T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİYERARŞİK GÖZENEKLİ İSKELELERİN DOĞAL POLİMERLER KULLANILARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN HAZIRLANMASI

TUĞÇE ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MEHMET MURAT ÖZMEN

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİYERARŞİK GÖZENEKLİ İSKELELERİN DOĞAL POLİMERLER KULLANILARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN HAZIRLANMASI

Tuğçe ŞEN tarafından hazırlanan tez çalışması 15.07.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ**olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd.Doç.Dr. Mehmet Murat Özmen

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç.Dr.Bünyamin Karagöz

İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Prof.Dr.İbrahim Işıldak

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimiyle bana yol gösteren, her zaman benim için vaktini ayıran değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet Murat Özmen'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansta tanıştığım, bundan sonra da hep hayatımda olmasını dilediğim, tanıdığım en iyi insanlardan biri olan arkadaşım Begüm Aytuğrul'ayardımları ve destekleri için,

Çalışmalarım boyunca tüm sorularımı yanıtlayan ve bana yardımcı olan Tayfun Acar, Pelin Pelit Arayıcı, Araş. Gör. Dr. Murat Topuzoğulları, Kübra Burcu Akkaya ve Caner Cebeci'ye,

Son olarak hayatım boyunca beni destekleyen, sevgilerini her zaman hissettiğim, sevgili annem Mehtap Yümniye Şen'e, babam Yaşar Şen'e ve kardeşim Büşra Şen'e, çok teşekkür ederim.

Temmuz, 2016

Tuğçe ŞEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ 4

2.1 Doku Mühendisliği 4
2.2 Doku İskelelerinin Genel Özellikleri 5
2.2.1 Doku İskelelerinde Gözeneklilik 6
2.2.1.1 Hiyerarşik Gözenekli Doku İskeleleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar 8
2.3 Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Malzemeler 10
2.3.1 Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Sentetik Polimerler 11
2.3.2 Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Doğal Polimerler 12
2.3.2.1 Kitosan 13
2.3.2.2 Ovalbumin 14
2.4 Doku İskelesi Üretim Metotları 15
2.4.1 Faz Ayrılması 19

2.4.2 Kriyojelasyon 20
2.5 Doku Mühendisliği için Jeller 22
2.5.1 Hiyerarşik Gözenekli Doğal Polimer Bazlı Kriyojeller 23
2.5.2 Hiyerarşik Gözenekli Sentetik Polimer Bazlı Kriyojeller 24

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM..... 26

3.1 Materyal 26
3.1.1 Kitosan 26
3.1.2 Ovalbumin 27
3.1.3 Poli(Etilen Glikol) Diglisidil Eter 27
3.1.4 Gluteraldehit 28
3.2 Kullanılan Cihazlar 28
3.3 Faz Ayrılması Yöntemiyle Hiyerarşik Gözenekli Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerin Hazırlanması 28
3.4 Kriyojelasyon Yöntemiyle Hiyerarşik Gözenekli Kitosan ve OA-Kitosan Kriyojellerinin Hazırlanması 31
3.5 Karakterizasyon Metotları 34
3.5.1 ATR-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi 34
3.5.2 Jel Fraksiyonu Hesabı 35
3.5.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi 35
3.5.4 Denge Şişme Ölçümleri 35
3.5.5 Şişme Kinetik Ölçümleri 37
3.5.6 Mekanik Ölçümler 37

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... 38

4.1 Faz Ayrılması/Buz Kalıplama Yöntemiyle Üretilen Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerleri 39
4.1.1 Kitosan-PEGDGE Süngerinin ATR-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FT-IR) Analizi 40
4.1.2 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin İç Yapılarının SEM ile Aydınlatılması 41
4.1.3 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin Şişme Özellikleri 43
4.1.4 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin Mekanik Özellikleri 44
4.2 Kriyojelasyon Yöntemiyle Üretilen Kitosan ve Ovalbumin-Kitosan Kriyojelleri 45
4.2.1 Kriyojelasyon Yöntemiyle Elde Edilen Kitosan Kriyojelleri 46
4.2.1.1 Kriyojelasyon Yöntemiyle Üretilen Kitosan Kriyojellerinin ATR-FT-IR Analizi 46
4.2.1.2 Kitosan Kriyojellerinin Jel Fraksiyonu 47
4.2.1.3 Kitosan Kriyojellerinin İç Yapılarının SEM ile İncelenmesi 48
4.2.1.4 Kitosan Kriyojellerinin Şişme Özellikleri ve Gözenekliliği 49
4.2.1.5 Kitosan Kriyojellerinin Mekanik Özellikleri 50

4.2.2 Kriyojelasyon Yöntemiyle Elde Edilen OVA-Kitosan Kriyojelleri..... 52
4.2.2.1 OVA-Kitosan Kriyojellerinin ATR-FT-IR Analizi..... 52
4.2.2.2 OVA-Kitosan Kriyojellerinin Jel Fraksiyonu..... 53
4.2.2.3 OVA-Kitosan Kriyojellerinin İç Yapılarının SEM ile İncelenmesi 53
4.2.2.4 OVA-Kitosan Kriyojellerinin Şişme Özellikleri ve Gözenekliliği..... 56
4.2.2.5 OVA-Kitosan ve Kitosan Kriyojellerin Şişme Kinetiği Davranışlarının Mukayese Edilmesi 58
4.2.2.6 OVA-Kitosan Kriyojellerin Mekanik Özellikleri 60

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER ……62

KAYNAKLAR..... 65

ÖZGEÇMİŞ..... 72

SİMGE LİSTESİ

C_o	Polimer konsantrasyonu
Da	Dalton
D_{kuru}	Kuru jelin çapı
$D_{şiş}$	Şişmiş durumdaki jelin çapı
m_o	Jelin sentez sonrası ağırlığı
$m_{bağ}$	Bağıl ağırlık
m_{kuru}	Kuru jelin ağırlığı
$m_{şiş}$	Şişmiş durumdaki jelin ağırlığı
m_t	Jelin t zamanındaki ağırlığı
nm	Nanometre
q_v	Hacimce şişme denge oranı
q_w	Ağırlıkça şişme denge oranı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
W_g	Jel fraksiyonu
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ε	Gerinim
σ	Gerilim

KISALTMA LİSTESİ

CL	Çapraz bağlayıcı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDC	1-etil-3-(3-dimetiaminopropil) karbodiimid hidroklorür
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	Gluteraldehit
HDM	Hücre Dışı Matriks
NHS	N-Hidroksisüksinimid
OVA	Ovalbumin
PC	Polikarbonat
PCL	Polikaprolakton
PEG	Poli(etilen glikol)
PEGDGE	Poli(etilen glikol) diglisidil eter
PFA	Perfloro alkoksi
PGA	Poli(glikolik asit)
PHB	Poli(3-hidroksi bütirat)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PMMA	Poli(metil metakrilat)
POE	Poliortoester
PU	Poliüretan
PVA	Poli(vinil alkol)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Doku mühendisliğinde i) yalnız hücrelerin, ii) yalnız doku iskelesinin ve iii) doku iskelesi ve hücrelerin kullanıldığı yaklaşımlar [7] 5
Şekil 2. 2 Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen doku iskelelerinin gözenek boyutlarının aralığı [44] 16
Şekil 2. 3 Farklı yöntemlerle üretilen doku iskelelerinin iç morfolojilerinin yatay kesitlerinin SEM görüntüleri; (a ve d) faz ayrılması yöntemiyle hazırlanan gözenekli poli(L-Laktik asit) doku iskeleleri, (b ve e) poli(etil metakrilat) partiküllerinin uzaklaştırılmasıyla üretilen polikaprolakton doku iskeleleri, (c ve f) 105^{o}C'de gaz köpüklendirme yöntemiyle hazırlanan poli(ester amin) örnekleri [49] 18
Şekil 2. 4 Faz ayrılması prosesinin şematik olarak gösterimi (a) [48], katı-sıvı faz ayrılması sonucu oluşan PLLA doku iskelesinin SEM görüntüsü (b) [54] 20
Şekil 2. 5 Kriyojelasyon prosesinin şematik gösterimi; 1; başlangıç sistemi, polimer, monomer çözeltisi, 2; kriyojelasyon; sıfırın altındaki sıcaklıkta karışımın donması, 3; eritilen kriyojel, erime sonrası birbiriyle bağlantılı büyük gözenekli kriyojel [58] 21
Şekil 3. 1 Kitosanın kimyasal yapısı 27
Şekil 3. 2 Ovalbuminin kimyasal yapısı 27
Şekil 3. 3 PEGDGE'nin kimyasal yapısı 28
Şekil 3. 4 Gluteraldehitin kimyasal yapısı 28
Şekil 3. 5 Hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin faz ayrılması yöntemiyle üretilmesinin şematik gösterimi 29
Şekil 3. 6 Gözenekli bir jelin şişme sürecinin şematik gösterimi [90] 37
Şekil 4. 1 %5 asetik asit çözeltisinde çözünen çapraz bağlanma reaksiyonu yapılmayan kitosan matrisi (a), PEGDGE ile 60^{o}C'de çapraz bağlanma reaksiyonu yapılan hibrit sünger (b) 39
Şekil 4. 2 Kitosan-PEGDGE hibrit süngeri ve bu jelin hazırlanmasında kullanılan PEGDGE ve kitosana ait FT-IR spektrumları 40
Şekil 4. 3 Faz ayrılması/buz kalıplama metodu ile üretilen kitosan-PEGDGE (%50) hibrit süngerlerinin SEM görüntüleri, a; n-bütanol eklenmeyen kitosan-PEGDGE jeli, b; n-bütanol eklenen kitosan-PEGDGE hibrit süngeri, c; yüksek büyütmede (x500) n-bütaol eklenen hibrit süngeri 41

Şekil 4. 4 Kitosan-PEGDGE (%50) hibrit süngerlerinin SEM görüntüleri, a; n-bütanol eklenen kitosan-PEGDGE hibrit süngerinin gözenek duvarı, b; n-bütanol eklenmeyen kitosan-PEGDGE hibrit süngerinin gözenek duvarı 42
Şekil 4. 5 Çapraz bağlayıcı PEGDGE oranına göre kuru kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin ağırlıkça şişme oranları 44
Şekil 4. 6 Farklı miktarda PEGDGE kullanılmasıyla kitosan süngerlerinin değişen gerilim değerleri (%50 gerinimde) 45
Şekil 4. 7 OVA-kitosan kriyojellerin, kuru halde (solda), kurutulmamamış halde (sağda) 46
Şekil 4. 8 Kitosan jeli ve sentezinde kullanılan kitosan tozu, GA'ya ait FT-IR spektrumları 47
Şekil 4. 9 GA ile -20^{o}C'de sentezlenen kitosan kriyojellerinin SEM görüntüleri, a; hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojelleri, b; tek boyutlu gözenek yapıda kitosan kriyojelleri 49
Şekil 4. 10 Farklı miktarlarda GA ile sentezlenen kitosan kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (qw) (■) ve hacimce şişme oranları (qv) (●) 50
Şekil 4. 11 Kitosan kriyojellerinin basma deneyleri 51
Şekil 4. 12 Farklı çapraz bağlayıcı miktarları kullanılarak sentezlenen kitosan kriyojellerinin gerilim-gerinim eğrileri (a; %0,25 GA, b; %0,375 GA, c; %0,5 GA) 52
Şekil 4. 13 OA-kitosan jeli ve sentezinde kullanılan OVA, kitosan, GA'ya ait FT-IR spektrumları 53
Şekil 4. 14 Kuru OVA-kitosan jelleri ve gözenekli iç morfolojisi 54
Şekil 4. 15 OVA-kitosan kriyojellerinin (1:1) iç morfolojilerinin SEM görüntüleri, a; hiyerarşik gözenekli OVA-kitosan-n kriyojeli, b; tek tip boyutta gözenek yapısı olan OVA-kitosan-k kriyojeli 54
Şekil 4. 16 Farklı oranlarda OVA:kitosan ile sentezlenen kriyojellerin SEM görüntüleri, a; 1:1 oranında OVA:kitosan-k, b2:1 OVA:kitosan 55
Şekil 4. 17 OVA-kitosan kriyojellerinin gözenek duvarlarının SEM görüntüleri a; OVA-kitosan-k kriyojeli,b; OVA:Kitosan-n (1:1) kriyojeli, c; OVA:Kitosan-n (2:1) kriyojeli 56
Şekil 4. 18 Farklı miktarlarda GA eklenen OVA-kitosan kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) (■) ve hacimce şişme oranları (q_v) (●) 57
Şekil 4. 19 Farklı oranlarda OVA-kitosan içeren kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) (■) ve hacimce şişme oranları (q_v) (●) 58
Şekil 4. 20 Farklı miktarlarda GA içeren OA-kitosan kriyojellerin şişme kinetikleri (▲; kitosan kriyojelini,■; 1:1 OVA:kitosan) 59
Şekil 4. 21 Farklı oranlarda ovalbumin-kitosan içeren kriyojellerin şişme kinetikleri (OVA:Kitosan oranları; ■ ;1:1, ● ; 2:1, ▲;3:1, ▼;4:1,) 60
Şekil 4. 22 Farklı GA miktarları kullanılarak sentezlenen OVA-kitosan kriyojellerinin gerilim-gerinim grafiği (a; %0,25 GA, b;%0,4 GA, c;%0,5 GA,) 61

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Farklı doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelelerinde belirlenen optimum gözenek boyutları [15]……..7
Çizelge 3.1 Üretilen OVA-kitosan jellerinin hazırlanma şartları ……34
Çizelge 4.1 %2,5 polimer konsantrasyonu ile -20^{o}C'de farklı miktarlarda çapraz bağlayıcıyla sentezlenen kitosan kriyojellerinin jel fraksiyonu değerleri……48
Çizelge 4.2 Kitosan kriyojellerinin gözenek boyutları……49
Çizelge 4.3 Farklı yöntemlerle hazırlanan jellerin gözenek boyutları……..55

ÖZET

HİYERARŞİK GÖZENEKLİ İSKELELERİN DOĞAL POLİMERLER KULLANILARAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN HAZIRLANMASI

Tuğçe ŞEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Hasarlı doku ya da organların tedavisi için uygun doku iskelelerinin geliştirilmesi doku mühendisliği araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında, hedef doku, doku iskelesinin yapısı içinde büyüyebilmelidir. Bunun için doku iskelelerinin birbiriyle bağlantılı gözenekli bir yapıya sahip olmaları gerekir. Doku iskelesinin gözenek boyutu, hücrelere besin, oksijen difüzyonu, vaskülarizasyon ve doku oluşumu için önemlidir. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda genel olarak tek boyutlu gözenek yapısına sahip doku iskeleleri üretimi mevcuttur. Ancak, yapısında büyük ve küçük gözenekleri içeren hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin kullanımı, tek tip gözenek yapısı olan iskelelere göre avantaj sağlamaktadır. Öte yandan, doku iskelelerinin mekanik özellikleri, kullanılacakları doku mühendisliği alanını belirleyen önemli bir faktördür. Bu nedenle, üretim parametrelerine göre mekanik özellikleri ayarlanabilen doku iskelelerini hazırlamak doku mühendisliği uygulamalarının ilerlemesine katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada, doğal polimerler ile faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemleri kullanılarak yeni hiyerarşik gözenekli doku iskeleleri üretilmiştir. Bu iki farklı yöntem ile üretilen hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin doku mühendisliği için uygunluğu karşılaştırılarak incelenmiştir. İkincil gözenekliliği sağlamak için her iki yöntemde de sulu reaksiyon çözeltilerine faz ayrılmasını sağlayan n-bütanol

eklenmiştir. İki yöntem arasındaki temel farklılık çapraz bağlayıcının reaksiyon sistemine katıldığı aşamadır. Faz ayrılması/buz kalıplama yönteminde çapraz bağlanma reaksiyonu sonradan 60^{o}C'de yapılırken (üretilen polimer matrisi çapraz bağlanma çözeltisinde çapraz bağlanmıştır), kriyojelasyon/faz ayrılması yönteminde ise çapraz bağlayıcı ilk başta polimer karışımına eklenmiş ve çapraz bağlanma reaksiyonu -20^{o}C gibi düşük bir sıcaklıkta yapılmıştır.Çalışmanın ilk kısmında, faz ayrılması/buz kalıplama (phase separation/ice templating) metoduyla ilk önce 3 boyutlu kitosan matris hazırlanmıştır. Bunun için, kitosan, n-bütanol ihtiva eden seyreltik sulu asetik asit çözeltisinde çözünmüştür. Bu polimer çözeltisi çapraz bağlayıcı eklenmeden -20^{0}C'de dondurulmuştur. Çözücünün donma noktası altında oluşan buz kristalleri matriste büyük gözeneklerin oluşmasını sağlarken, polimer çözeltisine eklenen n-bütanol yapıda küçük gözeneklerin oluşmasını sağlamıştır. Ardından, bu hiyerarşik gözenekli 3 boyutlu kitosan matris, çapraz bağlayıcı olan poli(etilen glikol) diglisidil eter (PEGDGE) çözeltisine alınarak, 60^{o}C'de ileri bir çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirilerek hibrit kitosan-PEGDGE süngerleri elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı PEGDGE farklı oranlarda kullanılarak (% 0-100, v/v %), bu oranların süngerlerin mekanik ve şişme özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen süngerlerin %50 gerinimdeki gerilim değerleri 0,1-2 MPa arasında değişmiş olupkullanılan çapraz bağlayıcı miktarının değiştirilmesiyle mekanik özellikleri ayarlanabilen yeni sünger doku iskeleleri elde edilmiştir.SEM fotoğraflarının analizi sonucu, % 50 PEGDGE ile çapraz bağlı hiyerarşik gözenekli 3 boyutlu kitosan süngerlerin yapısındaki büyük gözeneklerin boyutu 50-100 µm iken küçük gözeneklerin boyutu ise 2-7 µm olarak hesaplanmıştır. Böylece ilk defa burada üretimi gerçekleştirilen, kullanılan PEGDGE çapraz bağlayıcı miktarıyla mekanik özellikleri ayarlanabilen, farklı doku mühendisliği uygulamalarında kulanılabilme potansiyelinde olan hiyerarşik gözenekli yeni hibrit doku iskeleleri elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, yağ ve kalp gibi yumuşak doku mühendisliği alanlarında kullanılabilecek daha yumuşak ve esnek mekanik özelliklerde doku iskeleleri elde edebileceğimizi düşündüğümüz kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemi denenmiştir. Bunun için, kriyojelasyon yöntemi kullanılmış olup yukarıda bahsedilen faz ayrılması/buz kalıplama yönteminden farklı olarak, gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ilk baştan reaksiyon çözeltisine ilave edilmiş ve çapraz bağlanma reaksiyonları -20^{o}C gibi düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojellerinin büyük gözeneklerin boyutu 35-55 µm, küçük gözeneklerin boyutu ise 7-11 µm arasındahesaplanmıştır. Kitosan kriyojellerinin % 50 gerinimdeki gerilim değerleri 5-22kPa arasında değişmiştir.Polimer karışımında ovalbumin oranının artmasıyla büyük gözeneklerin boyutları 70-90µm aralığında değerlere yükselmiştir. Kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinden farklı olarak daha tok (tough)ve esnekliği olankriyojeller elde edilmiştir. Böylece, daha kolay, hızlı ve işlem basamakları daha az olan bir yöntemle, doğal polimerler kullanılarak hiyerarşik gözenekli ve yumuşak doku mühendisliği için optimum mekanik özelliklere sahip kriyojel doku iskeleleri üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku iskelesi, hiyerarşik gözeneklilik, kriyojelasyon, faz ayrımı

ABSTRACT

PREPARATION OF HIERARCHICAL POROUS SCAFFOLDS WITH USING NATURAL POLYMERS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Tuğçe ŞEN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Mehmet Murat ÖZMEN

In tissue engineering (TE) applications, for treatment of damaged tissues and organs, biocompatible and biodegradable scaffolds are needed. The development of proper scaffolds having optimum porosity and elasticity plays an important role in TEresearch. Target tissue can grow in tissue scaffold structure. Therefore, scaffolds need to have an interconnected porous structure. The pore size of the scaffolds is important for nutrient transfer and oxygen diffusion to cells, vascularization and histogenesis. Generally, the scaffolds in the literature have monomodal (monotype) pore structure. However, the use of hierarchical scaffolds with large and relatively smaller pores (bimodal) is more advantageous compared to monomodal scaffolds.On the other hand, mechanical properties of scaffolds are an important factor for determining the applications of the scaffolds in particular TE field. Thus, to prepare scaffold with tailorable mechanical properties based on the fabrication parameters contributes to improvement of TE applications.

The aim of this thesis is to produce novel hierarchical structured scaffolds with tailorable elasticity using natural polymers. To achieve this aim, hierarchical porous scaffolds were produced by two different methods; phase separation/ice templatingand cryogelation/phase separation. The main difference between two methods is the step in which the crosslinker is added to the reaction system, that is, in phase separation/ice templating method the crosslinking takes place at further steps at 60^{o}C (an already formed polymer matrix is crosslinked within a crooslinker solution)

while in cryogelation/phase separation method, the crosslinker is added at the very beginning and the crosslinking reactions occur at low temperatures such as -20^{o}C.Both methods were successfully employed to produce novel scaffolds.

Initially, a 3-dimensional biopolymer network was produced using the phase separation/ice templating technique. N-butanol was used as a porogen to produce small pores whereas large pores were formed by ice templating. N-buthanol was added to o a homogenous solution of the chitosan and the chitosann-buthanol mixture was frozen at -20^{o}C. Subsequently water and the porogen were removed by leaching in chilled acetone at -20^{o}C. The dried chitosan matrix was subsequently modified by crosslinking with functionalized PEGDGE solutions at 60^{o}C to provide hydrogel sponges with improved stability and mechanical properties. Various concentrations of PEGDGE were used to determine the effect on the mechanical properties of the newly fabricated hydrogel sponges. The prepared sponges were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), compression and swelling tests. It was found that the stress value at 50 % strain of the sponges were significantly varied between 0,1-2 MPa. Thus, sponge scaffolds with tunable mechanical properties were obtained which have potential applications in various TE types. SEM images revealed that the sponges have a bimodal pore structure where the pore sizes of the large and small pores were 50-100 µm and 2-7 µm, respectively. Such a hierarchical internal morphology enhances the performance of scaffolds used in TE applications.

Secondly, it occurred to us that cryogelation could be employed to prepare tough and flexible scaffolds for soft TE, i.e., adipose TE. Here, hierarchical porous chitosan and ovalbumin-chitosan cryogels were produced to mimic hierarchical morphologies of tissues by cryogelation/phase separation. At first, chitosan and ovalbumin-chitosan were dissolved in aqueous acetic acid solutions at predetermined ratios; subsequently n-butanol was added to enable phase separation. Control samples were prepared without n-butanol addition. Then after, glutaraldehyde was added to the initial polymer mixtures as a crosslinker and the polymer solution was transferred to a syringe and stored at -20°C for 24h. The resulting cryogel scaffolds were taken out and immersed in acetone for solvent leaching. The obtained cryogels were characterized by SEM, swelling, FTIR and mechanical measurements. SEM results revealed that while the internal morphology of the n-butanol added cryogels have a hierarchical structure, the control samples possess monotype porosity. The pore sizes of the chitosan cryogels were varied between 35-55 µm for large pores and 7-11 µm for small pores. Moreover, their stress value at 50 % deformation was varied between 5-22 kPa. Increasing the amount of ovalbumin included to the initial polymer solution increased the size of the large pores to 70-90 µm. Compared to the Chitosan-PEGDGE hybrid sponges; all obtained cryogels were softer and tougher. Characterization and evaluation of the produced hierarchical porous cryogels demonstrate their suitable properties for potential soft tissue engineering applications.

Keywords: Scaffold, porosity, hierarchical porosity, cryogelation, phase separation

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Doku mühendisliği uygulamalarında hasarlı ya da hastalıklı dokuları tedavi etmek için kullanılan doku iskeleleri, hücreler için tutunma, çoğalma, hücre-hücre iletişimleri gibi hücrelerin hayatta kalması için gerekli fonksiyonlarını yerine getirebilecekleri bir alan sağlar. Bu fonksiyonların yerine getirilebilmesi için doku iskeleleri birbiriyle bağlantılı gözenekli bir yapı gösterebilmelidir. Ayrıca doku iskeleleri vücut içinde uygulanacakları bölgenin mekanik özelliklerini karşılayabilmelidir. Dolayısıyla, optimum gözeneklilik ve elastisite doku iskeleleri tasarımında önemli iki temel gerekliliktir [1].

Literatürdeki çalışmalarda doku iskelelerinin içyapısı genellikle tek tip gözenek ihtiva etmektedir. Ancak hem büyük hem de küçük gözenekleri bulunduran yani hiyerarşik gözenekli doku iskeleleri tek tip boyutta gözenek yapısı olanlara göre çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinde büyük gözenekler hücrelerin çoğalmasını sağlarken, küçük gözenekler ise hücrelerin fonksiyonlarını yapabilmeleri için gerekli besin ve oksijenin hücrelere transferini gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalar, hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinde tek tip boyutta gözenekleri olanlara göre hücre canlılığının arttığını göstermektedir [2]. Doku iskelelerini üretmek için faz ayrılması, kriyojelasyon, gaz köpüklendirme, elektro eğirme, partikül uzaklaştırma gibi yöntemler kullanılmaktadır [3]. Bu kullanılan yöntemlerin her birinin doku iskelelerinde oluşturduğu gözeneklerin boyut aralığı farklıdır. Bu yüzden hiyerarşik gözenekli doku iskelelerini üretmek için genellikle birden fazla yöntem birleştirilmekte böylece kullanılan yöntemlerin oluşturduğu farklı gözenek boyutlarıyla hiyerarşik gözenekli

doku iskeleleri üretilmektedir. Doku iskelelelerinin tasarımında diğer önemli parametre ise sahip oldukları mekanik özelliklerdir, üretilen doku iskelesi mekanik özelliklerini kaybetmeden ve orijinal dokulara uygulanan yükleri destekleyebilmelidir [4]. Doku iskeleleri tasarlanırken bu iki temel gereklilik vücut içinde uygulanacak bölgeye göre ayarlanabilmelidir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi doku iskelelerinin başarılı olabilmesi için gözenekli yapısının ve mekanik özelliklerinin vücut içinde uygulanacakları bölgenin özelliklerine göre uygun olması gerekmektedir. Literatürdeki metotların yanısıra, halen doku iskelesi üretmek için basit ve optimum doku iskelesi özellikleri sağlayan yeni metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, doku mühendisliği uygulamaları için doğal polimerler kullanılarak, yapısında birbiriyle bağlantılı büyük ve küçük gözenekleri olan hiyerarşik gözenekli yapıda ve mekanik özellikleri çapraz bağlanma reaksiyonları ile ayarlanabilen yeni biyomalzemelerin üretilmesi amaçlanmıştır. Üç boyutlu ve hiyerarşik içyapıda jel doku iskeleleri üretmek için farklı çapraz bağlanma stratejileri içeren faz ayrılması/buz kalıplama (PEGDGE ile 60^{o}C'de ileri çapraz bağlanma), kriyojelasyon/faz ayrılması (*in situ,* gluteraldehitle -20^{o}C'de çapraz bağlanma) metotları kullanılmıştır. Böylelikle, optimum gözeneklilik ve elastisite özellikleri gösteren ve farklı doku mühendisliği alanlarında kullanılabilecek yeni doku iskelelerinin üretilmesi hedeflenmişitr.

1.3 Hipotez

Doku iskelelerinin başarısı uygulandığı dokunun işlevlerini ve hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesine bağlıdır. Doku iskelesinin gözenekli yapısı hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. Doku iskelelerinin mekanik özellikleri ise uygulandığı bölgenin özellikleri ile uyumlu olmalıdır. Bu yüzden, bu tezde birbiriyle bağlantılı hiyerarşik gözenek yapısı içeren yeni doku iskelelerinin farklı yöntemlerle üretilerek hücre yapışması ve proliferasyonu ile hücreler için besin ve oksijen alışverişinin daha kolay olabileceği varsayılmıştır. Ayrıca, farklı çapraz bağlanma yöntemleri ve değişik çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak, üretilen iskelelerin ve farklı

elastisiteler gerektiren farklı doku mühendisliği türleri için kullanılabilecekleri öngörülmüştür.

BÖLÜM 2

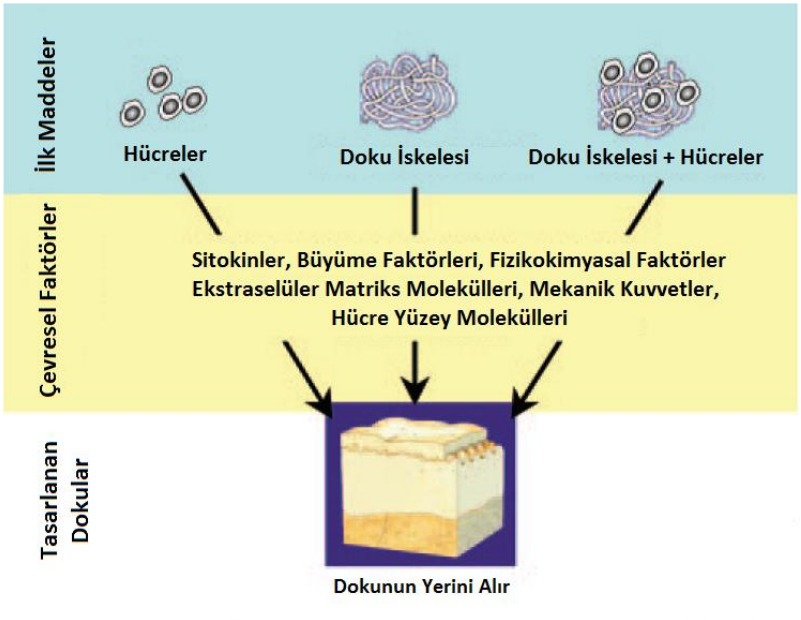
GENEL BİLGİ

2.1 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hasarlı dokuları iyileştirmek amacı ile biyoloji, malzeme ve mühendislik alanlarının prensiplerini uygulayan multidisiplinerbir alandır. Doku mühendisliğinde zarar görmüş dokuların tedavisinde, yeni dokuların oluşumunu sağlamak ve hasarlı dokuların fonksiyonlarını tekrar yerine getirmek için doku iskeleleri, hücreler ve biyosinyal moleküllerinden yararlanılır [5].

1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yeni dokuları oluşturmak için doku mühendisliğinin üç temel stratejisi tanımlanmıştır. Buna göre ilk yaklaşım sadece hücrelerin nakli, ikinci yaklaşım ise büyüme faktörleri gibi doku başlatıcı biyosinyal moleküllerinin kullanılması, üçüncü yaklaşım ise hücrelerin doku iskelelerine yerleştirilmesidir[5]. İlk yaklaşımdaki yeni organ ya da doku oluşumu için alternatif bir yöntem olan hücre nakli için, donor dokudan toplanıp izole edilen hücreler, hücre kültür teknikleriyle *in vitro* çoğaltılır. Ardından hücreler, fonksiyonu düzeltilmesi istenen dokulara implante edilir. Ancak hücrelerin kendi başlarına yeni dokuları oluşturamayacağı düşünülmektedir. Hücreler, hem *in vitro* hem de *in vivo,* yeni dokuları oluşturmak için uygun bir çevreye ihtiyaç duyarlar. Doku mühendisliğinde bu çevreyi oluşturan doku iskeleleridir [6]. Yalnızca doku iskelelerinin kullanılması ise doku mühendisliğinde dördüncü bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır [7]. Şekil 2.1'de doku mühendisliği yaklaşımları, yalnızca hücrelerin, doku iskelelerinin kullanıldığı ve

doku iskelesi ile hücrelerin birlikte kullanıldığı yaklaşımlar şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2. 1 Doku mühendisliğinde i) yalnız hücrelerin, ii) yalnız doku iskelesinin ve iii)doku iskelesi ve hücrelerin kullanıldığı yaklaşımlar [7]

2.2 Doku İskelelerinin Genel Özellikleri

Doku iskeleleri; hücrelerin yapışması, çoğalması ve farklılaşması için destekleyici bir ortam oluşturan, uygun oksijen seviyesi, besin transferini sağlayan, mekanik bütünlüğüile yeni dokuların *in vivo* ve *in vitro* oluşması için kullanılan hücre dışı matriks (HDM) analoglardır [8], [7]. Doku iskeleleri, hücrelerin tutunması, çoğalması, kendi hücre dışı matriks moleküllerini biriktirerek yeni dokuları oluşturabilmeleri için hücrelere 3 boyutlu bir çevre sağlarlar [7]. Doku mühendisliği uygulamaları için istenen özelliklere sahip doku iskelelerinin tasarlanması önemlidir. Doku iskelelerinin fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için, doku iskelesi tasarımında dikkat edilmesi gereken temel gereklilikler vardır, bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Doku iskelelerinin yeni dokunun oluşumuna rehberlik edebilmeleri ve destek olabilmeleri için 3 boyutlu bir yapıya sahip olmaları gereklidir.
- Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan malzemeler biyouyumlu olmalıdır, konakta olumsuz bir cevap oluşturmamalıdır [9].

- Biyobozunur doku iskelelerinde yeni doku oluşumunun hızına uyumlu kontrollü bozunma hızı olmalıdır ve hem doku iskelesi hem de bozunma ürünleri toksik olmamalıdır [5], [9].
- Doku iskeleleri, yeni oluşan dokuya mekanik olarak destek sağlayabilmelidir [10]. Doku iskelelerinin vücut içinde uygulanacakları dokulara göre sahip olması gereken mekanik özellikler değişir. Örneğin sert doku mühendisliği (kemik, diş gibi) ve yumuşak doku mühendisliği (kalp, kas, kan damarları, sinir, deri, karaciğer gibi) için kullanılacak doku iskelelerinin elastik modül değerleri farklıdır [11].Kortikal kemiğin elastik modülü 15-20 GPa arasında iken, süngerimsi kemiğin 0,1-2 GPa arasında değişmektedir. Yumuşak dokuların elastik modül değerleri ise 0,4-350 MPa arasında değişmektedir [12].
- Doku iskeleleri, hücre adezyonunun kontrol edilebilmesi için yeterli bir yüzey kimyasına ve topografisine sahip olmalıdır [5].
- Doku iskelelerinin üretim prosesi seçilen üretimde kullanılacak malzemeye uygun olmalı ve implante edilebilmeleri kolay olmalıdır [13].
- Doku iskeleleri, doku oluşumu için gerekli olan oksijen difüzyonu ve kütle (besin ve atık) transferini sağlayabilmeli ve hücrelerin çoğalması için birbiriyle bağlantılı gözenekli yapıda olmalıdır. Hücre farklılaşmasını ve hücre dışı matriks biyosentezlerini arttırmak için gözenekli yapılarıyla büyüme faktörleri ve proteinleri dağıtabilmelidir. Bunun için doku iskeleleri yüksek gözenekliliğe ve uygun gözenek boyutuna sahip olmalı ve hücrelerin çoğalması için birbiri ile bağlantılı gözenekli yapıda olmalıdır. Çünkü gözenekli bir yapı, malzemenin mekanik özelliğini de etkilemekte, malzeme implante edildiğinde doku iskelesinin gözenekli yapısı iskele ile çevresindeki doku arasında mekanik tutunmayı sağlayarak malzemenin mekanik stabilitesini arttırmaktadır [16].

2.2.1 Doku İskelelerinde Gözeneklilik

Doku iskelelerinin gözenekli yapısı *in vivo* çevresindeki doku ile etkileşmesinde önemli bir rol oynar [14].Doku iskelelerinin gözenekliliği ve gözenek boyutu; hücreler için besin geçişi, hücre çoğalması, göçü, yeni damarların ve dokuların oluşumu için gereklidir.

Doku iskelesindeki gözenekler yeni doku oluşumuna rehberlik ederek destek olurlar [16].Literatürde yapılan çalışmalar, farklı doku mühendisliği uygulamaları için farklı optimum gözenek boyutları olduğunu göstermiştir. Çizelge 2.1'de farklı doku mühendisliği için yapılan çalışmalarda elde edilen optimum gözenek çapları gösterilmektedir.

Çizelge 2. 1 Farklı doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelelerinde belirlenen optimum gözenek boyutları [15]

Doku Mühendisliği Uygulaması	**Malzeme Gözenek Boyutu**
Yeni damarlanma	5 µm
Deri rejenerasyonu	20-125 µm
Fibroblastların bağlanması	40-150 µm
Fibroblastların büyümesi	5-15 µm
Karaciğer doku rejenerasyonu	45-150 mm
Kemik rejenerasyonu	100-400 µm
Kondrositlerin büyümesi	70-120 µm

Vücuttaki dokular, aynı yapı içinde boyutlarınanometre-mikrometre aralığında olan hiyerarşik gözenekli yapılara sahiptir [16]. Bu yaşayan kompleks organizmaların hiyerarşik yapısını taklit ederek analoglarını doku mühendisliği için üretmek oldukça zordur. Yapısında birbiri ile bağlantılı büyük ve küçük boyutta gözenekleri içeren hiyerarşik gözenekli malzemeler tek tip boyutta gözenekleri içerenlere göre madde transferini ve spesifik yüzey alanını arttırarak malzemenin özelliklerinin geliştirilmesini sağlamaktadır [17]. Malzemenin özelliklerini iyileştiren nanometreden mikrometreye kadar farklı ölçeklerde gözenek boyutlarını içeren hiyerarşik gözenekli malzemelerindoku iskelesi olarak kullanılmaktadır. Zhang vd.,ideal bir doku iskelesinin gözenekli bir yapı göstermesine ek olarak, hücre-hücre ve hücre-doku iskelesi etkileşimlerini arttıran için hiyerarşik gözenekli bir yapı göstermesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Bir dokunun gerekli fonksiyonel birimlerini oluşturmak ve doğal bir yapının yeniden yapılması için hücresel çevreyi kontrol eden hücre altı yapılar (1-10 µm),

hücre-hücre etkileşimlerini kontrol eden hücresel boyutlarda yapılar (10-100 µm) ve bir dokunun gerekli fonksiyonel birimlerini oluşturan hücre-üstü boyutta (100-1000 µm) yapılar gereklidir [18]. Büyük gözenekler yapının kararlılığını sürdürmesine, hücre proliferasyonuna, hücre dışı matriks birikimine ve doku oluşumuna destek olurken; küçük gözenekler besin difüzyonu ve damar oluşumu için önemlidir [19]. Dolayısıyla, hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin kullanımı, tek tip boyutta gözenekleri olan doku iskelelerine göre avantaj sağlamaktadır. Aşağıdaki bölümde, literatürdeki hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin ilgili çalışmalar verilmektedir.

2.2.1.1 Hiyerarşik Gözenekli Doku İskeleleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Yukarıda da belirtildiği gibi biyolojik dokuların hiyerarşik yapı göstermesinden dolayı doku mühendisliği için yapılmış mevcut çalışmalarda, hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin üretimi artmıştır. Hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin üretiminde, faz ayrılması, gözenek yapıcı madde uzaklaştırılması, elektro eğirme, gaz köpüklendirme, 3-boyutlu yazıcı, lazer sinterleme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin her biri genellikle tek tip boyutta gözenekli doku iskelelerinin tasarımını sağlamaktadır. Hiyerarşik gözenekli doku iskeleleri farklı metotların birleştirilmesiyle üretilmektedir [20]. Literatürde bu yöntemlerin kullanılmasıyla yapılan hiyerarşik gözenekli doku iskeleleri ile ilgili örnekçalışmalardan biri Akbarzadeh vd., tarafından yapılan, faz ayrılması ve 3 boyutlu yazıcı yöntemleri birleştirilerek hiyerarşik gözenekli PLGA doku iskelelerinin üretilmesidir [21]. 3 boyutlu yazıcı kullanılarak üretilen PEG yapıları, PLGA çözeltilerinebüyük gözenekleri oluşturmak için batırılırken faz ayrılması ile küçük gözenekler oluşmuştur. Fare MC3T3-E1 hücreleriyle yapılan *in vitro*hücre çalışmaları, üretilen doku iskelelerinin hücre adezyonu ve büyümesi için destek sağlayan uygun bir çevre oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmada üretilen hiyerarşik gözenekli PLGA doku iskelelerinin yumuşak doku mühendisliği için kullanımının uygun olduğu bulunmuştur.

Ko vd., hiyerarşik gözenekli kitosan süngerleri, buz parçalarının gözenek yapıcı kalıp olarak kullanarak hazırlamışlardır [22]. Buz parçalarını elde etmek için su PFA ile kaplı bakır bir plakaya püskürtülmüş ve dondurulmuştur. Kitosan çözeltisi, buz parçalarını içeren bu plakaya dökülerek dondurulmuş ve kurutulmuştur. Hücre çalışmaları yeni doğan insan deri fibroblastları ile yapılmıştır. Buz parçalarının kullanıldığı kitosan doku

iskelelerinde büyük ve küçük gözenekler oluşurken, kullanılmayan kontrol örneğinde hiyerarşik bir yapı oluşmamıştır. Hiyerarşik gözenekli kitosan süngerlerde hücreler homojen olarak dağılıp, kontrol süngere göre daha yüksek canlılık ve daha hızlı proliferasyon gösterirken, kontrol kitosan süngerinde hücreler homojen olarak dağılmamış üst tabakada kalıp orta kısımlara dağılmamıştır.Zhang vd., hiyerarşik gözenekli PCL doku iskelelerini faz ayrılması ve tuz uzaklaştırma yöntemlerinin birleştirilmesiyle üretmişlerdir [18]. Çalışmada gözenekler arası bağlantılılığı sağlamak için sodyum klorür (NaCl) ve sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ikili tuz sistemi kullanılmıştır. Üretilen doku iskelelerinde üç farklı gözenek boyutu oluşturulmuştur. NaCl büyük gözenekleri oluştururken (200-300 µm) ve $NaHCO_3$ orta boyuttaki (45-50 µm) gözenekler, faz ayrılması metoduyla da küçük gözenekler (10 µm'den daha küçük) oluşmuştur. Elde edilen doku iskeleleri, hücre çalışmalarında insan deri hücreleri için kullanılmıştır. Üçlü gözenek yapısına sahip PCL doku iskelelerinde, büyük gözeneklerin hücre-hücre ve hücre-doku iskelesi etkileşimlerini arttırmasında, orta boyuttaki gözeneklerin hücrelerin göçünü sağlamasında ve küçük gözeneklerin besin ve atıkların taşınmasında etkili olduğu bulunmuş, bu yüzden üçlü hiyerarşik gözenek yapısının doku iskelesi için ideal olduğu bulunmuştur. Du vd., [19], PCL polimerini kullanarak faz ayrılması ve gözenek yapıcı partiküllerin uzaklaştrılması (tris-hidroksimetil-aminometan)yöntemlerinin birleştirerek yapısında 3 farklı boyutta gözenekleri olan doku iskelelerini üretmişlerdir [19]. Bir başka çalışmada, faz ayrılması ve tuz uzaklaştırma yöntemlerinin birleştirilmesiyle PLLA/β-Tri-kalsiyum fosfat nanokompozit doku iskeleleri üretilmiştir [23].

Jelatin ve kitosan gibi doğal polimerlerin kullanılmasıyla üretilen hiyerarşik gözenekli doku iskeleleriyle ilgili çalışmalar da bulunmaktadır [24]. Jelatin doku iskeleleri faz ayrılması ve gözenek yapıcı partiküllerin uzaklaştırılması yöntemlerinin birleştirilmesiyleüretilmiştir. Gözenek yapıcı madde olarak farklı boyutlarda parafin kullanılmıştır. Jelatin doku iskeleleri üretildikten sonra EDC ve NHS ile çapraz bağlanmıştır ve MC3T3-E1 osteoblast hücreleriyle doku iskelelerinin hücre çalışmaları yapılmıştır. Gözenek boyutu parafinin boyutuna bağlı olarak 150-600 µm arasında değişen, gözenek duvarları 50-500 nm aralığında nanoliflerden oluşan hiyerarşik gözenekli doku iskeleleri, doku yenilenmesini önemli oranda arttırmıştır.

Faz ayrılması yöntemi kullanılarak hazırlanan hiyerarşik gözenekli kitosan doku iskeleleri ile ilgili yapılan çalışmada, hiyerarşik gözeneklikitosan doku iskelelerinde küçük gözenekler n-bütanolün eklenmesi ile elde edilmiştir ve n-bütanol eklenmeyen kontrol örneğine göre gözenekler arası bağlantılılığın daha iyi olduğu bulunmuştur [25]. Faz ayrılması yöntemiyle, n-bütanolün kullanıldığı bir başka çalışmada ise hiyerarşik gözenekli kitosan doku iskelelerine insan deri fibroblast hücreleri uygulanmıştır. Başlangıç hücre adezyonunun hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinde, tek tip boyutta gözenekleri olan kontrol doku iskelelerine göre %190 daha fazla olduğu ve hücrelerin çoğalmasının da daha hızlı olduğu bulunmuştur [26].

Yapılan çalışmalarda, hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin daha fazla açık gözeneklerinin olduğu, gözenekler arası bağlantılılığın ve yüzey alanının fazla olmasından dolayı hücrelerin doku iskelesine yapışmasını ve çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir.

2.3 Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Doku iskelesi üretimi için kullanılan malzemeler, hasarlı dokuyu tedavi etmek için hücreler ile direkt olarak temas ederler. Bu hücrelerin, fonksiyonlarını yerine getirebilmesi doku iskelelerinin tasarımı için önemli bir faktördür. Bu yüzden doku iskelesi üretiminde malzeme seçimi doku mühendisliği uygulamalarının başarısını etkilemektedir [27]. Doku iskelesi için kullanılan malzemelerin biyouyumlu olması ilk gerekli özelliklerinden biridir. Polimerik malzemelerin kimyası, molekül ağırlığı, çözünürlüğü, implantın şekli ve yapısı, hidrofilik/hidrofob olması, yüzey enerjisi, su absorplaması, bozunma mekanizması gibi özellikleri biyouyumluluğunu etkileyen faktörlerdir [13]. Doku iskeleleri için genellikle polimer, seramik, ya da metalik malzemeler kullanılırken bunlar arasında polimerler doku mühendisliği için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Metallerin hücre dışı matriksi sağlayamaması, seramiklerin sınırlı bozunurluğu ve kırılganlığı, gözenekli yapıların üretilmesindeki zorluk gibi dezavantajlardan dolayı doku iskelesi olarak kullanılmaları polimerlere göre daha az yaygındır. Dokuların fiziksel ve mekaniksel özelliklerine uyan polimerler, sentezlerinin ya da modifiye edilmelerinin esnek olmasından dolayı doku mühendisliği uygulamalarında ve araştırmalarında geniş ölçüde kullanılmaktadırlar [28], [29].

Aşağıdaki paragraflarda, doku mühendisliğinde kullanılan doğal ve sentetik polimerler ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

2.3.1 Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, biyomedikal uygulamalarda 1960'ların yarısından beri kullanılmaktadır [13]. Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), kopolimerleri poli[(laktik asit)-ko-(glikoliki asit)] (PLGA) ve poli(kaprolakton) (PCL) alifatik polimerleri, biyouyumlu olmaları, kontrollü bozunmaları ve işlenebilirliliklerinden dolayı doku iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlerdir. FDA onaylı bu sentetik polimerler birçok doku iskelesi üretim metodunda kullanılabilmektedir [29],[30].

PGA, PLA ester bağlarının hidrolizi ile bozunurlar ve bozunma ürünleri toksik değildir. Poli(laktik asit)'in bozunması ile laktik asit oluşur, laktik asit insan vücudunda anaerobik metabolizmanın ürünüdür ve vücuttan karbondioksit ve su olarak atılır. PGA ise hem hidroliz hem de enzimin (esteraz) birleşimi ile bozunur, bozunma ürünü olan glikolik asit vücuttan CO_2 ve su olarak atılır. PLA, yapısının hidrofobik olmasından dolayı PGA'dan daha yavaş bir şekilde bozunur. PGA kristal yapıda bir polimer olduğu için bozunması hızlı bir şekilde olur. PLGA'nn bozunma hızı ise monomerlerin (PLA ve PGA oranı) oranına ve üretim şartlarına bağlı olarak birkaç haftadan bir yıla kadar kontrol edilebilir.

PCL, yarı kristal, biyouyumluluğu oldukça iyi olan bir polimerdir. Hidroliz ile yavaş bir bozunma hızı vardır, tam bozunması 24 ay sürebilir, diğer polimerler ile kolay karıştırılabilir olduğu için kopolimeri oluşturularak istenilen bozunma hızları sağlanabilir [30]. Literatürde, poli(α-hidroksi asit) ve PCL'den daha az çalışmaları olmasına rağmen poli(3-hidroksibütirat) (PHB), poliüretan (PU), polikarbonat (PC), poli(orto ester) (POE) doku iskelelerinde kullanılmaktadır [30].

Sentetik polimerlerin bozunmaları genellikle hidrolizle gerçekleştiğinden *in vivo* bozunma hızı hastadan hastaya değişmektedir. Genellikle doku iskelesi üretim yöntemlerinin birçoğu ile üretilebilmektedirler [31].

2.3.2 Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Doğal Polimerler

Doğal kaynaklardan elde edilen polimerler, kendiliğinden sahip oldukları yüksek biyouyumluluk özelliği ve hücrelerin yapışmasını sağlayan yapılarındaki ligandlar sayesinde doku mühendisliğinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar [32].Doğal polimerlerin de sentetik polimerler gibi avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğal polimerlerin kaynağına bağlı olarak özelliklerinde değişkenlik göstermeleri, konakta yaratabileceği immünolojik cevaplar ve konaktaki enzim seviyesindeki farklılıklardan dolayı bozunma hızında değişkenlik göstermeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bunlara ek olarak doğal polimerlerin işlenmesinde zorluklar bulunmaktadır ancak doku iskelesi tasarımında doğal polimerleri kullanmak için yöntemlerde gelişmeler sağlamıştır [30], [31]. Doğal polimerlerin biyomalzeme olarak kullanılmasının sentetik polimerlere göre avantajlarıda bulunmaktadır. Birçok doğal polimer, vücutta hücreler ve dokular tarafından tanınan biyolojik aktiviteleri yerine getirebildikleri spesifik moleküllere sahiptirler, hücreler ile olan bu etkileşimleri sayesinde yeni doku oluşumuna uygundurlar. Sentetik polimerler ile yapılan uygulamalarda bu etkileşim tam olarak sağlanamamıştır. Ayrıca doğal polimerler fizyolojik ortamda enzimatik olarak bozunurlar ve bu bozunma ürünleri hücreler tarafından kullanılabilen toksik olmayan ürünlerdir [30], [31]. Genellikle, doku iskelesi üretiminde kitosan, aljinat, hiyaluronik asit gibi polisakkarit bazlı doğal polimerler ve albümin, kolajen, jelatin, ipek, fibrin gibi protein bazlı doğal polimerler kullanılmaktadır.

Kolajen, insan vücudunda deri ve iskelet kasında bulunan en yaygın proteindir ve 22'den fazla tip kolajen sınıflandırılmıştır, en yaygın bulunanı Tip I-IV'dür. Kolajen, ekstraselüler matriksin en önemli bileşeni olduğundan dolayı hücrelerin yapışmasınıve çoğalmasını sağlayabilir, ayrıca vücut içinde kolajenaz ve metalloproteinaz gibi enzimlerle bozunur, bu yüzden doku iskelelerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kolajenin doku iskelelerinde kullanımını, elde edildiği kaynağa bağlı olarak vücut içinde immun cevap oluşturabilmesi ve saf kolajenin elde edilmesinin maliyetinin yüksek olması sınırlandırmaktadır [13].

Jelatin, ısıl denatürasyon ve hidrolizle kolajenin üçlü heliks yapısının bozunmasıylaelde edilen doğal bir polimerdir. Jelatin, iyi hücre uyumluluğuna sahip olması, hücre

çoğalmasını arttırması ve düşük immünojenisite göstermesinden dolayı doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılır. Yüksek sıcaklıklarda mekanik dayanımını kaybetmesinden dolayı mekanik özelliklerinin arttırılması gerekir bu yüzden çapraz bağlayıcılar kullanılır [33].

Aljinat, L-gluronik asit ve D-mannuronik asidin tekrarlanması ile oluşan, lineer formda polisakkarit bazlı doğal bir polimerdir. Kalsiyum gibi iki değerlikli iyonlarla jel formunu oluştururlar. Genellikle bu aljinat jeller ilaçların, büyüme faktörlerinin ve hücrelerin kapsülasyonunda kullanılmaktadır. Kalsiyum aljinatlar hidrolitik olarak bozunamazlar ancak enzimatik olarak bozunabilirler. Aljinat, vücutta immun cevap oluşturabilme ve tam olarak bozunmama gibi dezavantajlara sahiptir. Ancak gluronik asit ve mannuronik asit negatif yüklü grupları içermektedir bu negatif yüklü bölgeler aljinat doku iskelelerinin doğal dokularda bulunan sülfatlı proteoglikanlar tarafından oluşturulan elektrostatik koşullara benzer özellikler gösterebilmesini sağlamaktadır [34].

Bu çalışmada hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin üretilmesi için kullanılan kitosan ve ovalbumin doğal polimerleri aşağıdaki bölümlerde ayrı olarak ele alınacaktır.

2.3.2.1 Kitosan

Kitosan, poli-β-(1 → 4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz, glikozamin ve asetilglikozaminden oluşan aminopolisakkarit bazlı doğal polimerdir. Kitosan; mantar, ıstakoz, karides, yengeç kabukları ve böceklerin epiderminden elde edilen doğada en yaygın bulunan polisakkarit olan kitinin deasetilasyonu sonucu üretilir [37]. Yapısındaki glikozamin içeriği deasetilasyon derecesi olarak ifade edilir. Kitosanın hazırlama prosedürüne ve kaynağına bağlı olarak molekül ağırlığı 300 KDa'dan 1000 KDa üzerine çıkabilir deasetilasyon derecesi ise %30-95 arasında değişir [35]. Kitosan yarı kristal bir doğal polimerdir, deasetilasyon derecesi kristalliğini etkilemektedir, minumum kristalliği orta seviyede deasetilasyon derecesinde göstermektedir. Kristal yapının kararlılığından dolayı kitosan pH 7 üzerinde sulu çözeltilerde çözünmez, ancak pH 5'in altında seyreltik asitlerde yapısındaki serbest amin grupları protonlanır ve tamamen çözünür [36].

Fizikokimyasal ve biyolojik özelikleri, biyobozunur ve biyouyumlu olması, toksik etki göstermemesi, antimikrobiyal özellikte olmasından dolayı kitosan doku mühendisliği

uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosan polikatyonik özelliğinden dolayı negatif yüklü mikrobiyal hücre duvarına bağlanarak mikroorganizmaların hücre içi bileşenlerinin zayıflamasını sağlayarak antimikrobiyal etki gösterir. Ayrıca kitosanın yapısal özellikleri hücre dışı matrikste bulunan glikozaminoglikanlara benzerdir. Bu özellikler, yara örtülerinde, doku iskelelerinde kullanılması için kitosanı önemli bir malzeme haline getirmektedir [37]. Vücut içinde lizozim, lipaz ve N-asetil-D-glukozaminidaz enzimleri tarafından bozunur ve bozunma ürünü olarak farklı uzunluklarda biyouyumlu kitosan oligosakkaritleri oluşur. Kitosanın bozunma hızı deasetilasyon derecesine bağlıdır %85'den büyük deasetilasyon derecesinde bozunma hızı birkaç ay sürebilir [35], [38].

Kitosan doğal polimeri, doku iskelesi üretim yöntemine bağlı olarak jel, film, lif ve sünger formlarında oluşturularak farklı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır.

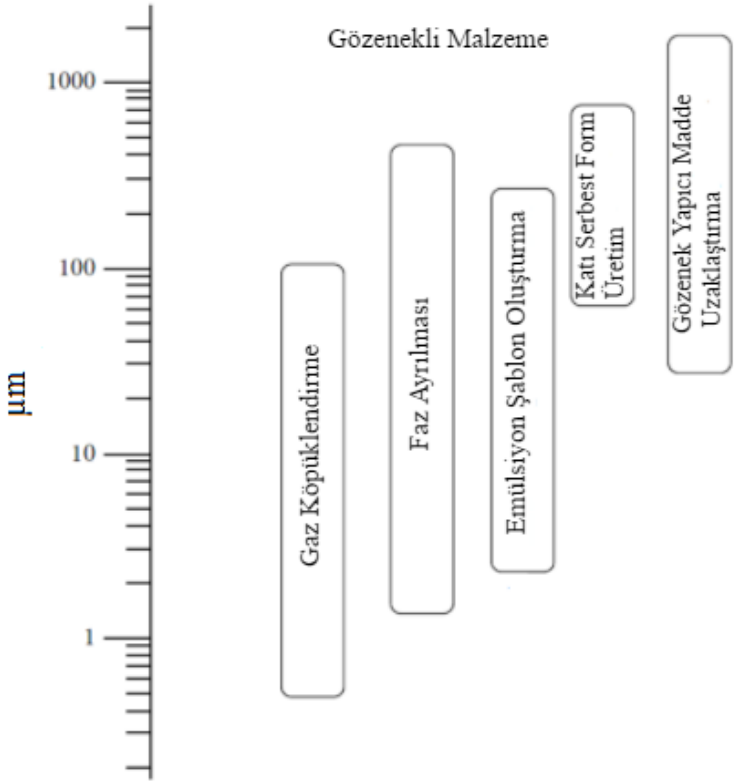
2.3.2.2 Ovalbumin

Ovalbumin, yumurta beyazında bulunan temel bir doğal proteindir. Vücut içine bozunduğunda bozunma ürünleri toksik değildir [39], [40]. Kitosan, jelatin, kollajen gibi diğer doğal polimerlerin aksine ovalbumin doku iskeleleriyle ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Genellikle ovalbumin doku iskeleleri yağ doku ve kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere üretilmişlerdir [39], [40]. Farrar vd., NaCl tuzu uzaklaştırma ve dondurarak kurutma yöntemlerini kullanarak gluteraldehitle çapraz bağlı OVA doku iskeleleri üretmişlerdir. Çalışmada OVA doku iskelelerinin basınç dayanımı ve modülü kemik doku mühendisliği için düşük bulunmasına rağmen MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin sayısı artmıştır [40]. Kumar vd., kemik doku mühendisliği için selüloz nanokristalleri ile güçlendirilmiş OVA/poli(vinil alkol) (PVA) biyokompozitleri gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlayarak dondurarak kurutma yöntemiyle üretmişlerdir. Doku iskeleleri birbiriyle bağlantılı gözenekli bir yapı göstermiş ve selüloz nanokompozitleri doku iskelelerinin mekanik özelliklerini arttırmıştır [41]. Kumar vd., bir önceki çalışmalarında [41] selüloz nanokristalleriyle elde ettikleri OA/PVA biyokompozit doku iskelelerinin mekanik performansını arttırmak için nano-hidroksiapatit eklemişlerdir. Çapraz bağlama reaksiyonunu GA ile

yaparak, doku iskelelerini üretmek için dondurarak kurutma yöntemini kullanmışlardır. Biyokompozit doku iskeleleri uzun süreli kemik doku mühendisliği için uygun bulunmazken, kemik dolgu malzemesi olarak düşük yük dayanımı gerektiren uygulamalarda kullanılabilir olarak bulunmuştur. Ayrıca kompozit doku iskelesini oluşturan maddelerin miktarının ayarlanmasıyla, doku iskelelerinin iyi bir mekanik performansla uzun süreli stabilitesi istenen seviyeye arttırılabilir bulunmuştur. Ovalbumin kemik doku mühendisliği dışında yumuşak doku mühendisliğinde yağ doku mühendisliği için de kullanılmıştır [39]. Luo ve Choong üç farklı çapraz bağlayıcı (GA, EDAC ve 1,4-bütandioldiglisidil eter) kullanarak ovalbumin doku iskelelerini yağ doku mühendisliğinde kullanmak üzere üretmişlerdir. Çapraz bağlayıcının etkisi ile yüzey morfolojisi ve gözenek boyutu değişirken, çapraz bağlayıcı miktarı doku iskelelerinin sıkıştırma modülüyle orantılı olarak bulunmuştur [39]. Ovalbumin kriyojeliyle ilgili ilk çalışma Lozinsky ve Konstantinovatarafından yapılmıştır, çalışmada OVA kriyojellerinin hazırlanması için üre kullanılmıştır [42]. OVA kriyojelleri ile ilgili Matiasson vd., ovalbumin, kriyojeli eldesi için üre kullanılarak kovalent olmayan çapraz bağlanma yapılmıştır. Ovalbumin jelinin daha hızlı rejenerasyon özellikleriyle elastik bir doku için uygun olacağı belirtilmiştir [43].

2.4 Doku İskelesi Üretim Metotları

Doku iskelelerini üretmek için seçilen yöntem, doku iskelesinin formunu (lif, köpük, jel vb.), gözenekliliğini, gözenek boyutunu, mekanik dayanımını etkiler bu yüzden üretim metodunu belirlemek doku iskelesi tasarımının temelini oluşturur. Doku iskelelerini üretmek için genellikle faz ayrılması, kriyojelasyon, elektro eğirme, gözenek yapıcı madde/çözücü uzaklaştırma, gaz köpüklendirme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca 3 boyutlu yazıcılar da doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır. Doku iskelesi üretim yöntemlerinin her biri farklı boyut aralığında gözenekleri oluşturur. Şekil 2.2'de doku iskelesi üretim yöntemlerinin oluşturduğu gözenek boyutlarının aralığı gösterilmektedir.



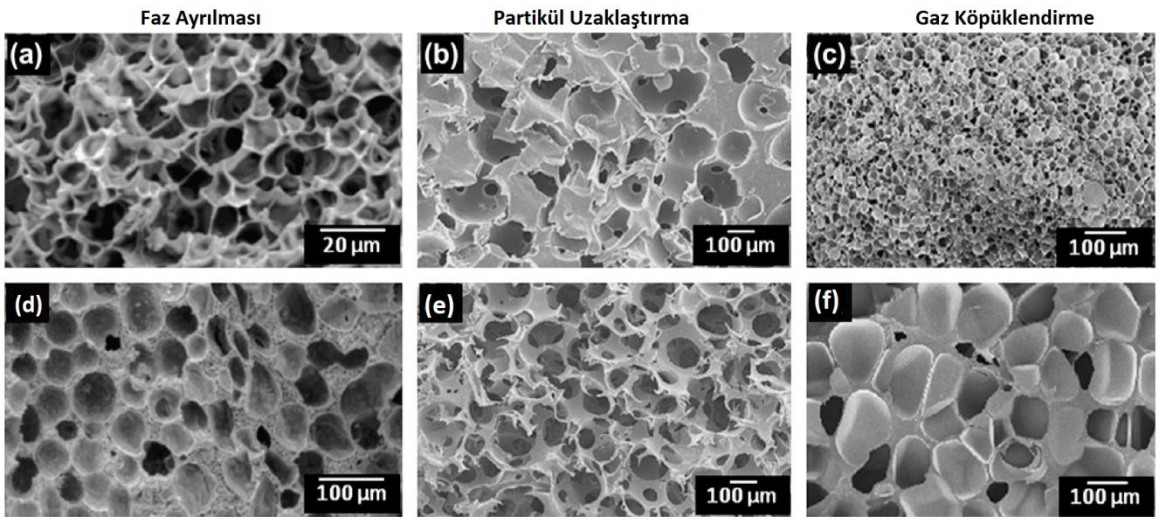
Şekil 2.2 Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen doku iskelelerinin gözenek boyutlarının aralığı [44]

Gözenek yapıcı madde uzaklaştırma/çözücü dökme yöntemlerinde, hazırlanan polimer çözeltisine gözenekleri oluşturması için belirlenen boyutta uygun maddeler eklenir. Çözeltiye eklenen maddelerin polimer çözeltisinde çözünmemesi gereklidir. Ardından kurutulup, katılaşan doku iskelesine gözenek yapıcı maddeleri uzaklaştırmak için uygun bir çözücü dökülür, maddelerin bu çözücüde çözünmesi sağlanarak yapıdan uzaklaştırılırlar. Böylece gözenek boyutları, kullanılan maddelerin boyutuna bağlı olarak ayarlanabilen doku iskeleleri üretilebilir. Tuzlar, şekerler, yağlar ve polimerler gözenek yapıcı madde olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde maddelerin polimer çözeltisinde çözünmemesi ve ikinci aşamada maddeleri uzaklaştırmak için oluşan doku iskelesine dökülen çözücünün polimeri çözmemesi gereklidir [45]. Kullanılan maddelerin boyutu ve şekli doku iskelesindeki gözenekleri belirler. Üretim prosesinin spesifik bir ekipman gerektirmemesi bu yöntemin avantajı iken, partikül boyutunu seçmedeki zorluk, yeterli mekanik özellikleri sürdürme ve geniş hacimli yapılardan partiküllerin uzaklaştırılmasının zor olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca yöntemde

organik çözücüler kullanılmaktadır bu çözücüler toksik olabileceği için doku iskelesine sonraki aşamalarda ekilen hücrelere zarar verebilir [46].

Gaz köpüklendirme, doku iskelelerinin üretimi için kullanılan yaygın yöntemlerden biridir. İlk kez 1991 yılında poli(alfa-hidroksi asit)lerden doku iskelesi üretimi için gaz köpüklendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, polimer sistemine polimerin camsı geçiş sıcaklığını düşürmek ve plastikleştirmek için yüksek basınçta CO_2 nüfuz ettirilir. CO_2 ve polimer arasındaki moleküller arası etkileşimin ardından basıncın hızlı bir şekilde düşmesiyle termodinamik kararsızlık oluşur ve gaz oluşmasıyla doku iskelesinde gözenekler meydana gelir. Gaz köpüklendirme amorf ve yarı kristal polimerlere uygulanabilen bir yöntemdir [47]. Şekil 2.3'te doku iskelelerinin üretiminde kullanılan yöntemlerin her birinin farklı gözenek yapılarını oluşturduğu görülmektedir.

Elektro eğirme yöntemi, doku iskelelerinin elde edilmesi için oldukça fazla kullanılan lifli yapıda malzemelerin üretildiği bir yöntemdir. Elektro eğirme prosesinde polimer çözeltisi, genellikle iletken bir metal iğneden çekilir. İletken iğnenin ucundan ayarlanan bir mesafeye (genellikle 5-25 cm) yerleştirilen topraklanmış hedef ve iğne arasında gerilim uygulanır. Polimer çözeltisindeki elektriksel potansiyel oluşan damlacıkların yüzey gerilmesini ortadan kaldırdığı için, polimer iğneden çıkar, çözücü buharlaşır ve polimer lifler zemin üzerine toplanır. Oluşan dokunmamış lifli polimerin boyutu, 100 nanometreden birkaç mikron aralığında prosesin parametrelerine bağlı olarak değişir [48].



Şekil 2.3 Farklı yöntemlerle üretilen doku iskelelerinin iç morfolojilerinin yatay kesitlerinin SEM görüntüleri; (a ve d) faz ayrılması yöntemiyle hazırlanan gözenekli poli(L-Laktik asit) doku iskeleleri, (b ve e) poli(etil metakrilat) partiküllerinin uzaklaştırılmasıyla üretilen polikaprolakton doku iskeleleri, (c ve f) 105^{o}C'de gaz köpüklendirme yöntemiyle hazırlanan poli(ester amin) örnekleri [49]

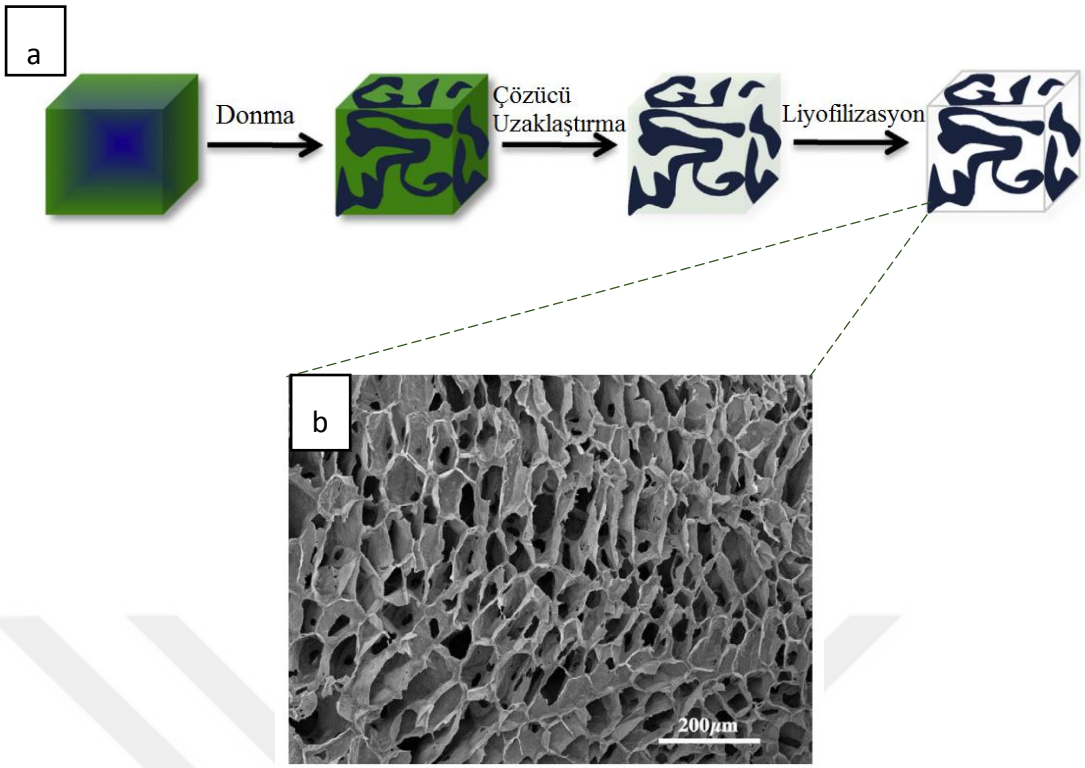
Faz ayrılması, sistemin parametreleriyle ayarlanabilen gözenek boyutu ve gözenekliliğe sahip, gözenekler arası bağlantılılığın sağlanabildiği doku iskelelerinin üretilebildiği bir yöntemdir [50], [51]. Faz ayrılması, bir polimer ve bir çözücünün termodinamik olarak kararsız hale gelmesi ve iki faza ayrılmaya yönelmesiyle polimer-zengin ve polimer zayıf fazları oluşan bir sistemde elde edilir. Çözücünün giderilmesi sırasında polimer-zengin faz katılaşır ve 3 boyutlu doku iskelesi elde edilir.Bu çalışmada doku iskelelerini sentezlemek için kullanılan iki yöntemden biri olan faz ayrılması metodu aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Kriyojelasyon yöntemi büyük gözenekli çapraz bağlı jelleri oluşturmak için çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklarda çapraz bağlama reaksiyonlarının gerçekleştiği jelleşme metodudur. Sıfırın altındaki sıcaklıklarda oluşan buz kristallerinin etrafındaki donmayan/yarı donmuş fazda polimerizasyon ve çapraz bağlama reaksiyonları meydana gelir. Oluşan jelde daha sonra buz kristallerinin eritilmesiyle büyük gözenekler oluşur böylece makro gözenekli jeller elde edilir. Kriyojelasyon yöntemi bu çalışmada kullanılan ikinci yöntemdir ve bu yöntemle alakalı da aşağıda ayrıntılı olarak bilgiler verilmiştir.

2.4.1 Faz Ayrılması

Faz ayrılması 3-boyutlu doku iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [52]. Ma, Zhang ve Nam, Park poliester bazlı oldukça gözenekli doku iskelelerini üreterek bu yöntemin öncüleri olmuşlardır [48].

Bu yöntemde, polimer ve çözücüden oluşan homojen çok bileşenli bir sistembelirli şartlar altında, termodinamik olarak kararsız hale gelir ve sistem serbest enerjisini düşürmek için tek fazdan daha fazla faza ayrılmaya yönelir [48], [54]. Polimer çözeltisi polimerce-zengin ve polimerce-zayıf fazolarak iki faza ayrılır. Termal olarak ve çözücü etkileşimi gibi temel olarak iki farklı yöntemle faz ayrılması başlatılabilir. Çözücü ile başlatılan faz ayrılmasında, hazırlanan polimer çözeltisi, polimeri çözmeyen ikinci bir çözücüye batırılır. Polimeri çözen ve çözmeyen çözücüler arasındaki temas bir sıvı çözeltisinin oluşumuna neden olur ve ardından faz ayrılmasıyla farklı yapılar oluşur [4]. Diğer bir teknik ise faz ayrılmasının termal olarak başlatılmasıdır [53]. Termal olarak başlatılan, katı-sıvı faz ayrılması prosesinde faz ayrılması, polimer çözeltisinden çözücünün kristalleşmesini başlatmak için sıcaklığın düşürülmesiyle meydana gelir. Çözücü kristallerinin süblimasyon ya da çözücüyle uzaklaştırma yöntemleriyle giderilmesinin ardından, polimer-zengin faz dondurulmaya devam ettirilerek katılaşır, çözücü kristallerinin olduğu kısımlarda meydana gelen boşluklar oldukça gözenekli polimer yapısının oluşmasını sağlar [54]. Bu yöntemde elde edilen doku iskelelerinin gözenek boyutları 10-100 µm arasında değişmektedir [52]. Üretilen doku iskelelerinin morfolojisi jelleşme sıcaklığı, çözeltideki polimerin türü ve konsantrasyonu, kullanılan çözücü ve çözücü konsantrasyonu gibi parametrelerle kontrol edilebilir [53]. En önemli avantajı bu yöntemde 3 boyutlu doku iskelelerinin üretilmesi için boyutları belli kalıpların kullanılmasının yeterli olmasıdır, karmaşık ekipmanlar gerekli değildir [48], [53]. Şekil 2.4'de faz ayrılması yönteminin şematik gösterimi ve faz ayrılmasıyla üretilen oldukça açık ve birbiriyle bağlantılı gözenekli doku iskelesinin SEM görüntüsü gösterilmektedir. Faz ayrılması yönteminin dezavantajı üretim prosesinin dondurma, çözücü uzaklaştırma gibi üretim adımlarıyla uzun sürmesidir[48].

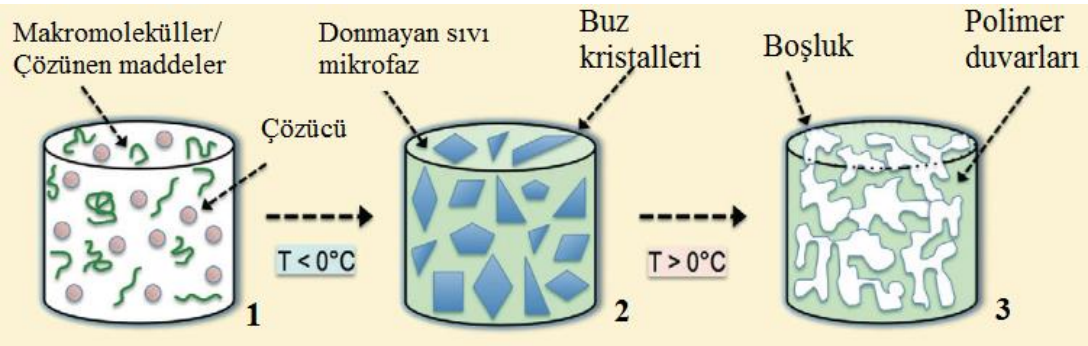


Şekil 2. 4 Faz ayrılması prosesinin şematik olarak gösterimi (a) [48], katı-sıvı faz ayrılması sonucu oluşan PLLA doku iskelesinin SEM görüntüsü(b) [54]

2.4.2 Kriyojelasyon

Lozinsky'nin grubu tarafından kriyojelasyon yöntemiyle ilk kez gözenekli polimer malzemeler üretilmiştir, bu gözenekli polimerik malzemeler, kriyojel ya da makrogözenekli hidrojel olarak adlandırılmaktadırlar. Kriyojelasyon yönteminde deniz suyunun donması sırasındaki mekanizmadan ilham alınmıştır. Deniz suyu donarken buz kristallerinin oluşmasıyla suda çözünen tuzlar kristallerden uzaklaşır. Kristallerin çevresinde tuzları içeren donmayan bir faz oluşur. Kriyojelasyon mekanizmasında da bu proses taklit edilmektedir [55]. Monomer ya da polimer, başlatıcı, çapraz bağlayıcı içeren çözelti, çözücünün donma noktası altına soğutulduğunda, reaksiyon bileşenleri donmayan kısımda birikir ve çapraz bağlama reaksiyonu bu donmamış bölgede gerçekleşir.Donma ile birlikte oluşan buz kristalleri kriyojelasyon yönteminde gözenek yapıcı bir kalıp olarak rol oynar. Buz kristalleri daha sonra eritildiğinde birbiriyle bağlantılı gözenekli bir yapı oluşur. Kriyojellerdeki gözeneklerin boyutu 1-100 µm arasındadır [56]. Şekil 2.5'te kriyojelasyon prosesinin şematik gösterimi verilmiştir. Kriyojelasyon prosesi temel olarak 4 basamaktan oluşmaktadır [56], [57].

- İlk olarak kriyojeli oluşturmak için monomer, başlatıcı (polimerizasyon tipi kriyojel durumunda), çapraz bağlayıcı ve polimer içeren (makromoleküllerin çapraz bağlanmasıyla hazırlanan kovalent kriyojel durumunda) başlangıç karışımı hazırlanır. Bu basamakta, çözeltiyi dondurmadan önce jelin oluşması minumuma indirilmek istenir, bu yüzden başlatıcı ya da çapraz bağlayıcı sisteme eklenmeden başlangıç çözeltisi soğutulur.
- Ardından başlangıç çözeltisi kriyojeli oluşturmak için çözücünün donma noktasının birkaç derece altında dondurulur. Bu basamak kriyojelasyon yönteminin kritik aşamasıdır. Donma işleminde çözücünün kristallenmesi ile oluşacak gözeneklerin şekli, boyutu kriyojelin morfolojisini etkiler.
- Üçüncü basamak ise jelleşme reaksiyonun gerçekleşmesi için çözücünün donma noktasının altında uygun sıcaklıkta başlangıç çözeltisinin bekletilmesidir. Donmuş sistem, katı bir görünüme sahip olmasına rağmen donmuş kristallerin etrafında donmayan sıvı mikrofaz denilen bölge vardır, reaksiyonlar bu bölgede gerçekleşir ve çapraz bağlı jel oluşmaya başlar.
- Son basamakta ise reaksiyon tamamlandıktan sonra donmuş sistem uygun bir pozitif sıcaklıkta eritilir. Jel sisteminde oluşan kristaller gözenek yapıcıdır, kristallerin erimesi ile makro gözenekler oluşur. Donma işleminde oluşan kristallerin büyümesi diğer kristaller ile karşılaşıncaya kadar devam eder, böylece eritme işleminden sonra birbiri ile bağlantılı gözenekli bir yapı oluşur [56], [57].



Şekil 2.5Kriyojelasyon prosesinin şematik gösterimi; 1;başlangıç sistemi, polimer, monomer çözeltisi, 2;kriyojelasyon; sıfırın altındaki sıcaklıkta karışımın donması, 3; eritilen kriyojel, erime sonrası birbiriyle bağlantılı büyük gözenekli kriyojel [58]

2.5 Doku Mühendisliği için Jeller

Jeller, yapılarında sıvıların tutunabildiği, çapraz bağlı, elastik ve üç boyutlu ağsı yapıda malzemelerdir [59]. Jeller, polimer ve immobilize çözücü içerirler, üç boyutlu ağın oluşması için polimer zincirleri birbirlerine kimyasal ya da fiziksel bağlarla bağlanırlar [56], [60]. Katı olmalarına rağmen metal, seramik gibi malzemelere göre yüksek şekil değiştirme özelliğine sahiptirler. Jeller, üretildiği malzemeye göre sentetik ve doğal jel; ağdaki sıvı ortamına göre hidrojel ya da organojel; çapraz bağlanmasına göre kimyasal ya da fiziksel jel olarak sınıflandırılırlar [59]. Çözünmeyen polimer ağını oluşturmak için hidrofilik homopolimer, kopolimer ya da makromerlerden oluşan jellere hidrojel denir. Hidrojeller, suda çözünmeden kuru durumuna göre 10-100 kata kadar suyu absorplayabilen üç boyutlu hidrofilik polimerik ağlardır [56], [60]. Sulu fazda hidrofilik polimer zincirlerinin çözünmemesi için çapraz bağlar olmalıdır ve böylece ağsı yapı oluşur [61], [62]. Hidrojeller, su ile termodinamiksel olarak uyumlu oldukları için elastik ve yumuşak yapıdadırlar. Büyük oranda suyu absorplayabilirler ve sıcaklık, pH, çözücünün niteliği, elektriksel alan gibi dış uyarıcılara karşı hacimlerinde büyük değişiklikler gösterebilirler[61],[63]. Doku iskelelerinin dış uyarılara karşı hızlı cevap vermesi, biyolojik sıvıları yapı içine hızlı bir şekilde absorplaması ve iyi mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ancak, geleneksel hidrojellerin dış uyarıcılara karşı cevabının yavaş olması en önemli dezavantajlarından biridir. Hidrojellerin suyu absorplaması difüzyon ile olmaktadır ve bu proses yavaş ilerlemektedir.

Kriyojelasyon yönteminde ise hidrojellerin bu dezavantajını ortadan kaldırmak için jelde gözenekli bir yapı oluşturulur. Jelde oluşan birbirine bağlı gözenekli yapı, suyun difüzyon yerine konveksiyon ile gözeneklere dolmasına ve neden olur ve böyle kriyojeller süper hızlı bir şekilde çözücü absorplarlar [60].

Ayrıca, hidrojeller, jelde enerjiyi dağıtma mekanizmasının yeterli olmamasından dolayı çok düşük gerilmelerde kırılırlar. Ancak, kriyojeller kırılgan değillerdir, germe, bükme gibi şekil değişimlerine karşı oldukça dayanıklıdırlar ve çatlak ilerlemesi olmadan tamamen sıkıştırılabilirler [63], [64]. Örneğin Okay vd. tarafından yapılan bir çalışmada, ipek kriyojelleri parçalanmadan %100 ve ipek hidrojelleri ancak %10'a kadar sıkıştırılabilmiştir [65]. Başka bir çalışmada ise agoroz-jelatin kriyojeller doku iskelesi

olarak kullanılmak üzere üretilmişlerdir. Bu çalışmada agoroz-jelatin kriyojeller kalıcı şekil değişimi olmadan orijinal şekillerinin %90'ına kadar sıkıştırılabilmişler ve yük kaldırılıp tekrar suya batırıldıklarında orijinal hallerine geri dönmüşlerdir [66].

Hidrofilik yapıdaki kriyojeller, gözenekli yapıları sayesinde hücrelerin organizasyonunu, besin, oksijen difüzyonunu ve atık metabolitlerin uzaklaştırılmasını sağlarlar, birbiriyle bağlantılı gözenekli yapıları ile kan damarları büyüyebilir ve hücre dışı matriksin elastik ve mekanik özelliklerine benzer yapıda olmaları nedeniyle *in vivo* şartları taklit edebilirler. Bu avantajları sayesinde kriyojeller, hasarlı dokuların tedavisi için doku iskeleleri olarak kullanılmaktadır [67].

Literatürde sentetik ve doğal polimerler kullanılarak üretilen birçokkriyojel doku iskeleleri bulunmaktadır. Kolajenin kısmi bozunması sonucu oluşan jelatin, hücre yapışmasını arttırma özelliğine sahiptir bu yüzden farklı doku mühendisliği uygulamaları için kriyojel doku iskelelerinin üretiminde kullanılmaktadır [68], [69]. Herhangi bir toksik etkisi olmayan kazein, ovalbumin kullanıldığı protein bazlı kriyojeller doku mühendisliği uygulamaları için uygun bulunmuştur [43]. Kitosan, aljinat gibi polisakkaritlerin kullanıldığı kriyojel doku iskeleleri de üretilmiştir [70], [71]. Literatürde kriyojel doku iskelelerinin üretilmesi için poli(hidroksietil metakrilat)/jelatin [72], polietilen glikol/jelatin [73], polivinilalkol/jelatin [74], poli(akrilo nitril)/jelatin [75] gibi sentetik ve doğal polimerlerin birlikte kullanıldığı hibrit jellerde bulunmaktadır. Özellikle kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hidroksiapatit-polimer içeren kompozit kriyojel doku iskeleleri üzerine çalışmalar da bulunmaktadır [76], [77].

Literatürde, hiyerarşik gözenekli kriyojellerle de alakalı bazı çalışmalar mevcuttur. Doğal polimerlerin kullanıldığı çok az sayıda birkaç çalışma bulunurken, sentetik polimerler daha yoğun olarak çalışılmıştır. Aşağıdaki bölümlerde bu çalışmalarla alakalı özet bilgiler verilmiştir.

2.5.1 Hiyerarşik Gözenekli Doğal Polimer Bazlı Kriyojeller

Doğal polimerler kullanılarak hazırlanan hiyerarşik gözenekli kriyojellerle alakalı çalışmalar sınırlıdır. Dinu vd., tarafından yapılan çalışmada, kriyojellerin büyük gözeneklerinde biriken hücrelerin gözenekleri tıkaması sonucu hücrelere besin

sağlanmasının sınırlandırıldığı ve hücrelerin büyümesinin bu yüzden azalacağı belirtilmiştir. Bu yüzden çalışma, geniş gözenekleri arasında daha az yoğun duvarları olan uygun gözenekli kriyojelleri tasarlamayı amaçlamıştır. Bu şekilde büyük gözenekler hücreler ile dolduğunda geçirgen duvarların düşük molar kütleli maddelerin geçişine izin vereceği belirtilmiştir. Çalışmada kriyojelasyon yöntemi, gözenek yapıcı maddelerin uzaklaştırılması yöntemiyle birleştirilerek gözenekleri ayarlanabilen hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojelleri üretilmiştir. Gözenek yapıcı madde olarak PMMA kullanılmıştır. PMMA'nın partikül boyutunun artması ile büyük gözeneklerin boyutunda azalma olurken, birbiri ile bağlantılı küçük gözeneklerin sayısının arttığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, PMMA'ın boyutu ile daha az yoğun gözenek duvarları elde edilmiştir [78].

Kundu vd., tarafından yapılan çalışmadan [79], ipek fibroin kriyojelleri -20^{o}C ve -80^{o}C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta hazırlanmış ve donmuş fibroin jellerin buz kristalleri etanol kullanılarak -20^{o}C'de eritilmiştir. Etanolün kullanılması ile reaksiyonla başlatılan faz ayrılmasının sonucu olarak jellerin yapısında küçük gözenekler oluşmuştur. Etanolün etkisi ile gözenek duvarlarında oluşan küçük gözeneklerin, gözeneklerin birbiri ile bağlantılılığını arttırdığı ve bu özelliğin hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını artıracağı belirtilmiştir [79].

2.5.2 Hiyerarşik Gözenekli Sentetik Polimer Bazlı Kriyojeller

Hiyerarşik gözenekli sentetik polimerlerle ilgili doğal polimerlere göre daha fazla çalışma bulunmaktadır. Literatürde sentetik polimerlerin kullanıldığı, kriyojelasyon ve farklı yöntemlerin birleştirilmesiyle üretilen hiyerarşik gözenekli kriyojeller bulunmaktadır. Mattiasson vd., tarafından yapılan çalışmada [80], -12^{o}C'de hazırlanan poliakrilamid kriyojellerinin morfolojisine tuzların ve çözücülerin etkisi ayrı olarak incelenmiştir. Tuz olarak NaCl ve $CaCl_2$, çözücü olarak ise su ile karışabilen aseton ve etanol monomer çözeltilerine eklenmiştir. Tuzların jellerin gözenekliliğinde etkisi bulunmazken, daha kalın gözenek duvarları oluşmuştur. Kriyojelasyon yönteminde termal olarak başlatılan katı-sıvı faz ayrılmasının sonucu olarak büyük gözenekler oluşurken, çözücülerin eklenmesiyle reaksiyonla başlatılan faz ayrılmasından kaynaklanan 1 µm boyutlu küçük gözenekler meydana gelmiştir [80]. Mattiasson vd.,

bir başka çalışmada poliakrilamid kriyojelleri -12^{O}C ve -18^{O}C'de hazırlanmış ve farklı soğutma hızları uygulandığında -18^{O}C'de hazırlanan kriyojelin yapısında büyük gözenekler ve 0,1-3 µm boyutunda küçük gözenekler oluşmuştur [81]. Özmen ve Okay tarafından yapılan çalışmada [82], poli(akrilamid) kriyojelleri -18^{O}C'de DMSO çözeltilerinde hazırlanmış, %25 DMSO çözeltisinde hazırlanan kriyojeller 10 µm boyutunda gözenekleri olan yapı göstermiştir. %60 DMSO çözeltisinde sentezlenen kriyojellerde ise kriyojeller iki morfoloji göstermiş; mikrometre boyutunda gözenekler ve oluşan mikroküreciklerin arasında mikrometre altında gözenekler oluşmuştur [82]. Bir diğer çalışmada -12^{O}C'de sentezlenen iminodiasetik asit-poliakrilamid kriyojelleri büyük gözeneklerinin duvarlarında birbiriyle bağlantılı küçük gözeneklerin olduğu bir yapı göstermiştir [83]. Reichelt vd., yaptığı çalışmada PEG polimeri gözenek yapmak için kullanılmış ve kriyojeller -20^{O}C'de sentezlenmiş [84]. 100-200 µm aralığında büyük gözenekler ve 10 µm boyutunda küçük gözeneklerin oluşmasıyla hiyerarşik gözenekli kriyojeller üretilmiştir. Bir başka çalışmada, poli(hidroksietil metakrilat-L-laktit-dekstran) (pHEMA-LLA-D) kriyojeli çözücünün donma noktası altında farklı sıcaklıklar uygulanarak N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAm) çapraz bağlayıcısı kullanılarak sentezlenmiştir [85]. Yapısında 185±5 µm boyutunda büyük gözeneklerin ve 24±5 µm boyutunda küçük gözeneklerin olduğu kriyojeller elde edilmiştir. Buz kalıplama ve UV ile başlatılan kriyopolimerizasyonla, poli(N-izopropilakrimalid) (PNIIPAAm)'in kil ile çapraz bağlanmasıyla elde edilen kompozit kriyojelin yapısında mikrometre boyutunda büyük gözenekler ve nanometre boyutunda küçük gözenekler oluşmuştur[86]. Düşük sıcaklıkta (-20^{O}C) radikal polimerizasyonuyla üretilen poli(hidroksietil metakrilat), poli(etilen glikol) diakrilat çapraz bağlayıcısıyla çapraz bağlanarak hiyerarşik gözenekli kriyojeller sentezlenmiştir. Kriyojellerin küçük gözenekleri reaksiyonla başlatılan faz ayrılmasıyla oluşurken, 20-50 µm boyutunda büyük gözenekler buz kristalleriyle oluşmuştur [87]. Tuncaboylu ve Okay'ın yaptığı çalışmada ise poliizobütilen kriyojellerine silika nanopartiküllerinin eklenmesi ile hibrit orgonojeller sentezlenmiştir. -18^{O}C'de hazırlanan jellerde, çözücü olarak kullanılan siklohekzanın kristalleriyle büyük gözenekler oluşurken silika nanopartiküllerinin birikmesi ile küçük gözenekler oluşmuştur [88].

BÖLÜM 3

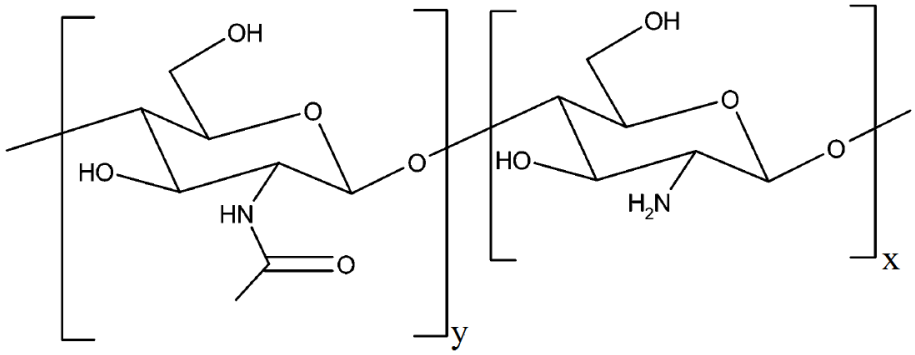
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Karides kabuklarından elde edilen kitosan (deasetilasyon derecesi ≥85), tavuk yumurtası beyazından ovalbumin ve poli(etilen glikol) diglisidil eter (PEGDGE) Sigma-Aldrich'ten, gluteraldehit (%25 sulu çözelti) Merck'tensağlanmıştır. Asetik asit (Merck), doku iskelelerinin üretiminde polimerleri çözmek için kullanılmıştır. Milli Q su, Millipore su sisteminden elde edilmiştir, doku iskelelerinin sentezinde, yıkanmasında ve şişme-kinetik ölçümlerinde kullanılmıştır. N-bütanol (Sigma-Aldrich), faz ayrılması ve kriyojelasyon ile üretilen süngerlerde gözenek oluşturucu olarak polimer karışımlarına eklenmiştir. Çalışmalarda, aseton (Merck) çözücü değişiminde, n-bütanolü uzaklaştırmada ve buz kristallerinin çözünmesinde -20^{o}C'de soğutulmuş olarak kullanılmıştır. Sodyum hidroksit (NaOH) (Riel de Haen),üretilen süngerlerdeki kalan asetik asidi nötrleştirmek için kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallara herhangi bir ön işlem uygulanmamış, temin edildikleri halleriyle kullanılmıştır.

3.1.1 Kitosan

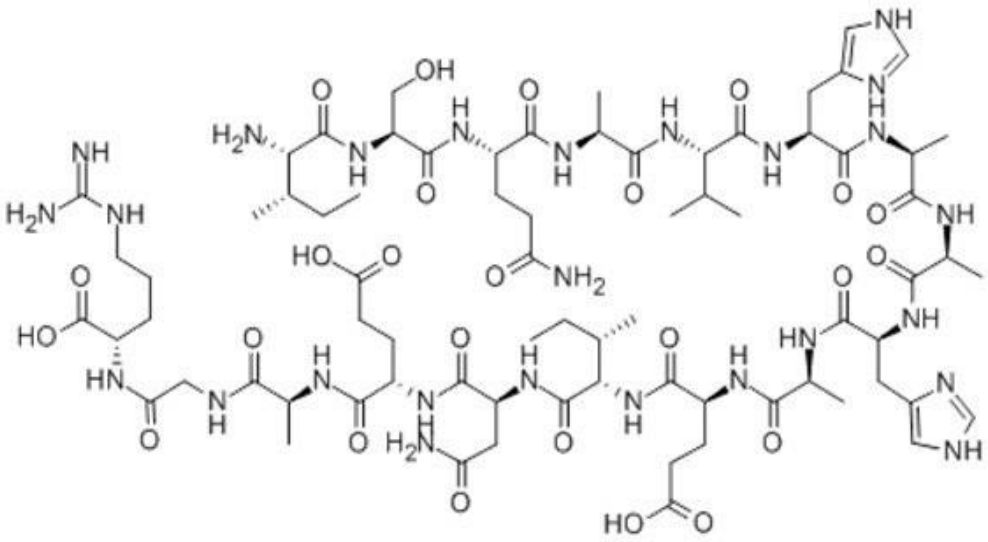
Çalışmada, kitosan faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemleri ile oluşturulan süngerlerin üretimi için hazırlanan polimer karışımına eklenen doğal polimerlerden biridir. Şekil 3.1'de kitosanın kimyasal yapısı gösterilmektedir. x birimlerinin yüzdesi deasetilasyonun derecesini gösterir, kitosan ağırlıklı olarak x birimlerinden oluşur, kitin ise y birimlerinden oluşmaktadır.



Şekil 3. 1 Kitosanın kimyasal yapısı

3.1.2 Ovalbumin

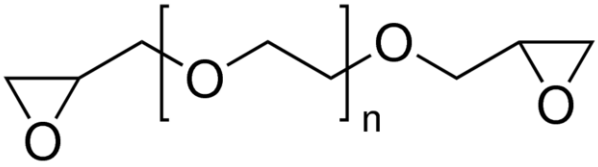
Bu çalışmada, ovalbumin kriyojel doku iskelelerinin üretimi için hazırlanan polimer karışımına eklenen ikinci doğal polimerdir. Şekil 3.2'de ovalbuminin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 3. 2 Ovalbuminin kimyasal yapısı

3.1.3 Poli(Etilen Glikol) Diglisidil Eter

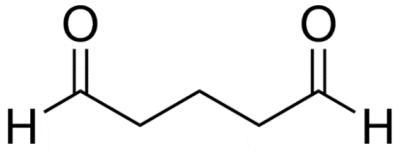
PEGDGE, faz ayrılması metodu ile üretilen kitosan süngerlerin çapraz bağlanma reaksiyonunda çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Şekil 3.3'te PEGDGE'nin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3. 3 PEGDGE'nin kimyasal yapısı

3.1.4 Gluteraldehit

Gluteraldehit kriyojellerin üretimi için -20^{o}C'de yapılan çapraz bağlanma reaksiyonlarında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Şekil 3.4'de gluteraldehitin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 3. 4 Gluteraldehitin kimyasal yapısı

3.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada polimer çözeltilerini hazırlamak için manyetik karıştırıcı, vorteks ve santrifüj cihazları kullanılmıştır. Faz ayrılması yönteminde 30 mL'lik polistiren plastik kaplarda, kriyojelasyon yönteminde ise 2 mL'lik şırıngalarda reaksiyonlar yapılmıştır. Reaksiyonlar -20^{o}C'deki dondurucuda gerçekleştirilmiştir. Üretilen malzemeler, liyofilizatör ve vakumlu etüvde kurutulmuştur. Kurutulmuş jellerin çaplarını ölçmek için Mitutoyo dijital kumpas kullanılmıştır.

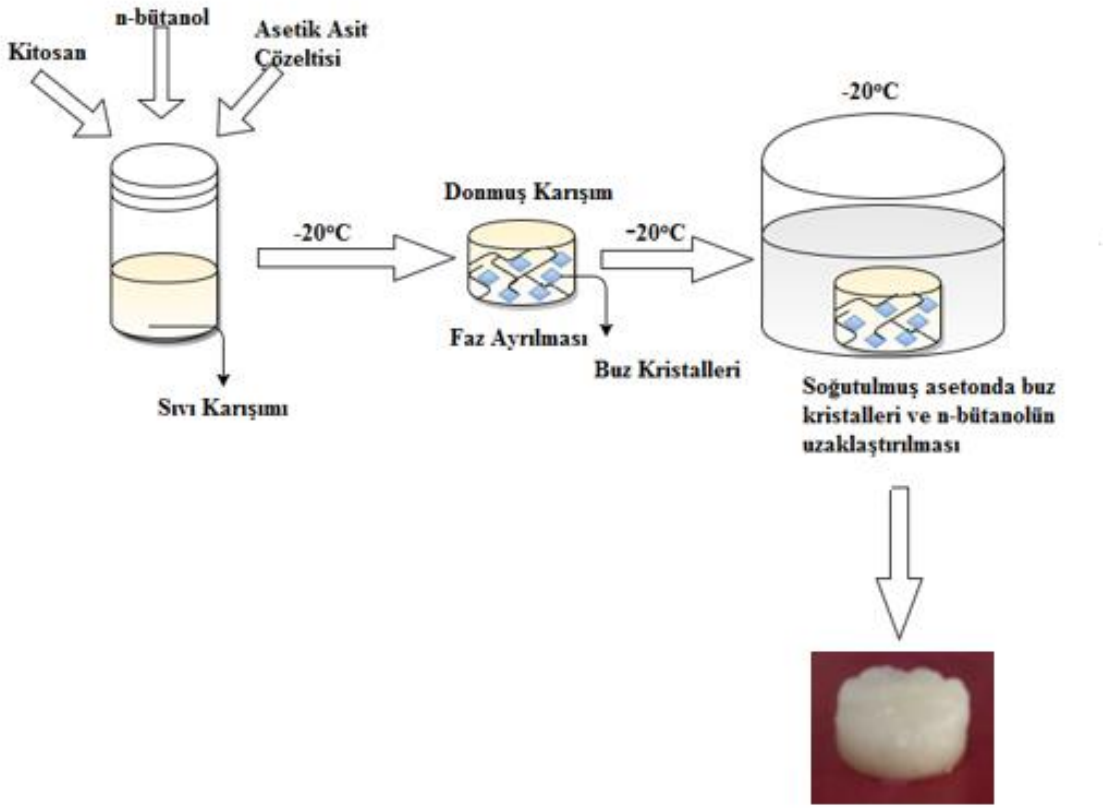
Sentezlenen malzemelerin yapısını analamak içinATR-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Shimadzu-IR Prestige 21), iç morfolojilerini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (Jeol JSM-6510) ve mekanik özelliklerini belirlemek için Texture Stabil Micro cihazları kullanılmıştır.

3.3 Faz Ayrılması Yöntemiyle Hiyerarşik Gözenekli Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerin Hazırlanması

Hiyerarşik gözenekli kitosan-PEGDGE hibrit jelleri, kitosan ile PEGDGE polimerleri arasında sonradan çapraz bağlanma reaksiyonu yapılarak üretilmiştir. Jelleri

sentezlemek için % 8,5 kitosan konsantrasyonu içeren kitosan polimer çözeltileri, 30 ml'lik plastik viallerde hazırlanmıştır. Öncelikle 5 ml % 5'lik asetik asit çözeltilerine belirlenen miktarda kitosan ve 1 ml n-bütanol eklenerek, karışım vortekslenmiştir. Karışımların viskoziteleri arttığı için karıştırma teflon bir çubukladevam ettirilmiş, ardından oluşan yüksek viskoziteli karışımlar 4400 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, plastik vialler içinde bulunan karışımlar -20^{o}C'deki dolaba 24 saat bekletilmek üzere alınmıştır. Doku iskelelerinin gözenekliliğine n-bütanolün etkisini görmek için kontrol örneğine n-bütanol eklenmeyerek jel üretim prosedürü aynı kalacak şekilde hazırlanmıştır.24 saat sonra -20^{o}C'deki dolaptan alınan plastik vialler kesilerek içindeki donmuş doku iskeleleri yapıdaki n-bütanol ve çözücüyü uzaklaştırmak için, önceden soğutulmuş aseton ile doldurulan 125 ml'lik cam şişelere alınmıştır.

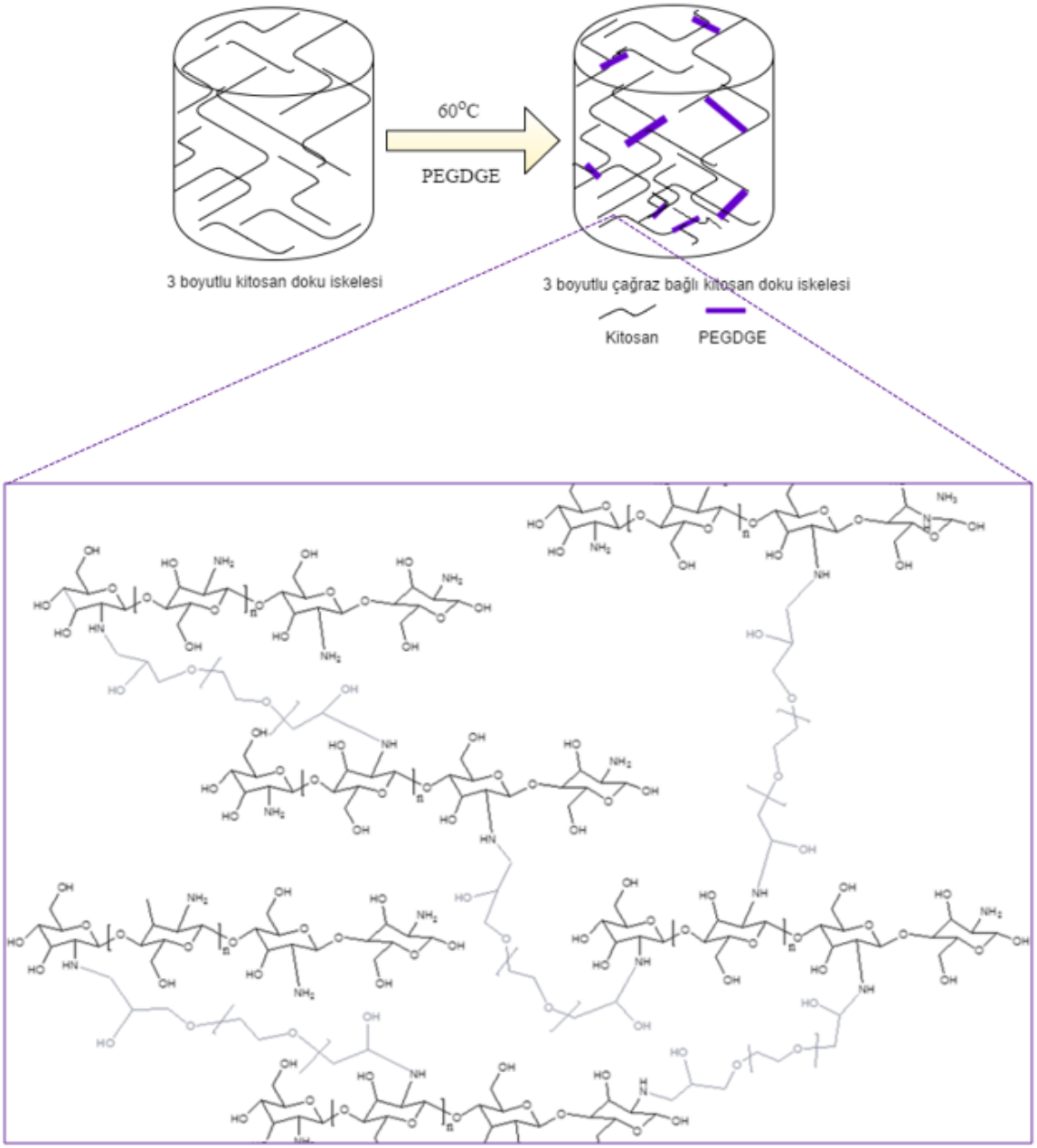
Hiyerarşik gözenekli 3 boyutlu kitosan süngerlerinin üretimi şematik olarak Şekil 3.5'te gösterilmektedir. Soğutulmuş aseton içinde donmuş doku iskeleleri -20^{o}C'de 96 saat bekletilmiş ve soğutulmuş aseton en az 3 kez tazelenmiştir.



Şekil 3. 5 Hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin faz ayrılması yöntemiyle üretilmesinin şematik gösterimi

96 saatin ardından, doku iskeleleri cam şişelerdeki soğuk asetondan alınarak 3 saat boyunca 60^{o}C'deki etüvde kurutulmuştur. Kurutulan doku iskelelerinin yüzeyinden yaklaşık 1-2 mm kalınlığında ince bir tabaka jiletle kesilerek alındıktan sonranumuneler yapıda kalan asetik asidi nötrleştirmek için 1 M 150 mL sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisine batırılarak 3 saat bekletilmiştir. NaOH çözeltisinden alınan doku iskeleleri distile su ile 48 saat yıkanmış, sular en az 3 kez değiştirilmiş ve yıkanan doku iskeleleri 60^{o}C'de etüvde 48 saat kurutulmuştur.

İleri çapraz bağlama reaksiyonları için kurutulan matrisler, daha önce hazırlanan % 0, % 10, % 30, % 50, % 70, % 100 PEGDGE-su çözeltilerine batırılarak 60^{o}C'de 6 saat bekletilmiştir. Şekil 3.6'da 3 boyutlu kitosan doku iskelesinin PEGDGE ile çapraz bağlanma reaksiyonu şematik olarak gösterilmektedir. Çapraz bağlanma reaksiyonunun ardından kitosan-PEGDGE hibrit doku iskeleleri distile su ile yıkanmış ve yıkama suyunun pH'sı kontrol edilmiştir. Son olarak kitosan-PEGDGE hibrit doku iskeleleri yapıları liyofilizatörde (-60^{o}C, 0,549 mbar) 2 gün boyunca kurutulmuş, kurutulan numuneler karakterizasyon analizlerinin yapılması için daha ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere plastik viallerealınmıştır.



Şekil 3. 6 Kitosan matrisinin PEGDGE ile çapraz bağlanma reaksiyonlarının şematik gösterimi

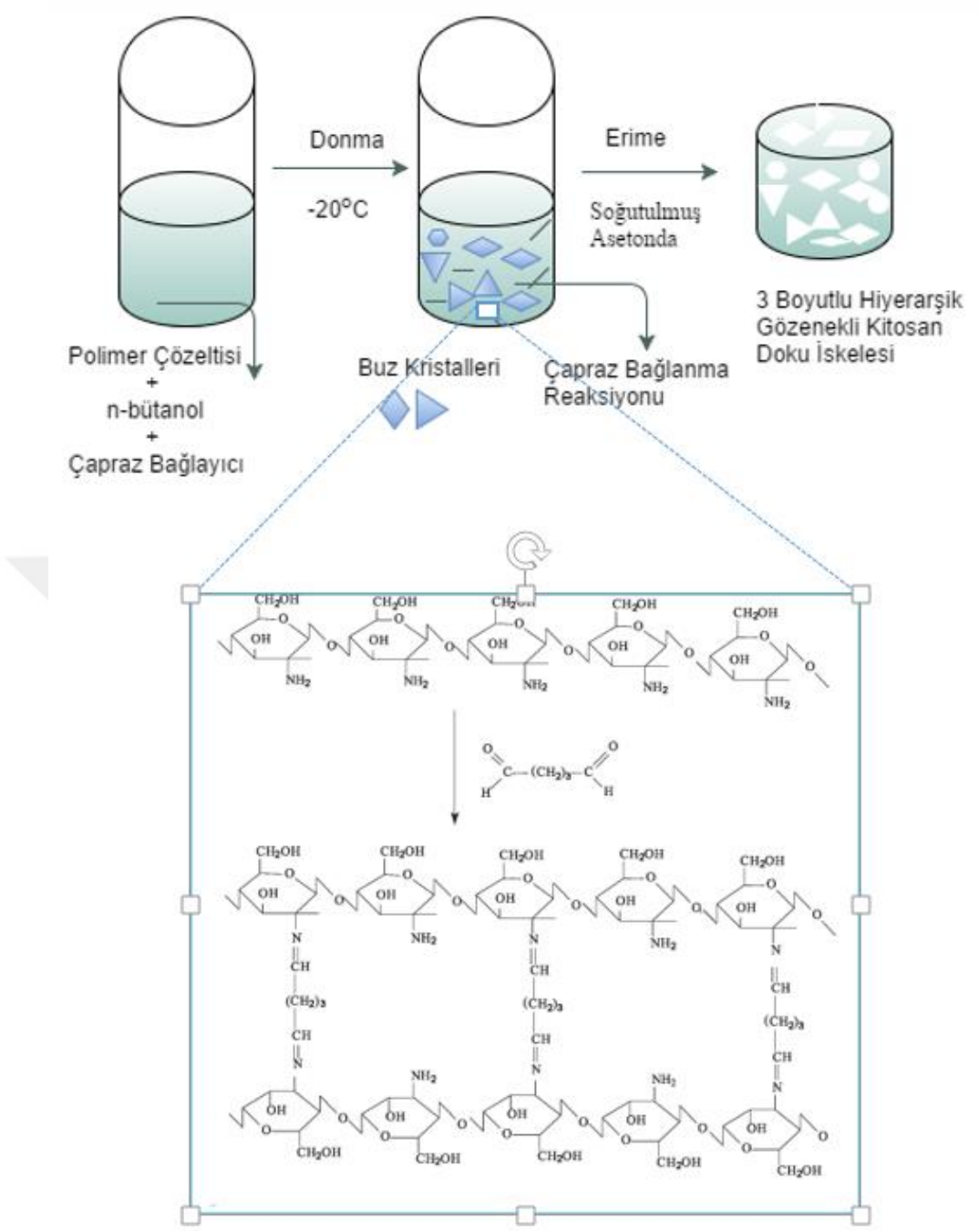
3.4 Kriyojelasyon Yöntemiyle Hiyerarşik Gözenekli Kitosan ve OA-Kitosan Kriyojellerinin Hazırlanması

Çalışmanın bu kısmında ilk önce kitosan kullanılarak hiyerarşik kriyojeller üretilmiştir. Burada yukarıda bahsedilen Kitosan-PEDGE hibrit süngerlerinin ileri bir çapraz bağlanma reaksiyonu ile hazırlanmasından farklı olarak, GA çapraz bağlayıcısı başlangıç

polimer çözeltisine ilk baştan ilave edilmiştir. Hiyerarşik gözenekli kriyojel hazırlanması prosedürü aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

5 ml % 5 asetik asit çözeltisinde % 2,5 polimer konsantrasyonu olacak şekilde kitosan, homojen bir karışım elde edilinceye kadar 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kriyojelasyon prosesi ile birlikte faz ayrılmasının ve dolayısıyla küçük gözenek oluşumunun sağlanması için elde edilen homojen karışımlara 1 ml n-bütanol eklenerek 15 dakika karıştırılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak n karışımlara GA eklenerek 30 sn karıştırılmış ve karışımlar çok hızlı bir şekilde 2 ml'lik şırıngalara alınarak -20^{o}C'de dolaba alınmıştır.

Çapraz bağlayıcı miktarının doku iskelelerine etkisini incelemek için % 0,25, % 0,375, % 0,5 (v/v) GA içeren kitosan kriyojelleri hazırlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra -20^{o}C'deki dolaptan alınan jeller, şırıngalardan çıkarılmışve yaklaşık olarak 15 mm uzunluğunda kesilmiştir. Kriyojellerin sentezlendikten sonraki ilk ağırlıkları ölçülmüştür. Kriyojeller yapılarında oluşan buz kristallerinin çözünmesi ve n-bütanolün uzaklaştırılması için -20^{o}C'de soğutulmuş asetonlara alınmıştır, soğutulmuş aseton en az 3 kez düzenli olarak değiştirilmiştir. Hiyerarşik gözenekli kriyojellerin üretimi şematik olarak Şekil 3.7'de gösterilmektedir. Üretilen kitosan kriyojellerini kurutmak için kriyojeller distile su içinde birkaç gün bekletildikten sonra ve ardından %40, %60, %80, %90,%100aseton-su karışımlarının her birinde artan aseton içeriği ile sırasıyla 1 buçuk saat bekletilmiştir.Aseton su karışımlarımdan alınan jeller oda sıcaklığına 1 saat bekletildikten sonra 40^{o}C'de 24 saat kurutulmuştur. N-bütanolün gözenek yapıcı etkisini incelemek için kontrol örnekleri n-bütanol eklemeden -20^{o}C'de prosedür aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu numune ise kitosan-k olarak kodlandırılmıştır.



Şekil 3. 7 Hiyerarşik gözenekli jellerin kriyojelasyon yöntemiyle üretilmesinin şematik gösterimi ve GA ile kitosan arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu

Son olarak, hiyerarşik gözenekli OVA-kitosan kriyojelleri *in situ* çapraz bağlama reaksiyonu ile yukarıda verilen hiyerarşik kitosan kriyojelleri ile aynı şekilde sentezlenmiştir. Burada ovalbumin, kitosan %1'lik 5 mL asetik asitte çözdürüldükten sonra polimer çözeltisine eklenerek 15 dk karıştırılmıştır. Prosedür kitosan kriyojellerinin hazırlanmasıyla aynı olacak şekilde devam ettirilmiştir.OVA-kitosan

kriyojel doku iskelelerine çapraz bağlayıcı miktarının etkisi % 0,25, 0,4, 0,5, 0,6 (v/v)GA ile 1:1 oranında polimer içeren karışımlarda incelenmiştir. Sentezlenen OVA-kitosan jellerinin hazırlanma şartları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 -20^{o}C'de üretilen OVA-kitosan jellerinin hazırlanma şartları

Ovalbumin: Kitosan Oranı	CL Miktarı % (v/v)	n-bütanol
1:1	0,25	Var
2:1	0,25	Var
3:1	0,25	Var
4:1	0,25	Var
1:1	0,25	Yok
1:1	0,4	Var
1:1	0,5	Var
1:1	0,6	Var

3.5 Karakterizasyon Metotları

3.5.1 ATR-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Üretilen kitosan süngeriyle PEGDGE arasındaki 60^{o}Cdeki çapraz bağlanma reaksiyonu ve GA ile kitosan, OVA arasındaki -20^{o}C'deki çapraz bağlanma reaksiyonlarının gerçeklemesiyle oluşan jellerin yapısı, ATR-FT-IR spektroskopisiyle kurutulmuş numuneler ile incelenmiştir.Mukayese amaçlı jellerin hazırlanmasında kullanılan tüm bileşenlerin de FT-IRspektrumları alınmıştır.

3.5.2 Jel Fraksiyonu Hesabı

Jel fraksiyonu, W_g, bir gram polimerden elde edilen çapraz bağlanmış polimer ağını miktarını ifade etmektedir. Çalışmada çapraz bağlanma reaksiyonusonucu doğal polimerlerden elde edilen jellerinjel fraksiyonu aşağıdaki Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır.

$$W_g = \frac{m_{kuru}}{m_o \times C_o/100} \quad (3.1)$$

Eşitlikte, m_{kuru}; kuru haldeki jelin ağırlığı, m_o sentezlendikten sonra jelin ilk ağırlığı, C_o ise reaksiyonlarda kullanılan polimerin konsantrasyonudur.

3.5.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Kuru jellerin gözenekliliğini ve morfolojisini belirlemek içinSEMkullanılmıştır. Jellerin. Kurutulan örnekler, ilk olarak iletkenliği sağlamak için altın/paladyum ile kaplanmıştır. Daha sonra örneklerin gözenekli yapısı Jeol JSM-6510 LV düşük vakum taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Jellerin gözenek boyutları SEM görüntüleri üzerinde ImajeJ programı ile ölçümler yapılarak hesaplanmıştır.

3.5.4 Denge Şişme Ölçümleri

Faz ayrılması/buz kalıplamayöntemi ile üretilen hibrit süngerlerin kuru duruma göre ağırlıkça denge şişme oranlarını (q_w) belirlemek için farklı oranlarda PEGDGE içeren hibrit süngerler distile su içine alınmışve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ağırlıklar hassas terazi ile ölçülmüş, ağırlıkça dengeye gelen süngerlerin değerleri kaydedildikten sonra süngerler liyofilizatörde 40 saat kurutulmuştur. Liyofilizatörden alınan örneklerin kuru ağırlıkları (m_{kuru}) hassas terazide ölçülerek ve Eşitlik 3.2 kullanılarak süngerlerin çapraz bağlayıcı miktarına bağlı olarak ağırlıkça denge şişme oranları hesaplanmıştır.

Kriyojelasyon yöntemi ile üretilen kriyojellerin kuru duruma göre denge şişme ölçümleri distile su içinde gravimetrik ve volumetrik olarak yapılmıştır Sentezlendikten sonra soğutulmuş aseton içine alınankriyojeller liyolifizatörde kurutulmuştur. Kuru jellerin şişme davranışlarını analiz etmek için kriyojeller disk şeklinde kesilmiştir. Jellerin kuru ağırlıkları (m_{kuru}) ve kuru çapları (D_{kuru}) ölçülmüştür. Kriyojellerin çaplarını

ölçmek için dijital kumpas kullanılmıştır. Disk şeklinde kesilen kuru kriyojeller distile su içine alınmış ve oda sıcaklığında suda bekletilmiştir. Ağırlıkça dengeye gelen jellerin şişmiş ağırlıkları ($m_{şiş}$) ve çapları ($D_{şiş}$) ölçülmüştür. Kriyojellerin ellerin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) ve hacimce (q_v) denge şişme oranları sırasıyla Eşitlik 3.2 ve 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

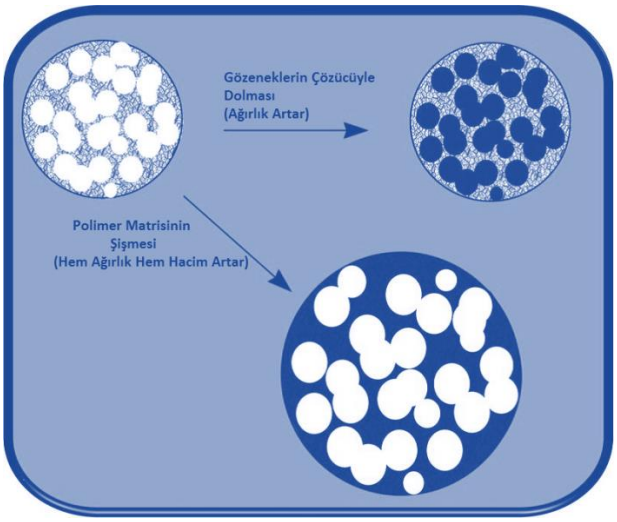
$$q_w = \frac{Şişmiş\ jelin\ ağırlığı}{Kuru\ Jelin\ ağırlığı} = \frac{m_{şiş}}{m_{kuru}} \tag{3.2}$$

$$q_v = \frac{Şişmiş\ jelin\ çapı}{Kuru\ jelin\ çapı} = \left(\frac{D_{şiş}}{D_{kuru}}\right)^3 \tag{3.3}$$

Kriyojellerin uygun bir çözücüye batırıldığı zaman ağırlıkça şişmesi (q_w), çözücünün jellerin yapısındaki gözeneklere dolması ve polimer ağına absorplanması şeklinde iki ayrı mekanizma meydana gelmektedir (Şekil 3.6). Ancak kriyojellerin hacimce şişmesinde (q_v) çözücünün yalnızca polimer ağı tarafından alınmasını göstermektedir, gözeneklerin hacmi sabit kalmaktadır. Bu yüzden kriyojellerin ağırlıkça ve hacimce şişme oranlarının arasındaki farkın yüksek olması, gözeneklerin hacminin de o kadar yüksek olduğunu göstermektedir [74], [89]. Şişmiş durumdaki jelin ağırlıkça ve hacimce şişme oranları kullanılarak jellerin gözenekliliği hesaplanmıştır. Jelin şişmiş durumdaki gözenekliliği Eşitlik 3.4'den hesaplanmıştır. Şekil 3.6'da kriyojellerin çözücüyü gözeneklerine ve polimer matrisine alarak, şişme mekanizmaları şematik olarak gösterilmektedir.

$$\%\ P = [1 - \frac{q_v}{1+(q_w-1)\times\frac{d_2}{d_1}}] \times 10^2 \tag{3.4}$$

Burada P; şişmiş durumdaki kriyojelin gözenekliliğini, d_2; polimerin yoğunluğunu, d_1; çözücünün yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 3. 6 Gözenekli bir jelin şişme sürecinin şematik gösterimi [90]

3.5.5 Şişme Kinetik Ölçümleri

Şişme kinetik ölçümleri için, kurutulan OVA-kitosan jelleri disk şeklinde kesilmişve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Kuru jeller, 100 ml distile su içine batırılmış ve jellerin ağırlıklarındaki değişim belirli zaman aralıklarında sudan çıkarılan kriyojeller üzerindeki fazla su alınıp gravimetrik olarak ölçüldü. Jellerin zamana bağlı olarak aldığı su, bağıl kütle ($m_{bağ}$) olarak Eşitlik 3.5'ten hesaplanmıştır.

$$m_{bağ} = \frac{m_t}{m_{kuru}} \tag{3.5}$$

Burada m_{kuru} jelin kuru ağırlığını, m_t ise jelin t zamanındaki şişmiş ağırlığını göstermektedir.

3.5.6 Mekanik Ölçümler

Üretilen jel doku iskelelerinin mekanik özelliklerini incelemek için tek eksenli basma testi uygulanmıştır. Yaklaşık olarak 7-8 mm çapında, 7-9 mm boyunda silindirik jellere 5 kg'lık yük hücresiyle oda koşullarında sıkıştırma testi yapılmıştır. Jellerin birim alanına uygulanan kuvvet olan gerilim σ ile gösterilmiştir, kuvvetin uygulanmasıyla birim uzunlukta malzemede oluşan deformasyon ise gerinim ε olarak ifade edilmiştir. Numunelerin mekanik ölçümlerine ait değerler, %50 gerinim oranındaki gerilim değeri baz alınarak verilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

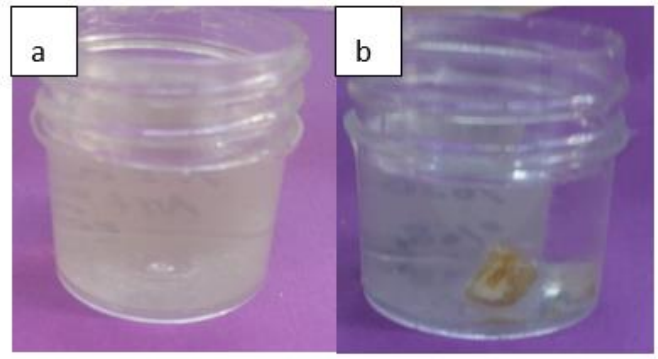
Bu çalışmada faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon metotlarının karşılaştırmalarının yapılması için her iki yöntemle doku iskeleleri üretilmiştir. Bu iki metot arasındaki temel fark, çapraz bağlayıcının hangi aşamada katıldığı ve çapraz bağlanma reaksiyonlarının gerçekleştiği sıcaklıktır. Faz ayrılması/buz kalıplama yönteminde kitosan polimeri ile 3 boyutlu gözenekli malzemeler elde edildikten sonra ileri çapraz bağlanma reaksiyonları, PEGDGE çapraz bağlayıcısı ile 60^{o}C'de başarıyla gerçekleştirilmiştir. Kriyojelasyon yönteminde ise kitosan ve ovalbumin-kitosan kriyojelleri, çapraz bağlayıcı olan GA'nın başlangıç polimer çözeltisine ilk baştan katılmasıyla düşük sıcaklıkta (-20^{o}C) gerçekleştirilerek elde edilmiştir. Daha sonra her iki yöntemle elde edilen biyomalzemeler, gözenek yapısı, şişme özellikleri, gözeneklilik ve mekanik özellikleri bakımından incelenmiştir. Aşağıdaki bölümlerde verileceği üzere, her iki yöntemle de üretilen biyomalzemelerin, doku mühendisliği için oldukça uygun hiyerarşik ve birbiri ile bağlantılı gözenekli bir iç morfolojiye ve oldukça yüksek mekanik dayanıma sahip oldukları görülmüştür.

Deneysel sonuçlar, iki bölümde tartışılmıştır. İlk bölümde yani Bölüm 4.1'de faz ayrılması/buz kalıplama metoduyla üretilen ve ileri çapraz bağlanma reaksiyonuyla elde edilen kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin ATR-FT-IR spektrumu ile belirlenen yapısı, gözenekliliği, şişme özellikleri ve çapraz bağlayıcı miktarının mekanik özelliklere etkisi tartışılmıştır.

İkinci bölümde (Bölüm 4.2) ise kriyojelasyon yöntemiyle, GA çapraz bağlayıcısı kullanılarak üretilen kitosan ve OVA-kitosan kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumu ile yapısı belirlenmiş, jel fraksiyonu, morfolojik, şişme özellikleri ve çapraz bağlayıcı miktarının mekanik özelliklere etkisi incelenmiştir. Ayrıca, polimer oranının, hazırlanan ovalbumin ve kitosan kriyojellerinin morfolojisi ve şişme davranışları üzerine etkisi de ele alınmıştır.

4.1 Faz Ayrılması/Buz Kalıplama Yöntemiyle Üretilen Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerleri

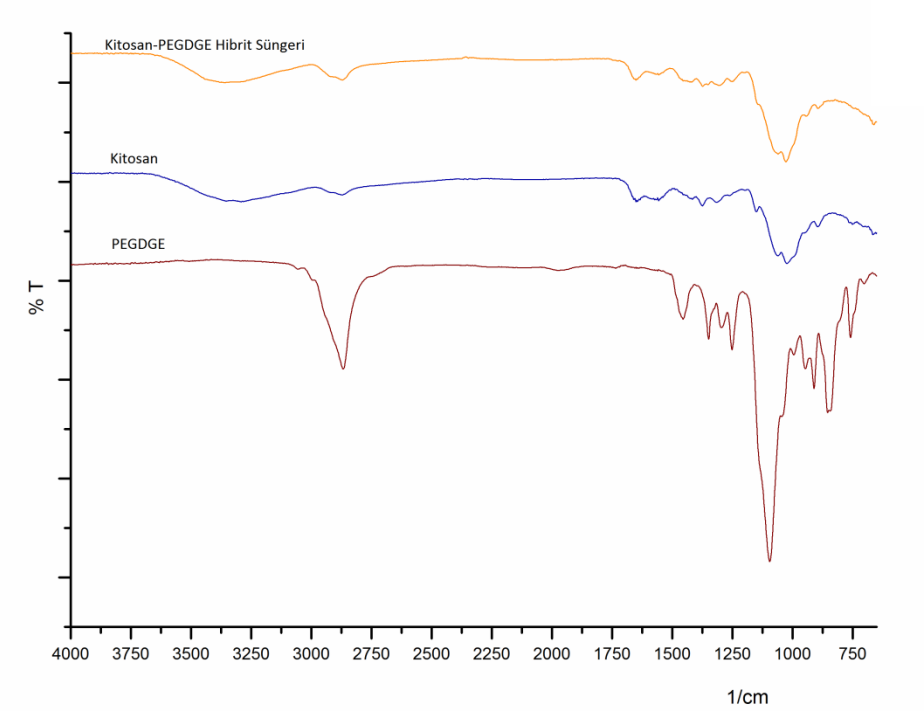
Faz ayrılması/buz kalıplama yöntemiyle üretilen 3 boyutlu kitosan matrisleri ile farklı oranlarda kullanılan PEGDGE arasında 60^{o}C'de ileri çapraz bağlanma reaksiyonları yapılmış ve çapraz bağlı yapıda kitosan-PEGDGE hibrit süngerleri elde edilmiştir. İlk etapta, PEGDGE ile yapılan ileri çapraz bağlanma reaksiyonlarının etkinliğini incelemek için hem PEGDGE ile çapraz bağlı PEGDGE-kitosan hibrit süngeri hem de çapraz bağlanma işlemi yapılmamış kitosan matrisleri, kitosan için iyi bir çözücü olan %5'lik asetik asit çözeltilerine alınmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, çapraz bağlanmamış kitosan matrisi (Şekil 4.1 a) 6 saat içinde çözünürken, % 50 PEGDGE ile çapraz bağlama muamelesi yapılmış kitosan matrisi (Şekil 4.1 b) ise 15 gün sonunda bile çözünmeden yapısını korumuştur. Bu durum, PEGDGE ile kitosan arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonlarının oldukça etkin olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 4. 1 %5 asetik asit çözeltisinde çözünen çapraz bağlanma reaksiyonu yapılmayan kitosan matrisi (a), PEGDGE ile 60^{o}C'de çapraz bağlanma reaksiyonu yapılanhibrit sünger (b)

4.1.1 Kitosan-PEGDGE Süngerinin ATR-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FT-IR) Analizi

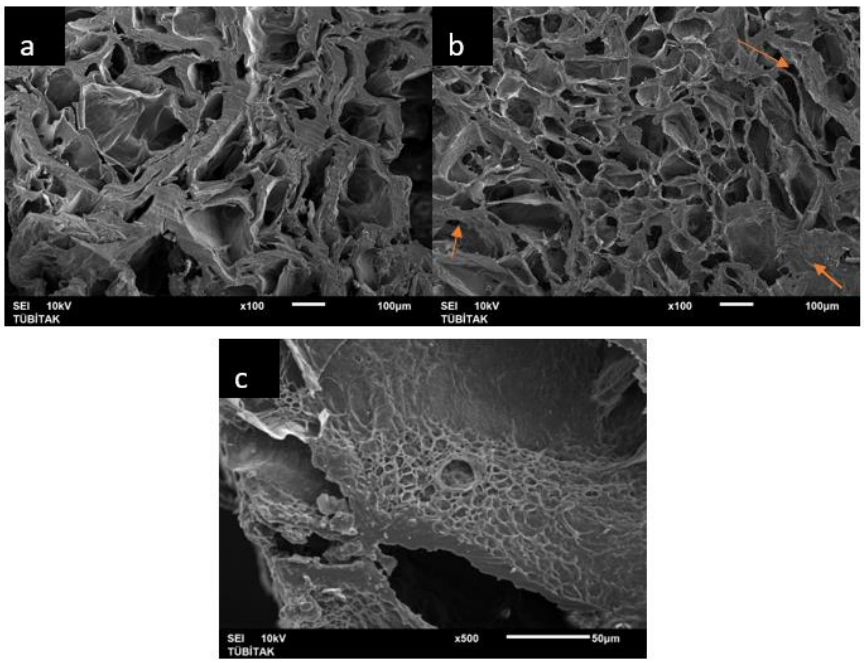
Çalışmada üretilen kitosan matrisi ile PEGDGE arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonunu ATR-FT-IR ile incelenmiştir. Kitosan-(%50) PEGDGE hibrit süngerine ve süngeri sentezlemek için kullanılan kitosan ve PEGDGE polimerlerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Kitosanın spektrumunda amit grubunun 1643 cm-^{1}'de C=O grubuna ve amit grubunun 1566 cm^{-1}'de N-H bağlanmasına ait bandlar görülmektedir. 3250 cm^{1}'deki band N-H ve O-H'ın titreşim gerilmesinden kaynaklanmaktadır. PEGDGE spektrumunda 1095 cm^{-1}'deki band C-O-C antisimetrik gerilimden kaynaklanmaktadır ve kitosan-PEGDGE süngerine ait spektrumda bu bandın yoğunluğu azalmıştır. Kitosan polimerindeki 3336 cm^{-1}'deki pik, kitosan-PEGDGE hibrit süngerinde PEGDGE'nin epoksi grubunun açılıp iki yeni hidroksil grubunun oluşmasından ve kitosanın amin gruplarının azalmasından dolayı 3382 cm^{-1}'e dönüşmüştür. Böylece, kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin kitosan polimerinin glikozamin grubunda bulunan amin fonksiyonel grupları ile PEGDGE çapraz bağlayıcısında bulunan epoksi grupları arasında gerçekleşen çapraz bağlanma reaksiyonları sonucu elde edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 Kitosan-PEGDGE hibrit süngerive bu jelin hazırlanmasında kullanılan PEGDGEve kitosana ait FT-IR spektrumları

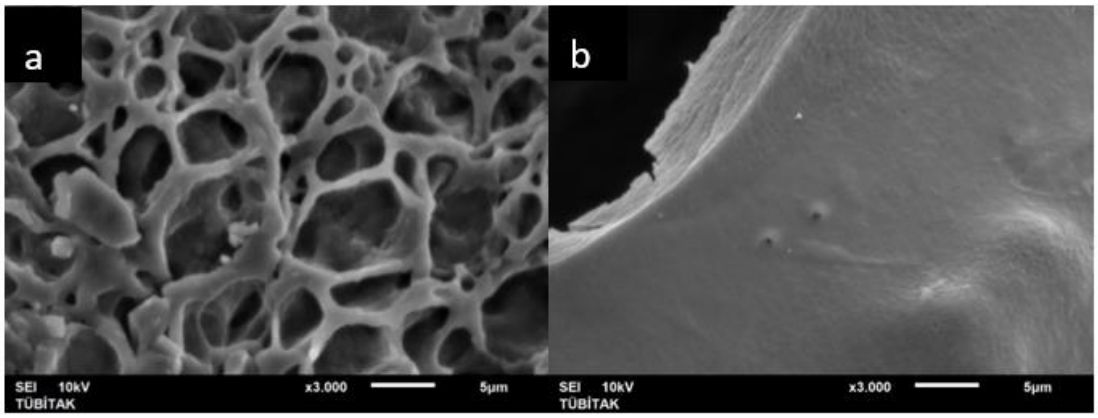
4.1.2 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin İç Yapılarının SEM ile Aydınlatılması

Çalışmada doku iskelesi olarak üretilen hibrit süngerlerin gözenek türleri, gözenek çapı ve gözenek kalınlığı gibi iç yapılarına ait özellikleri belirlemek için SEM kullanılmıştır. Faz ayrılması/buz kalıplama yöntemiyle hazırlanan hibrit süngerlerin iç morfolojisine polimer karışımına eklenen polimere inert bir çözücü olan n-bütanolün etkisi incelenmiştir. Şekil 4.3'te kuru haldeki kitosan-PEGDGE (%50) hibrit süngerlerinin iç kesitlerine ait morfolojilerini gösteren SEM görüntüleri verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, başlangıç polimer karışımına n-bütanol eklenmeyen kontrol örneğinin ve n-bütanolün eklendiği örneğin her ikisi de büyük gözenekli yapı göstermiştir. Ancak n-bütanolün eklenen (b) ve eklenmeyen (a) hibrit süngerlerin morfolojilerinde belirgin farklılıklar bulunmaktadır. N-bütanol, hibrit süngerlerin gözenek boyutunu ve gözenek duvarlarını etkilemiştir. Faz ayrılması/buz kalıplama yöntemi ile üretilen kontrol hibrit süngerlerinin gözenek duvarları pürüzsüzdür (Şekil 4.3.a) ve yalnızca buz kristallerinin oluşturduğu büyük gözenekler mevcuttur. N-bütanol eklenen kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin gözenek duvarlarında ise küçük gözenekler bulunmaktadır (Şekil 4.3.a), küçük gözenekler yüksek büyütmede (x500) daha ne olarak görülmektedir (Şekil 4.3.c).



Şekil 4. 3 Faz ayrılması/buz kalıplama metodu ile üretilen kitosan-PEGDGE (%50) hibrit süngerlerinin SEM görüntüleri, a; n-bütanol eklenmeyen kitosan-PEGDGE jeli, b; n-bütanol eklenen kitosan-PEGDGE hibrit süngeri, c; yüksek büyütmede (x500) n-bütanol eklenen hibrit süngeri

Şekil 4.4.a'da ise n-bütanol eklenen süngerin daha büyük büyütmelerde küçük gözenekleri net bir şekilde görülmektedir. Başlangıç polimer karışımına gözenek yapıcı madde olarak eklenen n-bütanol -20^{o}C'de faz ayrılmasının sonucu büyük gözeneklerin duvarlarında küçük gözeneklerin oluşmasını sağlamıştır (Şekil 4.4.a), ancak n-bütanol eklenmeyen kontrol örneğinin gözenek duvarlarında küçük gözeneklerin oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.4.b). Kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinde, n-bütanol etkisi ile oluşan küçük gözeneklerden dolayı yapıda açık gözenekler ve daha iyi gözenekler arası bağlantılılık elde edilmiştir.



Şekil 4. 4 Kitosan-PEGDGE (%50) hibrit süngerlerinin SEM görüntüleri, a; n-bütanol eklenen kitosan-PEGDGE hibrit süngerinin gözenek duvarı, b; n-bütanol eklenmeyen kitosan-PEGDGE hibrit süngerinin gözenek duvarı

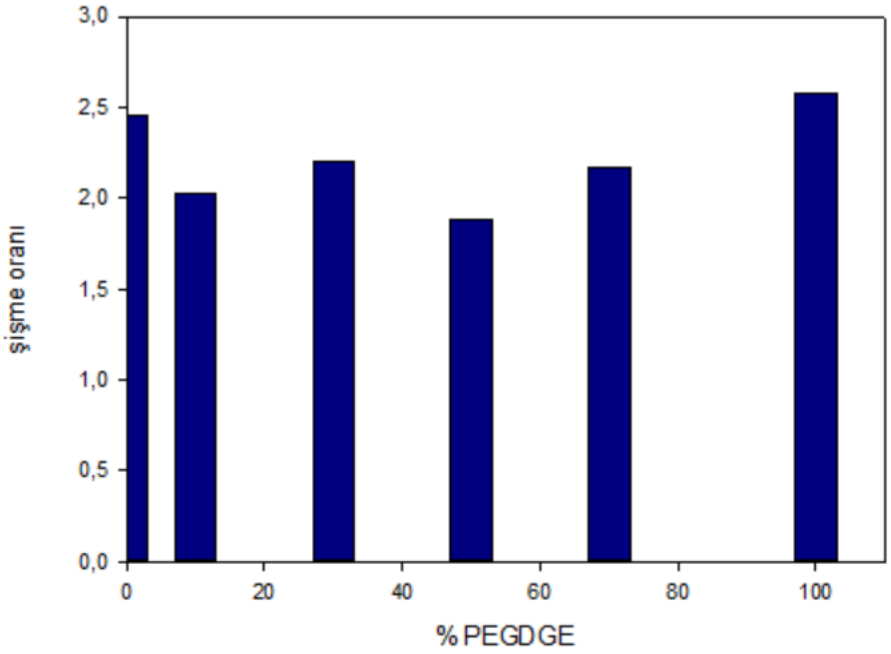
Polimer karışımına n-bütanolün eklenmesiyle üretilen hiyerarşik gözenekli süngerlerin büyük gözeneklerinin boyutu 76±26 µm iken küçük gözeneklerin boyutu 5±2 µm olarak hesaplanmıştır. N-bütanol eklenmeyen kontrol örneğinde ise tek tip boyutta 86±24 µm büyük gözenekler oluşmuştur. Bu sonuçlar literatürde faz ayrılması yöntemi kullanılarak üretilen doku iskelelerinin gözenek boyutları ile uyumludur [71], [72].

Bu tezin temel amaçlarından biri olan doku iskelesi olarak kullanılması için hiyerarşik gözenekli süngerlerin oluşturulması, buz kristallerinin kalıp olarak kullanılmasıyla büyük gözeneklerin, polimer karışımında polimere inert bir çözücü olan n-bütanolün eklenmesiyle de küçük gözeneklerin oluşturulması sağlanmıştır.

4.1.3 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin Şişme Özellikleri

Doku iskelelerinin şişme özelliği, *in vitro* kültür ortamında hücrelerin iskele içine girmelerini, kültür ortamındaki besinlerin daha verimli olarak alınmasını sağladığı için önemlidir ve çapraz bağlayıcı miktarı malzemelerin şişme davranışlarını etkileyen faktörlerden biridir. Bu çalışmada kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin şişme özelliklerine, farklı miktarlarda PEGDGE çapraz bağlayıcısının etkisi oda sıcaklığında distile su içinde incelenmiştir. Distile suda, suyu absorplayarak şişme dengesine ulaşan kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin denge ağırlıkları ölçüldükten sonra, süngerler liyofilizatörde kurutulmuş ve kuru durumdaki ağılıkları ölçülerek Eşitlik 3.2 yardımıyla denge şişme oranları hesaplanmıştır.

Kitosan-PEGDGE süngerlerinin farklı oranlarda PEGDGE ile çapraz bağlanmasının ağırlıkça şişme oranları üzerine etkisi Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Çapraz bağlı süngerler, sulu ortamda %50 PEGDGE ile çapraz bağlandığında en düşük şişme oranına sahipken çapraz bağlayıcının oranı arttıkça şişme oranı da önemli oranda artmıştır. Kitosan süngerlerinin en yüksek şişme oranı %100 PEGDGE ile çapraz bağlanan süngerlerde 2,6 g/g hesaplanmıştır. Bu sonuç literatürdeki çapraz bağ miktarının artmasıyla şişme oranının azaldığı sonuçlarla uyuşmamaktadır. Çalışmamızda, %50-%100 PEGDGE aralığında çapraz bağlayıcı oranının artmasıyla süngerlerin şişme oranları artmaktadır. Bunun nedeni PEGDGE çağraz bağlayıcısının hidrofilik karakterde olmasıdır.



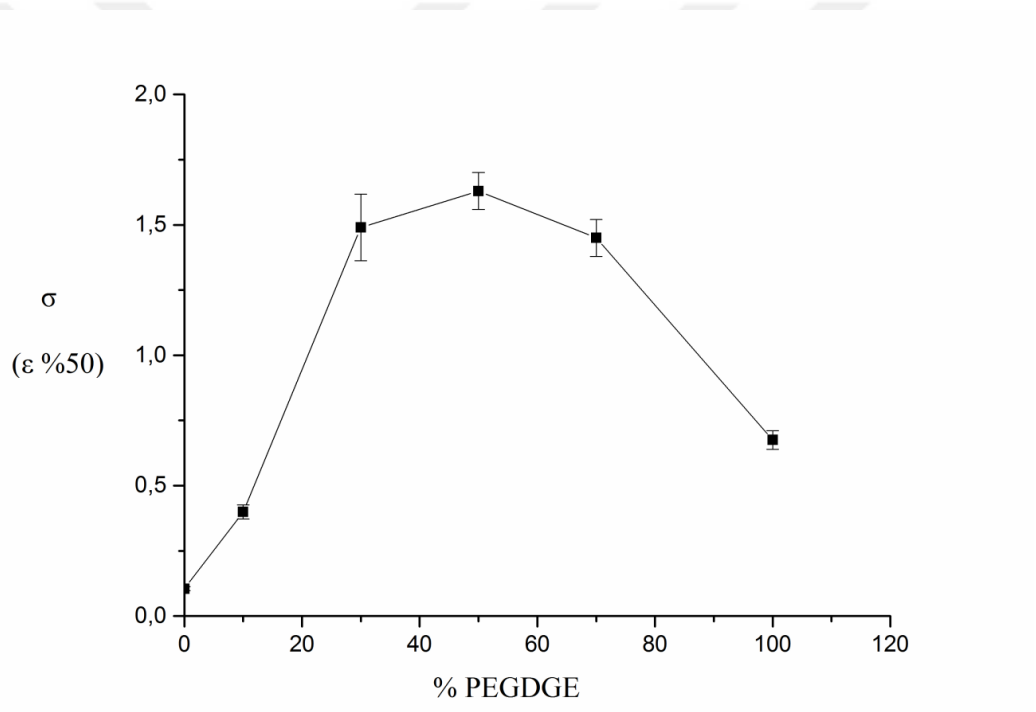
Şekil 4. 5 Çapraz bağlayıcı PEGDGE oranına göre kuru kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin ağırlıkça şişme oranları

4.1.4 Kitosan-PEGDGE Hibrit Süngerlerinin Mekanik Özellikleri

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PEGDGE'nin kitosan süngerlerin mekanik özelliklerine etkisini görmek için tek eksenli basma deneyleri yapılmıştır. Distile su içindeki kitosan süngerlerinin mekanik özellikleri, oda sıcaklığında, yük ve yer değiştirme hızı 1 mm/dk hızında, %80 deformasyona kadar gerçekleştirilmiştir. Kitosan-PEGDGE süngerlerinin değişen PEGDGE oranına bağlı olarak 50 % gerinimdeki gerilim değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Süngerlerin sertliği ve esnekliği ile ilgili bilgi veren bu değerler farklı çapraz bağlayıcı miktarları ile 0,1-2 MPa arasında değişmiştir. En yüksek gerilim değeri %50 PEGDGE ile çapraz bağlanan sünger için elde edilmiştir. Bu sonuç, Şekil 4.5'te görülen % 50 Kitosan PEGDGE numunesinin en düşük denge şişme oranına sahip olmasıyla uyumludur. Çapraz bağlı malzemelerin şişme oranının azalmasıyla mekanik dayanımının arttığı literatürde bilinen bir gerçektir. %50'den daha yüksek oranlarda çapraz bağlayıcı içeren kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin gerilim değerleri düşmüştür, en düşük gerilim değeri, %100 PEGDGE ile çapraz bağlanan süngerlerde hesaplanmıştır. Buna göre %50'den daha fazla PEGDGE ile çapraz bağlanan süngerler daha esnek özelliktedir. Kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinde çapraz bağlayıcı miktarı, süngerlerin şişme oranlarına ve gerilim değerlerine farklı etki etmiştir. Şişme oranı en

yüksek değerde olan %100 PEGDGE ile çapraz bağlanan sünger en düşük gerilim değerine sahipken, şişme oranı en az olan %50 PEGDGE ile çapraz bağlanan sünger en yüksek gerilim değerine sahiptir.

Yine Şekil 4.6'da belirgin olan en önemli sonuç, faz ayrılması/buz kalıplama yöntemiyle üretilen hibrit süngerlerin elastisitelerinin, çapraz bağlayıcı miktarlarının kullanılmasıyla önemli oranda değiştiğidir. Bu süngerlerin %50 gerinimdeki gerilim değerlerinin; 0,1-2 MPa arasında değiştirilebileceği gösterilmiştir. Böylelikle, tezin amaçlarından biri olan çapraz bağlayıcı miktarını değiştirerek elde edilen biyomalzemenin mekanik özelliklerini ayarlayabilme başarılmıştır. Burada farklı mekanik dayanımlara sahip süngerlerin farklı doku mühendisliği alanlarında kullanılabilecekleri düşünülmektedir.



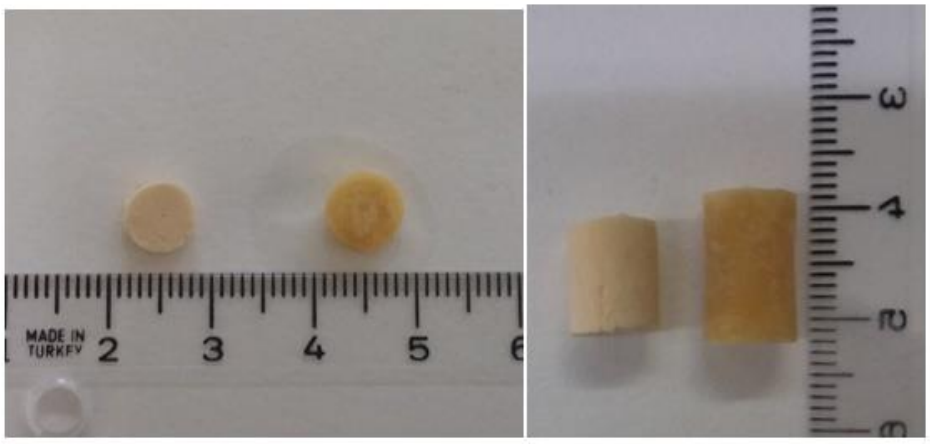
Şekil 4. 6 Farklı miktarda PEGDGE kullanılmasıyla kitosan süngerlerinin değişen gerilim değerleri (%50 gerinimde)

4.2 Kriyojelasyon Yöntemiyle Üretilen Kitosan ve Ovalbumin-Kitosan Kriyojelleri

Çalışmanın bu kısmında, kriyojelasyon yöntemi/faz ayrılması ile birlikte kullanılarak hiyerarşik gözenekli kriyojeller üretilmiştir. Kriyojelasyon/faz ayrılması yönteminde kitosan ve OVA--kitosan kriyojelleri, başlangıç polimer çözeltisine eklenen GA ile -20^{o}C'de çapraz bağlanma reaksiyonu yapılarak hazırlanmıştır. Kriyojellerin iç morfolojik özelliklerine n-bütanolün etkisi ve mekanik özelliklerine çapraz bağlayıcı miktarının

etkisi araştırılmıştır. Başlangıç polimer çözeltisine n-bütanol eklenmeyen örnekler kontrol örneği olarak incelenmiştir ve kitosan kriyojellerin için kitosan-k, OVA-kitosan kriyojelleri için OVA-kitosan-k kriyojeli olarak isimlendirilmiştir. N-bütanol eklenen örnekler ise kitosan-n ve OVA-kitosan-n şeklinde kodlanmıştır. Çalışmada OVA-kitosan kriyojellerinin farklı polimer oranlarının şişme özelliklerine etkisi incelenmiştir.

Şekil 4.7'de, -20^{o}C sentezlenen kurutulmuş (solda) ve şişmiş durumda kuru olmayan OVA-kitosan (1:1) kriyojelleri (sağda) gösterilmektedir. Kriyojeller reaksiyonun gerçekleştiği ve silindirik şekillerini aldıkları şırıngalardan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 mm boyunda kesilmişlerdir. Kuru ve şişmiş durumdaki kriyojellerin çapları ise yaklaşık olarak 8 mm'dir. Kriyojeller sıvıları polimer ağına absorpladıklarında hacimlerinde çok az farklılık oluştuğu için distile suda şişen kriyojelin çapı ile kurutulmuş kriyojelin çapı arasında belirgin bir fark yoktur.



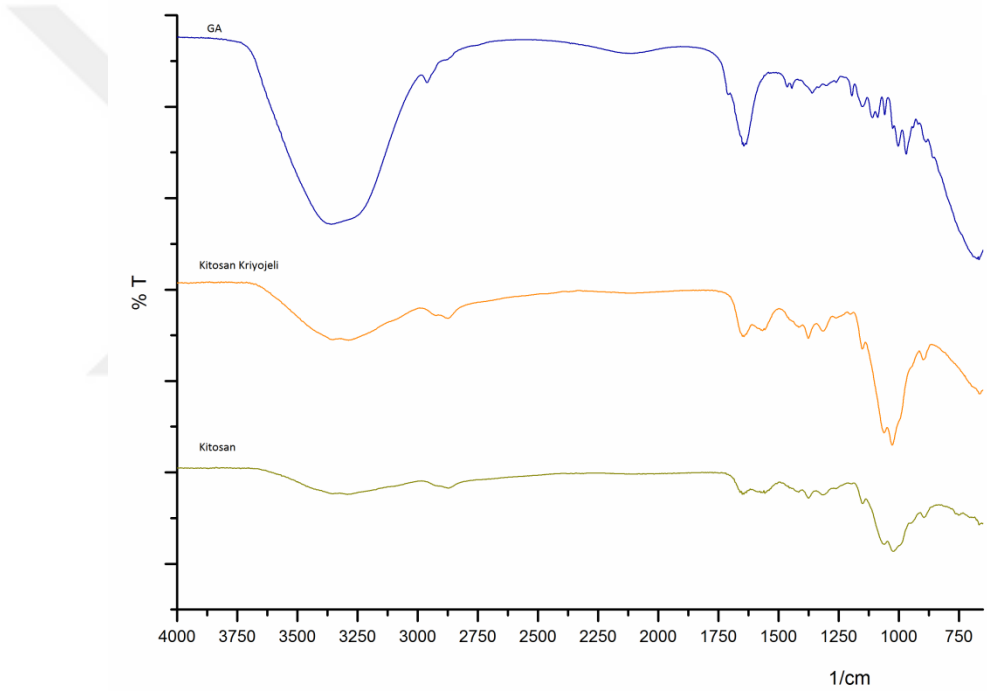
Şekil 4. 7 OVA-kitosan kriyojellerin, kuru halde (solda), kurutulmamamış halde (sağda)

4.2.1 Kriyojelasyon Yöntemiyle Elde Edilen Kitosan Kriyojelleri

4.2.1.1 Kriyojelasyon Yöntemiyle Üretilen Kitosan Kriyojellerinin ATR-FT-IR Analizi

Kitosanın yapısındaki glikozamin grubu ile çapraz bağlayıcı GA'nın karbonil grupları arasında -20^{o}C'de gerçekleşen reaksiyonla oluşan çapraz bağlı kitosan kriyojeline ait FT-IR spektrumu ve sentezde kullanılan kitosan ve GA'ya ait spektrumlar Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Kitosanın FT-IR spektrumunda 3343, 2922, 2875 cm^{-1}'deki karakteristik bandlar sırasıyla OH, CH_2, CH_3 gruplarının varlığını göstermektedir. 1643 cm^{-1}'de C=O gerilme (amit I) piki N-asetilglikozaminin yapısını gösterirken, 1566 cm^{-}

^{1}'dek NH_2 gerilmepiki glikozamin fonksiyonel gruplarının varlığını göstermektedir. Kriyojellerde çapraz bağlayıcı olarak kullanılan GA'nın spektrumunda 3348cm^{-1}'deki band kullanılan GA'daki (%25'lik sulu çözelti) bağlı suyu göstermektedir. Kitosan kriyojelinin kitosan polimerinin spektrumundan farklı olarak kitosanın GA ile çapraz bağlanmasından dolayı 2922 cm^{-1}'deki C-H gerilim bandının yoğunluğu değişmiştir. Kitosan kriyojelinde amin ve karbonil gruplarının bağlanmasıyla oluşan C=N bağının titreşimini gösteren band bu kitosan kriyojelinin karakteristik pikidir, kitosan kriyojelinde bu band 1643 cm^{-1} 'dedir. Böylece kitosanın yapısındaki amin grupları ile GA'nın karboksil grupları arasında -20^{o}C'de çapraz bağlanma reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görülmüştür.



Şekil 4. 8 Kitosan jeli ve sentezinde kullanılan kitosan tozu, GA'ya ait FT-IR spektrumları

4.2.1.2 Kitosan Kriyojellerinin Jel Fraksiyonu

Polimer zincirlerinin çapraz bağlanma reaksiyonundan sonra oluşan polimer ağını gösteren jel fraksiyonu Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de farklı çapraz bağlayıcı miktarlarıyla sentezlenen kitosan kriyojellerinin jel fraksiyonları verilmiştir. Çözücünün donma noktası altında -20^{o}C'de sentezlenen jellerin jel fraksiyon değerleri kitosan kriyojelleri için 0,9'a yakın olarak hesaplanmıştır. Buna göre -20^{o}C'de kitosan kriyojellerinin sentezi sırasında neredeyse tüm polimer zincirleri, çapraz bağlı polimer

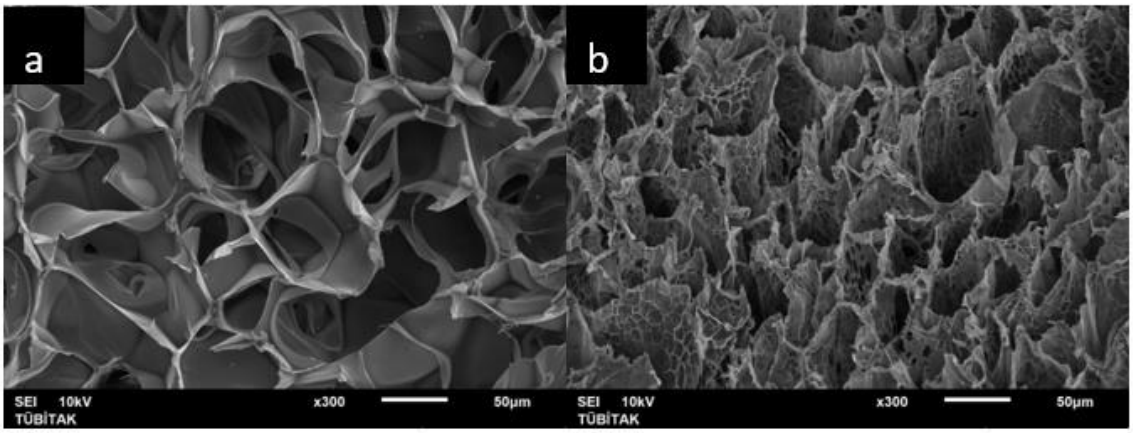
ağına katılmıştır. Bu yüksek dönüşüm çapraz bağlayıcı gluteraldehitin, -20 C gibi düşük sıcaklıklarda bile oldukça etkin bir çapraz bağlayıcı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 1 %2,5 polimer konsantrasyonu ile -20^{o}C'de farklı miktarlarda çapraz bağlayıcıyla sentezlenen kitosan kriyojellerinin jel fraksiyonu değerleri

Kriyojel	GA miktarı % (v/v)	W_g
Kitosan-n	0,25	0,856
Kitosan-n	0,375	0,834
Kitosan-n	0,5	0,881

4.2.1.3 Kitosan Kriyojellerinin İç Yapılarının SEM ile İncelenmesi

Yukarıda belirtildiği gibi, kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemi ile doku iskelesi olarak kullanılmaları için hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojelleri üretilmiştir. İlk olarak faz ayrılması metodu ile üretilen kitosan-PEGDGE süngerlerinin gözenekli yapısını karşılaştırmak için kriyojelasyon yöntemi ile kitosan kriyojel doku iskeleleri hazırlanmıştır. Geleneksel kriyojelasyon metodu ile hazırlanan büyük gözenekli kitosan jelinin morfolojisine n-bütanolün etkisi SEM ile değerlendirilmiştir. Kitosan kriyojelleri hazırlanırken n-bütanol eklenmeyen kontrol örneğinin (kitosan-k) iç yapısı Şekil 4.9.a'da gösterilmektedir. Kitosan-k, düzgün gözenek duvarları ile tek tip boyutlu büyük gözeneklere sahipken, kitosan-n kriyojelinin iç yapısı belirgin bir şekilde farklılık göstermiştir Şekil 4.9.b çözücünün donma noktası altında sentezlenen geleneksel kriyojellerde oluşan buz kristalleri sentez sonrası malzemenin eritilmesi ile oluşan gözenekler için bir kalıp oluşturarak büyük gözeneklerin oluşmasını sağlarken, polimer çözeltisine eklenen n-bütanol katı sıvı faz ayrılmasını oluşturarak kriyojeldeki büyük gözeneklerin duvarlarında küçük gözeneklerin oluşmasını sağlamış ve hiyerarşik gözenekli bir yapı oluşmuştur. N-bütanolün eklenmesi jellerin gözenek duvarlarının pürüzlü ve daha az yoğun olmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar literatürde PMMA'nın gözenek yapıcı olarak kullanılmasıyla üretilen hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojellerin ile uyumludur, PMMA'nın miktarının artmasıyla pürüzlü ve daha az yoğun gözenek duvarları oluşmuştur [78].



Şekil 4. 9 GA ile -20^{o}C'de sentezlenen kitosan kriyojellerinin SEM görüntüleri,a; hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojelleri, b; tek boyutlu gözenek yapıda kitosan kriyojelleri

Yuvarlak yapıda gözeneklerin oluştuğu hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojellerinin büyük gözeneklerinin ortalama gözenek çapı Çizelge 4.2'de görülebileceği gibi 46± 11 µm iken, küçük gözenekleri 10±3 olarak hesaplanmıştır. Geleneksel olarak üretilen tek boyutta gözenekleri olan kitosan kriyojellerinin (kontrol örneği) ise gözenek boyutu 60±13 µm olarak hesaplanmıştır. Çözeltilere eklenen n-bütanol çözeltilerin viskozitelerini düşürerek, küçük gözeneklerin oluşmasını arttırmış ve kontrol örneğine göre az miktarda düşürmüştür [26].

Çizelge 4. 2 Kitosan kriyojellerinin gözenek boyutları

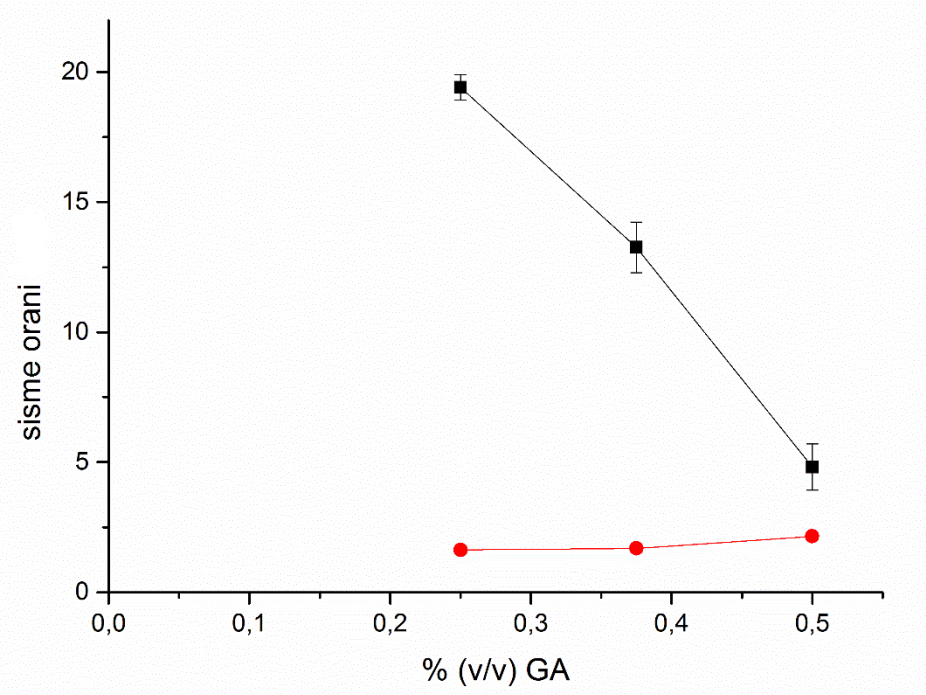
Malzeme	Gözenek Yapısı	Gözenek Türü	Gözenek Boyutu (µm)
Kitosan-k Kriyojeli	Tek Tip Boyutlu	Büyük	60±13
Kitosan-n Kriyojeli	Hiyerarşik	Büyük	46 ± 11
		Küçük	10 ± 3

4.2.1.4 Kitosan Kriyojellerinin Şişme Özellikleri ve Gözenekliliği

Sentezlendikten sonra kurutulan kriyojeller distile suya alınmış ve şişme özellikleri incelenmiştir. Ağırlıkça (q_w) ve hacimce (q_v) denge şişme oranları Eşitlik 3.2 ve 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır. Kriyojelasyon yöntemiyle çapraz bağlayıcı olarak GA'nın farklı miktarları ile sentezlenen kitosan kriyojellerinin şişme oranları sırasıyla Şekil 4.10'da gösterilmektedir.

Şekil 4.10'dan da görülebileceği gibi GA miktarının % 0,25'den % 0,5'e artmasıyla ağırlıkça şişme oranı düşmüştür. Kriyojeller suyu hem gözeneklerine hem de polimerik

ağ kısmına absoplarlar ve bu absorpladıkları su ağırlıkça şişme (q_w) oranını verir. % 0,5 GA kullanılan örneğin ağırlıkça şişme oranı oldukça düşük bulunmuştur. Hacimce şişme oranı ise kriyojellerin suyu polimerik ağ kısmına almasını gösterir. Kitosan kriyojellerinin hacimce şişme oranları (q_v) birbirine yakın bulunmuştur, böylelikle kriyojellerin şişmesiyle birlikte belirgin bir hacim değişikliğinin olmadığı burada da görülmüştür.



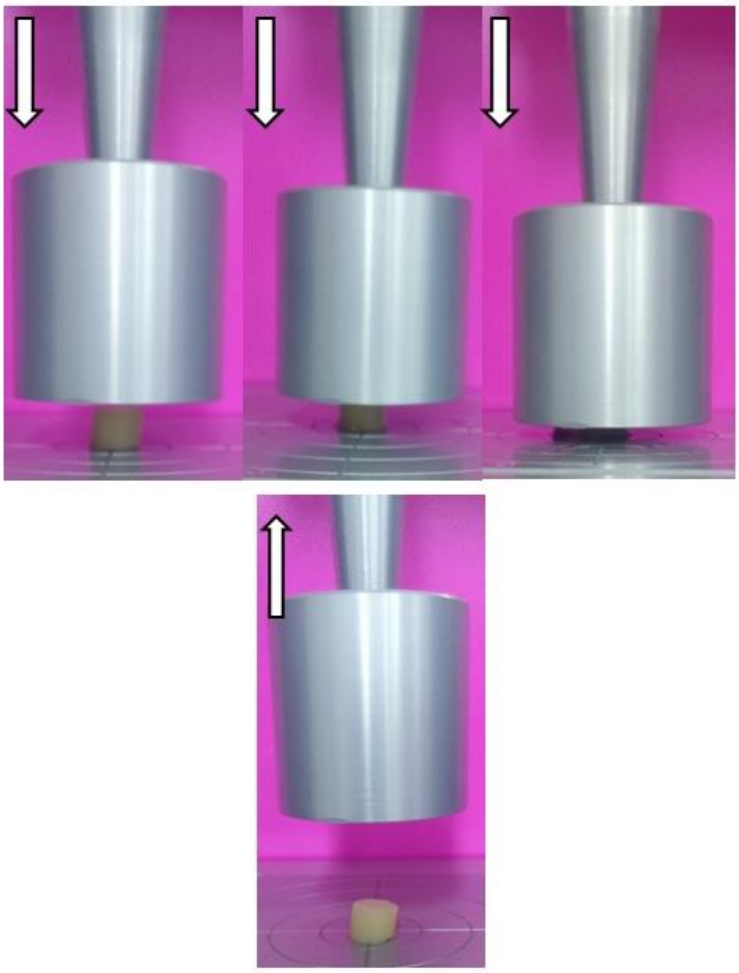
Şekil 4. 10 Farklı miktarlarda GA ile sentezlenenkitosan kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) (■) ve hacimce şişme oranları (q_v) (●)

Kriyojellerin şişmiş durumdaki gözenekliliği ağırlıkça ve hacimce şişme oranları kullanılarak Eşitlik 3.4'den hesaplanmıştır. Kitosan kriyojellerinde % 0,25 ve % 0,375 GA kullanılan jellerin gözenekliliği %93 olarak hesaplanmıştır. Ancak % 0,5 GA ile çapraz bağlanan jellerin gözenekliliği %68 olarak bulunmuştur. Bu sonuç kitosan kriyojellerinin ağırlıkça şişme oranları ile uyumludur.

4.2.1.5 Kitosan Kriyojellerinin Mekanik Özellikleri

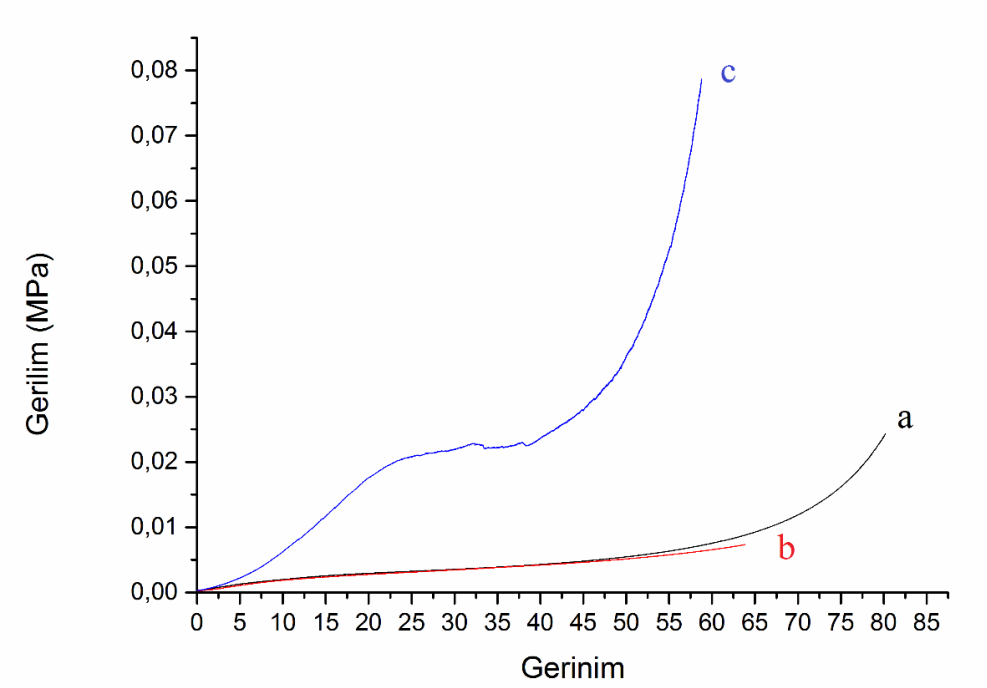
Çapraz bağlayıcı miktarının kriyojellerin mekanik özelliklerine etkisini görmek için tek eksenli basma deneyleri yapılmıştır. Kitosan kriyojellerinin mekanik özellikleri, oda sıcaklığında, yük ve yer değiştirme hızı 1 mm/dk hızında gerçekleştirilmiştir. Kitosan kriyojellerinin basma deneylerine ait görüntüleri Şekil 4.11'de gösterilmektedir, distile su içinde şişmiş durumdaki kriyojeller, uygulanan kuvvetle birlikte yapısındaki suyu

bırakmış ve kuvvetin kaldırılmasıyla tekrar etrafına bıraktığı suyu geri alarak, orijinal şekline geri dönmüştür.



Şekil 4. 11 Kitosan kriyojellerinin basma deneyleri

GA çapraz bağlayıcısıyla -20^{o}C'de sentezlenen kitosan kriyojellerinin mekanik özelliklerine farklı miktarlarda çapraz bağlayıcının etkisi Şekil 4.12'de gerilim-gerinim grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.12'de a ve b eğrilerinden görülebileceği gibi %0,25 ve %0,375 GA ile sentezlenen kitosan kriyojelleri, orijinal uzunluklarının sırasıyla %80 ve %65 sıkıştırmaya kadar elastik davranış göstermiş ve yapılarında çatlak oluşmamıştır. % 0,5 GA ile sentezlenen kitosan kriyojeli (Şekil 4.12. c) orijinal uzunluğunun % 20 sıkıştırmaya kadar elastik davranış göstermiştir.



Şekil 4. 12 Farklı çapraz bağlayıcı miktarları kullanılarak sentezlenen kitosan kriyojellerinin gerilim-gerinim eğrileri (a; %0,25 GA, b; %0,375 GA, c; %0,5 GA)

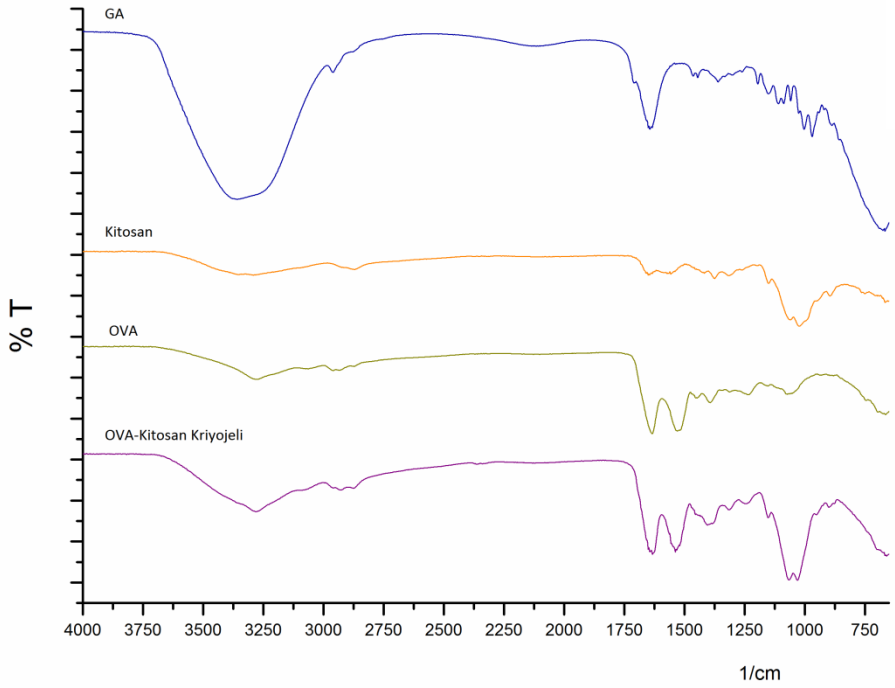
Kitosan kriyojellerinin değişen GA oranına bağlı olarak 50 % de gerinimdeki gerilim değerleri çapraz bağlayıcı oranının % 0,25; %0,375 ve %0,5 olarak değişmesiyle sırasıyla 5,45; 6,5 ve 22,67 kPa şeklinde değişmiştir. GA oranının en yüksek olduğu kitosan kriyojeli en yüksek gerilim değeri göstermiştir.

4.2.2 Kriyojelasyon Yöntemiyle Elde Edilen OVA-Kitosan Kriyojelleri

4.2.2.1 OVA-Kitosan Kriyojellerinin ATR-FT-IR Analizi

Kitosan ve OVA doğal polimerlerinin -20^{o}C'de GA ile çapraz bağlanmasıyla oluşan kriyojelin yapısını belirlemek için yapılan FT-IR analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.13'te, OVA-kitosan jelinin, sentezde kullanılan polimer tozlarının ve çapraz bağlayıcının FT-IR spektrumları şeklinde verilmiştir. OVA polimerinin spektrumunda, 3300-3000 cm^{-1}'de OH/N-H gerilmesinin birleşmesiyle geniş bir band görülmektedir. 1633 cm^{-1}'de (HNC=O) amit I ve 1530 cm^{-1} civarında amit II bandları görülmektedir. Çapraz bağlı OVA-kitosan kriyojelinde amin ve karbonil gruplarının bağlanmasıyla oluşan C=N bağının titreşimini gösteren band bu jelin karakteristik pikidir. OVA-kitosan kriyojelinde C=N bağının titreşimini gösteren band 1643 cm^{-1} 'dedir ancak bu pik amit I

piki ile çakışarak bu bölgede pikin yoğunluğunun çok az da olsa artmasına neden olmuştur.



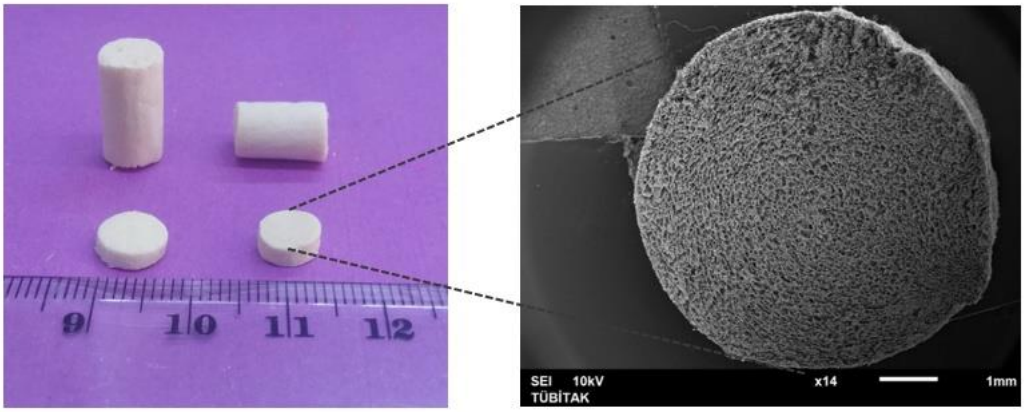
Şekil 4. 13 OA-kitosan jelive sentezinde kullanılan OVA,kitosan, GA'ya ait FT-IR spektrumları

4.2.2.2 OVA-Kitosan Kriyojellerinin Jel Fraksiyonu

OVA-Kitosan Kriyojellerine de ait jel fraksiyonu hesaplamaları, yukarıda kitosan kriyojelleri için yapılan hesaplamalar gibi yine Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır. Numunelerin jel fraksiyonu değeri burada da 1'e yakın oranlarda bulunmuştur.

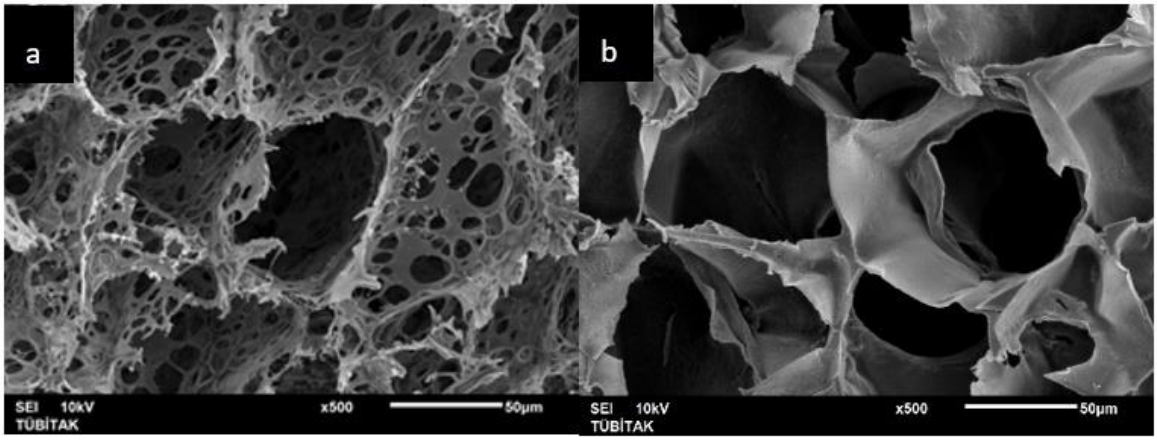
4.2.2.3 OVA-Kitosan Kriyojellerinin İç Yapılarının SEM ile İncelenmesi

Kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemiyle -20^{o}C'de GA ile çapraz bağlanma reaksiyonu sonucu elde edilen OVA-kitosan kriyojellerinin, gözenekli yapısına n-bütanolün etkisi SEM ile araştırılmıştır. OVA-kitosan-n kriyojellerinin Şekil 4.14'de kuru durumdaki yapıları ve iç morfolojisini gösteren SEM görüntüsü verilmektedir. OVA-kitosan kriyojellerin beyaz renklidir ve kurutulduktan sonra da silindirik formunu sürdürmüştür.



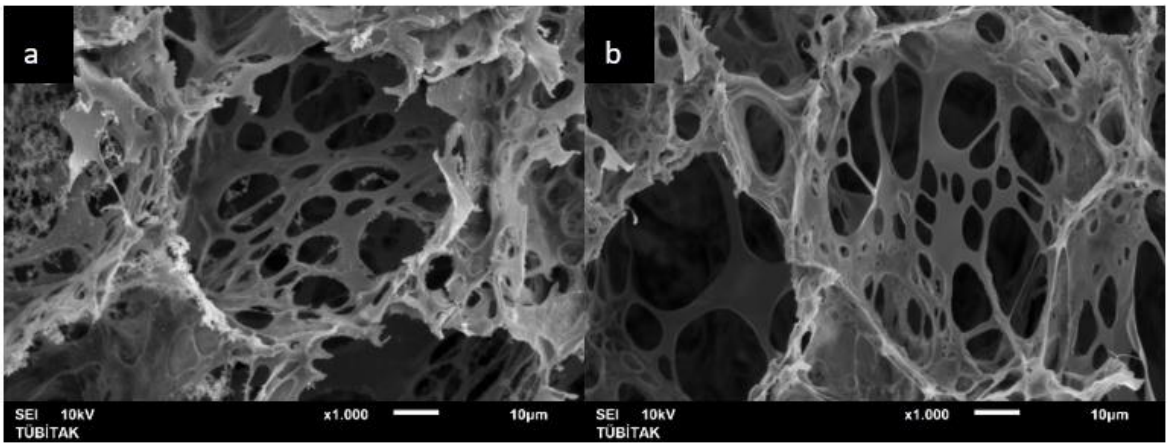
Şekil 4. 14Kuru OVA-kitosan jelleri ve gözenekli iç morfolojisi

N-bütanol içeren OVA-kitosan-n ve içermeyen OVA-kitosan-k numunelerine ait SEM görüntüleri ise Şekil 4.15'te verilmektedir. Şekil 4.15.a 'da görüldüğü gibi kriyojelasyon sistemine n-bütanol katkısıyla, yapısında büyük ve küçük gözeneklerin bulunduğu OVA-kitosan-n hiyerarşik gözenekli kriyojelleri elde edilmiştir. N-bütanol eklenmesi ile gözenek duvarlarında küçük boyutta gözenekler oluşmuştur. Böylece birbiri ile bağlantılı ve oldukça açık gözenekli morfolojiye sahip jeller üretilmiştir. Öte yandan, Şekil 4.15.b'de, OVA-kitosan-k kriyojellerinde ikincil bir gözenek oluşturacak n-bütanol bulunmadığından kriyojelasyon prosesindeki buz kristallerinin kalıp vazifesi görmesinden ötürü yalnızca büyük gözenekler oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4. 15 OVA-kitosan kriyojellerinin(1:1) iç morfolojilerinin SEM görüntüleri, a; hiyerarşik gözenekli OVA-kitosan-n kriyojeli, b; tek tip boyutta gözenek yapısı olan OVA-kitosan-k kriyojeli

Farklı oranlarda OVA:kitosan (1:1 ve 2:1) içeren örneklerin başlangıç polimer karışımlarına n-bütanol eklenerek iç morfolojileri SEM ile incelenmiştir. OVA-kitosan kriyojellerinin iç morfolojilerine, farklı oranlarda OVA ve kitosanın etkisi Şekil 4.16'da gösterilmiştir. N-bütanol her iki kriyojelde (a; 1:1, b; 2:1) hiyerarşik yapıdaki küçük gözenekleri oluşturmuştur ancak gözenek yapıları arasında belirgin bir fark oluşmamıştır. 1:1 ve 2:1 oranında hazırlanan OVA:kitosan-n hiyerarşik gözenekli OVA-kitosan-n kriyojellerinin gözenek boyutları farklılık göstermiştir. 2:1 oranında hiyerarşik gözenekli OVA-kitosan jellerinin 1:1 oranındakine göre büyük gözenekleri daha büyük bulunmuştur (Çizelge 4.3). Kitosan ve OVA:kitosan kriyojellerinin 40-100 µm aralığındaki büyük gözeneklerinin boyutu literatürdeki kitosan ve ovalbumin kriyojelleri ile uyumludur [70], [91], [92].

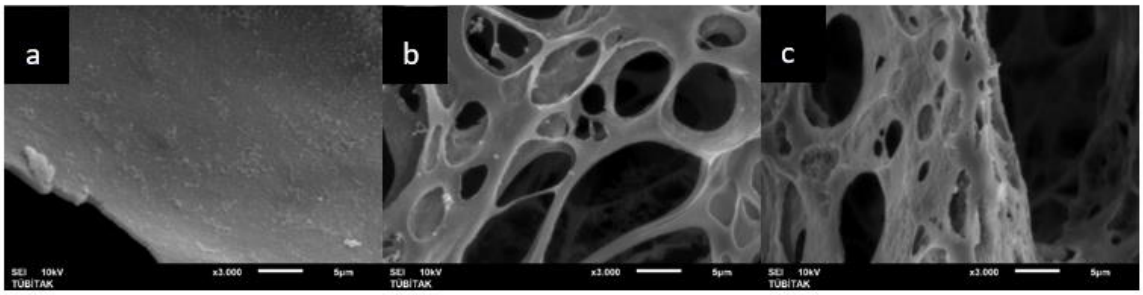


Şekil 4. 16 Farklı oranlarda OVA:kitosan ile sentezlenen kriyojellerin SEM görüntüleri, a; 1:1 oranında OVA:kitosan-k, b2:1 OVA:kitosan

Çizelge 4. 3 Farklı yöntemlerle hazırlanan jellerin gözenek boyutları

Malzeme	Gözenek Yapısı	Gözenek Türü	Gözenek Boyutu (µm)
OA-Kitosan-k (1:1) Kriyojeli	Tek tip boyutlu	Büyük	65 ± 17
OA-Kitosan-n (1:1) Kriyojeli	Hiyerarşik	Büyük	51 ± 10
		Küçük	12 ± 4
OA-Kitosan-n (2:1) Kriyojeli	Hiyerarşik	Büyük	80 ± 11
		Küçük	13 ± 3

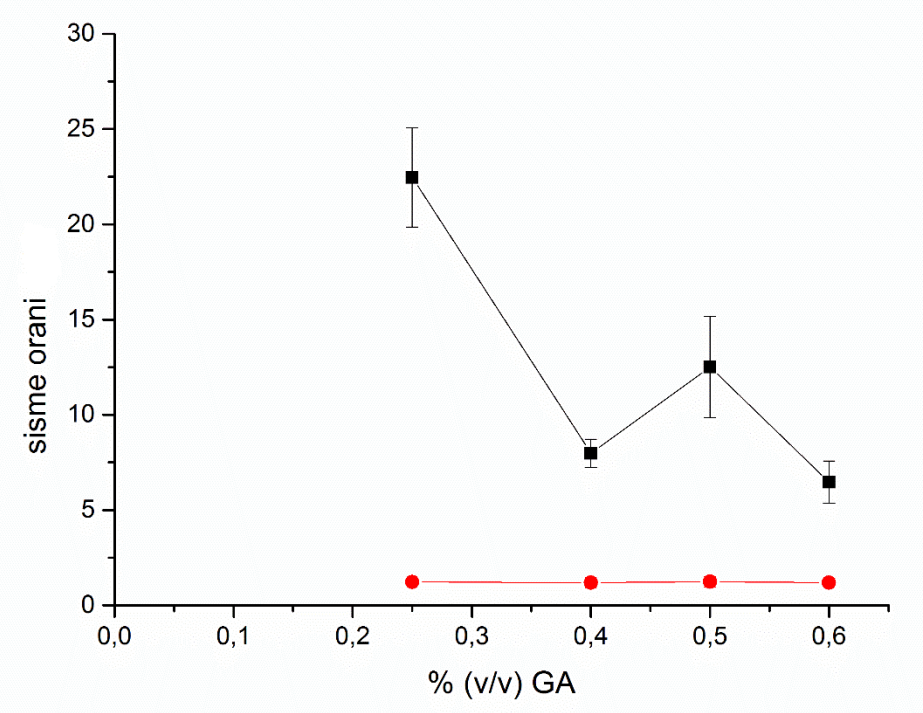
Yine n-bütanol etkisini daha net görebilmek için OVA kitosan jellerinin gözenek yapısına ait SEM görüntüleriŞekil 4.17'de görüldüğü gibi çok daha büyük büyütmelerde (x3000) verilmiştir. N-bütanol eklenmeyen OVA:kitosan-k örneğinin gözenek duvarları sürekli ve gözeneksiz bir yapıdadır (Şekil 4.17 a). Şekil 4.17.b-c'de n-bütanolden ötürü oluşan küçük gözenekler x3000 büyütmede belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4. 17 OVA-kitosan kriyojellerinin gözenek duvarlarının SEM görüntüleri a; OVA-kitosan-k kriyojeli,b; OVA:Kitosan-n (1:1) kriyojeli, c; OVA:Kitosan-n (2:1) kriyojeli

4.2.2.4 OVA-Kitosan Kriyojellerinin Şişme Özellikleri ve Gözenekliliği

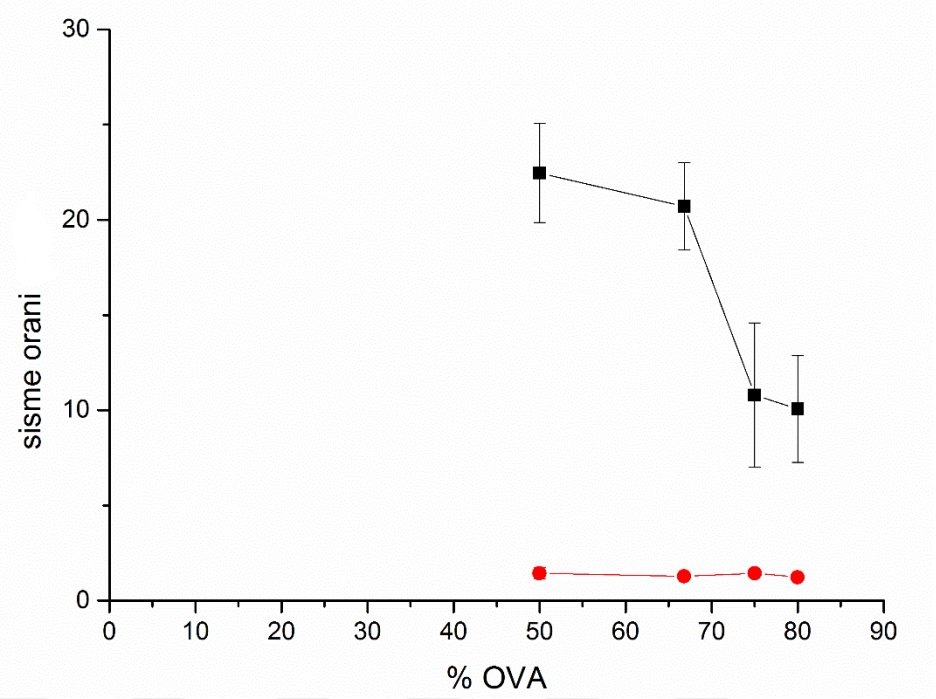
OVA-kitosan kriyojellerinin şişme özellikleri distile su içinde, oda sıcaklığında incelenmiştir. Şekil 4.18'deGA miktarına bağlı olarak OVA-kitosan-n jellerinin şişme oranları verilmiştir. Jellerin hacimce şişme oranları literatürdeki kriyojellere yakın olmakla birlikte ağırlıkça şişme oranı 5-12 g/g arasında değişmekte ve 20-30 g/g aralığında değişen ağırlıkça şişme oranlarıyla uyuşmamaktadır. %0,4, %0,6GA ile çapraz bağlanan OVA-kitosan jellerinin ve kitosan kriyojellerinin şişme oranlarının düşük olmasının nedeni kurutma sırasında yapıdaki gözeneklerin çökmesi olarak düşünülmektedir. OVA-kitosan kriyojellerinin hacimce şişme oranı ise kitosan kriyojellerinde olduğu gibibirbirine yakın bulunmuştur.



Şekil 4. 18 Farklı miktarlarda GA eklenen OVA-kitosan kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w)(■) ve hacimce şişme oranları (q_v) (●)

Farklı oranlarda ovalbumin-kitosan içeren kriyojellerin ovalbumin miktarına bağlı olarak şişme oranları Şekil 4.19'da gösterilmektedir. Polimer karışımında ovalbumin miktarının artması ağırlıkça şişme oranlarının düşmesine neden olmuştur.

Ovalbumin-kitosan kriyojellerinin ise %0,25 ve % 0,5 GA ile çapraz bağlanan jelin gözenekliliği, sırasıyla %95 ve %93 olarak hesaplanmıştır. Ancak % 0,4 ve % 0,6 GA kullanılan jellerin gözenekliliği sırasıyla, %88, %85 olarak hesaplanmıştır. Farklı oranlarda ovalbumin-kitosan kullanılan kriyojellerin gözenekliliği, OVA:kitosan oranı 1:1 ve 2:1 için %95, 3:1 ve 4:1 için %91 olarak hesaplanmıştır.



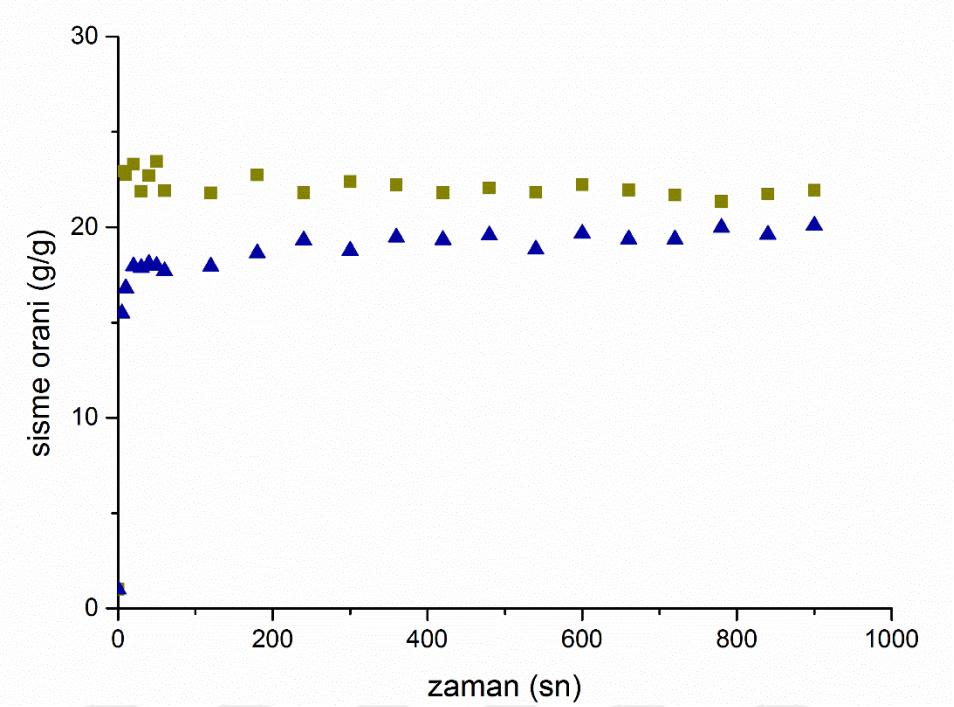
Şekil 4. 19 Farklı oranlarda OVA-kitosan içeren kriyojellerinin kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) (■) ve hacimce şişme oranları (q_v) (●)

4.2.2.5 OVA-Kitosan ve Kitosan Kriyojellerin Şişme Kinetiği Davranışlarının Mukayese Edilmesi

Gözenekli yapılarından dolayı kriyojelleri hidrojellerden ayıran en önemli özelliklerinden biri uygun sıvı ortamında hızlı bir şekilde şişmeleridir. Kriyojellerin, hidrojellere göre çözücüleri hızlı bir şekilde absorplaması ve denge ağırlığına ulaşması doku mühendisliğinde biyolojik ortamdaki sıvıların daha hızlı bir şekilde jele absorplanmasını sağlar.

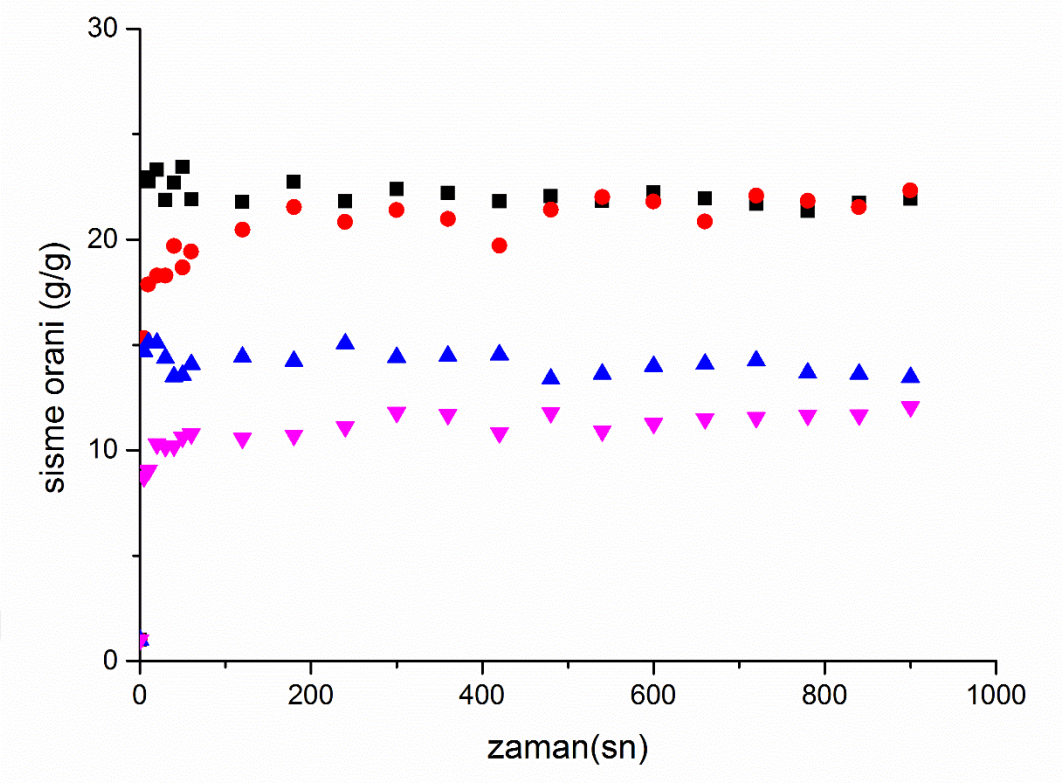
Bu çalışmada kitosan ve ovalbumin-kitosan kriyojellerinin şişme kinetik ölçümlerinin hepsi kurutulmuş kriyojeller ile distile su içinde yapılmıştır. %0,25GA ile -20^{o}C'de sentezlenen, % 2,5 (w/v) polimer içeren kitosan ve OVA-kitosan kriyojellerinin zamana bağlı olarak şişme oranları Şekil 4.20'de verilmiştir. Tüm kriyojeller 2 dakika içinde denge ağırlığına gelmiştir. Kriyojellerin gözenekli yapısından dolayı su, gözeneksiz geleneksel hidrojellerde gerçekleşen difüzyonla şişmeden farklı olarak konveksiyon ile gözeneklere dolmaktadır. Böylece kriyojeller çok hızlı bir şekilde şişerek denge şişme ağırlıklarına hemen ulaşmışlardır. Kitosan ve OVA-kitosan kriyojellerinin şişme kinetiği arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Ancak, kitosan kriyojelinin sıvının

absorplandığı gözeneklerin boyutlarının daha küçük olması şişme oranının daha az olmasına neden olmuştur.



Şekil 4. 20Farklı miktarlarda GA içeren OA-kitosan kriyojellerin şişme kinetikleri (▲; kitosan kriyojelini, ■; 1:1 OVA:kitosan)

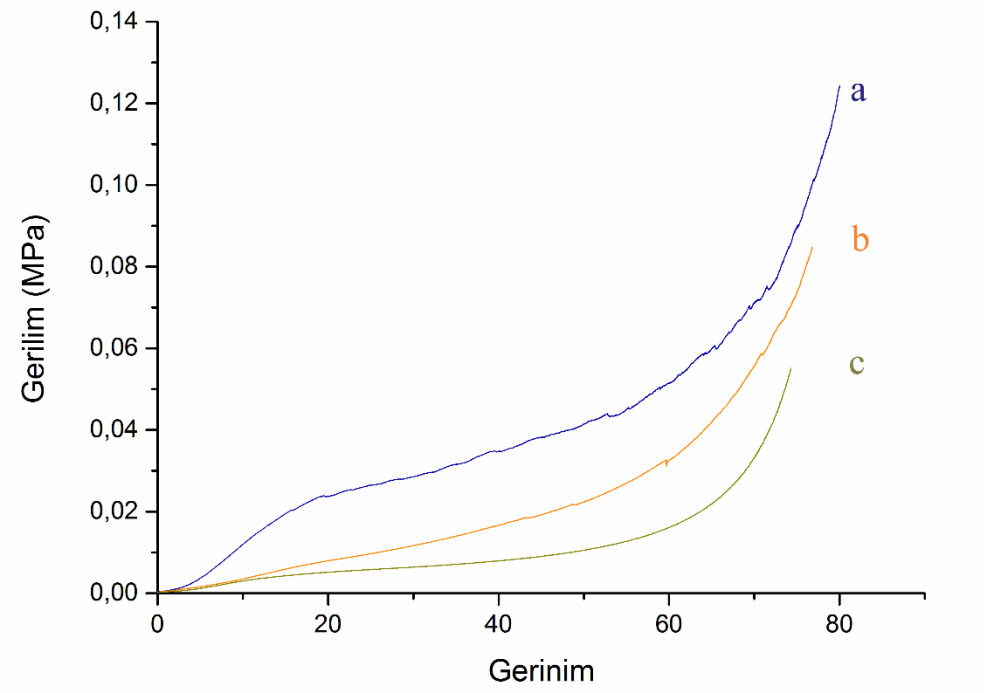
Değişen OVA-kitosan oranlarının zamana bağlı olarak şişme özellikleri Şekil 4.21'de gösterilmektedir. %2,5 (w/v) polimer konsantrasyonu sabit tutularak, polimer karışımına OVA-kitosan oranları değiştirilereküretilenOVA-kitosan kriyojelleri 2 dakika içine denge ağırlıklarına ulaşmıştır. Bu kriyojellerde OVA miktarının artmasıyla kriyojellerin denge şişme ağırlıklarına ulaşma hızlarında belirgin bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4. 21 Farklı oranlarda ovalbumin-kitosan içeren kriyojellerin şişme kinetikleri (OVA:Kitosan oranları■ ;1:1, ● ; 2:1, ▲;3:1, ▼;4:1)

4.2.2.6 OVA-Kitosan Kriyojellerin Mekanik Özellikleri

GA'nın OVA-kitosan kriyojellerinin mekanik özellikleri üzerie etkisi tek eksenli basma deneyleri oda sıcaklığında, yük ve yer değiştirme hızı 1 mm/dk hızında yapılarak incelenmiştir, mekanik sonuçlar gerilim-gerinim grafiği şeklinde verilmiştir. Şekil 4.22'de farklı miktarlarda -20^{o}C'de GA ile çapraz bağlanan OVA-kitosan (1:1) kriyojellerine ait gerilim-gerinim grafiği gösterilmiştir. GA miktarları %0,25 (a), %0,4 (b), %0,5 (c) olan kriyojeller ise benzer gerilim-gerinim davranışı göstermişlerdir. Bu jellerin orijinal uzunlukları %80'e kadar sıkıştırıldığında jellerin yapısında kırılma görülmemiştir. Kriyojellere uygulanan kuvvet kaldırılığında numune ağırlık altında içinden çıkmış olan suyu kısa bir süre içinde tekrar absorplayarak ilk haline dönmüştür.



Şekil 4. 22 Farklı GA miktarları kullanılarak sentezlenen OVA-kitosan kriyojellerinin gerilim-gerinim grafiği (a; %0,25 GA, b;%0,4GA, c;%0,5 GA)

OVA-kitosan kriyojellerinin değişen GA oranına bağlı olarak % 50 gerinimdeki gerilim değerleri çapraz bağlayıcı oranının % 0,25; %0,4 ve %0,5 olarak değişmesiyle sırasıyla 41,39; 20,41 ve 9,34 kPa şeklinde değişmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, doku mühendisliği uygulamaları için, mekanik özellikleri ayarlanabilen yapısında birbiriyle bağlantılı büyük ve küçük gözenekleri olan hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için, faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon/faz ayılması yöntemleri kullanılmıştır. Her iki yöntemde de farklı aşamalarda farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak doku iskeleleri üretilmiştir. Çalışmamızdan çıkarılabilecek genel sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

i) Faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemlerinin her ikisinde de, hiyerarşik gözenek yapılı çapraz bağlı doku iskeleleri elde edilmiştir. Yine, her iki yöntemde de büyük gözenekler -20^{o}C'de çözücünün donması esnasında oluşan buz kristallerinden ötürü oluşurken, reaksiyon karışımına eklenen n-bütanol faz ayrılmasıyla küçük gözenekleri oluşturmuştur.

ii) Hiyerarşik gözenekli kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin büyük gözeneklerin boyutu 76±26 µm iken küçük gözeneklerin boyutu 5±2 µm olarak hesaplanmıştır. Hiyerarşik gözenekli kitosan kriyojellerinin büyük gözenekleri ise 46±11 µm, küçük gözenekleri 10±3µm olarak hesaplanmıştır. Hiyerarşik yapıdaki ovalbumin-kitosan kriyojellerinin ise büyük gözeneklerinin boyutları kitosan kriyojelerinde daha fazladır ve polimer karışımında ovalbumin miktarının artmasıyla büyük gözeneklerin boyutu 51±10 µm'den 80±11 µm'ye yükselmiştir.

iii) Kitosan-PEGDGE süngerlerinin şişme oranları %50 PEGDGE ile yapılan çapraz bağlanmada en düşükken, çapraz bağlayıcı miktarı artırıldığında şişme oranı da artmıştır, denge şişme oranı en yüksek % 100 PEGDGE ile çapraz bağlanan kitosan süngerinde hesaplanmıştır.

iv) Kitosan ve ovalbumin-kitosan kriyojellerinin şişme oranları ise GA miktarı arttıkça düşmüştür. Kitosan kriyojellerinde %0,25 ve %0,375 GA kullanılan jellerin gözenekliliği %93 olarak hesaplanmıştır. %0,5 GA ile çapraz bağlanan kriyojellerin gözenekliliği %68 olarak bulunmuştur. OVA-kitosan kriyojellerinde 100 µL GA ile çapraz bağlanan jelin gözenekliliği, kitosan kriyojelleri gibi %93 olarak hesaplanmıştır. Ancak %0,25-0,6 GA kullanılan jellerin gözenekliliği %85-90 arasında oranında hesaplanmış olup GA miktarının değişmesiyle önemli bir farklılık göstermemiştir. Kitosan-PEGDGE hibrit süngerlerinin mekanik özellikleri PEGDGE çapraz bağlayıcısıoranının değiştirebilmesiyle ayarlanabilmiştir. En yüksek gerilim değeri %50 PEGDGE ile çapraz bağlanan sünger için bulunurken, %50 gerinimdeki gerilim değerleri 0,1-2 MPa arasında değişmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarını değiştirerek farklı mekanik dayanımları olan süngerler elde etmek, farklı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek potansiyelde doku iskelelerinin üretilmesini sağlamıştır.

v) Kitosan kriyojellerinin mekanik özelliklerine GA miktarının etkisi incelenmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarının %0,25-%0,5 olarak artmasıyla %50 gerinimde gerilim değeleri 5-22 kPaarasında değişirken,OVA-kitosan kriyojellerinin ise 9-40 kPa arasında değişmiştir.

Yukarıdaki sonuçlar, tezin amaçlarından olan hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin faz ayrılması/buz kalıplama ve kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemleriyle doğal polimerler kullanılarak başarıyla üretildiklerini göstermiştir.Doku iskelesi olarak kullanılması hedeflenen bu yeni biyomalzemeler oldukça açık, birbiriyle bağlantılı hiyerarşik bir yapı göstermiştir, bu morfolojik özellikleriyle doku mühendisliği uygulamalarının başarısını arttırabilecek potansiyele sahip oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca, burada üretilen hiyerarşik gözenekli doku iskelelerinin mekanik özellikleri kullanılan çapraz bağlayıcı miktarıyla ayarlanabilmiştir. Bu ayarlanabilen mekanik

özellikler doku iskelelerinin hem yumuşak hem de sert doku mühendislikleri için kullanılabileceklerini göstermiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda, burada kullandığımız faz ayrılması/buz kalıplama yöntemindeki PEGDGE ile ileri çapraz bağlanma reaksiyonununjelatin gibi başka doğal polimerler için de kullanılabileceği düşünülmektedir. Yine burada n-bütanol kullanarak gerçekleştirdiğimiz yeni kriyojelasyon/faz ayrılması yöntemimiz ile birçok hiyerarşik gözenekli doğal polimerlerden yeni doku iskelelerinin üretilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Bártolo, P.J., Domingos, M., Patrício, T., Cometa, S. Mironov, V., (2011). Biofabrication Strategies for Tissue Engineering, Advances on Modeling in Tissue Engineering,20:137-176.

[2] Ly, H.B. Le Droumaguet, B. Monchiet, V., Grande, D., (2015). "Facile Fabrication of Doubly Porous Polymeric Materials with Controlled Nano-and Macro-Porosity", Polymer, 78:13-21.

[3] Wei, C., Dong, J., (2014). "Hybrid Hierarchical Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds", Journal of Manufacturing Processes, 16:257-263.

[4] Reverchon, E., Cardea, S., (2012). "Supercritical Fluids In 3-D Tissue Engineering", The Journal of Supercritical Fluids, 69: 97-107.

[5] Yang, S. Leong, K.-F. Du, Z. ve Chua, C.-K., (2001). "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors", Tissue engineering, 7:679-689.

[6] Langer, R., Vacanti, J.P., (1993). "Tissue Engineering", Science, 260:920-926.

[7] Khademhosseini, A. Langer, R. Borenstein, J., Vacanti, J.P., (2006). "Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology", Proceedings of National Academy of Science of USA, 103: 2480-2487.

[8] Hutmacher, D.W., (2001). "Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues State of The Art and Future Perspectives", Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 12:107-124.

[9] Hutmacher, D.W., (2000). "Scaffolds In Tissue Engineering Bone and Cartilage", Biomaterials, 21:2529-2543.

[10] Hollister, S.J., (2009). "Scaffold Design and Manufacturing: from Concept to Clinic", Advanced Materials, 21:3330-3342.

[11] Brown, X.Q., Ookawa, K., ve Wong, J.Y., (2005). "Evaluation of Polydimethylsiloxane Scaffolds with Physiologically-Relevant Elastic Moduli: Interplay of Substrate Mechanics and Surface Chemistry Effects on Vascular Smooth Muscle Cell Response", Biomaterials, 26: 3123-3129.

[12] 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: 485-502.

[13] Nair, L.S., Laurencin, C. T., (2007). "Biodegradable Polymers as Biomaterials", Progress in Polymer Science, 32: 762-798.

[14] Ozcelik, B., Blencowe, A., Palmer, J., Ladewig, K., Stevens, G.W., Abberton, K.M., Morrison, W.A., Qiao, G.G., (2014). "Highly Porous and Mechanically Robust Polyester Poly(Ethylene Glycol)SpongesAs Implantable Scaffolds", Acta Biomaterialia, 10: 2769-2278.

[15] Ambrosio, L. ve Guarino, V., (2010). "Temperature-Driven Processing Techniques for Manufacturing FullyInterconnected Porous Scaffolds in Bone Tissue Engineering", Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 224: 1389-1400.

[16] Jones, J.R. Lee, P.D. ve Hench, L.L., (2006). "Hierarchical Porous Materials for Tissue Engineering", Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 364: 263-281.

[17] Yuan, Z.-Y. ve Su, B.-L., (2006). "Insights into Hierarchically Meso–Macroporous Structured Materials", Journal of Materials Chemistry, 16: 663-677.

[18] Zhang, Q. Luo, H. Zhang, Y. Zhou, Y. Ye, Z. Tan, W. ve Lang, M., (2013). "Fabrication of Three-Dimensional Poly(ε-caprolactone) Scaffolds with Hierarchical Pore Structures for Tissue Engineering", Materials Science and Engineering: C, 33: 2094-2103.

[19] Du, Y., Chen, X., Hag Koh, Y., Lei, B., (2014). "Facilely Fabricating PCL Nanofibrous Scaffolds with Hierarchical Pore Structure for Tissue Engineering", Materials Letters, 122: 62-65.

[20] Roohani-Esfahani, S.-I. Lu, Z. ve Zreiqat, H., (2011). "Novel, Simple and Reproducible Method for Preparation of Composite Hierarchal Porous Structure Scaffolds", Materials Letters, 65: 2578-2581.

[21] Akbarzadeh, R., Minton, J. A., Janney, C. S., Smith, T. A., James, P. F., Yousefi, A. M., (2015). "Hierarchical Polymeric Scaffolds Support The Growth of MC3T3-E1 Cells", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 26: 116.

[22] Ko, Y.G., Kawazoe, N., Tateishi, T., Chen, G., (2010). "Preparation of Chitosan Scaffolds with a Hierarchical Porous Structure", Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 93: 341-350.

[23] Lou, T., Wang, X., Song, G., Gu, Z., ve Yang, Z., (2014). "Fabrication of PLLA/beta-TCP Nanocomposite Scaffolds with Hierarchical Porosity for Bone Tissue Engineering", Int J Biol MacromoInternational Journal of Biological Macromoleculesl, 69: 464-470.

[24] Liu, X., ve Ma, P.X., (2009). "Phase Separation, Pore Structure, and Properties of Nanofibrous Gelatin Scaffolds", Biomaterials, 30: 4094-4103.

[25] Lim, J., Kim, G., Na, J., Noh, I., Son, Y., Kim, C., (2007). "A Novel Method for Porous Chitosan Scaffold", Key Engineering Materials, 342-343: 65-68.

[26] Chun, H.J. Kim, G.-W. ve Kim, C.-H., (2008). "Fabrication of Porous Chitosan Scaffold in Order to Improve Biocompatibility", Journal of Physics and Chemistry of Solids, 69: 1573-1576.

[27] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S. ve Kenny, J.M., (2010). "Biodegradable Polymer Matrix Nanocomposites for Tissue Engineering: A review", Polymer Degradation and Stability, 95: 2126-2146.

[28] Nair, L.S., ve Laurencin, C.T., (2006). "Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery", 102: 47-90.

[29] Liu, X., Holzwarth, J.M. ve Ma, P.X., (2012). "Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering", Macromolecular Bioscience, 12: 911-919.

[30] Dumitriu, S., (2002). Polymeric Biomaterials, NewYork: Marcel Dekker.

[31] Burdick, J.A.ve R.L.,Mauck, (2011). Biomaterials for Tissue Engineering Applications- A Review of the Past and Future Trends Germany: Springer-Verlag/Wien.

[32] Sabir, M.I., Xu, X. ve Li, L., (2009). "A review on Biodegradable Polymeric Materials for Bone Tissue Engineering Applications", Journal of Materials Science, 44: 5713-5724.

[33] Suntornnond, R.A., J., Yeong, W. Y.ve Chua, C. K., (2015). "Biodegradable Polymeric Films and Membranes Processing and Forming for Tissue Engineering", Macromolecular Materials and Engineering, 300: 858-877.

[34] Seal, B.R., Otero, T.C., Panitch, A., (2001). "Polymeric Biomaterials for Tissue and Organ Regeneration", Materials and Science Enginnering R, 34: 147-230.

[35] Kim, I.Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., Cho, C.S., (2008). "Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications", Biotechnol Adv, 26: 1-21.

[36] Suh J.K.F. ve Matthew., H.W.T, (2000). "Application of Chitosan-Based Polysaccharide BiomaterialsIn Cartilage Tissue Engineering:A Review", Biomaterials, 21: 2589-2598.

[37] Thomas, S., Ninan, N., Mohan, S., Francis, E., (2012). Advances in Materials Science, Toronto: Apple Academic Press.

[38] Muzzarelli, R.A.A., (2009). "Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage and Bone", Carbohydrate Polymers, 76: 167-182.

[39] Luo, B. ve Choong, C., (2014). "Porous Ovalbumin Scaffolds with tunable Properties: A resource-Efficient Biodegradable Material for Tissue Engineering Applications", Journal of Biomaterials Applications, 0: 1-9.

[40] Farrar, G., Barone, J. ve Morgan, A., (2010). "Ovalbumin-Based Porous Scaffolds for Bone Tissue Regeneration", Journal of Tissue Engineering, 2010: 1-6.

[41] Kumar, A., Negi, Y.S., Choudhary, V., Bhardwaj, N.K., (2014). "Effect of Modified Cellulose Nanocrystals on Microstructural and Mechanical Properties of Polyvinyl Alcohol/Ovalbumin Biocomposite Scaffolds", Materials Letters, 129: 61-64.

[42] Konstantinova, N.R., Lozinsky, V., (1997). "Cryotropic Gelation of Ovalbumin Solutions", 11: 113-123.

[43] Elowsson, L., Kirsebom, H., Carmignac, V., Mattiasson, B., (2012). "Porous Protein-Based Scaffolds Prepared Through Freezing as Potential Scaffolds for Tissue Engineering", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 23: 2489-2498.

[44] Berro, S. El Ahdab, R. Hajj Hassan, H. Khachfe, H.M. ve Hajj-Hassan, M., (2015). "From Plastic to Silicone: The Novelties in Porous Polymer Fabrications", Journal of Nanomaterials, 2015: 1-21.

[45] Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J., (2007). Principles of Tissue Enginnering: Elsevier Academic Press.

[46] Janik, H. ve Marzec, M., (2015). "A review: Fabrication of Porous Polyurethane Scaffolds", Materials Science and Engineering C, 48: 586–591.

[47] Bhamidipati, M., Scurto, A.M. ve Detamore, M.S., (2013). "The Future of Carbon Dioxide for Polymer Processing in Tissue Engineering", Tissue Engineering: Part B, 19: 221-232.

[48] Wade, R.J. ve Burdick, J.A., (2014). "Advances in Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications: From Electrospinning to Self-Assembly", Nano Today, 9: 722-742.

[49] Stella, J.A., D'Amore, A., Wagner, W. R., Sacks, M. S., (2010). "On the Biomechanical Function of Scaffolds for Engineering Load-Bearing Soft Tissues", Acta Biomaterialia, 6: 2365-2381.

[50] Akbarzadeh, R. ve Yousefi, A. M., (2014). "Effects of Processing Parameters in Thermally Induced Phase Separation Technique on Porous Architecture of Scaffolds for Bone Tissue Engineering", Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 102: 1304-1315.

[51] Shen, Q., Shi, P., Gao, M., Yu, X., Liu, Y., Luo, L., Zhu, Y., (2013). "Progress on Materials and Scaffold Fabrications Applied to Esophageal Tissue Engineering", Materials Science and Engineering: C, 33: 1860-1866.

[52] Liu, X. ve Ma, P.X., (2004). "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering", Annals of Biomedical EngineerinG, 32: 477-486.

[53] Sakina, R. ve Ali, M., (2014). "An Appraisal of the Efficacy and Effectiveness of Nanoscaffolds Developed by Different Techniques for Bone Tissue Engineering

Applications: Electrospinning A Paradigm Shift", Advances in Polymer Technology,0:21429.

[54] Ma, P.X., (2004). "Scaffolds for Tissue Fabrication", Materials Today, 7: 30-40.

[55] Kirsebom, H. ve Mattiasson, B., (2011). "Cryostructuration As A Tool for Preparing Highly Porous Polymer Materials", Polymer Chemistry, 2: 1059.

[56] Lozinsky, V. ve Okay, O., (2014). "Basic Principles of Cryotropic Gelation", Advances in Polymer Science, 263: 49-101.

[57] Lozinsky, V.I. Galaev, I.Y. Plieva, F.M. Savina, I.N. Jungvid, H. ve Mattiasson, B., (2003). "Polymeric Cryogels As Promising Materials of Biotechnological Interest", Trends in Biotechnology, 21: 445-451.

[58] Bencherif, S.A. Braschler, T.M. ve Renaud, P., (2013). "Advances in The Design of Macroporous Polymer Scaffolds for Potential Applications in Dentistry", Journal of Periodontal & Implant Science, 43: 251-261.

[59] Osada, Y., Ping Gong, J. ve Tanaka, Y., (2004). "Polymer Gels", Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 44: 87-112.

[60] Galaev, I. ve Mattiasson, B., (2007). Smart Polymers: Application in Biotechnology and Biomedicine, New York: CRC Press.

[61] Slaughter, B.V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A., (2009). "Hydrogels in Regenerative medicine", Advanced Materials, 21: 3307-3329.

[62] Hennink, W.E. ve Van Nostrum, C.F., (2012). "Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels", Advanced Drug Delivery Reviews, 64: 223-236.

[63] Okay, O. ve Lozinsky, V.L., (2014). "Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels", Advances in Polymer Science, 263: 103-157.

[64] Yui, N., Mrsny, R.J. ve Park, K., (2004). Reflexive Polymers and Hydrogels: Understanding and Designing Fast Responsive Polymeric Systems, Florida: CRC Press.

[65] Ak, F., Oztoprak, Z., Karakutuk, I., Okay, O., (2013). "Macroporous Silk Fibroin Cryogels", Biomacromolecules, 14: 719−727.

[66] Tripathi, A., Kathuria, N., Kumar, A., (2009). "Elastic and Macroporous Agarose-Gelatin Cryogels with Isotropic and Anisotropic Porosity for Tissue Engineering", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 90: 680-694.

[67] Henderson, T.M.A., Ladewig, K., Haylock, D.N., McLeanb, K.M., J. O'Connor, A., (2013). "Cryogels for Biomedical Applications", Journal of Materials Chemistry B, 1: 2682–2695.

[68] Changa, K.-H., Liao, H-T. ve Chen, J-P., (2013). "Preparation and Characterization of Gelatin-Hyaluronic Acid Cryogels for Adipose Tissue Engineering: in Vitro and in Vivo Studies", Acta Biomaterialia, 9: 9012-9026.

[69] Dainiak, M.B., Allan,I.U., Savina, I.N., Cornelio, L., James, E.S., James, S.L., Mikhalovsky, S.V., Jungvid, H., Galaev , I.Y., (2009). "Gelatin–Fibrinogen Cryogel

Dermal Matrices for Wound Repair:Preparation, Optimisation and in Vitro Study", Biomaterials, 31: 67-76.

[70] Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K. K., Kumar, A., (2009). "Synthesis and Characterization of Elastic and Macroporous Chitosan-Gelatin Cryogels for Tissue Engineering", Acta Biomaterialia, 5: 406-418.

[71] Tripathi, A., Kumar, A., (2011). "Multi-featured macroporous Agarose-Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering Applications", Macromolecular Bioscience, 11: 22-35.

[72] Singh, D., Tripathi, A., Nayak, V., Kumar, A., (2011). "Proliferation of Chondrocytes on A 3-D Modelled Macroporous Poly(hydroxyethyl methacrylate)-Gelatin Cryogel",Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 22: 1733-1751.

[73] Welzel, P.B., Grimmer, M., Renneberg, C., Naujox, L., Zschoche, S., Freudenberg, U., Werner, C., (2012). "Macroporous StarPEG-Heparin Cryogels", Biomacromolecules, 13: 2349-2358.

[74] Vrana, N.E., Cahill, P. A., McGuinness, G. B., (2010). "Endothelialization of PVA/Gelatin Cryogels for Vascular Tissue Engineering: Effect of Disturbed Shear Stress Conditions", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 94: 1080-1090.

[75] Jain, E., Srivastava, A., Kumar, A., (2009). "Macroporous Interpenetrating Cryogel Network of Poly(acrylonitrile) and Gelatin for Biomedical Applications", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20: 173-179.

[76] Rodrigues, S.C., Salgado, C. L., Sahu, A., Garcia, M. P., Fernandes, M. H., Monteiro, F. J., (2013). "Preparation and Characterization of Collagen-Nanohydroxyapatite Biocomposite Scaffolds by Cryogelation Method for Bone Tissue Engineering Applications", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 101: 1080-1094.

[77] Bundela, H., (2008). "Designing of Hydroxyapatite-Gelatin Based Porous Matrix As Bone Substitute: Correlation with Biocompatibility Aspects", eXPRESS Polymer Letters, 2: 201-213.

[78] Dinu, M.V. Přádný, M. Drăgan, E.S. ve Michálek, J., (2013). "Ice-Templated Hydrogels Based on Chitosan with Tailored Porous Morphology", Carbohydrate Polymers, 94: 170-178.

[79] Kundu, B. ve Kundu, S. C., (2013). "Bio-Inspired Fabrication of Fibroin Cryogels from the Muga SilkwormAntheraea Assamensisfor Liver Tissue Engineering", Biomedical Materials, 8: 055003.

[80] Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., (2010). "Modulating The Porosity of Cryogels by Influencing The Nonfrozen Liquid Phase Through The Addition of Inert Solutes", Langmuir, 26: 16129-16133.

[81] Plieva, F.M. Savina, I.N. Deraz, S. Andersson, J. Galaev, I.Y. ve Mattiasson, B., (2004). "Characterization of Supermacroporous Monolithic Polyacrylamide Based Matrices Designed for Chromatography of Bioparticles", Journal of

chromatography B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences, 807: 129-137.

[82] Ozmen, M.M. ve Okay, O., (2008). "Formation of Macroporous Poly (acrylamide) Hydrogels in DMSO/Water Mixture: Transition from Cryogelation to Phase Separation Copolymerization", Reactive and Functional Polymers, 68: 1467-1475.

[83] Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., (2006). "Macroporous Polyacrylamide Monolithic Gels with Immobilized Metal Affinity Ligands: the Effect of Porous Structure and Ligand Coupling Chemistry on Protein Binding", Journal of Molecular Recognition, 19: 305-312.

[84] Reichelt, S., Prager, A., Abe, C., Knolle, W., (2014). "Tailoring the Structural Properties of Macroporous Electron-Beam Polymerized Cryogels by Pore Forming Agents and the Monomer Selection", Radiation Physics and Chemistry, 94: 40-44.

[85] Chalal, M., Ehrburger-Dolle, F., Morfin, I., Vial, J.C., Aguilar de Armas, M.R., Roman, J.S., Bölgen, N., Pişkin, E., Ziane, O., Caslegno, R., (2009). "Imaging the Structure of Macroporous Hydrogels by Two-Photon Fluorescence Microscopy", Macromolecules, 42: 2749-2755.

[86] Bai, H., Polini, A., Delattre, B., Tomsia, A. P., (2013). "Thermoresponsive Composite Hydrogels with Aligned Macroporous Structure by Ice-Templated Assembly", Chemistry of Materials, 25: 4551-4556.

[87] Krenkova, J., Cesla, P. ve Foret, F., (2015). "Macroporous Cryogel Based Spin Column with Immobilized Concanavalin A for Isolation of Glycoproteins", Electrophoresis, 36: 1344-1348.

[88] Tuncaboylu, D.C. ve Okay, O., (2010). "Hierarchically Macroporous Cryogels of Polyisobutylene and Silica Nanoparticles", Langmuir, 26: 7574–7581.

[89] Dinu, M.V., Ozmen, M.M., Dragan, E.S., Oguz O., (2007). "Freezing as A Path to Build Macroporous Structures: Superfast Responsive Polyacrylamide Hydrogels", Polymer Bulletin, 48: 195-204.

[90] Ozmen, M.M., (2009). Synthesis of Macroporous Hydrogels From Frozen Monomer Solution and Their Characterization, Polymer Science and Technology, Istanbul Technical University, Istanbul.

[91] Nikonorova, V.V., Ivanov, R.V., Kil'deeva, N.R., Bulatnikova, L.N., Lozinskii, V.I., (2010). "Synthesis and Characteristics of Cryogels of Chitosan Crosslinked by Glutaric Aldehyde", Polymer Science, 52: 828-834.

[92] Hedstrom, M., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., (2008). "Monolithic Macroporous Albumin/Chitosan Cryogel Structure: A New Matrix for Enzyme Immobilization", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390: 907-912.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğçe ŞEN

Doğum Tarihi ve Yeri : 26.08.1991/ İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : tugcesen91@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lise	Fen Bilimleri	Gökkuşağı Koleji	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2013	Sun Chemical	Stajyer
2012	Bilim İlaç	Stajyer

YAYINLARI

Bildiri

1. Şen, T., Özçelik, B., Özmen, M.M., (2016). “Hierarchical Porous Ovalbumin-ChitosanCryogel Scaffolds for Tissue Engineering Applications”, 46th IUPAC World Polymers Congress 17-21 July 2016, Istanbul.

2. Demirhan, E., Şen, T., & Baharçiçek, Z., (2014). “A Study on Adsorption of Nickel(II) From Aqueous Solutions onto Pistachio Shell”. 21st International Congress of Chemical and Process Engineering, 23-27 August 2014, Prague.