesi içinde dentin arayüzünde zayıf mineralize birikintilerle yoğun bir mineralize edilmiş matriks oluşmuştur. Bu sonuçlar periodontal rejenerasyon için ümit verici bir aday olarak bu emilebilir üç katmanlı iskeleyi desteklemektedir (Varoni ve diğerleri, 2018).

Srinivasan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, aljinat kompozit iskele içeren nano biyoaktif cam seramik partikül imal edilmiş ve SEM, EDAX, AFM, FTIR, XRD ve diğer yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Şişmenin kabiliyeti, *in vitro* bozunması, biyo-mineralizasyon ve iskelenin sito uyumu da değerlendirilmiştir. Sonuçlar azalmış, şişme ve bozulma ile gelişmiş biyo-mineralleşme ve protein adsorpsiyonunu göstermiştir. Ek olarak; iPDLF ve MG-63 hücreleri, kontrol aljinat yapılarına kıyasla aljinat / biyocam kompozit yapı iskeleleri üzerinde iyi bir şekilde yapılandırılmış ve çoğaltılmıştır. Nano biyoaktif cam seramik partikülün varlığı, bileşik yapı iskelelerinde kültürlenmiş iPDLF hücrelerinin alkalın fosfataz aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle, sonuçlar bu biyouyumlu kompozit yapı iskelelerinin periodontal doku rejenerasyonu için faydalı olabileceğini göstermektedir (Srinivasan ve diğerleri, 2012).

Zahid ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada, termoelastik özelliklere sahip gözeneksiz bir üst katmana (poliüretan) ve gözenekli alt katmana (polikaprolakton ve biyoaktif cam kompozit) sahip iki katmanlı bir zar, liyofilizasyon yoluyla geliştirilmiştir. Morfoloji, gözeneklilik ve katmanlar eki çoklu çözücü sistemi kullanılarak kontrol edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* biyouyumluluk, hücre bağlanması ve hücre çoğalması immünohistokimya ve histoloji ile analiz edilmiştir. Hücre proliferasyon hızı ve hücre bağlanma sonuçları her iki yüzeyin de biyouyumluluğunu göstermiştir. Ancak hücre metabolik aktivitesi polikaprolakton-biyoaktif cam yüzeyinde daha iyi olduğu görülmüştür.

Ayrıca, hücreler gözenekli olmayan poliüretan yüzeyinde kasıtlı olarak tasarlanmış ve güdümlü doku rejenerasyon/yönlendirilmiş kemik rejenerasyon membranları için önceden gerekli olan düşük hücre eki sergilerken; gözenekli olmayan poliüretan yüzeyinde düşük gözenekli biyoaktif yüzey üzerinde canlı, yapılandırılmış ve çoğaltılmıştır. Ek olarak; altı hafta boyunca bir sıçan modelinde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar, membranların iyi uyumluluğunu ortaya koymuştur. Histolojik analiz (hematoksilen ve eozin ile boyama), iltihaplanma veya konakçı immün hücrelerinin birikimi belirtilerini göstermemiştir. Bu sonuçlar, fabrikasyonu yapılan biyo-uyumlu iki tabakalı membranın periodontal doku rejenerasyonunda kullanımının uygun olduğunu söylemiştir (Zahid ve diğerleri, 2019).

Kafi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise, insan mezenkimal kök hücre (iMKH) yapışması, çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkilerini araştırmak için kitosan, kollajen ve kitosan-kollajen kompoziti kullanılarak 3B gözenekli yapı iskelelerinin imalat ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Gözenekli morfolojideki malzemeye bağlı değişiklikler ve üretilen kitosan, kollajen ve kitosan-kollajen iskelesinin mekanik davranışı, iMKH yapışma, çoğalma ve farklılaşma üzerinde önemli bir etki gösterdiği belirtilmiştir. Üretilen tüm iskele grupları arasında kitosan-kollajen iskelesinde maksimum iMKH yapışma ve çoğalma sağladığı bildirilmiştir. Kitosan-kollajen iskele içindeki gözenek yapısının birbirine bağlanabilirliği, iskele boyunca bu kadar gelişmiş büyüme ve dağılım için tercih edilen bir özellik olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, birbirine iyi bağlanmış gözenekli kitosan iskelesinin yetersiz yapışma motifleri nedeniyle zayıf yapışma ve çoğalma göstermiştir. Kollajen iskelesi durumunda iMKH 'nin optimum büyümesi ve dağılımı, gözenek yapılarında ara bağlantı olmaması nedeniyle sadece yüzeyde gerçekleştiği vurgulanmıştır. Benzer şekilde iMKH'nin osteojenik farklılaşması, en çok tercih edilen şekliyle tüm iskele grupları arasında kitosan-kollajen kompozit iskele olduğu sonucuna varılmıştır. Kitosan-kollajen iskelesinde bu gibi gelişmiş iMKH proliferasyonu ve farklılaşması, bir kemik dokusu implantının *in vivo* uygulaması için gerekli olan iskelenin mekanik davranışını önemli ölçüde etkilemiştir. Bu nedenle; kitosan-kollajen kompozit iskele, kemik dokusu implantının *in vitro* mühendisliği için uygun bir platform olacağına dair umut vadetmektedir (Kafi, Aktar, Phanny, ve Todo, 2019).

Liang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın amacı; biyobozunur polimer poli (D, L-laktid-ko-glikolit) (PLGA) ve biyoaktif seramik HA ile kaplanmış bir PLGA polimerik matriks katmanından oluşan iki katmanlı PLGA / PLGA-HA kompozit yapı iskelelerinin osteokondral rejenerasyon potansiyelinin araştırılmasıdır. Kompozit iskele kompresyon kalıplama / partikül liçi ve plazma işlemleriyle yüzey biriktirme ile imal edilmiştir. İskelenin

gözenek morfolojisi, mekanik özellikleri ve yüzey birikimi karakterize edilmiş ve iskeletteki kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin veya tıbbi sinyal hücrelerinin gelişimi doğrulanmıştır. Daha sonra, eklemde yapay osteokondral defektli tavşan modelleri üç tedavi grubuna randomize edilmiştir. Bunlar: iki katlı iskele, MKH'lerle *in vitro* önceden hazırlanmış iki katlı iskele ve tedavi edilmemiş boş kontrol. Postoperasyonun 16. haftasında hem hücresiz iskele hem de hücre tohumlu çift katmanlı iskele; biyomekanik analiz, histolojik değerlendirmeler ve Western blot ile doğrulanmıştır. Ayrıca osteokondral onarım sergilediği gözlenmiştir. Sonuçlar; osteokondral doku mühendisliği için ve özellikle doku rejenerasyonu veya *in situ* doku indüksiyonu için iki katmanlı PLGA / PLGA-HA kompozit iskelesinin potansiyelini, gözenekli biyomalzemelerde muhtemelen lokal hücreleri kondrojenik ve osteojenik farklılaşmaya yönelterek vurgulandı (Liang ve diğerleri, 2018).

Shahnnavazi ve ekibinin çalışmasının amacı HA 'yı organik polimer ile birleştirerek kemik-diş dokusu mühendisliğinde kullanmaktır. Bunun için nano-hidroksiapatit / kitosan yapı iskeleleri, farklı yöntemlerin yapı iskeleti özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak için iki farklı yöntemle sentezlenmiştir. İskelenin gözenek ebadı ve lif çapı gibi morfolojik özellikleri SEM değerlendirmesi kullanılarak araştırılmış ve ayrıca iskeletlerin biyoaktivitesi simüle vücut sıvısında ölçülmüştür. Sonuçlar, kitosan/nano-hidroksiapatit iskelesinin diş mühendisliği için uygun bir iskele olabileceğini gösterirken; elektroçirme teknikleri donma kurutmadan daha fazla esneklik ve kontrol edilebilir gözenek boyutu sunmuştur. Donma kurutma tekniği kullanımında hidroksiapatit yüzdesinin %40'a kadar yükseldiği, daha iyi makro-mekanik ve fiziksel özellikler gösterdiği sonucuna varılmıştır (Shahnnavazi ve diğerleri, 2016).

Akman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada amaç; periodontal doku mühendisliği uygulamaları için temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) yüklü kitosan ve HA-kitosan yapı iskelelerinin uygunluğunu değerlendirmektir. İskeleler, HA partiküllerinin yokluğunda veya %2 ve %3 kitosan jeli kullanılıp dondurularak kurutma tekniği ile üretilmiştir. HA boncuklarının kitosan jellerine eklenmesi, gözenek ebatları ve ara bağlantıların korunduğu yeni bir iskele oluşturduğu belirtilmiştir. İskeleler gömme tekniği ile 100 ng bFGF ile yüklenmiştir. HA-kitosan yapı iskeleleri, kitosan yapı iskeleleri ile karşılaştırıldığında bFGF için daha iyi kontrollü salma kinetiği sağlamış ve toplam salım 168 saate kadar devam etmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, PDL hücreleri ve sementoblastlarla yapılmıştır. Hem 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -difeniltetrazolyum bromid (MTT) deneyi hem de konfokal lazer tarama mikroskobu analizi, iskele içinde çoğalan hücreleri ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar; bFGF yüklü HA-kitosan yapı iskelelerinin, hücresel yapı, çoğalma ve mineralizasyonu

destekleyen uygun bir üç boyutlu ortam sağladığını göstermiştir (Akman, Tiğli, Gumusderelioglu, ve Nohutcu, 2010).

Gümüşderelioglu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada periodontitis tedavisi için kitosan bazlı, çok fonksiyonlu ve çift yüzölçümlü bir bariyer membranı geliştirilmiştir. Membranın gözenekli yüzeyi, mikrodalga destekli biyomimetik yöntemle üretilen ve kitosanın biyoaktivitesini arttırmak için kemik morfogenetik faktör 6 (BMP-6) ile zenginleştirilmiş kemik benzeri HA ile kaplanmıştır. Membranın bu yüzeyi periodontitis nedeniyle hasar gören sert doku ile temas edecek şekilde tasarlanmıştır. Enflamatuvar yumuşak doku ile temas halinde olan gözeneksiz membran yüzeyi, epitel hücrelerinin defekt alanına göçünü önlemek için elektrospun polikaprolakton lifleri ile kaplanmıştır. PrestoBlue (hücre canlılığı reaktifi), SEM ve gerçek zamanlı PCR sonuçları, membranın gözenekli yüzeyinin MC3T3-E1 preosteoblastlarının proliferasyonunu ve farklılaşmasını arttırırken, zarın gözeneksiz yüzeyinin epitelyal Madin Darby sığır böbreğinin hücrelerinin göçüne izin vermediğini göstermiştir. Burada geliştirilen bariyer membranın biyolojik olarak parçalanabilir ve kolayca manipüle edilebilir, osteojenik aktiviteye sahip ve epitel hücreleri için hareketsiz olduğu saptanmıştır. Böylece, bu zarın hasarlı periodontal dokuya implante edilmesi ile kemik rejenerasyonu gerçekleşecek ve periodontal dokuların bütünlüğünün korunacağı düşünülmektedir (Gümüşderelioglu, Sunal, Demirtaş, ve Kiremitçi, 2020).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

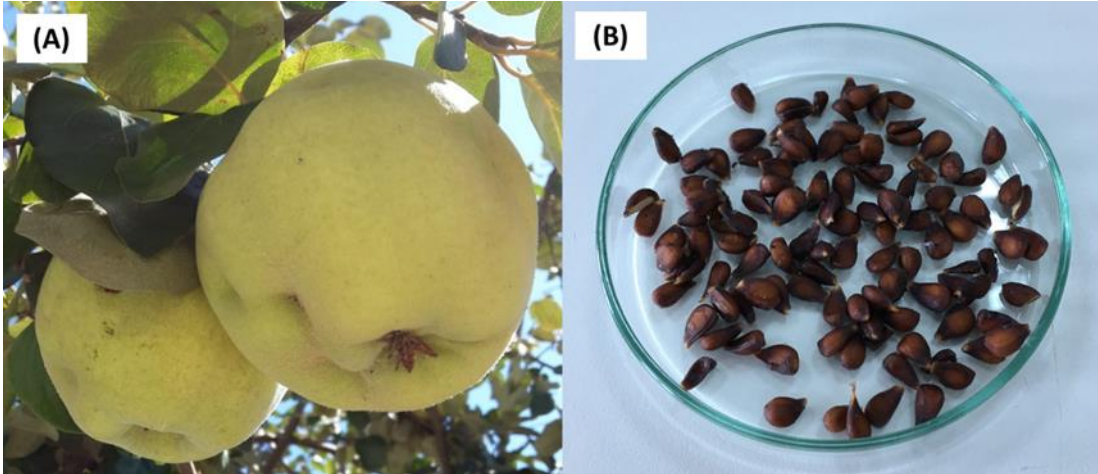
3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, ticari amaçlarla kesilen sığır tibiası kullanıldığı için söz konusu deneylerde etik kurul izni gerekmemiştir. iPDLF hücrelerinin izolasyonu için gerekli olan insan etik kurul izni Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (Karar No: 2019-14, Karar Tarihi: 24.07.2019) İlgili belge Ek 1' de sunulmuştur. Aksi belirtilmediği sürece tüm kimyasal maddeler Millipore-Sigma firmasından satın alınmıştır. Cihaz marka ve modelleri, ilgili yöntem içerisinde belirtilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ayva Çekirdeklerinin Temin Edilmesi

Tez çalışmasında kullanılan ayva çekirdekleri, Çanakkale-Kepez bölgesinden mevsiminde toplanan olgunlaşmış ayvalardan temin edilmiştir. Ayva içerisinden çıkarılan çekirdeklerin sağlıklı olanları (küf içermeyen ve şekilsel olarak düzgün olan çekirdekler gözlem ile belirlenmiştir) ayrılmıştır ve çekirdekler yıkama vb. gibi hiçbir işleme tabi tutulmadan uygun numune kaplarında +4 C°'de muhafaza edilmiştir (Şekil 7).

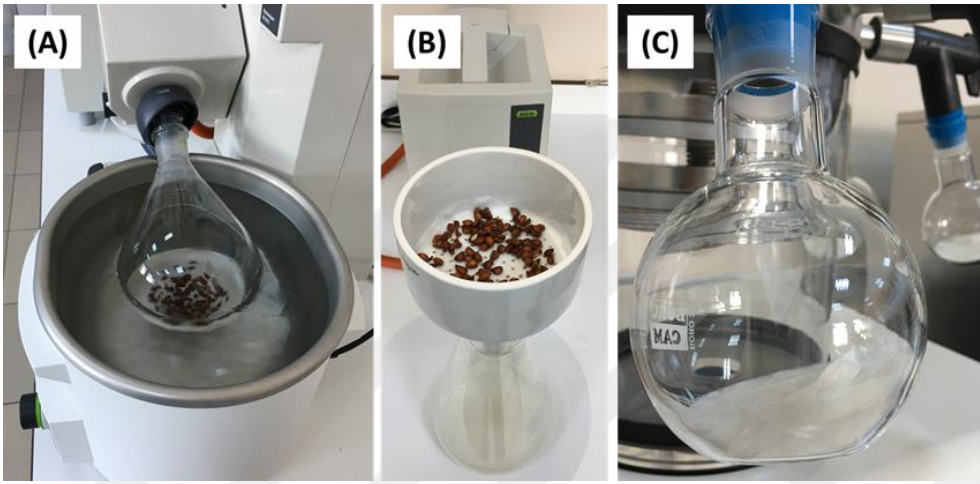


Şekil 7. (A) Ayva meyvesinin temini (B) Prosedürde kullanılmak üzere ayıklanmış ayva çekirdekleri

3.2.2. Ayva Çekirdeği Müsilajının Ekstrakte ve Liyofilize Edilmesi

AÇM'nin ekstraksiyon işlemi döner buharlaştırıcıda gerçekleştirilmiştir (Rotavapor R-200, Buchi, İsviçre). Bu işlem için 4 g ayva çekirdeği tartılarak (ATX224, Shimadzu, Japonya); 75 ml ultra saf su (Milli Direct-Q 3UV, Merck-Millipore, Almanya) içerisine

konmuştur ve 30 C°'de döner buharlaştırıcınının 6. hız seviyesinde bir gece boyunca ekstrakte edilmiştir. Ardından çekirdek taneciklerinin uzaklaştırılması ve berrak bir müsilaj elde etmek amaçlı ekstrakt, buchner hunisi ve nuçe erleni yardımıyla vakum altında süzölmüştür (Vacuum Pump V-700 Buchi, İsviçre). Elde edilen berrak müsilaj cam balonlara dökölmüştür ve bir gece boyunca -26 C°'de dondurulmuştur. Daha sonra cam balonlar içerisindeki donmuş müsilaj gece boyunca liyofilize edilmiştir (LyoQuest -55, Telstar, İspanya) (Şekil 8). İşlem sonunda elde edilen liyofilize müsilaj numune kaplarına alınarak +4 C°'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 8. Ayva çekirdeklerinden müsilaj elde etme prosedürü (A) Müsilaj ekstraksiyonu (B) Müsilajın partiköllerden vakum altında süzölerek ayrıştırılması (C) Müsilajın liyofilize edilmesi

3.2.3. Sığır Tibiasının Temin Edilmesi ve Trabeköler Kemiğın Uygun Boyutlarda Kesilmesi

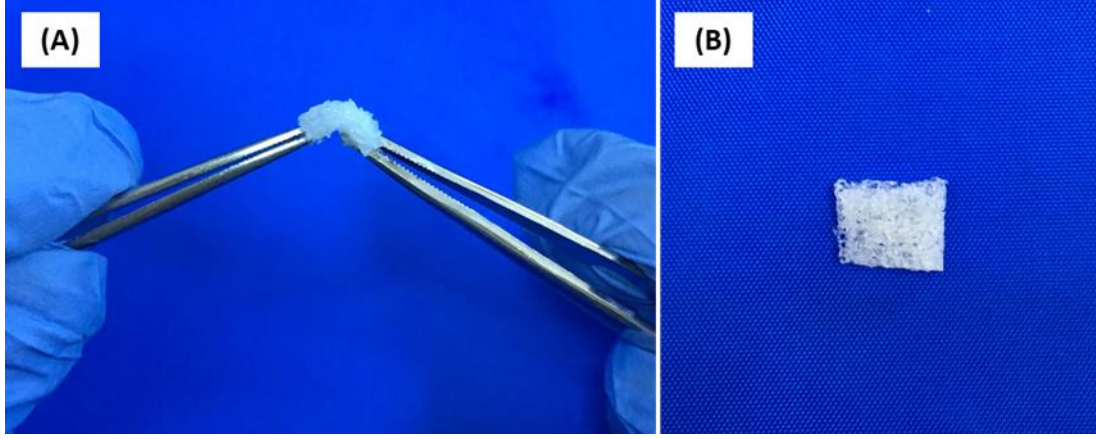
Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere gerekli olan sığır tibiası, Çanakkale ilinde kesimi yapılan sığırlardan temin edilmiştir. Kemik dokusun, sağlıklı ve kesimi yeni yapılmış sığırdan olmasına özen gösterilmiştir (Sağlık Bakanlığı'nın onay verdiği kesimhanelerden temin edilmiştir). Alınan kemik dokuları soğuk zincir altında 1-2 saat içerisinde laboratuvara transfer edilmiştir. Sığır tibiasının trabeköler bölümü ayrılmıştır ve 15x10x5 mm boyutlarında uygun boyutlara kesilerek -26 C°'de saklanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Ham kemik dokusunun uygun boyutlarda kesilme aşamaları (A) Sığır tibiası (B) Ayrılmış trabeküler kemik (C) Uygun boyutlara getirilmiş trabeküler kemikler

3.2.4. Trabeküler Kemiğin Demineralize ve Deselülerize Edilmesi

15x10x5 mm boyutlarında kesilen kemik dokularının hacmini belirlemek amaçlı cam mezür içerisine belli hacimde saf su konulmuştur ve ardından kemikler cam mezür içerisine alınmıştır. Oluşan hacim farkından kemiklerin hacmi belirlenmiştir. Sağlıklı bir demineralizasyon ve deselülerizasyon için işlemler dinamik çalkalayıcıda ve uygun sıcaklıkta (170 rpm, 25 C°) gerçekleştirilmiştir (Incu-Shaker, Mini Benchmark, ABD). Demineralizasyon işlemi için belirlenen hacmin 20 katı kadar %5' lik HCl çözeltisi hazırlanmıştır ve kemikler hazırlanan HCl çözeltisi ile 24 saat muamele edilmiştir (Şekil 10). Daha sonra asit kalıntılarının uzaklaştırılması için gece boyuca kemikler saf su ile yıkanmıştır. Deselülerizasyon işlemi için kemikler 24 saat boyunca pH seviyesi ayarlanmış (FE20 FiveEasy™ Benchtop pH Meter , Mettler-Toledo, ABD) hipotonik (10mM Trizma.HCl ve 5mM EDTA pH:8,00) çözelti içerisine alınmıştır. Kemikler olası kimyasal bulaşları önlemek için her işlemin ardından ultra saf su ile yıkanmıştır (Milli Direct-Q 3UV, Merck-Millipore, Almanya). Daha sonra kemikler 48 saat boyunca %1 Triton X-100 içeren hipertonic (1,0 M KCl, 50mM Trizma.HCl ve 5mM EDTA pH:8,00) çözelti ile muamele edilmiştir. Deselülerizasyonun son basamağında ise kemikler; yapıdaki DNA ve RNA moleküllerinin istenilen seviyede giderilmesi için 200 µg/mL DNase I (Sigma DN25, ≥400 Kunitz units/mg protein) ve 50 µg/mL RNase A (Sigma R5503, 50-100 Kunitz units/mg protein) (10mM MgCl₂, 50mM Trizma.HCl) içeren çözelti içerisinde 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Son olarak dekontaminasyon amaçlı kemikler 5 saat boyunca %4 etanol ve %0,1 perasetik asit içeren çözelti ile muamele edilmiştir ve sonrasında ultra saf su ile yıkanarak liyofilizasyon için gece boyunca -26 C°de dondurulmuştur. Ardından kemikler gece boyunca liyofilize edilerek +4 C°de muhafaza edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. (A) Demineralize edilmiş kemik dokusu (B) Deselelülerize kemik dokusu

3.2.5. DNA İçerik Analizi

Kemik dokularının başarılı bir şekilde deselülerize olduklarını kanıtlamak ve dokuların içerisindeki DNA miktarını belirlemek amaçlı DNA içerik analizi uygulanmıştır. Bu sebeple ticari GeneJET DNA saflaştırma kitinin (Thermo Scientific, ABD) prosedürleri uygulanarak DNA içerik analizi yapılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların bulunduğu çözelti kuvars mikroküvetlere alınarak, spektrofotometrik analizler (UV mini-1240 UV-Vis, Shimadzu, Japonya) 260 nm ve 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ortalama DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki matematiksel işleme göre hesaplanmıştır (Arslan, Galata, Sezgin Arslan, ve Derkus, 2018; Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016).

$$DNA\ Konsantrasyonu\ (ng/\mu l) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \quad (3.1)$$

3.2.6. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçeriğinin Belirlenmesi

Ham ve hücrelerden arındırılmış kemik dokularının yapısında mevcut olan kollajen miktarının belirlenmesi ve kıyaslanması için ticari hidroksiprolin test kiti (Merck, Almanya) kullanılmıştır. İlk olarak ham ve hücrelerinden arındırılmış kemik dokuları 5 mg olacak şekilde tartılmıştır ve ayrı ayrı kriyo viallere konmuştur. Daha sonra üzerlerine 100 µl ultra saf su ve 100 µl 12,18 M HCl ilave edilmiştir. Kriyo vialer 120 C° etüvde 3 saat boyunca hidroliz amaçlı inkübe edilmiştir (UN-55, Memmert, Almanya). Kömürleşmeyi engellemek amaçlı inkübasyon öncesi numuneler N_{2(g)} ile muamele edilmiştir. Hidroksiprolin içeriğinin belirlenmesi adına hidroliz olan örnekler hidroksiprolin kit prosedürü uygulanmıştır. Örnekler, 96 kuyucuklu hücre kültürü plastiğinin 1 kuyucuğuna 2 µl olacak şekilde ilave edilmiştir ve 60 C°'de 1 saat boyunca etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan örnekler

kloramın T/oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino) benzaldehit eklenmiş ve 30 dakika boyunca karanlık ortamda ve 25 C°' de inkübe edilmiştir. Ardından 560 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır ve hidroksiprolin miktarı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016).

Hidroksiprolin Miktarı

$$= \left(\frac{A_{560} \text{ Numune}}{A_{560} \text{ Spike Kontrol}} \right) - A_{560} \text{ Numune} \times 0,4 \text{ (}\mu\text{g)} \quad (3.2)$$

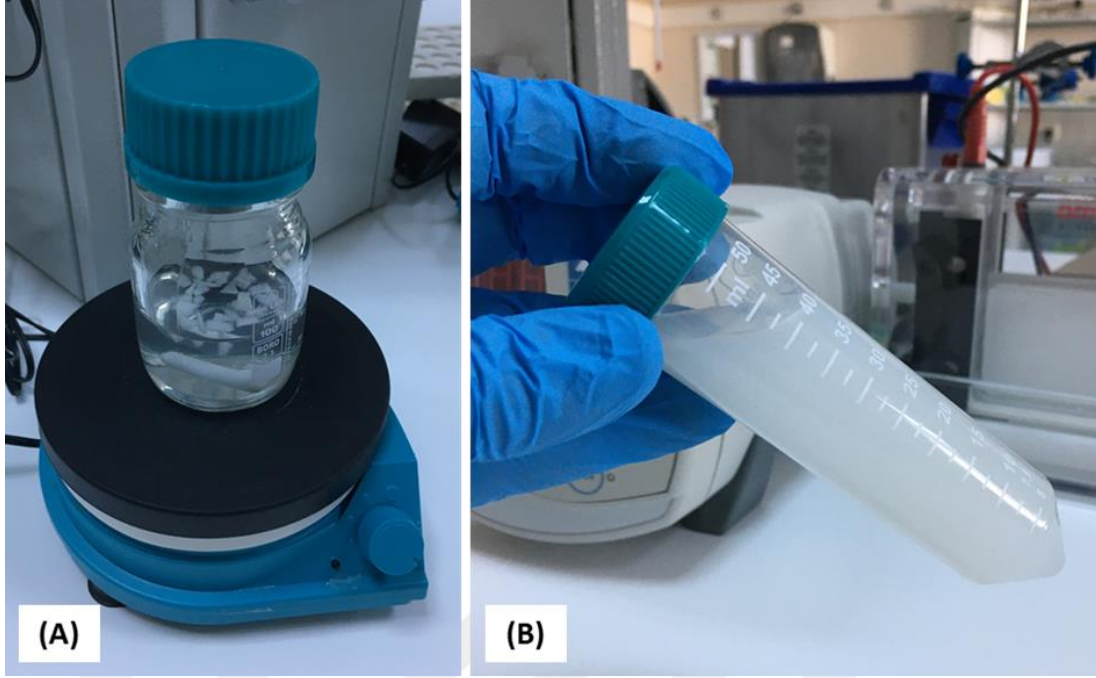
Ham ve hücrelerinden arındırılmış kemik dokularında mevcut GAG miktarı (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016) tarafından geliştirilen metot ile tayin edilmiştir. Ham ve hücrelerinden arındırılmış kemik dokuları 10 mg olacak şekilde papain çözeltisi (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂ EDTA, 10 mM L-sistein ve 0,125 mg/mL papain, ultra saf su içinde pH 7.5) ile blok ısıtıcıda (Jeiotec, Kore) gece boyunca 65C°'de muamele edilerek sindirilmiştir. Daha sonra papain enzimi 100C°'de 15 dakikada inaktive edilmiştir. Ardından örnekler 1,9-Dimetil-Metilen mavisi eklenmiştir. Bu işlem sonrasında, 525 nm'de spektrofotometrik ölçüm alınmış ve GAG içeriği aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016).

GAG Kuru Ağırlık (μg/mg)

$$= [(OD_{525}/Eğim) \times (Seyreltme Faktörü \times Toplam Hacim)] / \text{Kemik Dokusu Ağırlığı (mg)} \quad (3.3)$$

3.2.7. Deselülerize Kemik Dokularının Jel Formuna Getirilmesi ve Nötralizasyonu

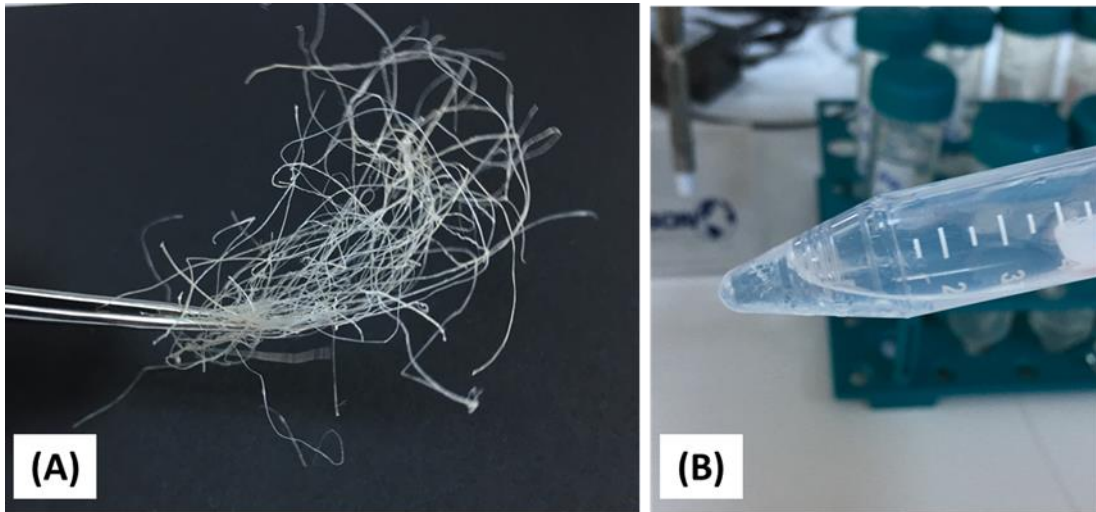
Liyofilize edilmiş deselülerize kemik dokusunun 1 gramı, 100 mg pepsin içeren 100 ml 0.01 N HCl çözeltisi içerisinde 3 gün süreyle manyetik karıştırıcı aracılığıyla sindirilerek jel formuna getirilmiştir. Ardından elde edilen jel içerisinde istenmeyen partiküllerin uzaklaştırılması amaçlı gazlı bez yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Nötralizasyon amacıyla elde edilen jelle toplam hacmin 1/10'u kadar 0,1 N NaOH ve 1/9'u kadar 10X PBS (2,70 gram Na₂HPO₄.2H₂O, 0,485 gram NaH₂PO₄.2H₂O ve 9 gram NaCl 100 ml ultra saf su içerisinde pH:7,4) ilave edilerek jel nötralize edilmiştir. Nötralize jel, 50 ml'lik falkon tüp içerisinde +4 C°'de saklanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. (A) Deselülerize kemik dokularının jel formuna getirilmesi (B) Deselülerize kemik jeli

3.2.8. Kollajen Tip I Çözeltisinin Hazırlanması

Kollajen tip I çözeltisi, doğal yapıştırıcı olarak kullanılmak amaçlı %1,5(w/v) olacak şekilde hazırlanmıştır. Sıçan kuyruğundan izole edilen kollajen lifleri makas yardımıyla iyice kıyılmıştır ve 60 mM fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 5 saat boyunca manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya) yardımı ile karıştırılmıştır. Ardından bir gazlı bez yardımı ile süzme işlemi yapılarak partiküller uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sıçan kuyruğu kaynaklı kollajen tip I çözeltisi $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. (A) Sıçan kuyruğundan elde edilen kollajen lifleri (B) Kollajen tip I çözeltisi

3.2.9. Ayva Çekirdeği Müsilajı/Deselülerize Kemik Kaynaklı Çift Katlı Biyoiskelelerin Üretilmesi, Çapraz Bağlanması ve İstenilen Boyutlarda Kesilmesi

Biyoiskelelerin üretiminde 6 kuyucuklu teflon kalıp kullanılmıştır. İlk olarak deselülerize sığır kemiği kaynaklı jel, 2 ml olacak şekilde kuyucuklara dökülmüştür. Ardından jelin olgunlaşması ve istenilen viskoziteye gelmesi (nötralizasyon) için teflon kalıp 90 dakika boyunca 37 C° etüvde bekletilmiştir. Bu işlemden sonra her bir kuyucuğa doğal bir yapıştırıcı vazifesi görmesi için 500 µl kollajen tip I çözeltisi (%1,5 (w/v)) eklenmiştir. Kemik jeli ve kollajen çözeltisi arasında bağ etkileşimlerinin gerçekleşmesi için teflon kalıp 30 dakika boyunca 37 C° etüve tekrar alınmıştır. Daha sonra kollajen çözeltisinin fazlası kuyucuklardan dikkatlice çekilmiş ve her bir kuyucuğa 2 ml, konsantrasyonu 5 mg/ml olan müsilaj çözeltisi ilave edilmiştir. Katmanlar arasında etkileşimlerin (Hidrojen bağları, London etkileşimleri vb.) gerçekleşmesi amaçlı teflon kalıp 5 saat süreyle +4 C°'de bekletilmiş ve sonrasında liyofilizasyon için bir gece -26 C°'de dondurulmaya alınmıştır ve ardından liyofilize edilmiştir. Liyofilize olan biyoiskeleleri çapraz bağlamak amaçlı 2-(N-morfolino) etansülfonik asitin (MES) (Sigma, kat. no. M 3885) 0,05 M'lık çözeltisi %70'lik etil alkol (Sigma-Aldrich, kat. no. 32221) içerisinde hazırlanmış ve pH'ı 5.5 olarak ayarlanmıştır. 1 ml MES çözeltisi başına 13,8 mg EDC/6,72 mg NHS ilave edilmiş ve ultrasonik banyo (S30H, Elma, Almanya) yardımıyla çözelti homojen hale getirilmiştir. Çapraz bağlama işleminden önce biyoiskelelerin yapısının korunması ve daha rijit hale gelmesi için biyoiskeleler 30 dakika boyunca EtOH (%100) içerisinde beklemeye alınmıştır. Daha sonra alkol kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve biyoiskelelerin her birine 3 ml olacak şekilde hazırlanan çapraz bağlayıcı çözeltisi (EDC/NHS, 0,05 M MES çözeltisi içerisinde, pH:5.5) eklenmiştir. 2 saat boyunca durgun şekilde çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından çapraz bağlayıcı kalıntılarının uzaklaştırılması için dinamik şekilde 2 saat boyunca saf su ile yıkama (1. saat sonunda saf su değişimi gerçekleştirilir) yapılmıştır (Çözeltilerin eklenmesi ve uzaklaştırılması direkt olarak biyoiskelelerin üzerine değil kuyucukların iç cidarından yavaş şekilde yapılmıştır). Yıkanan iskeleler liyofilizasyon amaçlı gece boyunca -26 C°'de dondurulmuş ve ardından gece boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilize çapraz bağlı iskeleler 5x5 mm boyutlarında kesilmiş ve + 4 C°'de muhafaza edilmiştir. Yapılan test ve analizlerde çift tabaka iskele ve onu oluşturan kemik ve müsilaj katmanlarının kıyaslanması için yalnızca kemik jeli ve müsilaj içeren biyoiskeleler de üretilmiştir. Bunun için ilk önce 6 kuyucuklu teflon kalıp içerisine 2 ml olacak kemik jeli dökülmüş ve çift tabaka üretimde olduğu gibi 90 dakika boyunca 37 C° etüvde bekletilmiştir. Daha sonra kalıbın boş kuyucuklarına 2 ml kadar müsilaj dökülmüştür ve kalıp 5 saat süreyle

+4 C°'de bekletilmiştir. Sonrasında liyofilizasyon için gece boyunca -26 C°'de dondurulmaya alınmıştır. Çapraz bağlama, dondurma, liyofilizasyon ve istenilen boyutlara kesilme işlemleri aynı şekilde uygulanmıştır (Çapraz bağlayıcı çözeltisi kuyucuk başına 2 ml olacak şekilde kullanılmıştır). Tüm test ve analizlerde çapraz bağlı biyoiskeleler kullanılmıştır.

3.2.10. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Çapraz bağlı kemik, müsilaj ve çift tabaka biyoiskelelerin arasındaki kimyasal bağ farklılıklarının belirlenmesi ve yapıdaki fonksiyonel grupların tayini için ATR-FTIR analizi, (Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 13). Spektrumlar, 650-4000 cm⁻¹ frekans aralığında, 64 kez tarama yapılarak ve 16 cm⁻¹ çözünürlükte alınmıştır.

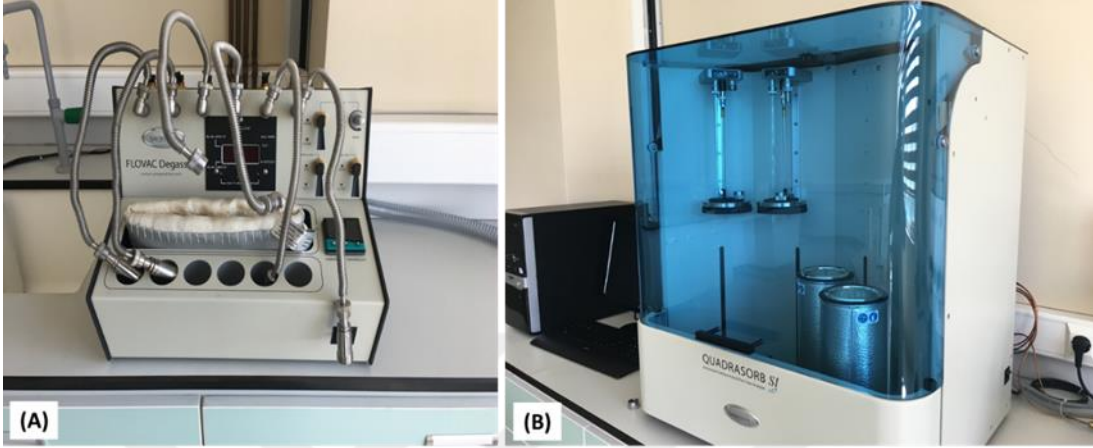


Şekil 13. ATR-FTIR cihazı

3.2.11. Brunauer, Emmet ve Teller (BET) Analizi

Çapraz bağlı çift tabaka biyoiskelelerin yüzey alanını belirlemek ve gözenek hacmini tayin etmek amaçlı (QUADRASORB SI Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantachrome Instruments, ABD) cihazında BET analizi yapılmıştır (Şekil 14). Analiz öncesinde biyoiskelelerin gözeneklerini tam olarak açmak ve böylece tam bir adsorbsiyonun

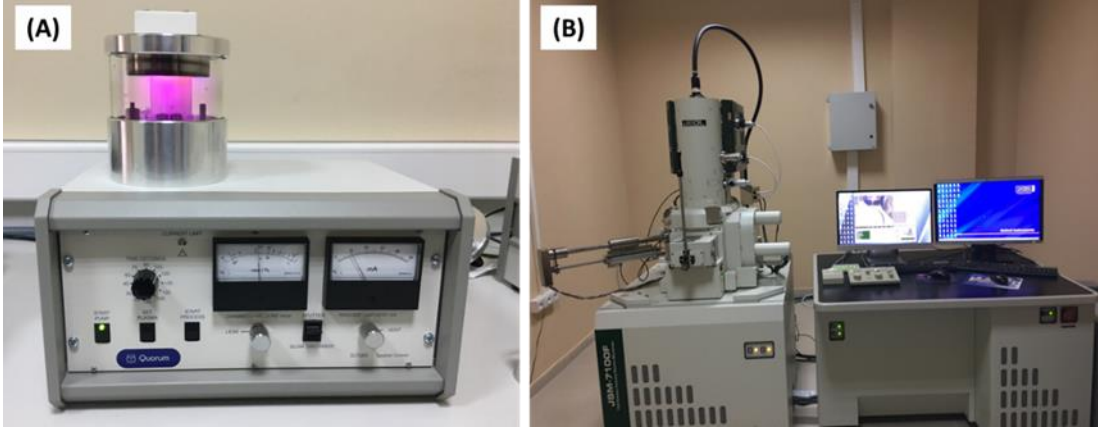
gerçekleşmesi için biyoiskelelere 1 saat boyunca 95 C°’ de degaz işlemi uygulanmıştır. 77 °K’ de nitrojen adsorpsiyon/yüzeyden salma eş sıcaklık eğrisi ve BET metodu kullanılarak yüzey alanı belirlenmiştir. Gözenek hacmi ise Barrett–Joyner–Halenda (BJH) metodu uygulanarak tayin edilmiştir.



Şekil 14. (A) Degaz ünitesi (B) BET cihazı

3.2.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX)

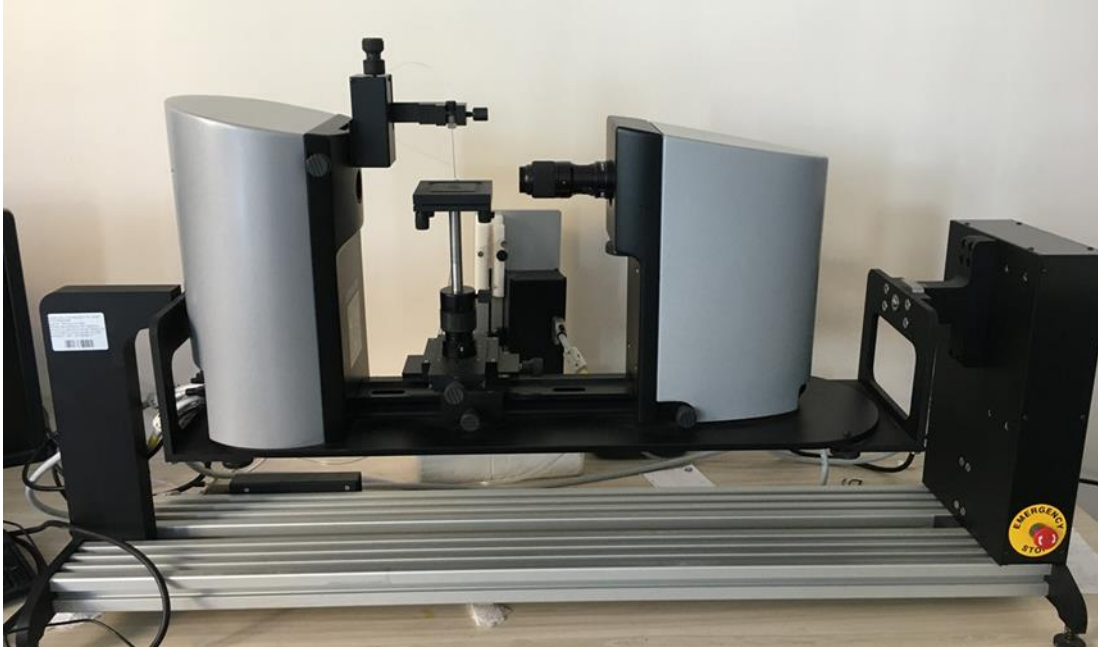
Çapraz bağlı çift tabaka biyoiskelenin hem kemik hem müsilaj katmanlarının yüzey morfolojisini gözlemlemek ve çift tabaka biyoiskelenin kesit kalınlığını belirlemek amaçlı SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japonya) analizi yapılmıştır. Ayrıca yapıda mevcut olan elementlerin nicel ve nitel tayini için EDX analizi gerçekleştirilmiştir. Biyoiskelelere iletken özellik kazandırmak amaçlı analiz öncesi 90 saniye boyunca bir mini püskürtmeli kaplayıcı tarafından (SC7620, Mini Sputter Coater, İngiltere) Au (%80) – Pd (%20) ile kaplanmıştır (Şekil 15). Numunelerin görüntüleri yüksek vakum altında, 10 kV gerilimde ve farklı büyütme oranlarında alınmıştır.



Şekil 15. (A) Au-Pd kaplama işlemi (B) SEM üniteleri

3.2.13. Temas Açısı Belirleme Analizi

Çift tabaka iskeleyi meydana getiren kemik ve müsilaj katmanlarının yüzey gerilimini ve sıvılara karşı hidrofilik özelliğinin belirlenmesi için temas açısı ölçümü yapılmıştır (KSV Attension Theta Lite Optical Tensiometer, ABD) (Şekil 16). Analiz 30 saniye boyunca ve saniyelik görüntü sayısı 12 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tabakalara damlatılan sıvı miktarı 3 μ l olacak şekildedir.



Şekil 16. Temas açısı cihazı

3.2.14. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

DSC, termal analitik bir yöntemdir. Bu amaçla; müsilaj, kemik ve çift tabaka iskeleler için 20-400 C° sıcaklık aralığında, dakikada 10C° sıcaklık artışı olacak şekilde ve dakikada 20 ml N_{2(g)} gönderilerek analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 17) (4000 Series Differential

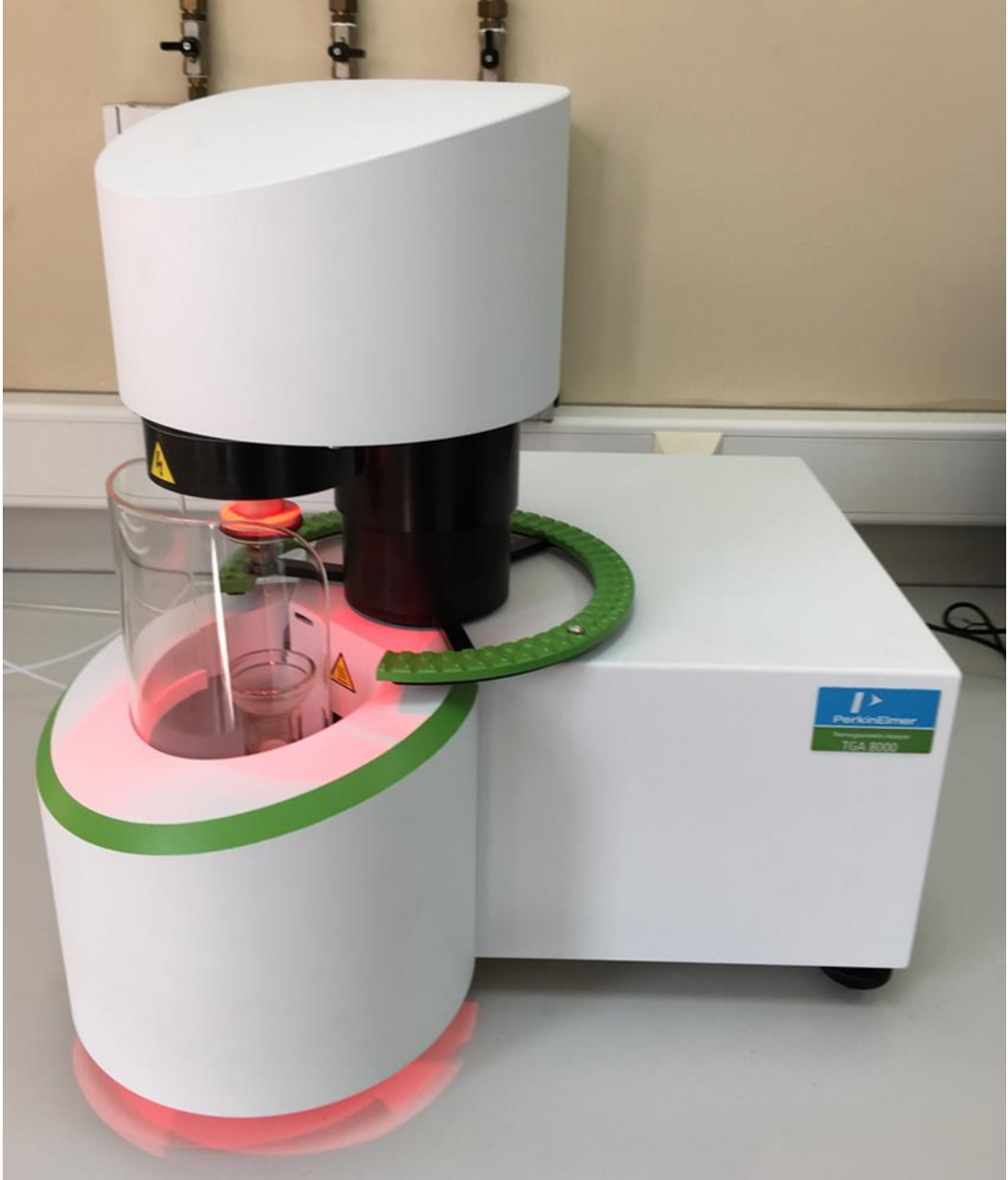
Scanning Calorimetry, Perkin-Elmer, Hollanda). Analiz öncesi yapılan numune tartımlarının en az 6 mg olmasına dikkat edilmiştir.



Şekil 17. DSC cihazı

3.2.15. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Çapraz bağlı kemik, müsilaj ve çift tabaka biyoiskelelerin, sıcaklık değişimine karşı kütledeki değişimleri belirlemek için termogravimetrik analiz yapılmıştır (Şekil 18) (TGA 8000™, Perkin Elmer, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz parametreleri; inert azot gazı altında (15 ml azot/dakika), 30-800 C° sıcaklık aralığında, dakikada 10 C° sıcaklık artışı şeklindedir.



Şekil 18. TGA cihazı ve analiz işlemi

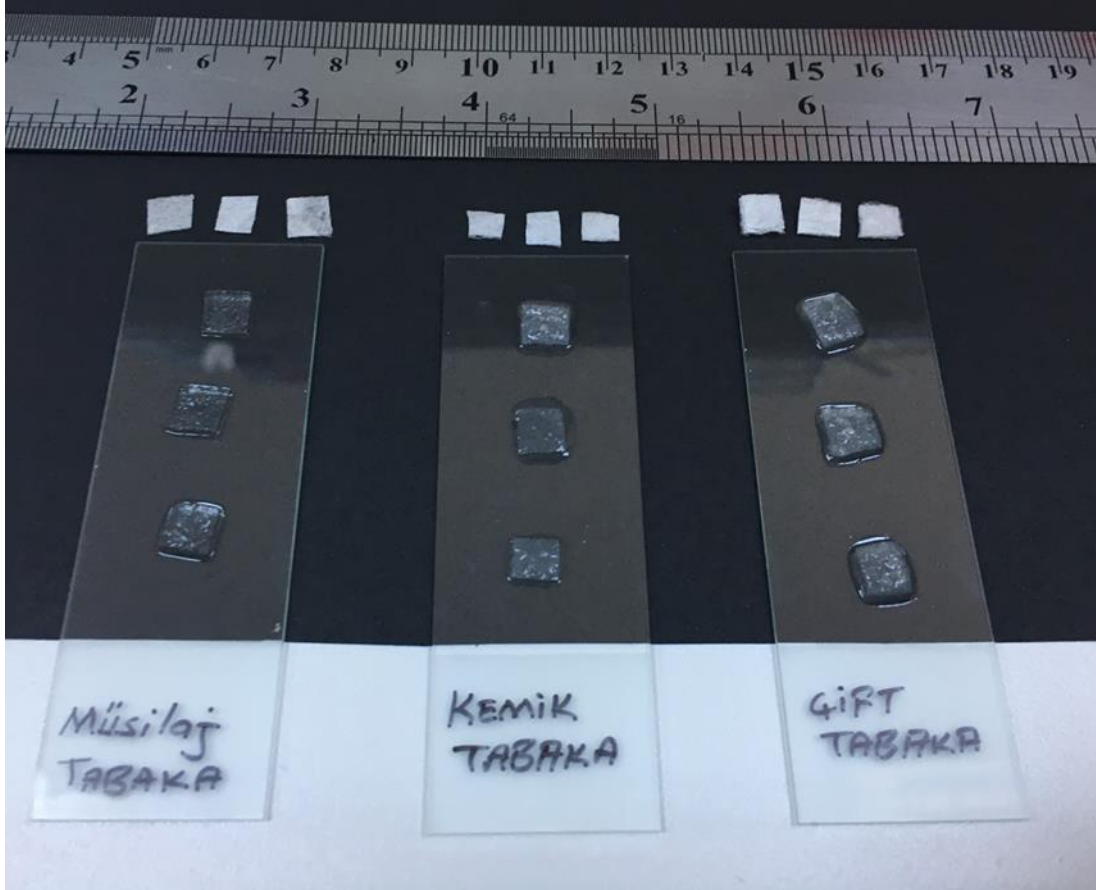
3.2.16. Şişme ve Sıvı Tutma Kapasitesi Belirleme Testleri

5x5 mm boyutlarında kesilmiş müsülaj, kemik ve çift tabaka biyoiskelelerin kuru kütleleri tartılmıştır (n=3).

Ardından 10 ml PBS numune kaplarına ilave edilmiştir ve PBS'nin net kütleleri tartılmıştır. PBS içerisine alınan biyoiskeleler 24 saat boyunca 37 C°'de etüvde bekletilmiştir. Daha sonra biyoiskelelerin şişme kapasitesini belirlemek amaçlı ıslak biyoiskelelerin kütlesi (Şekil 19), sıvı tutma kapasitesini belirlemek için ise numune kaplarında kalan PBS'nin net kütleleri ölçülmüştür. Şişme ve PBS tutma için uygulanan hesaplamalar aşağıdaki denklemlerde sırasıyla verilmiştir.

$$\frac{(\text{Islak K\u00fctle} - \text{Kuru K\u00fctle})}{\text{Kuru K\u00fctle}} \times 100 = \text{\u015fi\u015fme Oranı} \quad (3.4)$$

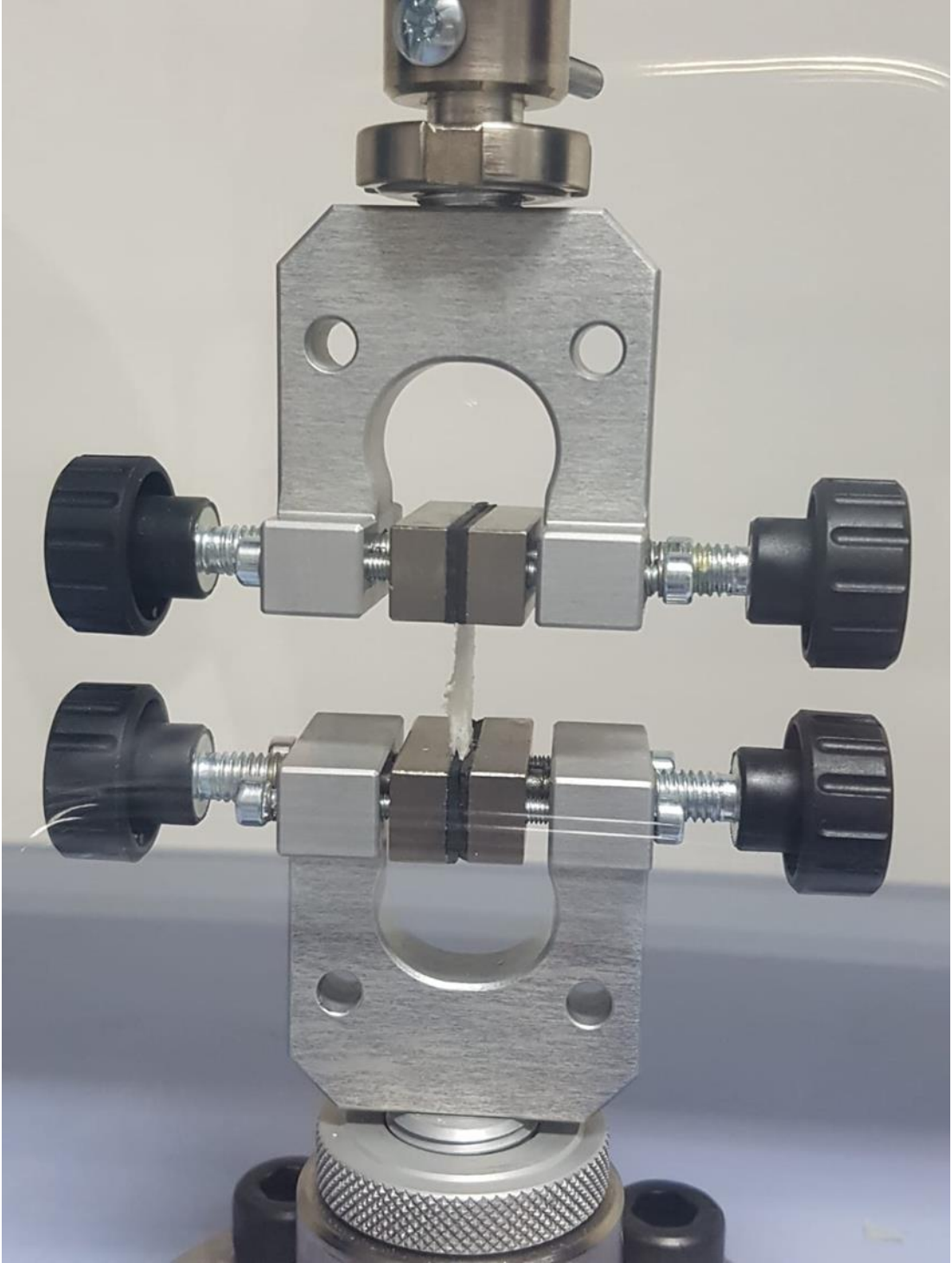
$$\frac{(\text{\u0130lk PBS Hacmi} - \text{Son PBS Hacmi})}{\text{Son PBS Hacmi}} \times 100 = \text{\u015fi\u015fme Oranı} \quad (3.5)$$



Şekil 19. Biyoiskelelere uygulanan şişme ve sıvı tutma testleri

3.2.17. Mekanik Test Analizi

Mekanik test analizi; ÇKB'nin ve onu oluşturan m\u00fcsilaj ve kemik katmanlarının \u00e7ekme dayanımını \u00f6l\u00e7mek ama\u00e7lı ger\u00e7ekle\u015ftirilmi\u015ftir (Şekil 20) (AGS-X, Shimadzu Japonya). Sa\u011flık bir analiz i\u00e7in uygun numune uzunlu\u011fu 5mm ve \u00fczeri olarak belirlenmi\u015ftir.



Şekil 20. Biyoiskelenin analiz esnasındaki görseli

3.2.18. Biyobozunurluluk Testi

ÇKB'lerin biyobozunmalarını belirlemek amaçlı biyoiskeleyi oluşturan kemik jeli ve müsilaj katmanlarına ayrı ayrı 6 kuyucuklu hücre kültürü plastiği içerisinde enzimatik bozunma uygulanmıştır. Kemik ve müsilajdan oluşan biyoiskeleler için sırasıyla %0,01 Proteinase K (20mM Tris-HCl, pH:8 içerisinde) ve 1,5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Lizozim (PBS, pH:7.2-7.4 içerisinde) enzim çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir biyoiskele başına 2 ml enzim çözeltisi

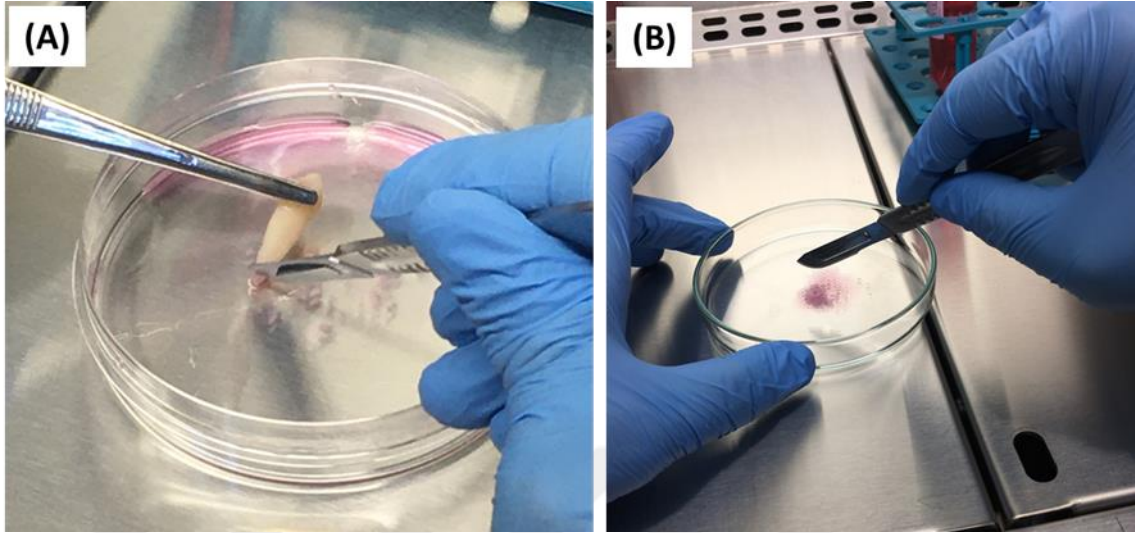
kullanılmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amaçlı enzim çözeltilerine %0,01 (g/mL) (sodium azid) ilave edilmiştir. Biyoiskelelerin başlangıç kütleleri tartıldıktan sonra 6 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine alınmıştır ve üzerlerine hazırlanan enzim çözeltileri ilave edilmiştir. Ardından biyoiskeleler 37 °C sıcaklıkta etüvde inkübe edilmiştir. Biyoiskelelerin bozunma takibi 3. ve 7. günlerde gerçekleştirilmiştir. Bu günler sonunda etüvden alınan biyoiskelelerin kütleleri tartılmış ve aşağıda belirtilen formülden yola çıkarak biyobozunurlulukları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ K\u00fctle Kayb\u0131} = \left(\frac{(\text{İlk K\u00fctle} - \text{Son K\u00fctle})}{\text{Son K\u00fctle}} \right) \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.19. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu

İzolasyon için 23 yaşında kadın bireyin sağlıklı premolar dişi, diş hekimi tarafından çekilmiştir. Alınan diş, hücre kültürü laboratuvarına transfer besi yeri (1 adet diş için 20 ml transfer besi yeri; %5 Pen./Strep. ve %95 DMEM High Glucose içermektedir) içerisinde en hızlı şekilde (yaklaşık 20 dakika) getirilmiştir. Temin edilen diş, laminer kabinde (Bio II Advance, Telstar, İspanya) bir petri kabı içerisinde 2-3 tur 1 ml PBS ile yıkanmış ve ardından bistüri yardımı ile periodontal doku diş üzerinden dikkatlice kazınmıştır ve kıyılmıştır (Şekil 21). Ardından 15 ml'lik tübe, bir diş başına %20 FBS içeren 3 ml %0,25'lik kollojenaz çözeltisi steril PBS içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti içerisinde alınan izole edilmiş periodontal dokular, 1 saat boyunca 37 C° de dinamik şekilde inkübe edilmiştir. Enzimatik sindirimi sonlandırmak amacıyla tüp içerisinde 10 ml tam besi yeri (%10 FBS, %1 Pen./Strep., %1 non essential amino acid, %1 L-Glutamine) eklenmiştir. Ardından 200 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir (NF1200, Nüve, Türkiye). Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpte kalan pellet üzerine 1 ml tam besi yeri ilave edilmiştir (homojen dağılım için naif bir şekilde pipetleme yapılır.) İçerisinde 6 ml tam besi yeri bulunan T25 hücre kültürü plastiği içerisinde izole edilen doku dikkatlice alınmıştır. T25, 37 C° sıcaklık, %5 CO2, %95 bağıl nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır (MCO-18 AC-PE, Panasonic, Japonya). Hücrelerin T25 de kapasiteyi doldurmasını önlemek için, T75 hücre kültürü plastiklerine geçiş yapılmıştır. Bu amaçla, T25 plastiğindeki besi yeri alınıp atılmıştır. Ardından hücreler PBS ile yıkanıp, tripsin enzimi ile plastik yüzeyine yapışan hücrelerin kaldırılması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra besi yeri ilave edilerek tüm ortam 15 ml falkon tüpe alınmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatantın atılmasından sonra, 1 tam besi yeri eklenip hücreler süspansiyon edilerek, T75 hücre kültürü plastiğine aktarılmıştır.

Hücreler, T75 hücre kültürü plastiği içerisinde tamamen çoğalana kadar gün aşırı besi yeri değiştirilerek kültüre devam edilmiştir.



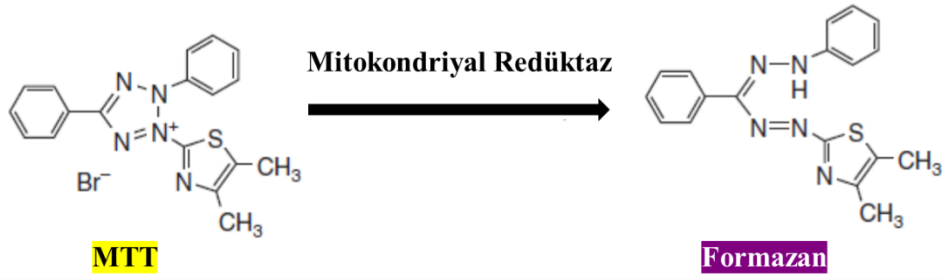
Şekil 21. (A) Periodontal dokunun diş üzerinden kazınması, (B) Ayrılan periodontal dokunun kıyılma işlemi

3.2.20. Çift Katmanlı Biyoiskelelerin İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri ile Hücrelendirilmesi

İlk olarak biyoiskelelere, laminar akışlı kabin içerisinde UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra biyoiskeleler 48 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine alınmıştır. Ardından, pasaj sayısı 4-6 olan iPDLF hücreleri 20.000 hücre/iskele yoğunluğunda biyoiskelelere ekilmiştir. Her bir biyoiskele üzerine 750 μ L tam besi yeri eklenmiş ve iPDLF hücrelerinin ekili olduğu biyoiskeleler %5 CO₂ ve %90 bağıl nem ve 37 °C koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Besi yeri gün aşırı yenilenerek kültüre 1. ve 3. günler olacak şekilde devam edilmiştir. Kültür tamamlandıktan sonra histokimyasal analizler için %10 Formalin, SEM analizleri için %2,5 glutaraldehit çözeltileri ile biyoiskeleler fikse edilip 4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.21. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Çift Katmanlı Biyoiskeleler Üzerindeki Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi

Substratın canlı hücreler tarafından kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık analizleri arasında, MTT testi güvenilir analizler arasındadır. MTT analizi, suda çözünür sarı MTT’nin mitokondriyal redüktaz etkisi ile çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülmesi prensibine dayanır (Şekil 22). Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon, 570 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenir.



Şekil 22. MTT testi kimyasal reaksiyonu (Kumar, Nagarajan, ve Uchil, 2018)

MTT analizi yapmak amaçlı ilk olarak ÇKB üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından biyoiskeleler 1 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir ÇKB üzerine 180 µl serumsuz besiyeri ve 20 µl MTT reaktifi içeren çözelti eklenmiş ve %5 CO₂ ve %90 bağıl nem ve 37 °C koşullarında 4 saat inkübe edilmiştir. Süre tamamlandıktan sonra biyoiskeleler üzerindeki çözelti tamamen uzaklaştırılarak her bir iskele üzerine 200 µl MTT çözücüsü (0,1 M HCl içinde hazırlanan susuz izopropanol) eklenmiştir. Ependorfa aktarılan biyoiskeleler 5 dakika boyunca mini spin yardımıyla ile spinlenmiştir. Oluşan mor renkli çözelti 96 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine alınarak 570 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Bu analiz kültürün 1. ve 3. günlerinde uygulanmıştır.

3.2.22. Histokimyasal Analiz

iPDLF hücrelerinin ekili olduğu ÇKB’lerin histokimyasal değerlendirilmesi H&E boyaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, tüm iskeleler %10’luk nötr tamponlu formaldehit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Ardından numuneler akan su altında yıkanmıştır. Daha sonra numuneler EtOH serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate olması sağlanmış ve parafine gömülerek 3-5 µm’lik kesitler alınmıştır. Ardından numunelerin tekrar hidrate olması için numunelerden parafin uzaklaştırılmıştır. Parafinin uzaklaştırılması amacıyla aşağıdaki işlemler takip edilmiştir:

I. Numunelerin kurutulması, lama tutunması ve parafinin giderilmesi amaçlı numuneler 15 dakika boyunca 55 °C’de etüvde bekletilmiştir.

II. Numunelerden parafinin tam anlamıyla giderilmesi amacıyla numuneler 5’er dakika süreyle ksilen ile muamele edilmiştir (Bu işlem iki defa uygulanmıştır).

III. Numuneler sırasıyla %100, %95 ve %70 alkol serilerinden geçirilmiştir. Daha sonra 10 dakika süreyle distile su ile muamele edilerek biyoiskelelerin tekrar su içeriği kazanması sağlanmıştır.

Son olarak numunelere H&E boyama protokolü uygulanmıştır.

3.2.23. Hücrelendirilmiş Çift Katmanlı Biyoiskelelerin SEM Analizi

iPDLF hücrelerinin ekili olduğu ÇKB'lerin yüzey morfolojisini ve bu hücrelerin biyoiskeleler üzerindeki davranışlarını (tutunma, göç, çoğalma) incelemek amaçlı SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizin yapılması amaçlı %2,5 glutaraldehit ile fikse edilmiş halde bulunan biyoiskeleler 30 dakika boyunca saf su ile yıkanmıştır. Ardından analiz edilecek biyoiskeleler 5 dakika boyunca sırasıyla %50, %70, %80, %90, %95 ve %100 EtOH serilerinden geçirildikten sonra oda sıcaklığında kurumaları amaçlı bir gece boyunca bekletilmiştir. Kurutulan biyoiskeleler 90 saniye olacak şekilde mini püskürtmeli kaplayıcı yardımıyla Au (%80) – Pd (%20) ile kaplanmıştır. Analiz yüksek vakum altında, 10 kV gerilimde gerçekleştirilmiştir (Numuneler stub üzerine kemik ve müsilaj tabaka olmak üzere iki farklı şekilde yerleştirilmiştir.).

3.2.24. İstatistiksel Analiz

Microsoft Office 365 Pro Plus Excel programı ile deneysel veriler ve verilerin standart sapmaları hesaplanmıştır. Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) kullanılarak aynı deney grubundaki gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, Tukey testi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak 0,05'ten küçük p değeri anlamlı kabul edilmiş ve anlamlılık derecelerini belirlemek için Prism'in sınıflandırma sistemi kullanılmıştır ($0,0001 < p < 0,001$ = son derece anlamlı (***) , $0,001 < p < 0,01$ = çok anlamlı (**), $0,01 < p < 0,05$ = anlamlı (*) ve $p > 0,05$ = anlamlı değil).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Ayva Çekirdeği Müsilajının Elde Edilmesi

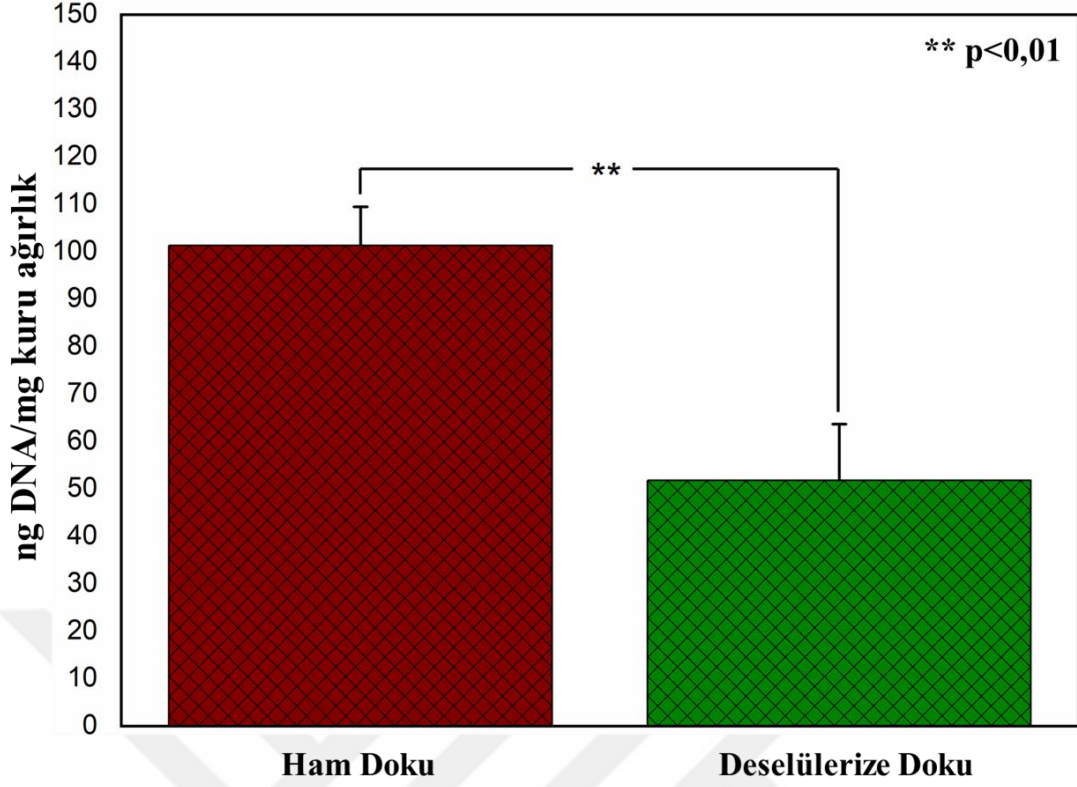
Çift katmanlı biyoiskelenin oluşturulması için ihtiyaç duyulan AÇM'nin elde edilme prosedürü Ekin 2020 ile yapılmış ve sonuç olarak ileri karakterizasyon adımları için başarılı bir şekilde ekstraksiyon sağlanmıştır (Şimşek, 2020).

4.2. Trabeküler Kemik İşleme Süreçlerinin Değerlendirilmesi

Yeni inşa edilen bir dokunun, alıcı organizmaya naklinden sonra, organizmanın bu yeni dokuyu kabul edebilmesi ve zaman içinde değişiklikler yaparak organizmaya ait bir yapı olarak değerlendirebilmesi için; işleme süreci esnasında içindeki birtakım biyolojik faktörlerin yok edilmesi/azaltılması (DNA miktarı, hücresel yapılar vb.) ve bir takım diğer faktörlerin de sabit tutulması gerekmektedir (HDM bileşenleri, sinyal molekülleri, mekanik özellikler vb.) (Arslan, Galata, Sezgin Arslan, ve Derkus, 2018). Çalışmamızda uyguladığımız trabeküler kemik demineralizasyon ve deselülerizasyon süreçleri, doku mühendisliğinin bu ilkeleri çerçevesinde uygulanmaya çalışılmıştır.

4.2.1. DNA İçerik Analizi Sonuçları

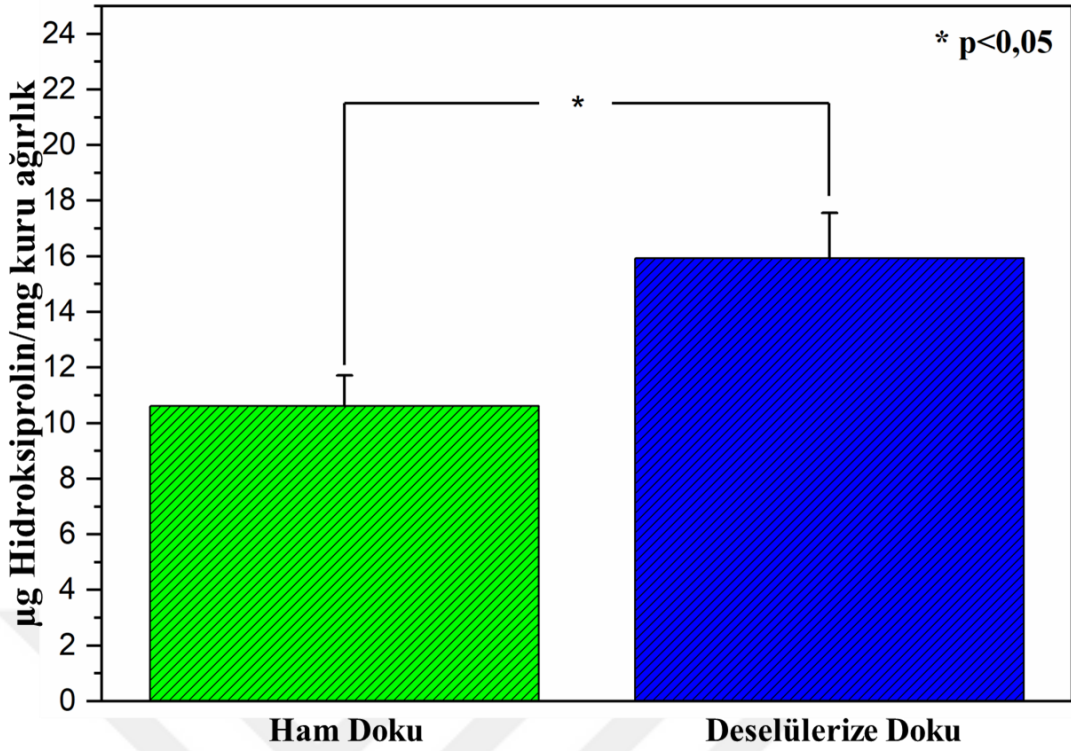
Doku mühendisliğinde kullanılacak farklı birey ve/veya canlı kaynaklı biyolojik materyaller (doku, organ vb.), uygulamada meydana gelebilecek immün tepkinin en aza indirgenmesi için donör canlıya ait hücresel materyallerin de minimize edilmesi gerekmektedir (Erten ve Arslan, 2018). DNA içerik analizi sonuçları ham ve deselülerize dokular için sırasıyla, $101,38 \pm 8,13$ ng DNA /mg kuru ağırlık ve $51 \pm 11,87$ ng DNA/mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur (n=3). Öte yandan ham doku ile deselülerize edilmiş doku arasında istatistiki olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,01$) (Şekil 23). Önceki çalışmalarda, 50ng/mg kuru ağırlığa kadar hücre arıtımı eşik değeri olarak değerlendirilmiştir (Crapo, Gilbert, ve Badylak, 2011). Çalışmamızdaki değerler, eşik seviyesini karşılamakta olup; başka bir deyişle, yeni doku rejenerasyonunun başlaması için gerekli olan immün yanıtı oluşturabilecek seviyededir. İmmün yangının belirli bir seviyede sağlanması doku yeniden inşa sürecini tetikleyecek biyolojik bir gerekliliktir (Badylak ve Gilbert, 2008).



Şekil 23. DNA içerik analizi grafiği

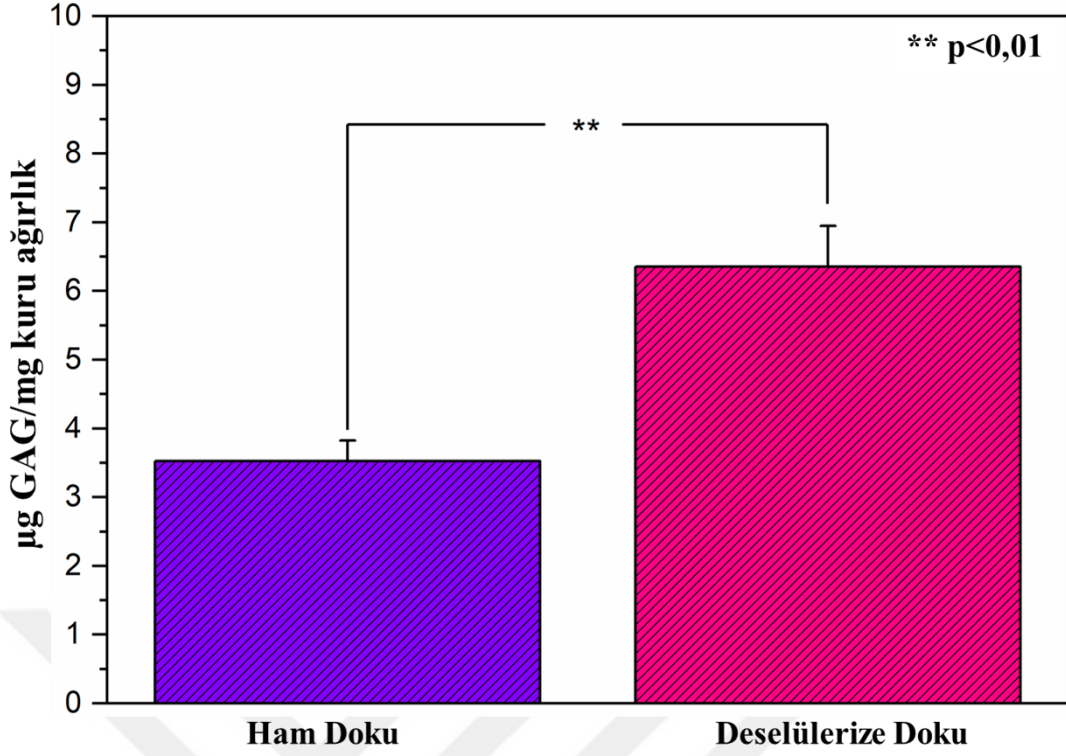
4.2.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçerik Analiz Sonuçları

Kemik dokusunun en önemli yapısal bileşenlerinden birisi de kollajendir (Chocholata, Kulda, ve Babuska, 2019). Kollajen tip 1 tüm proteinler arasında kemikte en çok bulunan proteindir ve %95 kadar çoğunluğu kaplayan kollejen tip 1 aynı şekilde hidroksiprolin açısından da zengindir (Zaitseva, Shandrenko, ve Veliky, 2015). Kollajenin kemik dokusundaki ana işlevleri arasında, dayanıklılık, kemotaksis, hücre adhezyonu ve direkt doku gelişimine etki etmek olarak da gösterilmektedir (Kusindarta ve Wihadmadyatami, 2018). Bu bilgiler ışığında, hidroksiprolin içeriğinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında korunması istenen bir yapı olup, özellikle deselülerizasyon sürecinde eksilmemesi arzu edilen bir bileşendir (Erten, Sezgin Arslan, Derkus, ve Arslan, 2016). Çalışmamızda elde edilen hidroksiprolin analiz sonuçları ham ve deselülerize doku için sırasıyla, $10,62 \pm 1,10$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık, $15,93 \pm 1,64$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiki olarak anlamlı bir fark göstermemişlerdir ($p > 0,05$) (Şekil 24).



Şekil 24. Hidroksiprolin içerik analizi grafiği

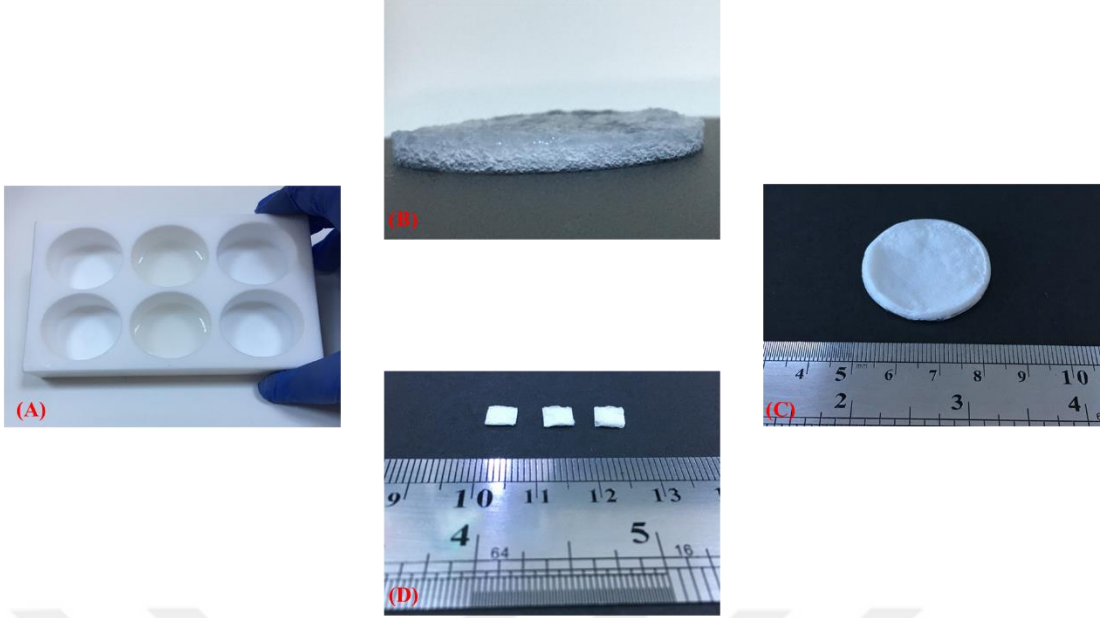
Hidroksiprolin ile birlikte bir diğer önemli bileşen ise glikozaminoglikandır. Kemik dokusunda da bulunmakla beraber, büyüme faktörleri üzerine ciddi bir rol üstlenmektedirler (K. Chen ve diğerleri, 2015; Hortensius ve Harley, 2013). GAG bileşenleri, osteojenik farklılaşma, hücre proliferasyonu gibi, kemik dokusu için hayati önem taşıyan biyolojik aktivitelerde ciddi katkılar sağlamaktadır (Chocholata, Kulda, ve Babuska, 2019). GAG içeriği de kemik doku mühendisliğinde korunması arzu edilen biyolojik bir bileşendir (De Witte, Fratila-Apachitei, Zadpoor, ve Peppas, 2018; Salih ve Thomas, 2013). Yapılan GAG analizleri sonucunda elde edilen ham doku ve deselülerize doku verileri sırasıyla, $3,53 \pm 0,30$ µg GAG/mg kuru ağırlık ve $6,35 \pm 0,60$ µg GAG/mg kuru ağırlık olarak ölçülmüş; istatistiki olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,01$) (Şekil 25). Deselülerizasyon süreci sonrasında ham dokuya göre anlamlı bir artış görülmesinin sebebi, ham dokuyu oluşturan hücresel materyallerin ve çözünebilir bileşenlerin (lipit vb.) prosedür esnasında dramatik olarak bozunması/uzaklaştırılması ile ilgili olabileceği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Özüdoğru, 2019).



Şekil 25. GAG içerik analizi grafiği

4.3. Çift Katmanlı Biyoiskele Üretimi ve Karakterizasyonu

Çift katmanlı biyoiskeleler, 6 kuyucuklu teflon kalıp içerisinde 1 mm yükseklik ve 3 cm çapında dairesel formda elde edilmiştir. Biyomalzeme karakterizasyonları ve *in vitro* çalışmalar için bu dairesel iskeleler, 5x5 mm boyutlara kesilmişlerdir (Şekil 26)



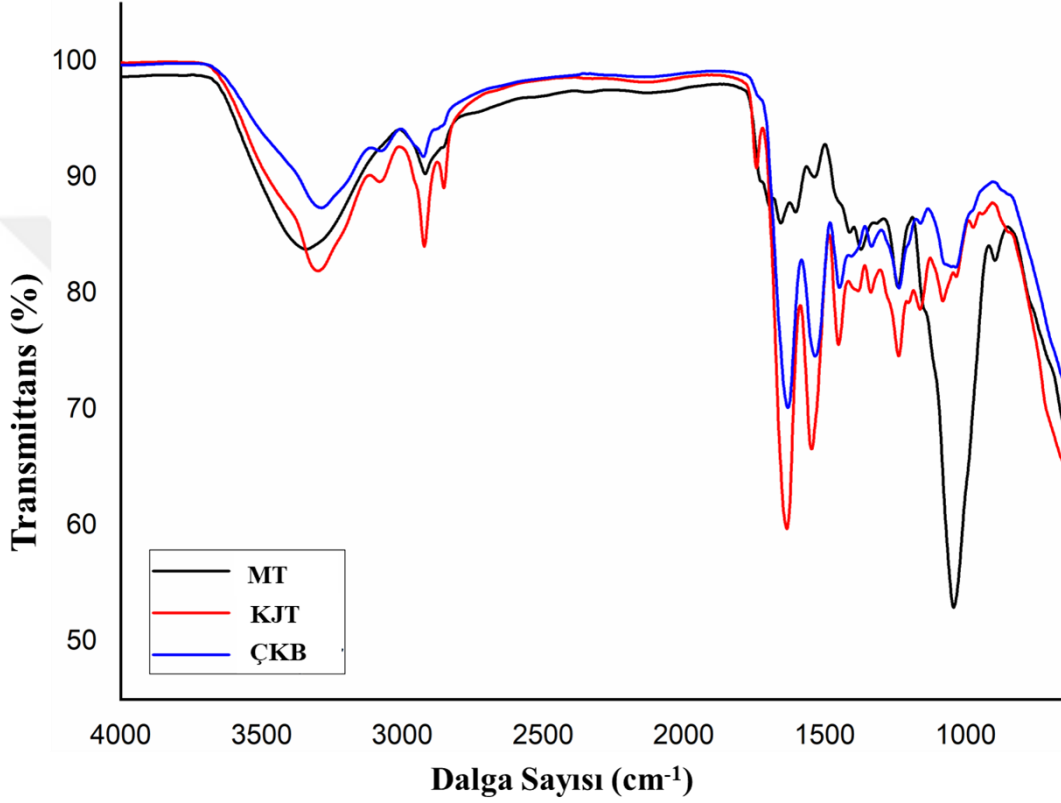
Şekil 26. Çift Katmanlı Biyoiskele Üretimi; (A) ÇKB'nin kalıplanması, (B) ÇKB'nin çapraz bağlı ıslak formu, (C) Çapraz bağlı ÇKB'nin liyofilize edilmiş formu ve (D) İstenilen boyutlara kesilmiş ÇKB

4.3.1. Fourier Dönüştürülmüş Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ÇKB ve onu oluşturan kemik jeli/müsilaj katmanları arasındaki kimyasal bağ ve fonksiyonel grup farklılıklarını ortaya koymak amaçlı ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Müsilaj tabakasını temsil eden polisakkarit parmak izi bölgesine ait pik 800-1200 cm^{-1} de görülmüştür. Bu bölgede söz konusu pik, spektrumda görüldüğü gibi (Şekil 27) müsilaj tabakası için şiddetli ve keskin, çift tabakalı biyoiskele için ise; zayıf bir pik olarak göze çarpmaktadır. Kemik tabakaya ait spektrumda, böyle bir pik gözlemlenmemektedir. Söz konusu aralık literatürde karbohidratlar için uygun aralıklarda olduğu görülmektedir (Can ve diğerleri, 2018; Şimşek, 2020). Söz konusu analizde, kemik dokusunda görülmesi beklenen GAG içeriğinden kaynaklı titreşim literatürde 1376 cm^{-1} olarak belirtilmiştir (Sanden ve diğerleri, 2019). Elde edilen spektrumlarda, kemik doku kaynaklı iskelenin spektrumunda 1381 cm^{-1} de GAG içeriğini temsil eden pik orta şiddette görülmüştür. ÇKB spektrumunda ise söz konusu pik zayıf olarak görülmektedir. Bununla birlikte, müsilaj içeriğinde söz konusu spektrumda pik mevcut değildir. (Şekil 27). ÇKB oluşturulabilmesi için kullanılan sıçan kuyruğu kaynaklı kollajen tip 1 içeriğini temsil eden pik 1600 cm^{-1} ile 1670 cm^{-1} spektrumları arasında gözlemlenmiştir (Şekil 27). Böylece, literatürde kollajen tip 1 için belirtilen pik 1660 cm^{-1} olarak belirtilmiş; bizim değerlerimiz ile örtüştüğü görülmüştür (Sanden ve diğerleri, 2019). Son olarak, çift katmanlı

biyoiskelenin başarıyla çapraz bağlandığı 2922 cm^{-1} civarında gözlenen piklerle görülebilmekte ve literatür ile bu veriler bağdaşmaktadır (León-Mancilla, Araiza-Téllez, Flores-Flores, ve Piña-Barba, 2016). Tüm spektrumlar ayrı ayrı ele alındığında, ÇKB'yi oluşturan her bir katmanın başarılı bir şekilde kendilerine özgü karakteristik özelliklerini gösterdiği ve bunun yanında ÇKB'nin geliştirilmesinde katmanlar arasında başarılı bir entegrasyon olduğu ATR-FTIR aracılığı ile ispatlanmıştır.



Şekil 27. ATR-FTIR analizi grafiği

4.3.2. Brunauer, Emmet ve Teller (BET) Analizi Sonuçları

Geliştirilen ÇKB'nin yüzey alanını belirlemek amaçlı BET analizi yapılmıştır. Yüzey alanı ve gözeneklilik, besin maddesi akışı için kanal görevi gördükleri ve yapı iskelesindeki hücrelerin büyümesi için geniş yüzey alanı sağladıklarından dolayı çok önemli bir özelliktir (Loh ve Choong, 2013). Yapılan analiz sonucu ÇKB'nin yüzey alanı $8.185\text{ m}^2/\text{g}$, gözenek hacmi ise 0.020 ml/g olarak bulunmuştur (Tablo 4). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği' nin (IUPAC) sınıflandırma sistemi göz önüne alındığında ÇKB'nin makro gözenek yapılı olduğu görülmektedir (Broekhoff ve de Boer, 1967).

Badhe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kitosan ve jelatinden ürettikleri çift katlı biyoiskelelerin yüzey alanı ve gözenek hacmi sırasıyla; $11.93\text{ m}^2/\text{g}$ ve 0.06 ml/g olarak

bulunmuştur. Literatür ile örtüşen sonuçlar dikkate alındığında, geliştirilen ÇKB'nin doku mühendisliği için uygun yüzey alanı ve gözenek hacmine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Badhe ve diğerleri, 2017).

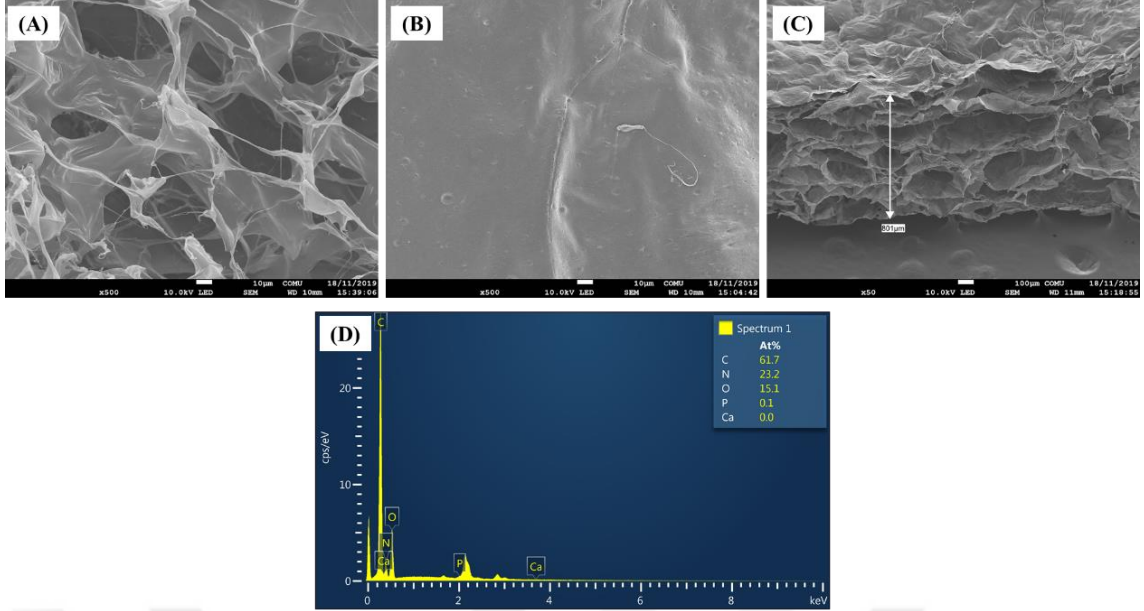
Tablo 4.

BET analizi sonuçları

İskele	Yüzey Alanı (m ² /g)	Gözenek Hacmi (ml/g)	Gözenek Boyutu
ÇKB	8,185	0,020	Makro Gözenek

4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Yayımlı X-Işını Analizi (EDX) Sonuçları

In vivo transplantasyondan önce *in vitro* kültürleme bir iskele üzerine hücre ekilmesi ile olabilir. İdeal iskeleler, hücrelerin HDM' ye tutunması, çoğalması ve farklılaşması için bir niş ve başlangıç desteği sağlar (Agrawal & Ray, 2001). Hücreler bir iskele yüzeyine yapıştığında, hücreler ve iskele arasında bir dizi fiziko-kimyasal reaksiyon meydana gelir. Bir doku mühendisliği iskelesi bir organizmaya transplante edildikten veya hücre kültürü ortamlarıyla temas ettikten hemen sonra, yüzeye protein adsorpsiyonu meydana gelir; hücre yapışmasına aracılık eder ve ayrıca hücre yapışması reseptörleri, özellikle integrinler aracılığıyla, hücreye sinyaller sağlar. Hücreler, doku mühendisliği iskelelerinin yüzeylerine yapışabilir ve sinyal, hücre dışı matriks birikimi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması için aktif bileşikler salabilir (Chang & Wang, 2011). Bu sebeplerden dolayı geliştirilen ÇKB'nin yüzey morfolojisini aydınlatmak amaçlı SEM analizi yapılmıştır. Yüzey analizleri sonucunda, elektron mikroskobu görüntüleri, ÇKB'nin karakteristik özelliklerini göstermiştir (Şekil 28). Bununla birlikte, ÇKB'nin kemik jeli kaynaklı biyoiskele katmanının kimyasal kompozisyonunu aydınlatmak için yapılan EDX analizi sonuçlarında, (Şekil 28) kemik dokusunda bulunan, inorganik bileşenlerin çoğunu oluşturan Ca ve P elementlerinin sonuçları sırasıyla, %0,0 ve %0,1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çerçevesinde, başarılı bir demineralizasyon yapıldığı gözlemlenmiştir (Galia ve diğerleri, 2011)



Şekil 28. Hüresiz ÇKB'nin SEM görüntüleri ve EDX analizi; (A) MT'nin SEM görüntüsü (500x), (B) KJT'nin SEM görüntüsü (500x), ÇKB kesitinin SEM görüntüsü (50x) ve (D) KJT'nin EDX analiz sonucu

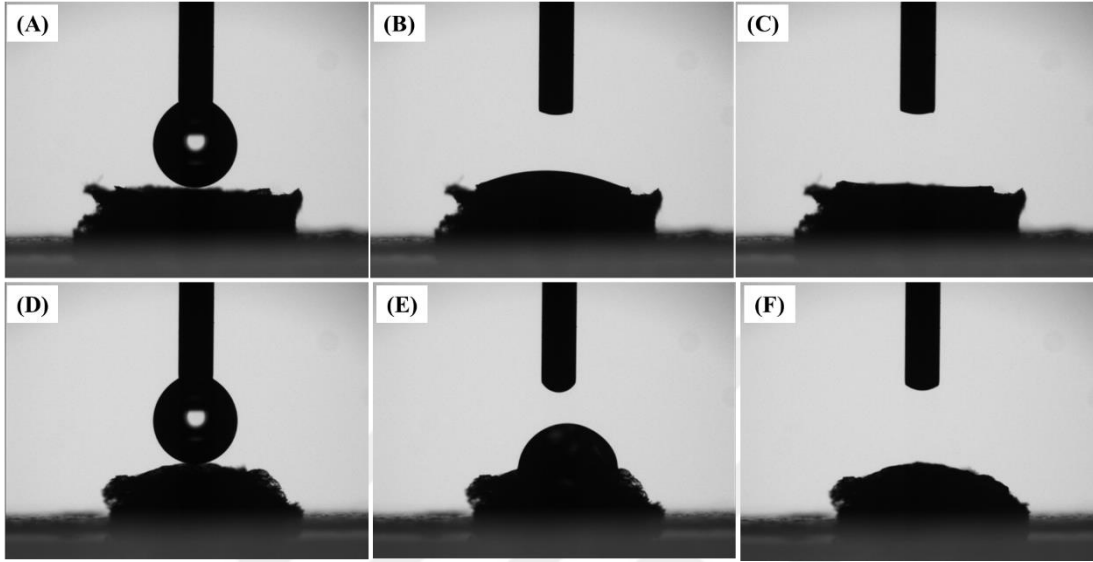
4.3.4. Temas Açısı Belirleme Analizi Sonuçları

Yüzey ıslanabilirliği, bir malzemenin belirli uygulamalarda kullanımının belirlenmesi için önemli özelliklerden biridir. Islanabilirliğin belirlenmesi, malzeme yüzey temas açısının ölçülmesine dayanır (Slepickova Kasalkova, Slepicka, Kolska, ve Svorcik, 2015).

Bir biyomateryalin *in vitro* biyoyumluluğu belirlendiğinde, esas olarak sertlik, yüzey yükü, kimyasal işlevsellikler, pürüzlülük ve ıslanabilirlik gibi kendi yüzey özelliklerine ve iskelenin bozunma ürünleriyle hücre etkileşimlerine bağlıdır. Bunun yanı sıra, kültür ortamı ve koşulları ile hücre tipi, hücrelerin davranışını modüle eden önemli parametrelerdir. Bir yüzeyin biyolojik ortamda kesin bir etkileşim mekanizmasının tahmini; vücut sıvılarının bileşimi (su, çeşitli proteinler) ve ayrıca hücrelerin sinerjistik etkileşimi, yüzey özellikleri bakımından ise hidrofobikliklerine veya hidrofilikliklerine göre ıslanabilirlik, bir biyomateryalin biyolojik tepkisini etkilemede önemli bir role sahiptir. Islanabilirlik özellikleri ile birlikte yüzey yükü, literatürde protein adsorpsiyonu ve hücre yapışmasını yöneten iki fiziksel konu olarak geniş bir şekilde yer almaktadır (Ferrari, Cirisano, ve Morán, 2019).

ÇKB'yi oluşturan kemik jeli-müsilaj katmanları için ayrı ayrı yapılan temas açısı belirleme analizinde; kemik katman 2,75-11,00 saniye aralığında (8,25 saniyede), müsilaj katman ise 1,17-1,75 saniye aralığında (0,58 saniyede) 3µl suyu tamamen emmiştir (Şekil 29). Süperhidrofilik yüzey; genel olarak bir sıvının (veya özellikle suyun) tamamen sıfır temas açısına yayıldığı yüzey olarak tanımlanır (Marmur ve diğerleri, 2017). Şekil 29'da da

görüldüğü gibi yüzeylere damlatılan su yüzeye tam olarak yayılmıştır (Şekil 29). Bu sonuçtan yola çıkarak ÇKB'nin süperhidrofilik bir biyomalzeme olduğu görülmüştür. Ayrıca su emme süreleri göz önüne alındığında müsilaj temelli yüzeyin, kemik jeli temelli yüzeyden daha hidrofilik olduğu söylenebilir.

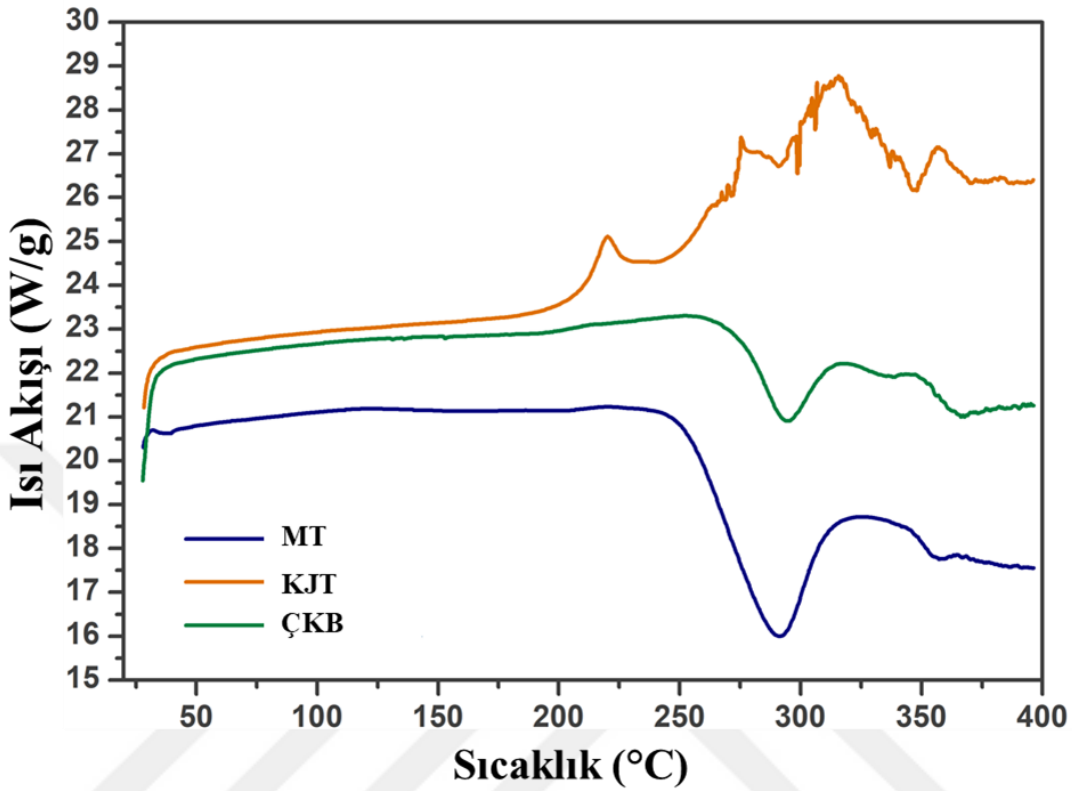


Şekil 29. Temas açısı analizi; (A), (B), (C) KJT'nin su emme süreci, (D), (E), (F) MT'nin su emme süreci

4.3.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

Kalorimetrik testler materyallerin termal özelliklerini ölçmek için kullanılan temel tekniklerden birisidir. Ayrıca, maddelerin sıcaklık ve spesifik fiziksel özellikleri arasında bir bağlantı kurmak için de kullanılabilir. Bu metot biyokimyada, biyolojide, hücre biyolojisinde, farmakolojide, biyoteknolojide ve kimyada kullanılmaktadır. Kalorimetrik yöntemler arasında en popüler yöntemlerden biri olan DSC analizi; lipid, karbohidrat, protein gibi biyolojik moleküllerin termal davranışlarını tespit etmek için kullanılmaktadır (Gill, Moghadam, ve Ranjbar, 2010). Şekil 30'da görüldüğü üzere müsilaj tabakaya ait 230 C° ve 330 C° aralığında gözlenen endotermik pik, karbohidrat yapıdaki müsilajın depolimerizasyonunu gösterdiği düşünülmektedir (Archana ve diğerleri, 2013) (Şekil 30). Kemik tabakaya ait termogramda ise, 190 C°-380 C° aralığında varlık gösteren ekzotermik pikler, kollajen bozunmasını temsil ettiği düşünülmektedir (Lozano ve diğerleri, 2003). ÇKB'nin ortaya koyduğu termogramda ise, grafiğin başlangıcında ısı akışına verdiği tepkinin aynı kemik tabaka gibi ekzotermik pik vermesi ve ilerleyen sıcaklıklarda müsilaj benzeri endotermik pik vermesi, bu biyomalzemenin termal bozunma açısından hem kemik

hem de müsilaj tabakalarının özelliklerini birleştirdiği, bununla birlikte TGA sonuçları ile uyum sergilediği görülmektedir.

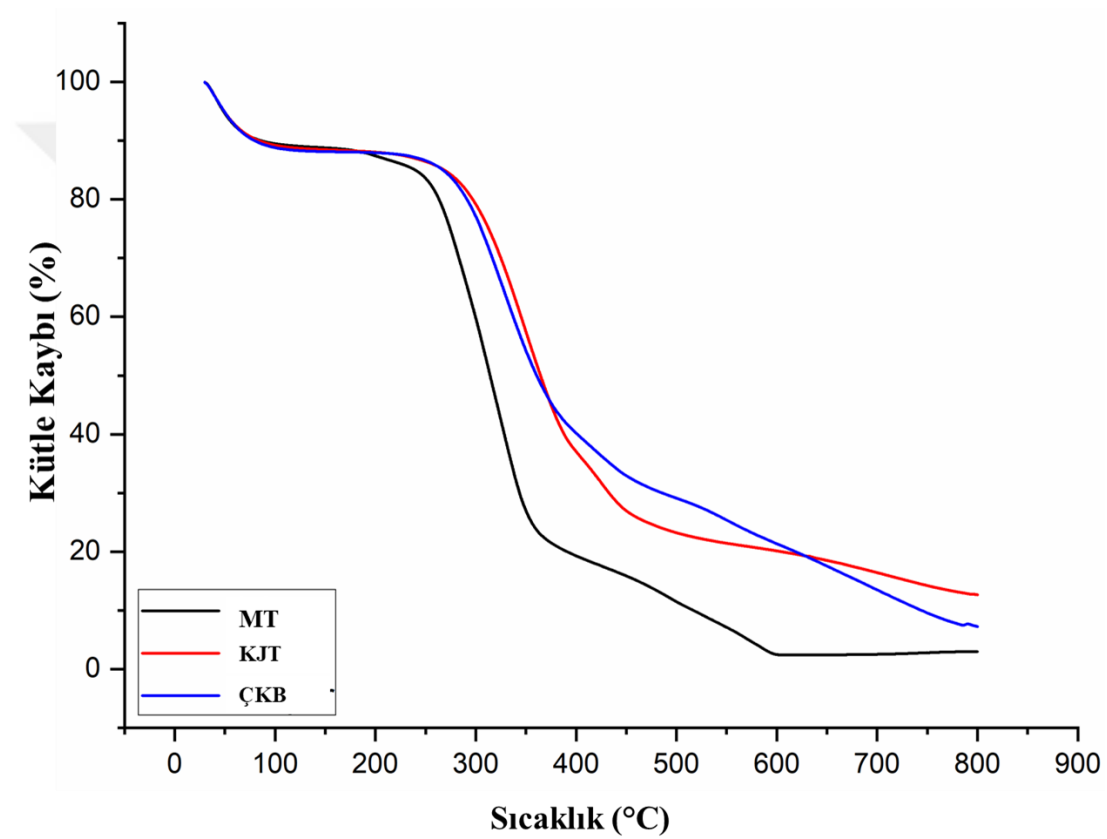


Şekil 30. DSC analizi grafiği

4.3.6. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları

Sıcaklık değişimine karşılık kütlede meydana gelen bozunmaları belirlemek amacıyla müsilaj, kemik jeli katmanları ve ÇKB için termogravimetrik analiz yapılmıştır. Termogramlar incelendiğinde (Şekil 31), müsilaja ait termogram için; 20-100 °C aralığındaki bozunma yapıda mevcut olan nemin uzaklaşmasına, ikinci bozunma basamağında ise 260-380 °C aralığında polisakkarit ayrışmasına yani yapının depolimerizasyonuna, son olarak 600 °C ve sonrası için ise yapının tamamen okside olduğuna karşılık gelen sonuçlar, literatürde benzer çalışmalara paralel olarak elde edilmiştir. (Singh ve Bothara, 2014). Kemiğe ait termogram incelendiğinde; 100 °C civarına kadar olan bozunma yapıdaki nemin uzaklaşmasından, 300-400 °C aralığındaki bozunma yapıda mevcut kollajen, kollajenöz olmayan proteinler ve hücre zarları dahil olmak üzere proteinlerin termal bozunmasından ve son olarak 450 °C ve sonrası için gözlenen bozunma matrikste mevcut inorganik içeriğin bozunmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (D. J. Lee ve diğerleri, 2014) ÇKB'ye ait termogram incelendiğinde ise müsilaj ve kemik jeli katmanlarına ait bozunmaların gerçekleştiği sıcaklık aralıklarına benzer aralıklarda

bozunduğu, hem müsilaj hem de kemik jeli katmanlarının özelliklerini taşıdığı görülmektedir (Şekil 31). Müsilaj, kemik jeli katmanları ve ÇKB için sırasıyla; 314,59°C’de %49,184, 349,99 °C’de %56,933 ve 331,09 °C’de %62,445 bozunma değeri bu çıkarımı desteklemektedir. Ayrıca analiz sonucunda başlangıç kütlelerinden kalan artık (kömürleşmiş) madde miktarı müsilaj, kemik jeli katmanları ve ÇKB için sırasıyla; %2,27, %12,55 ve %7 olarak bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar ışığında ÇKB’nin termal bir stabiliteye sahip olduğunu ve kendisini oluşturan katmanlar ile sağlıklı bir şekilde entegre olduğunu göstermektedir.

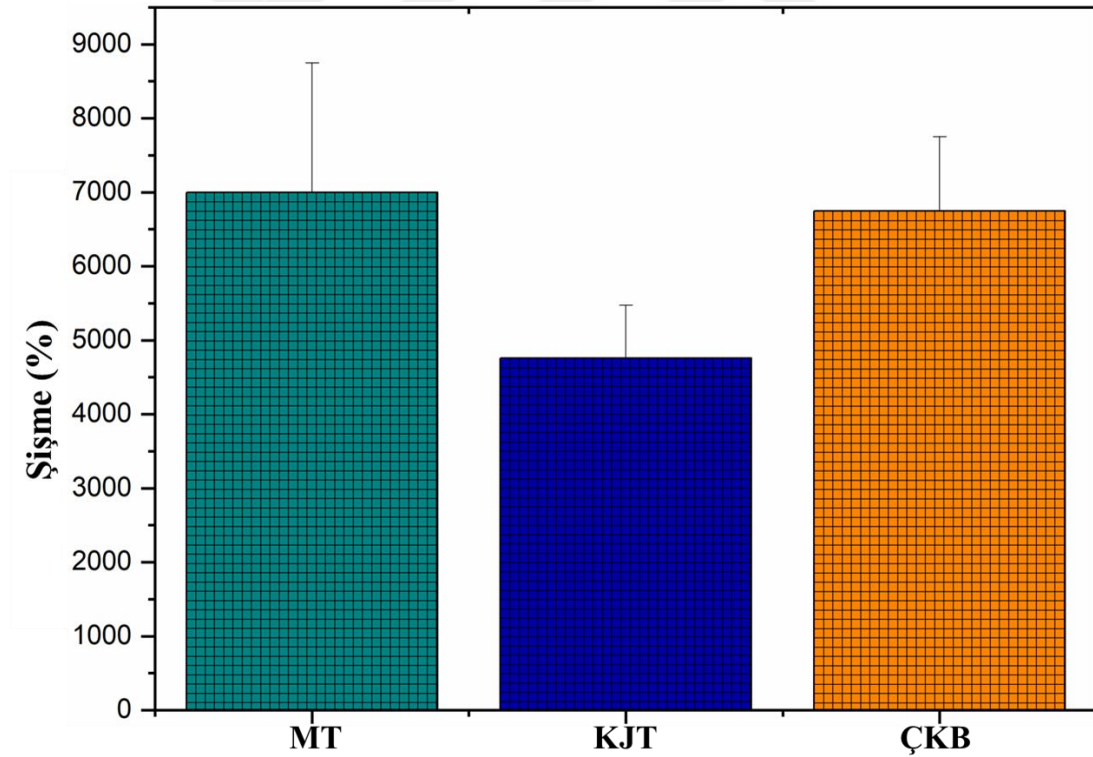


Şekil 31. TGA analizi grafiği

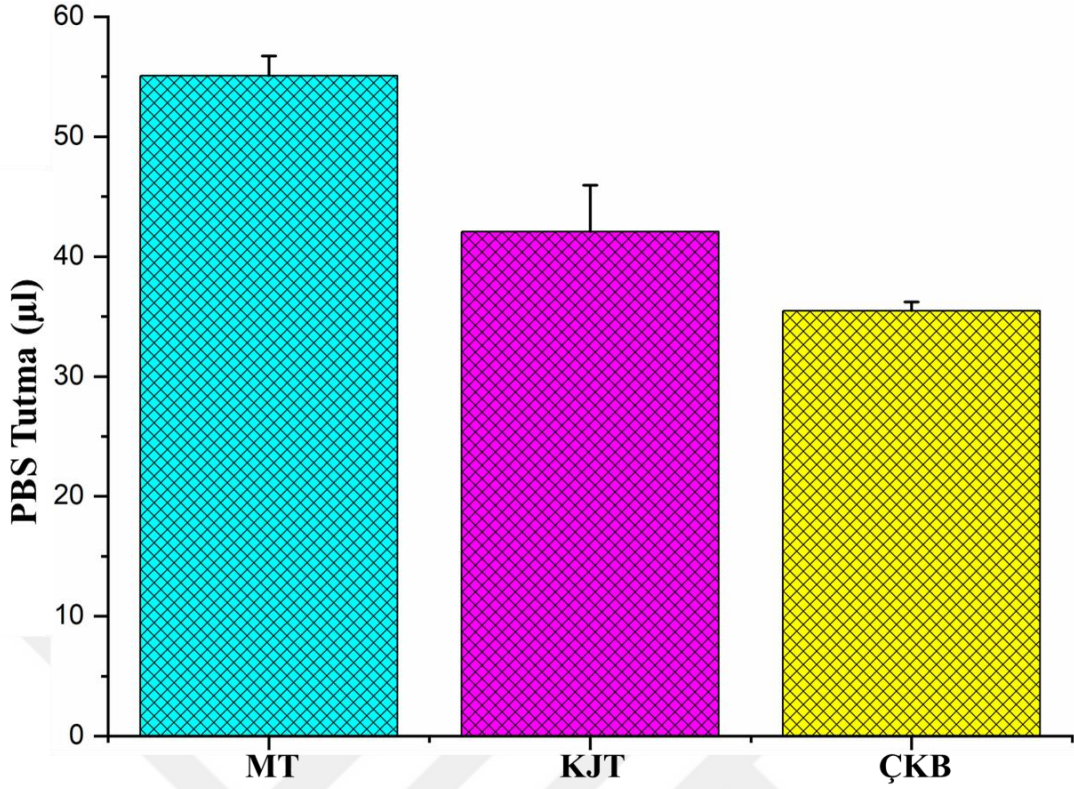
4.3.7. Şişme ve Sıvı Tutma Kapasitesi Belirleme Testi Sonuçları

Sıvı tutma ve şişme bir biyomalzemenin biyolojik konaklarında ikame edebilmesi için hayati önem taşımaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında sıvı mobilizasyonunun önemi başta hücrelere büyüme faktörleri sağlaması açısından önem arz ederken, biyoyumluluk için de bir faktör olarak değerlendirilebilmektedir. Zira malzemenin sıvı alımı ve salımı gözeneklilik çerçevesinde fikir verebilmekte, gözenekli yapının da hücrelere niş oluşturması adına önemli bir rolü bulunmaktadır (E.-J. Chung, Ju, Park, ve Park, 2015; Shimauchi, Nemoto, Ishihata, ve Shimomura, 2013). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara

göre müsilaj tabaka, kemik tabaka ve ÇKB için PBS sıvısı ile yüzde şişme oranları sırasıyla (n=3), % 6997,78±1750,18, % 4755,56±716,13 ve % 6746,30±1000,66; PBS tutma kapasitesi, 55,08±1,63 0181µl, 42,06±3,87µl ve 35,46±0,75 µl olarak belirlenmiştir. Şekil 32 de de görülebileceği gibi müsilaj tabaka, karbohidrat yapısı sebebi ile yüksek şişme yeteneğine sahip olduğu, kemik tabakanın ise görece kompakt yapısı nedeniyle daha az şişme eğilimi gösterdiği düşünülmektedir (Şekil 32). Bununla birlikte, ÇKB bileşenlerinden birinin müsilaj tabakaya ait olması hem tek başına müsilaj tabakaya göre düşük, hem de kemik tabakaya göre yüksek şişme oranı sergilemiştir. Öte yandan; PBS tutma yetenekleri açısından, müsilaj tabaka en yüksek oranıyla hem yüksek hacimli sıvı tutma kapasitesi hem de şişme oranı etkili olabileceği düşünülmektedir. Kemik tabakanın şişme testine nazaran yüksek görülen PBS tutma yeteneği, kemik tabakanın oldukça gözenekli yapısı sayesinde olduğu düşünülmektedir. Son olarak ÇKB'nin PBS tutma yeteneği diğer tabakalara göre nispeten düşük olması, her iki tabakaya göre gözeneklilik açısından kompakt yapıda olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 33).



Şekil 32. Şişme analizi grafiği

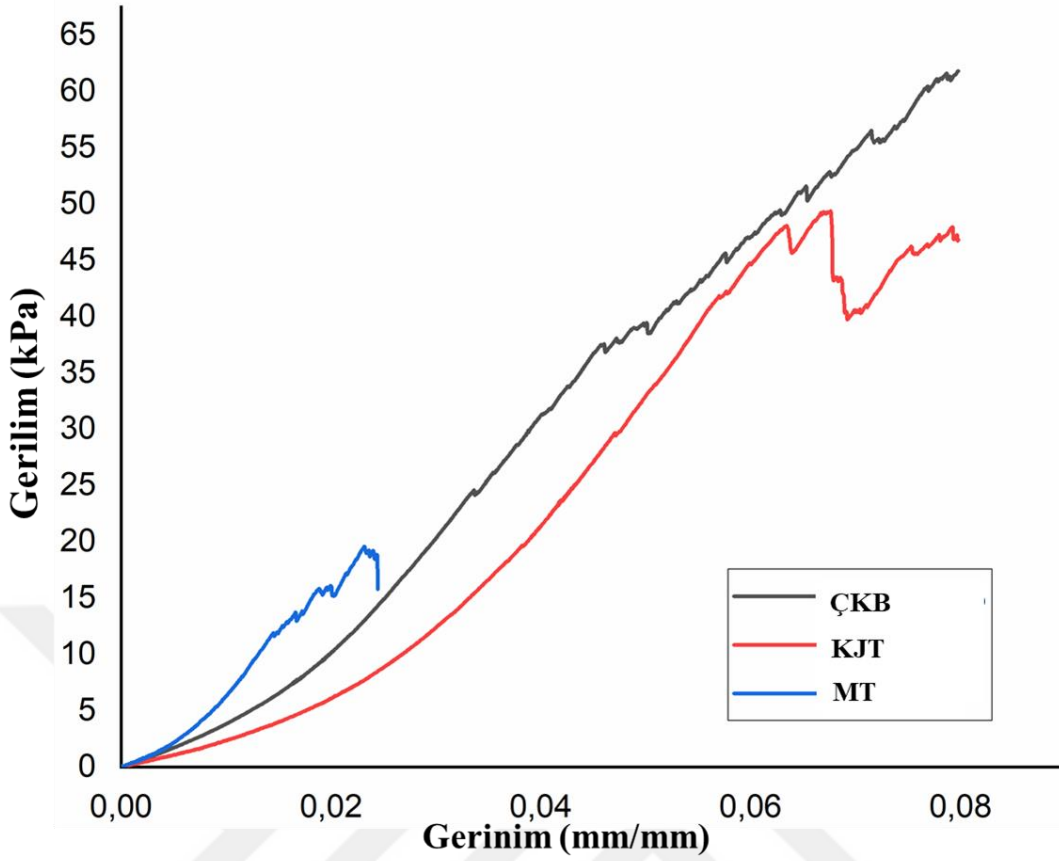


Şekil 33. PBS tutma analizi grafiği

4.3.8. Mekanik Test Analizi Sonuçları

Mekanik özellikler, iskelelerin imalatında dikkate alınması gereken temel faktörlerdendir. Mekanik mukavemet, implantasyon ve/veya transplantasyon sırasında iskele bütünlüklerini korumak için nihai bir zorunluluktur. Çünkü iskelelerin doğal doku veya organinkine yakın mekanik özelliklere sahip olması stresten kaynaklanan olası yan etkilerden kaçınılması anlamına gelir (Tran, Hamid, ve Cheong, 2018).

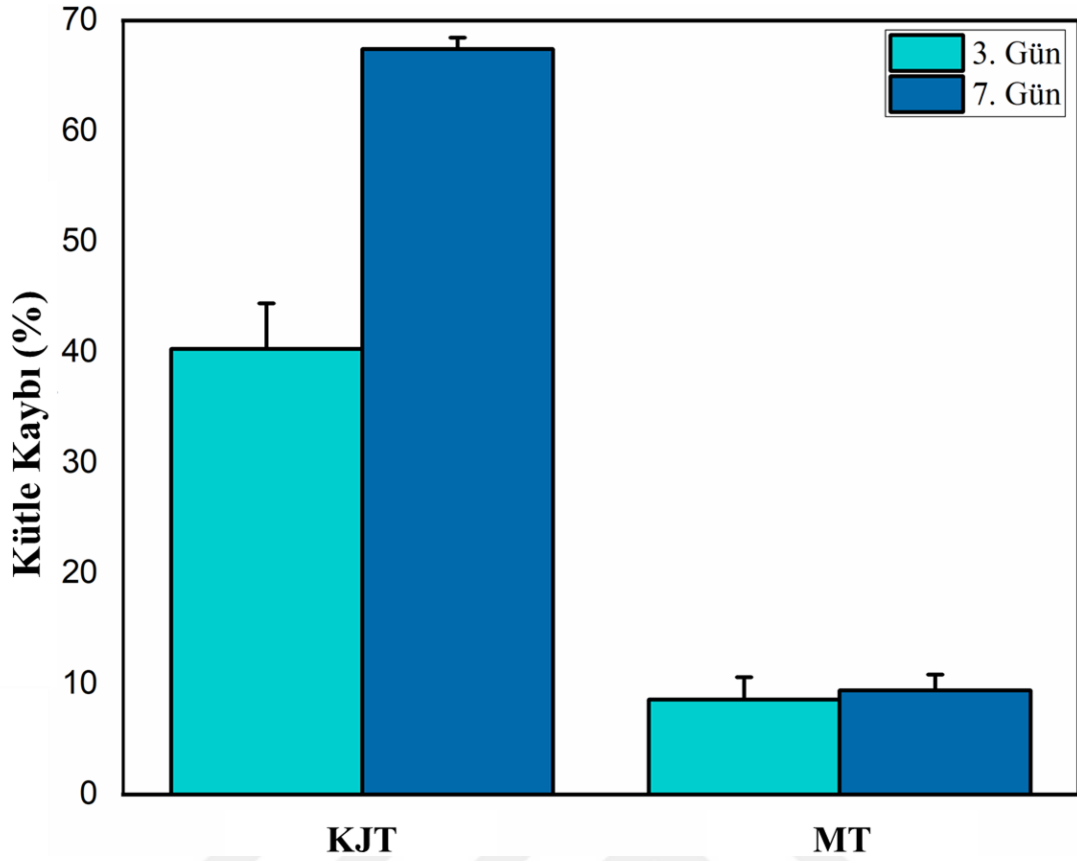
Müsilaj, kemik jeli katmanları ve ÇKB'nin değerlendirildiği çekme testi sonuçlarının grafiği Şekil 34'teki gibidir. Müsilaj, kemik jeli katmanları ve ÇKB için sonuçlar sırasıyla; 19,25, 49,33 ve 61,82 kPa'dır (Şekil 34). Bu sonuçlar ele alındığında çekme mukavemeti açısından en fazla dayanım gösteren ÇKB'dir. Bunun sebebi; kalınlık açısından ÇKB'nin (1,78 mm) müsilaj (0,81 mm) ve kemik jeli (1,18 mm) katmanlarından daha kalın olması olarak düşünülebilir. Literatür ile karşılaştırıldığında; ÇKB'nin, Chung ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada aljinat/galaktosillenmiş kitosan iskeleye göre, (43,5 kPa) mukavemetinin daha fazla olduğu; Zakhem ve arkadaşlarının çalışmasında yer alan iç lifli kitosan iskele (65 kPa) ile mukavemetinin örtüştüğü ve son olarak Gentleman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadaki kollajen fiber iskeleye göre (2900 kPa) ise mukavemetinin düşük olduğu görülmüştür (T. W. Chung ve diğerleri, 2002; Gentleman ve diğerleri, 2003; Zakhem ve Bitar, 2015)



Şekil 34. Mekanik test analizi grafiği

4.3.9. Biyobozunurluluk Testi Sonuçları

Biyobozunur iskeleler genellikle doğal dokuların mühendisliği için vazgeçilmez unsurlar olarak kabul edilir. Özellikle doğal HDM benzeri yapılar mekanik ve biyolojik özelliklere sahip geçici şablonlar olarak kullanılırlar. Biyolojik olarak fonksiyonel dokunun veya doğal HDM'nin rejenerasyonundan önce hücre yapışmasını, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını modüle ederler. Elde edilen HDM'nin hücreler tarafından yeniden düzenlenebilmesi ve doku rejenerasyonuna katkı sağlaması biyobozunurluluk ile ilişkilidir (Guarino ve diğerleri, 2014). ÇKB'yi oluşturan müsilaj ve kemik tabakalarına sırasıyla 3. ve 7. günler için uygulanan enzimatik bozunma süreçleri sonunda elde edilen % kütle kaybı verileri müsilaj tabaka için $8,59 \pm 2,01$ ve $9,39 \pm 1,46$; kemik tabaka için ise $40,31 \pm 4,12$ ve $67,41 \pm 1,05$ olarak elde edilmiştir (Şekil 35). Bu sonuçlar ele alındığında, bozunurluluk açısından farklılıkların sebebi; müsilaj ve kemik jeli tabakalarının farklı kaynaklardan elde edilmesi ve bu tabakalara uygulanan enzimlerin farklı aktiviteler göstermesi olarak düşünülebilir.



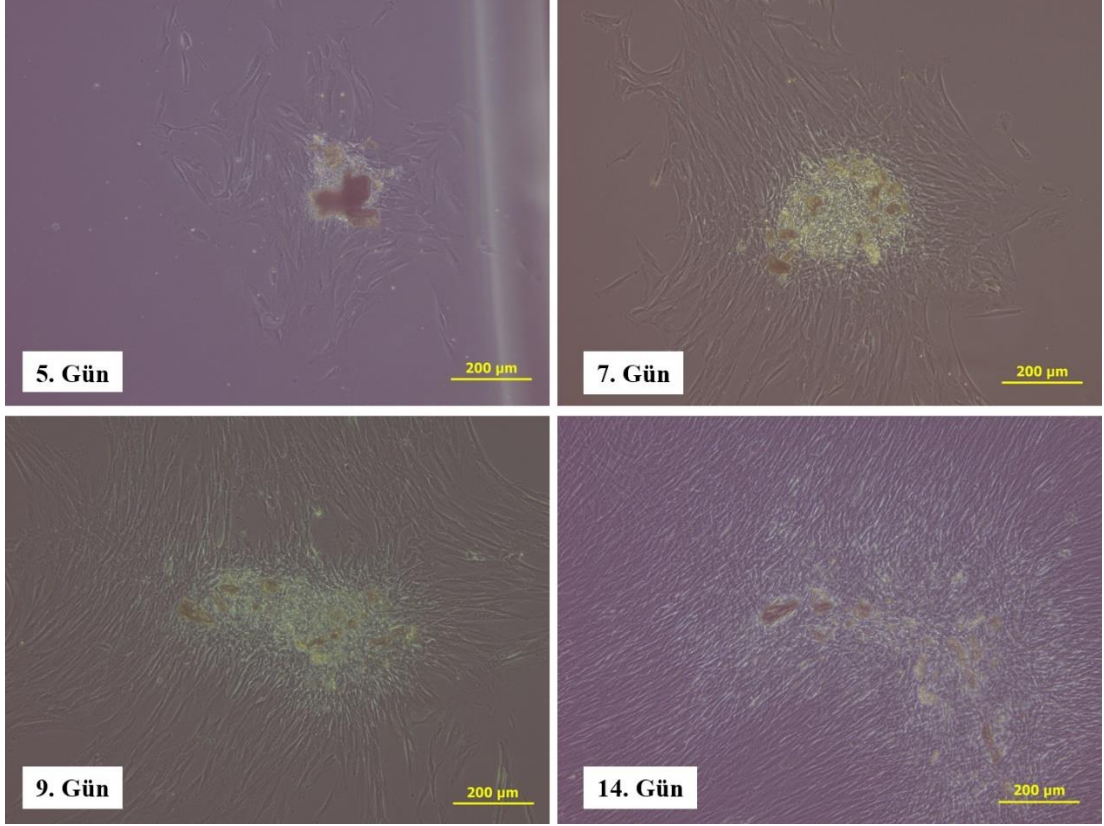
Şekil 35. Biyobozunurluluk testi grafiği

4.4. Çift Katmanlı Biyoiskele ve Hücre Etkileşimleri

Optimum şartlara en yakın ya da bu şartları sağlayabilen bir biyoiskele, hücrelere destek sağlamalı, niş oluşturmalı; büyüme, çoğalma, tutunma gibi hücrenin hayati fonksiyonlarını gerçekleştirmesine imkân sağlamalıdır. Aynı zamanda hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için iskelelerin yapısal olarak hücrelere yeterli boşluklar sunması ve hücreler arası ortamı oluşturabilmesi şarttır. Öte yandan, oluşturulan biyoiskelelerin içeriğinde ve/veya yüzeyinde hücre ölümlerine sebep olabilecek kimyasal ajanların, biyolojik faktörlerin ve fiziksel yapıların bulunmaması, sitotoksik etkilerden arınmış yapıda olması biyoiskele-hücre etkileşimlerinde son derece önemli nüanslardır (Erten ve Arslan, 2018; Sadeghi, Moztaizadeh, ve Aghazadeh Mohandesi, 2019). Bu bilgiler doğrultusunda, ÇKB'nin hücre etkileşimlerini incelemek için iPDLF izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, izole edilen hücrelerin biyomalzeme üzerindeki canlılıkları, etkileşimleri ve davranışları incelenmiştir.

4.4.1. İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu

İzolasyonu yapılan iPDLF hücrelerinin belirli günlerde hücre kültürü plastiğine tutunmalarının, çoğalmalarının ve morfolojilerinin takibi invert faz-kontrast mikroskop (Primovert, Zeiss, Almanya) ile yapılmıştır (Şekil 36).



Şekil 36. iPDLF hücrelerinin kültür esnasındaki mikroskopik görüntüleri (10x); 5. gün (A), 7. gün (B), 9. Gün (C) ve 14. gün (D)

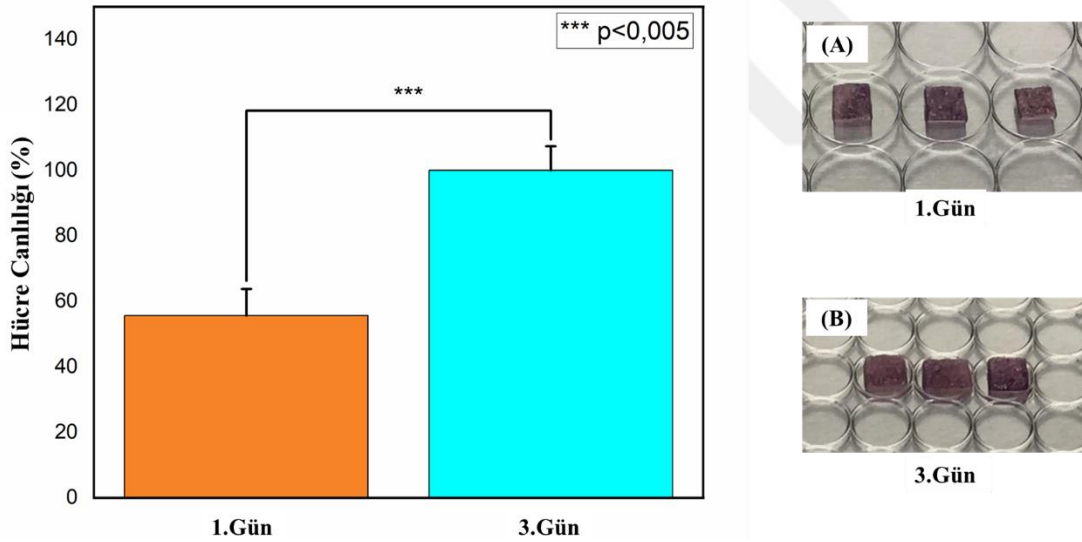
Fibroblast hücrelerinin kültürün ilk günlerinde düzensiz morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. İlerleyen günlerde hücrelerin karakteristik yapısı olan iğsi morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Farklı davranış sergileyen hücrelerin bazıları eksplanta bağlı kalmak suretiyle, süreklilik içinde büyümeler oluştururken, diğerlerinin çoğalmadan önce mesafe alarak göç ettikleri fotoğraflanmıştır (Şekil 36). Sonunda ayrık koloniler birbiri ile birleşerek daha büyük koloniler oluşturmuş; daha yakından incelendiğinde ise, birleşme noktasına ulaşılmadan önce yoğun oluşumlar ortaya çıkmış ve hücreler genellikle birbirine dik olarak (iğsi morfolojide) konumlanmışlardır. Gözlenen bu hücre aktivitelerinin, daha önceden yapılan benzer çalışmalarla uyum gösterdiği tespit edilmiştir (Adams, Soames, ve Searle, 1993). Ayrıca izole edilen hücrelerin morfolojileri Arslan ve ark. yaptığı çalışmada yer alan

iPDLF hücrelerinin morfolojileri ile açıkça benzerlik gösterdiği görülmektedir (Arslan ve Kantarcıoğlu, 2019).

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda iPDLF hücrelerinin başarılı bir şekilde izole edildiği ve kültürlendiği kanıtlanmıştır.

4.4.2. Hücrelendirilmiş ÇKB'nin Sitotoksosite Açısından Değerlendirilmesi

Pasaj sayısı 4-6 olan iPDLF hücreleri önceki tecrübelerimizden yola çıkarak, 20.000 hücre/iskele yoğunluğunda biyoiskelelere ekilmiş, ÇKB üzerindeki canlılığı ve davranışları incelenmiştir. Hücrelerin iskelelere ekilmesine müteakiben, 1. ve 3. günlerde hücre canlılığını belirlemek için MTT testi uygulanmıştır. $55,65 \pm 8,11$ ve $100 \pm 7,35$ oranları sırasıyla 1. ve 3. günler için belirlenmiştir (Şekil 37). 1. ve 3. günler arasında istatistiki olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,005$). Bu bilgiler ışığında ÇKB'nin hücre dostu bir yapıya sahip olduğu, sitotoksik etkilerden arınmış ve hücre proliferasyonunu destekleyen faktörleri içerdiği düşünülmektedir.

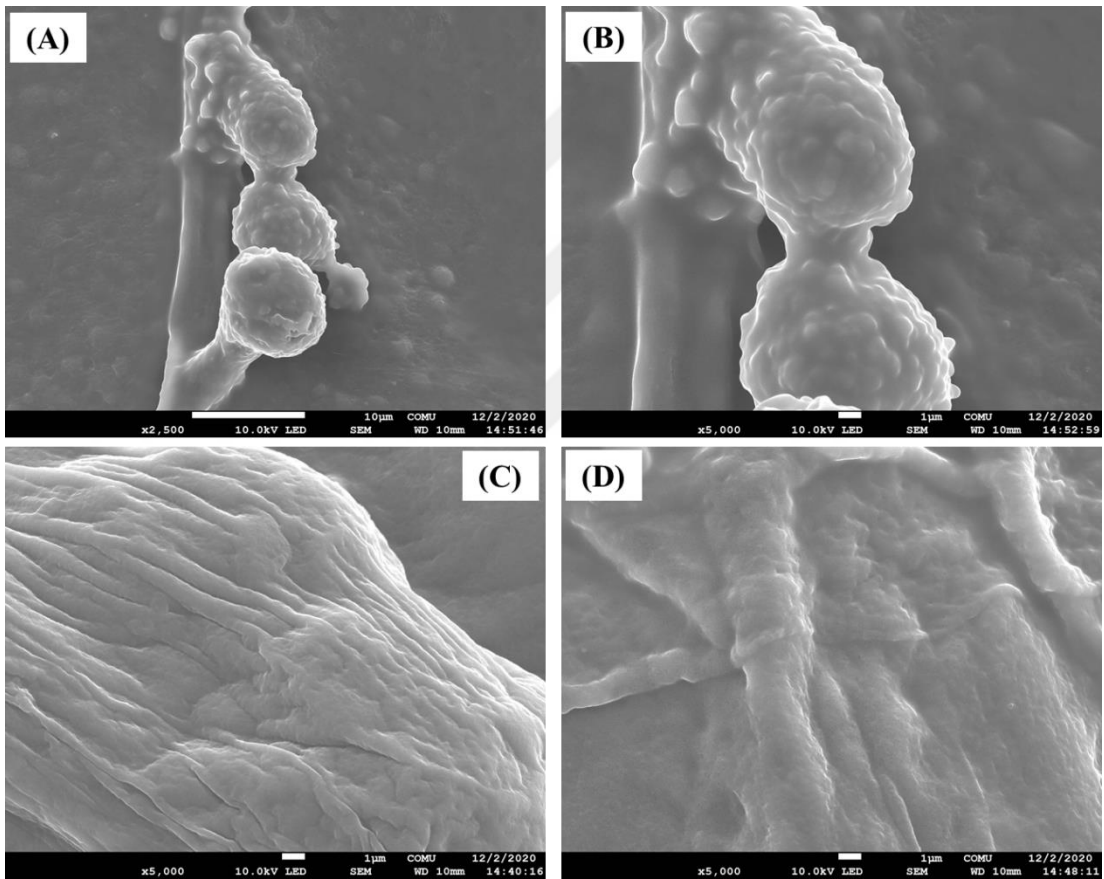


Şekil 37. iPDLF hücrelerinin 1. ve 3. günlerdeki canlılığı, iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerinde MTT reaktifi ile 1. gün (A) ve 3. gün (B) için boyanmış makro görselleri

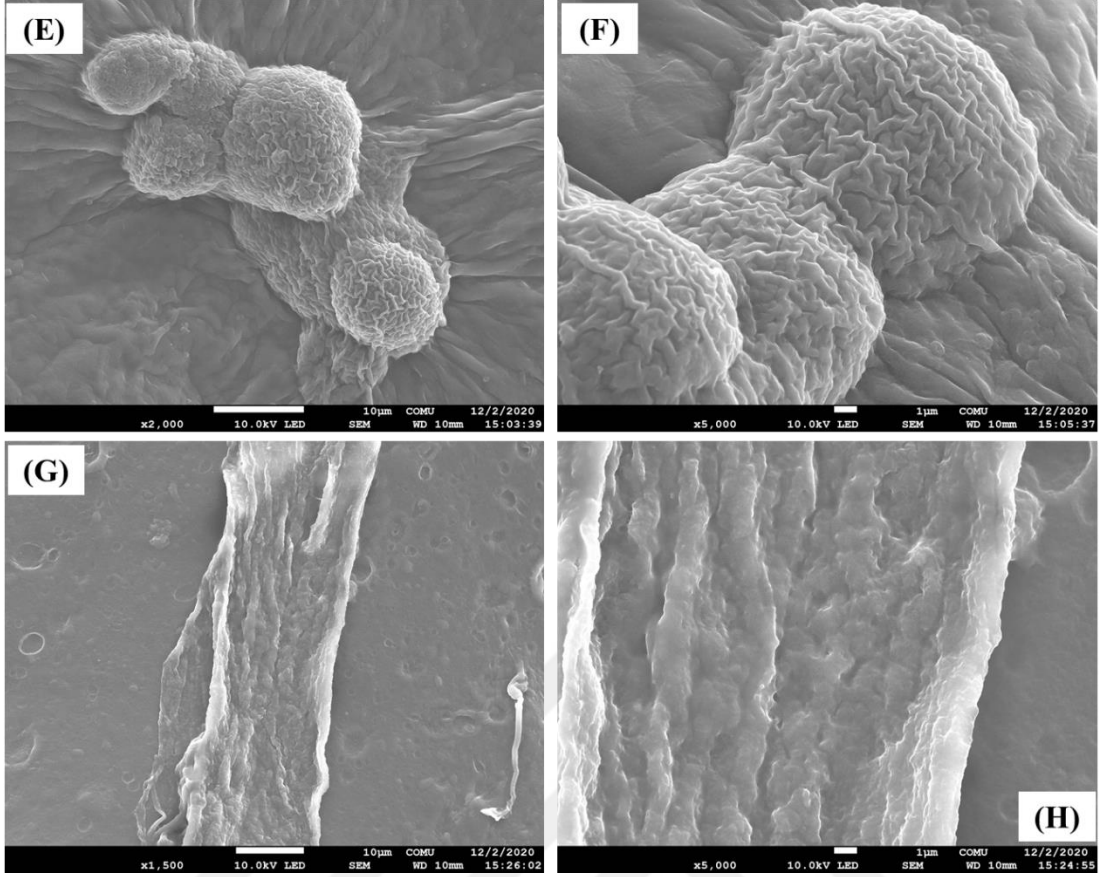
4.4.3. iPDLF Hücrelerinin ÇKB Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi

iPDLF hücrelerinin üretilen biyoiskeleler üzerindeki davranışlarının derinlemesine incelenmesi ve iskelelerin mikro mimari yapısını ortaya koymak için SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler ışığında, hücresiz müsülaj ve kemik tabakalarına göre, hücrelendirilmiş müsülaj ve kemik tabakaları arasında, hücrelerin tabakaların yüzeyini kaplamaları açısından, dramatik farklar gözlemlenmiştir (Şekil 38). Müsülaj tabakayı

oldukça yoğun kaplayan iPDLF hücreleri küresel yapıda gözlenmekteyken (Şimşek, 2020), kemik tabakayı yoğun kaplayan iPDLF hücreleri de ipliksi örtü yapıda gözlenmiştir (Arslan ve Kantarcıoğlu, 2019). Bu gözlemler literatürde daha önceden yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Gözenek boyutu dağılımları, gözenekler arasındaki ara bağlantılar, yüzey pürüzlülüğü gibi parametreler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için yararlı iskelelerin yapımında dikkate alınması gereken temel parametrelerdir. SEM mikrografları hem müsilaj ve kemik tabakaları hem de ÇKB ile ele alındığında, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılan iskelelerde ihtiyaç duyulan gözenekli yapıyı ortaya koyduğunu göstermektedir (Şekil 38).



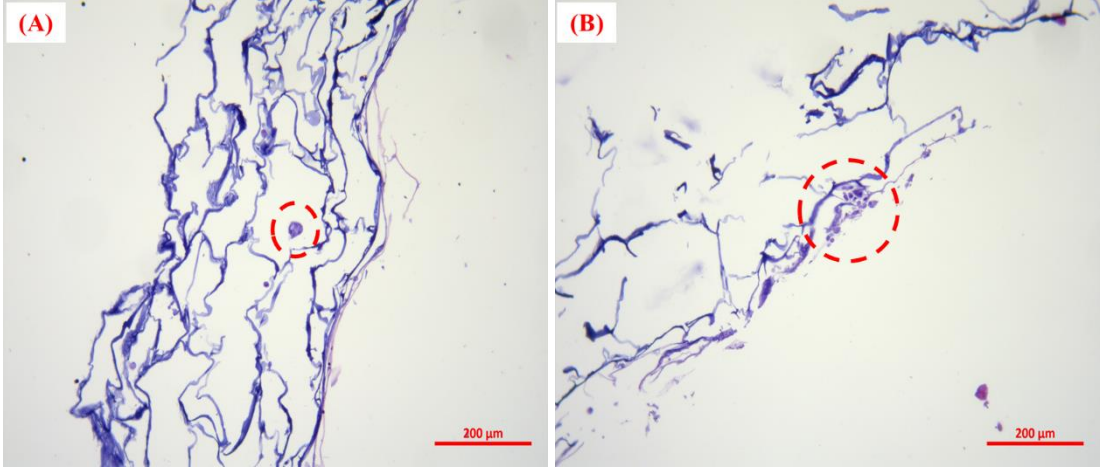
Şekil 38. iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerindeki davranışları gösteren SEM görüntüleri; 1. güne ait (A) ve (B) MT, (C) ve (D) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 3. güne ait (E) ve (F) MT, (G) ve (H) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir.



Şekil 38'in devamı iPDLF hücrelerinin ÇKB üzerindeki davranışları gösteren SEM görüntüleri; 1. güne ait (A) ve (B) MT, (C) ve (D) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir. 3. güne ait (E) ve (F) MT, (G) ve (H) KJT üzerindeki iPDLF hücrelerini temsil etmektedir.

4.4.4. Histokimyasal Analiz Sonuçları

HDM üzerindeki hücrelerin davranışlarını incelemek için H&E ile boyanmışlardır. Mikroskopik incelemeler sonucunda 1. günde oldukça seyrek dağılımlı fakat az sayıda olan hücreler bir arada görülürken; 3. günde ise ilk güne göre nispeten hücre sayısı artmış ve kümelenmiş olarak görülmektedir (Şekil 39). 1. ve 3. günler arasında mikroskopik incelemelerde de tıpkı MTT testi ve SEM analizlerinde elde edilen sonuçlarda olduğu gibi göreceli bir artış belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, hücrelerin ÇKB üzerinde büyüme ve çoğalma gibi fonksiyonları başarıyla sergiledikleri histokimyasal olarak görülmüştür.



Şekil 39. H&E boyama yapılan kesitlerin görüntüleri (10x); (A) 1. güne ait ve (B) 3. güne ait ÇKB'ye tutunan iPDLF hücrelerinin görüntülerini temsil etmektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Periodontal hastalıklar; diş eti ve dişleri destekleyen, diğer dokuları etkileyen iltihabi hastalıklardır. Erişkinlerde diş kayıplarının %70`inden periodontal hastalıklar sorumludur. Bu hastalıklar erken dönemde teşhis edildiklerinde kolay ve başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler. Diş eti hastalıklarının önlenmesi veya tedavisi; doğal dişlerin korunması, daha rahat çiğnemenin ve daha iyi bir sindirimin sağlanması gibi diğer faydaları da beraberinde getirir. Periodontal hastalıklar diş eti iltihabı ile başlar. Yani; gingivitis periodontal hastalığın erken dönemidir. Bu dönemde diş etleri kanamalı, kırmızı durumdadır ve hacim olarak büyümüştür. Erken dönemde çok fazla rahatsızlık vermeyebilir. Tedavi edilmezse hastalık periodontitise ilerleyerek diş eti ve dişleri destekleyen alveol kemiğinde geriye dönüşsüz hasar oluşturabilir. Periodontitis periodontal hastalıkların daha ilerlemiş bir safhasıdır. Dişleri destekleyen diğer dokularla birlikte alveol kemiğinde de hasar oluşur. Diş-diş eti arasında "periodontal cep" oluşur. Periodontal cep varlığı enfeksiyonun yerleşimini ve hastalığın ilerlemesini kolaylaştırır. Hastalık ilerledikçe dişler sallanmaya başlar, hatta dişlerin çekilmesine kadar gidebilir.

Hasar görmüş periodontal dokular gibi hastalıklı doku ve organların değiştirilmesi ve tedavisi için alternatiflere olan talep giderek artmaktadır. Klinik periodontolojide karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, kemik içi kusurlar, tahrip olmuş sement ve PDL gibi periodontal defektleri her zaman tedavi etmek ve yönetmek olmuştur. Periodontal rejenerasyon, hem yumuşak dokular (yani PDL) hem de sert dokular (yani, alveoler kemik ve sement) gibi hasarlı periodontal dokuları onarmayı amaçlamaktadır. PDL, sementum, alveolar kemik, diş eti bağ dokusu, diş eti epitelyumu ve ilgili tüm vaskülatür dahil bir periodontal lezyonun yeniden yapılandırılması için altı doku yer alır. Periodontal rejenerasyon, vücutta meydana gelen en karmaşık prosedürlerden biridir.

Periodontal doku mühendisliğinde, periodonsiyumun kendi kendine iyileşme kabiliyetini uyararak bir periodontal defektin yenilenmesi sağlanır. Bu nedenle; periodontal dokunun yeniden büyümesini kontrol etmek için dayanıklı bir matriks ile birlikte hücrelerin ve uyarıcı moleküllerin uygun dengesi gereklidir. Yeni kemik oluşumu için alanı korumak ve fonksiyonel rejenerasyon doku elde etmek için yumuşak diş eti dokusunun defektte büyümesini önlemek önemlidir. Rejenerasyon kabiliyeti, bahsedilen dokuların her biri için değişir. Örneğin alveoler kemik, orijinal dokuya benzer kemiği yeniden üretebilirken; sementum ve PDL'nin rejeneratif kabiliyeti çok sınırlı ve yavaştır.

Kemik greftlerinin kullanımı ve YDR gibi birçok rejeneratif tedavi tekniği belirlenmiştir. Ancak, başarı oranları zayıf ve sınırlıdır. Bu nedenle araştırmalar periodontal rejenerasyon için kök hücre temelli tekniklere yönelmiştir. Bununla birlikte, bu tekniklerin de sınırlamaları vardır. Örneğin; iskele dejenerasyonuna iltihaplanma, nekroz, kararsız transplante hücreler vb. neden olabilir.

Periodontal rejenerasyonda kullanım için, 3B gözenekli matrikslerin yapısı ve mekanik özellikleri, periodonsiyumun karmaşık yapısı dikkate alınarak uyarlanmalıdır. Ayrıca, hücre nekrozuna yol açan iskele orta bölgesinde besin bulunmaması durumunun önlenmesi için biyomalzemelerin ve gözenek büyüklüğünün optimum düzeyde olması gereklidir. Periodontal rejenerasyon için biyoaktif seramikler, biyobozunur polimerik kompozitler, allogreftler ve otogreftler dahil olmak üzere çeşitli biyomateryaller, oral dokulardan HDM'nin doğal bileşimine biyomimetik matrikslerin geliştirilmesi önemlidir.

Bu amaçla yapılan tez çalışmasında hem sert hem de yumuşak doku ile bağlantılı olan periodontal dokunun, geliştirilen ÇKB ile rejenerasyonu hedeflenmiştir. Ayva çekirdeğinin müsilağı ekstraksiyon işlemi ile elde edilmiştir. Kemik dokusu, ticari amaçlı kesimi yapılan sığırdan temin edilmiştir. Kemik dokusunun deselülerizasyonu Triton X-100 kullanılarak gerçekeştirilmiştir. Deselülerizasyon işleminden önce ve sonra ana matriks bileşenleri ve DNA miktarı; HP, GAG testleri ve çift sarmal DNA içerik analizi ile belirlenmiştir. Biyoiskelelerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, ATR-FTIR ile tayin edilmiştir. Yüzey alanını belirlemek amaçlı BET analizi yapılmıştır. Biyoiskelelerin yüzey morfolojisini aydınlatmak için SEM; yapıda mevcut olan elementlerin nicel ve nitel tayini için EDX analizleri yapılmıştır. Termal özelliklerin tayini amaçlı TGA ve DSC analizleri gerçekeştirilmiştir. Biyoiskelelerin ıslanabilirlik kapasiteleri şişme ve sıvı tutma testleri ile belirlenmiştir. ÇKB'nin biyobozunurluluk testleri enzimatik bozunma ile gerçekeştirilmiştir. ÇKB'nin hidrofilik özellikleri temas açısı analizi uygulanarak aydınlatılmıştır. Ham ve hücrelerinden arındırılmış kemik dokularının DNA içerik miktarı sırasıyla $101,31 \pm 8,13$ ve $51,79 \pm 11,87$ (ng/mg kuru ağırlık / n=3) olarak ölçülmüştür ve başarılı şekilde ham kemik dokusu hücrelerinden arındırılmıştır. Biyoiskelelerin yüzey alanı $8,185 \text{ m}^2/\text{g}$ belirlenmiştir. Alınan SEM görüntülerinde biyoiskelelerin *in vitro* çalışmaları için uygun yüzey morfolojisinde olduğu görülmüştür. Ayrıca mekanik test ile ÇKB'nin çekme dayanımı belirlenmiştir. şişme oranı $67,46 \pm 10,01$; sıvı tutma kapasitesi ise $35,46 \pm 0,75 \mu\text{l}$ olarak ölçülmüştür. Yapılan *in vitro* çalışmalarda; 20.000 hücre/iskele olacak şekilde iPDLF hücreleri ekilmiştir. Hücre canlılık seviyeleri 1. ve 3. gün olmak üzere MTT testi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre hücre canlılığının arttığı ve biyoiskelelerin hücreler için

sitotoksik etki göstermediği kanıtlanmıştır. Yapılan H&E boyama ve SEM analizi ile hücrelerin biyoiskeleler üzerinde tutunduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak; üretilen ÇKB'nin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yeni bir biyomalzeme olarak kullanım potansiyelinin olabileceği düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Adams, A. M., Soames, J. V., ve Searle, R. F. (1993). Cultural and morphological characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 38(8), 657–662. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(93\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(93)90004-6)
- Akman, A. C., Tiğli, R. S., Gumusderelioglu, M., ve Nohutcu, R. M. (2010). bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 92(3), 953–962. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32428>
- Archana, G., Sabina, K., Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Fayidh, M. A., Babu, P. A. S., Sivarajan, M., ve Sukumar, M. (2013). Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 89–94. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.062>
- Arslan, Y. E., Galata, Y. F., Sezgin Arslan, T., ve Derkus, B. (2018). Trans-differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells on decellularized bovine myocardial extracellular matrix-based films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(8), 127. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6135-4>
- Arslan, Y. E., ve Kantarcıoğlu, İ. (2019). Salvadora persica Extract-laden Jellyfish Collagen Hybrid Constructs for Periodontal Tissue Regeneration. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 6(1), 51–62. Erişim adresi: <https://doi.org/10.18596/jotcsa.484936>
- Babo, P. S., Reis, R. L., ve Gomes, M. E. (2017). Periodontal tissue engineering: current strategies and the role of platelet rich hemoderivatives. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(20), 3617–3628. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C7TB00010C>
- Badhe, R. V., Bijukumar, D., Chejara, D. R., Mabrouk, M., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., Kondiah, P. P. D., ve Pillay, V. (2017). A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1215–1225. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.095>
- Badylak, S. F., ve Gilbert, T. W. (2008). Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*, 20(2), 109–116. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>
- Bartold, P. M., Gronthos, S., Ivanovski, S., Fisher, A., ve Hutmacher, D. W. (2016). Tissue

- engineered periodontal products. *Journal of Periodontal Research*, 51(1), 1–15.
Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jre.12275>
- Bartold, P. Mark, McCulloch, C. A. G., Narayanan, A. S., ve Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24(1), 253–269. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240113.x>
- Basu, A., Rothermund, K., Ahmed, M. N., ve Syed-Picard, F. N. (2019). Self-Assembly of an Organized Cementum-Periodontal Ligament-Like Complex Using Scaffold-Free Tissue Engineering. *Frontiers in Physiology*, 10(APR). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00422>
- Behring, J., Junker, R., Walboomers, X. F., Chessnut, B., ve Jansen, J. A. (2008). Toward guided tissue and bone regeneration: Morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*, 96(1), 1–11. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10266-008-0087-y>
- Bright, R., Hynes, K., Gronthos, S., ve Bartold, P. M. (2015). Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 50(2), 160–172. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jre.12205>
- Broekhoff, J. C. P., ve de Boer, J. H. (1967). Studies on pore systems in catalysts. IX. Calculation of pore distributions from the adsorption branch of nitrogen sorption isotherms in the case of open cylindrical pores A. Fundamental equations. *Journal of Catalysis*, 9(1), 8–14. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/0021-9517\(67\)90174-1](https://doi.org/10.1016/0021-9517(67)90174-1)
- Bunyaratavej, P., ve Wang, H.-L. (2001). Collagen Membranes: A Review. *Journal of Periodontology*, 72(2), 215–229. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.2.215>
- Caddeo, S., Boffito, M., ve Sartori, S. (2017). Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(AUG), 1–22. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00040>
- Can, A., Ayvaz, H., Pala, Ç. U., Condelli, N., Galgano, F., ve Tolve, R. (2018). The potential of near and mid-infrared spectroscopy for rapid quantification of oleuropein, total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity in olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2747–2757.
Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9892-3>

- Carter, S. S. D., Costa, P. F., Vaquette, C., Ivanovski, S., Hutmacher, D. W., ve Malda, J. (2017). Additive Biomanufacturing: An Advanced Approach for Periodontal Tissue Regeneration. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 12–22. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1687-2>
- Chen, F. M., ve Jin, Y. (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(2), 219–255. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0562>
- Chen, K., Lin, X., Zhang, Q., Ni, J., Li, J., Xiao, J., Wang, Y., Ye, Y., Chen, L., Jin, K., ve Chen, L. (2015). Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 19, 46–55. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.020>
- Chocholata, P., Kulda, V., ve Babuska, V. (2019). Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*, 12(4). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Choi, S., Kim, K., Chang, J., Kim, S. M., Kim, S. J., Cho, H. J., ve Park, S. M. (2019). Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer’s Disease or Vascular Dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 67(6), 1234–1239. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jgs.15828>
- Chung, E.-J., Ju, H. W., Park, H. J., ve Park, C. H. (2015). Three-layered scaffolds for artificial esophagus using poly(ϵ -caprolactone) nanofibers and silk fibroin: An experimental study in a rat model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 2057–2065. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35347>
- Chung, T. W., Yang, J., Akaike, T., Cho, K. Y., Nah, J. W., Kim, S. Il, ve Cho, C. S. (2002). Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, 23(14), 2827–2834. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00399-4)
- Ciudad-Mulero, M., Fernández-Ruiz, V., Matallana-González, M. C., ve Morales, P. (2019). Dietary fiber sources and human benefits: The case study of cereal and pseudocereals. İçinde *Advances in Food and Nutrition Research* (1. bs., C. 90). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.002>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3, 131–139. Erişim adresi: <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., ve Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233–3243. Erişim adresi:

- <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
- Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., ve Nyman, S. (1988). Healing of Bone Defects by Guided Tissue Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 81(5), 672–676. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1097/00006534-198805000-00004>
- Darby, I. B., ve Morris, K. H. (2013). A Systematic Review of the Use of Growth Factors in Human Periodontal Regeneration. *Journal of Periodontology*, 84(4), 465–476. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120145>
- De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., ve Peppas, N. A. (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regenerative Biomaterials*, 5(4), 197–211. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>
- Dietrich, T., Ower, P., Tank, M., West, N. X., Walter, C., Needleman, I., Hughes, F. J., Wadia, R., Milward, M. R., Hodge, P. J., ve Chapple, I. L. C. (2019). Periodontal diagnosis in the context of the 2017 classification system of periodontal diseases and conditions – Implementation in clinical practice. *British Dental Journal*, 226(1), 16–22. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2019.3>
- Erten, E., ve Arslan, Y. E. (2018). The great harmony in translational medicine: Biomaterials and stem cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1119, 21–39. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/5584_2018_231
- Erten, E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., ve Arslan, Y. E. (2016). Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. *RSC Advances*, 6(96), 94236–94246. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/C6RA16647D>
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Papanikolaou, N., Coulthard, P., ve Worthington, H. V. (2009). Enamel matrix derivative (Emdogain®) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 101–104. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003875.pub3>
- Ferrari, M., Cirisano, F., ve Morán, M. C. (2019). Mammalian Cell Behavior on Hydrophobic Substrates: Influence of Surface Properties. *Colloids and Interfaces*, 3(2), 48. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/colloids3020048>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., ve Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015(6), 1–17. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1155/2015/421746>

- Fuchs, R. K., Thompson, W. R., ve Warden, S. J. (2019). Bone biology. İçinde *Bone Repair Biomaterials* (Second Edi). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102451-5.00002-0>
- Fuller, S., Beck, E., Salman, H., ve Tapsell, L. (2016). New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 1–12. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0529-6>
- Galia, C. R., Lourenço, A. L., Rosito, R., Souza Macedo, C. A., ve Camargo, L. M. A. Q. (2011). Physicochemical Characterization of Lyophilized Bovine Bone Grafts. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, 46(4), 444–451. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/s2255-4971\(15\)30260-3](https://doi.org/10.1016/s2255-4971(15)30260-3)
- Gentleman, E., Lay, A. N., Dickerson, D. A., Nauman, E. A., Livesay, G. A., ve Dee, K. C. (2003). Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(21), 3805–3813. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00206-0)
- Gill, P., Moghadam, T. T., ve Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(4), 167–193.
- Gordon, J. A. R., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., ve Goldberg, H. A. (2007). Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, 41(3), 462–473. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.04.191>
- Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., ve Wennström, J. (1986). New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(6), 604–616. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1986.tb00854.x>
- Guarino, V., Raucci, M. G., Ronca, A., Cirillo, V., ve Ambrosio, L. (2014). Multifunctional scaffolds for bone regeneration. İçinde *Bone Substitute Biomaterials* (ss. 95–117). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1533/9780857099037.2.95>
- Gümüşderelioğlu, M., Sunal, E., Demirtaş, T. T., ve Kiremitçi, A. S. (2020). Chitosan-based double-faced barrier membrane coated with functional nanostructures and loaded with BMP-6. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(1). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6331-x>
- Hardwick, R., Hayes, B. K., ve Flynn, C. (1995). Devices for Dentoalveolar Regeneration: An Up-To-Date Literature Review. *Journal of Periodontology*, 66(6), 495–505.

- Erişim adresi: <https://doi.org/10.1902/jop.1995.66.6.495>
- Hortensius, R. A., ve Harley, B. A. C. (2013). The use of bioinspired alterations in the glycosaminoglycan content of collagen–GAG scaffolds to regulate cell activity. *Biomaterials*, 34(31), 7645–7652. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.056>
- Human Studio. (2020). Tooth: Cross Section. Erişim adresi: Human Anatomy and Disease in Interactive 3D BioDigital Human Platform website: https://human.biodigital.com/edit?id=production/maleAdult/tooth_cross_section
- Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T., ve Tahir, M. N. (2019). Quince Seed Mucilage: A Stimuli-Responsive/Smart Biopolymer. İçinde *Functional Biopolymers* (ss. 127–148). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95990-0_19
- Hynes, K., Menicanin, D., Gronthos, S., ve Bartold, P. M. (2012). Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 59(1), 203–227. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00443.x>
- Ishikawa, I., Iwata, T., Washio, K., Okano, T., Nagasawa, T., Iwasaki, K., ve Ando, T. (2009). Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 51(1), 220–238. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00312.x>
- Ivanovski, S., Vaquette, C., Gronthos, S., Hutmacher, D. W., ve Bartold, P. M. (2014). Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering. *Journal of Dental Research*, 93(12), 1212–1221. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/0022034514544301>
- Ivanovski, Saso. (2009). Periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 54, S118–S128. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01150.x>
- Jiang, W., ve Liu, H. (2016). Nanocomposites for Bone Repair and Osteointegration with Soft Tissues. İçinde *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-452-9.00011-X>
- Jönsson, D., Nebel, D., Bratthall, G., ve Nilsson, B. O. (2011). The human periodontal ligament cell: A fibroblast-like cell acting as an immune cell. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 153–157. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01331.x>
- Kafi, M. A., Aktar, M. K., Phanny, Y., ve Todo, M. (2019). Adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell on chitosan/collagen composite scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(12). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6341-8>

- Khan, F., ve Tanaka, M. (2017). Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 17. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- Kolb, A. D., ve Bussard, K. M. (2019). The bone extracellular matrix as an ideal milieu for cancer cell metastases. *Cancers*, 11(7). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/cancers11071020>
- Kumar, P., Nagarajan, A., ve Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kusindarta, D. L., ve Wihadmadyatami, H. (2018). The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. *Tissue Regeneration*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75728>
- Landis, W. J., Hodgens, K. J., Arena, J., Song, M. J., ve McEwen, B. F. (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microscopy Research and Technique*, 33(2), 192–202. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960201\)33:2<192::AID-JEMT9>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<192::AID-JEMT9>3.0.CO;2-V)
- Landis, W. J., Hodgens, K. J., Song, M. J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C., ve McEwen, B. F. (1996). Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: Evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *Journal of Structural Biology*, 117(1), 24–35. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0066>
- Le, B. Q., Nurcombe, V., Cool, S. M. K., van Blitterswijk, C. A., de Boer, J., ve LaPointe, V. L. S. (2017). The Components of bone and what they can teach us about regeneration. *Materials*, 11(1), 1–16. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma11010014>
- Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., ve Spector, M. (2001). The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials*, 22(23), 3145–3154. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00067-9)
- Lee, D. J., Padilla, R., Zhang, H., Hu, W.-S., ve Ko, C.-C. (2014). Biological Assessment of a Calcium Silicate Incorporated Hydroxyapatite-Gelatin Nanocomposite: A Comparison to Decellularized Bone Matrix. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1155/2014/837524>

- León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O., ve Piña-Barba, M. C. (2016). Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology*, 14(1), 77–85. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>
- Liang, X., Duan, P., Gao, J., Guo, R., Qu, Z., Li, X., He, Y., Yao, H., ve Ding, J. (2018). Bilayered PLGA/PLGA-HAp Composite Scaffold for Osteochondral Tissue Engineering and Tissue Regeneration [Research-article]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(10), 3506–3521. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.8b00552>
- Loh, Q. L., ve Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 19(6), 485–502. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>
- Lozano, L. F., Peña-Rico, M. A., Heredia, A., Ocotlán-Flores, J., Gómez-Cortés, A., Velázquez, R., Belío, I. A., ve Bucio, L. (2003). Thermal analysis study of human bone. *Journal of Materials Science*, 38(23), 4777–4782. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1023/A:1027483220584>
- Marmur, A., Volpe, C. Della, Siboni, S., Amirfazli, A., ve Drelich, J. W. (2017). Contact angles and wettability: Towards common and accurate terminology. *Surface Innovations*, 5(1), 3–8. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1680/jsuin.17.00002>
- Mayfield, L., Nóbregas, N., Attström, R., ve Linde, A. (1997). Guided bone regeneration in dental implant treatment using a bioabsorbable membrane. *Clinical oral implants research*, 8(1), 10–17. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.1997.tb00002.x>
- Monrroy, M., García, E., Ríos, K., ve García, J. R. (2017). Extraction and Physicochemical Characterization of Mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1155/2017/4301901>
- Mortazavi, H., ve Baharvand, M. (2016). Review of common conditions associated with periodontal ligament widening. *Imaging Science in Dentistry*, 46(4), 229–237. Erişim adresi: <https://doi.org/10.5624/isd.2016.46.4.229>
- Murakami, S. (2011). Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): What role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontology 2000*, 56(1), 188–208. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00365.x>
- Özüdoğru, E. (2019). *Sığır Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması Ve Rejeneratif*

- Biyomalzeme Olarak Etkinliğinin Değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Park, C. H., Kim, K. H., Lee, Y. M., ve Seol, Y. J. (2016). Advanced engineering strategies for periodontal complex regeneration. *Materials*, 9(1), 1–11. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ma9010057>
- Peng, L., Cheng, X. R., Wang, J. W., Xu, D. X., ve Wang, G. (2006). Preparation and Evaluation of Porous Chitosan/Collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21(3), 207–220. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/0883911506065100>
- Qasim, S. B., Delaine-Smith, R. M., Fey, T., Rawlinson, A., ve Rehman, I. U. (2015). Freeze gelated porous membranes for periodontal tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 23, 317–328. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.05.001>
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., ve Lemons, J. E. (2004). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. *Chemical Engineering*, 26.
- Roach, H. I. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*, C. 18, ss. 617–628. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1006/cbir.1994.1088>
- Sadeghi, A., Moztarzadeh, F., ve Aghazadeh Mohandesi, J. (2019). Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 625–632. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.022>
- Salih, V., ve Thomas, D. (2013). Fundamentals of cell and matrix biology for tissue engineering. İçinde *Standardisation in Cell and Tissue Engineering* (ss. 3–17). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1533/9780857098726.1.3>
- Sanden, K. W., Kohler, A., Afseth, N. K., Böcker, U., Rønning, S. B., Liland, K. H., ve Pedersen, M. E. (2019). The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to characterize connective tissue components in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Biophotonics*, 12(9), 1–9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jbio.201800436>
- Scheid, C. R., ve Weiss, G. (2017). *Woelfel's Dental Anatomy* (9. bs.). Philadelphia, China: Wolters Kluwer.

- Seciu, A. M., Craciunescu, O., Stanciuc, A. M., ve Zarnescu, O. (2019). Tailored Biomaterials for Therapeutic Strategies Applied in Periodontal Tissue Engineering. *Stem Cells and Development*, 28(15), 963–973. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0016>
- Shahnavazi, M., Ketabi, M. A., Fekrazad, R., Moztarzadeh, F., Sadeghi, A., Tondnevis, F., Raz, M., Abolhasani, M. M., ve Rezaei-Tavirani, M. (2016). Fabrication of Chitosan-Nano Hydroxyapatite Scaffold for Dental Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*, 720, 223–227. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.720.223>
- Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynepas, M., Ganss, B., ve Glogauer, M. (2017). Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*, 21(1), 9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0095-5>
- Shimauchi, H., Nemoto, E., Ishihata, H., ve Shimomura, M. (2013). Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Dental Science Review*, 49(4), 118–130. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.05.001>
- şimşek, E. (2020). *Ayva (Cydonia oblonga Miller) ekirdeği Müsilajının Biyomalzeme Olarak Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tipta Kullanımı* (Yüksek Lisans Tezi). anakkale Onsekiz Mart niversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Singh, S., ve Bothara, S. B. (2014). Physico-chemical and structural characterization of mucilage isolated from seeds of Diospyros melonoxylon Roxb. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 713–725. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400006>
- Slepickova Kasalkova, N., Slepicka, P., Kolska, Z., ve Svorcik, V. (2015). Wettability and Other Surface Properties of Modified Polymers. İçinde *Wetting and Wettability* (s. 355). Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/60824>
- Srinivasan, S., Jayasree, R., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., ve Jayakumar, R. (2012). Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 274–283. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.058>
- Suganuma, J., Alexander, H., Traub, J., ve Ricci, J. L. (1991). Biological Response of Intramedullary Bone to Poly-L-Lactic Acid. *MRS Proceedings*, 252. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1557/proc-252-339>
- Tatakis, D. N., Promsudthi, A., ve Wikesj, U. M. E. (1999). Devices for periodontal

- regeneration. *Periodontology* 2000, 19(1), 59–73. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00147.x>
- Tran, T. T., Hamid, Z. A., ve Cheong, K. Y. (2018). A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering: Aloe Vera Composites. *Journal of Physics: Conference Series*, 1082(1), 012080. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1082/1/012080>
- Vaquette, C., Saifzadeh, S., Farag, A., Hutmacher, D. W., ve Ivanovski, S. (2019). Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets. *Journal of Dental Research*, 98(6), 673–681. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1177/0022034519837967>
- Varoni, E. M., Vijayakumar, S., Canciani, E., Cochis, A., De Nardo, L., Lodi, G., Rimondini, L., ve Cerruti, M. (2018). Chitosan-Based Trilayer Scaffold for Multitissue Periodontal Regeneration. *Journal of Dental Research*, 97(3), 303–311. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/0022034517736255>
- Williams, D. F. (2006). To engineer is to create: The link between engineering and regeneration. *Trends in Biotechnology*, 24(1), 4–8. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.10.006>
- Xu, X. Y., Li, X., Wang, J., He, X. T., Sun, H. H., ve Chen, F. M. (2019). Concise Review: Periodontal Tissue Regeneration Using Stem Cells: Strategies and Translational Considerations. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(4), 392–403. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0181>
- Zahid, S., Khan, A. S., Chaudhry, A. A., Ghafoor, S., Ain, Q. U., Raza, A., Rahim, M. I., Goerke, O., Rehman, I. U., ve Tufail, A. (2019). Fabrication, in vitro and in vivo studies of bilayer composite membrane for periodontal guided tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 33(7), 967–978. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1177/0885328218814986>
- Zaitseva, O. V., Shandrenko, S. G., ve Veliky, M. M. (2015). Biochemical markers of bone collagen type I metabolism. *Ukrainian Biochemical Journal*, 87(1), 21–32. Erişim adresi: <https://doi.org/10.15407/ubj87.01.021>
- Zakhem, E., ve Bitar, K. (2015). Development of Chitosan Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Intestinal Tissue Engineering Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(4), 999–1011. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.3390/jfb6040999>



EKLERİ

EK 1. T.C. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Klinik
Araştırmalar Etik Kurulu İzin Belgesi



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-050.01.04-E.1900106900
Konu : Başvuru İncelemesi(Dr. Öğr.
Üyesi Yavuz Emre ARSLAN)

30/07/2019

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Periodontal Doku Rejenerasyonu için Ayva Çekirdeği Müsilajı / Deselülerize Kemik Kaynaklı Çift Katlı Biyoiskelelerin Geliştirilmesi" başlıklı 2011-KAEK-27/2019-E.1900083769 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 24.07.2019 tarih ve 14-07 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 24.07.2019
Karar No :2019-14

Karar07)2011-KAEK-27/2019-E.1900083769 no'lu araştırma Etik Kurul üyeleri tarafından değerlendirilmiştir. Proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'ın sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirmenin okunması sonrasında yapılan oylamada **"ETİK KURUL ONAYINI ALIR."** Kararı verilmiştir.

e-İmzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Belge Doğrulamak İçin: <https://ubys.comu.edu.tr/ERMS/Record/ConfirmationPage/Index> adresinden FF9CDA3 kodu girerek belgeyi doğrulayabilirsiniz.

Adres : Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi Çanakkale
Bilgi İçin İrtibat : Kadir Yılmaz - Sekreter
Telefon :
Belgegeçer No :
e-posta : kadiryilmaz@comu.edu.tr
İnternet Adresi :



1900106900 numaralı belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince Öztürk Özdemir tarafından 30.07.2019 tarihinde güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burak KARACA
Doğum Yeri : Lüleburgaz KIRKLARELİ
Doğum Tarihi : 06.10.1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2018
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, 2020
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

1) SCI

Şimşek E., **Karaca B.**, Arslan Y.E., (basım aşamasında) Bioengineered 3D physical constructs from quince seed mucilage for human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*.

b) Bildiriler

1) Uluslararası

Karaca, B., ve Arslan, Y. E. (2019). Periodontal Doku Rejenerasyonu için Ayva Çekirdeği Müsilajı/Deselülerize Kemik Kaynaklı Çift Katlı Biyoiskelelerin Geliştirilmesi. İçinde A. Dikicioğlu (Ed.), 5. Uluslararası Mühendislik Mimarlık ve Tasarım Kongresi (s. 1426). Erişim adresi: <http://www.muhendislikmimarliktasarimkongresi.org/onemli-tarihler>

Özüdoğru E., **Karaca B.**, Uzun M., Arslan Y.E., "Isolation And Culture Of Neural Stem/Progenitor Cells From Rat Subventricular Zone For Use In Neural Tissue Engineering", II. International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Durres, ARNAVUTLUK, 9-12 Kasım 2018, pp.71-73

c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanmak Amacıyla Nöral Progenitör-Kök Hücrelerin Sıçan Beyninin Subventriküler Bölgesinden İzolasyonu ve Kültürü. Proje kodu: FBA-2018-2593. Çalışma süresi: 2018-2019, araştırmacı.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Oral ve maksillofasiyal bölgede kullanılma potansiyeli olan nHA/müsilaj temelli biyolojik iskelelerin üretilmesi ve *in vitro* değerlendirilmesi. Proje kodu: TSA-2019-2933. Çalışma süresi: 2019-2020, araştırmacı.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,
Bilim ve Teknoloji Uygulama ve
Araştırma Merkezi, 2016-2017

İLETİŞİM

E-posta Adresi : karacaburakjr@gmail.com

ORCID : 0000-0003-0327-5213