

**KÜRE FORMUNDA KRİYOJEL DOKU
İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

DİDEM DEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ – 2014**

**KÜRE FORMUNDA KRİYOJEL DOKU
İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

DİDEM DEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE**

**MERSİN
TEMMUZ – 2014**

Didem DEMİR tarafından Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE danışmanlığında hazırlanan “Küre Formunda Kriyojel Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

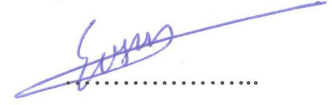
Doç. Dr. Bahadır Kürşad KÖRBAHTI



Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE



Yrd. Doç. Dr. Evren DEĞİRMENCİ



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03./09/2014 tarih ve 2014.19./534..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr.Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

KÜRE FORMUNDA KRİYOJEL DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Didem DEMİR

ÖZ

Bu tez çalışmasının amacı, enjekte edilebilir küre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin üretilmesi ve karakterizasyonudur. Çalışmanın ilk kısmında, farklı polimer kompozisyonlarındaki gözenekli kitosan mikroküreler, emülsiyon yağda su (Su/Yağ) fazı kimyasal çapraz bağlama ve kriyojelasyon tekniği bir arada kullanılarak üretilmiştir. Çalışmada, kitosanın %6'lık asetik asit çözücüsü ile farklı oranlarda hazırlanan karışımlarından üretilen mikroküre kriyojellerde, çapraz bağlayıcı olarak glüteraldehit kullanılmıştır. %0.5, 1 ve 2 (w/v) kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan polimer çözeltileri için viskozite değerleri sırasıyla 102.230, 234.513 ve 685.867 Pa.s olarak belirlenmiştir. 75:20:5 oranında petrol eteri:ayçiçeği yağı:Span 80'den oluşan yağ fazı içerisinde emülsiyon oluşturarak üretilmiş olan mikrokürelerin, %1, 3 ve 6 (v/v) glüteraldehit konsantrasyonlarında, -10, -16 ve -24 °C kriyojelasyon sıcaklıklarında, 500, 1000, 1500 rpm dağıtma ortamı karıştırma hızlarında, kriyojenik koşullarda çapraz bağlanmasıyla küre formunda kriyojel mikroküre üretimi tamamlanmıştır. Kriyojel mikrokürelerin gözeneklilikleri, gözeneklerin birbirleriyle olan bağlantısı, ortalama küre çapları ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. Farklı işlem değişkenlerinde üretilen mikrokürelerin ortalama gözenek çapı 197.72 ± 14.82 ile 581.80 ± 47.76 µm aralığında değişmektedir. Mikrokürelerin kimyasal yapısı FT-IR ile araştırılmış, denge şişme oranları ve yüzey yükleri analiz edilmiş, çapraz bağlanma dereceleri belirlenmiştir. Küre formunda üretilen kitosan kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma dereceleri %38.32 - 72.45 aralığında değişmiştir. Çapraz bağlanma derecesi artıkça yüzey yüklerinde azalma görülmüştür. -10°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen ve %72.20 olarak en yüksek şişme oranına sahip mikrokürelerin hızlı bir şekilde degradasyonunun başladığı görülmüştür. Kitosan ve glüteraldehit çözeltilerinin optimum üretim konsantrasyonlarının, sırası ile %1 (w/v) ve %3 (v/v) olduğu belirlenmiştir. Bu işlem değişkenlerinde üretilen mikroküreler enjekte edilmeye uygundur.

Anahtar Kelimeler: Doku Mühendisliği, Mikroküreler, Kriyojelasyon, Kitosan, Glüteraldehit

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE, Kimya Mühendisliği Bölümü, Mersin Üniversitesi

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CRYOGEL SCAFFOLDS IN THE FORM OF SPHERES

Didem DEMİR

ABSTRACT

The purpose of this study, produce and characterize an injectable chitosan cryogel tissue scaffold that in the form of spheres. In the first part of the study, different polymer compositions of chitosan microspheres are manufactured using a combination of water in oil emulsion (w/o) phase and cryogelation with chemical crosslinking by glutaraldehyde as a crosslinker. 0.5, 1, 2 (w/v, %) concentrations of chitosan solutions have different viscosity values 102.230, 234.513 and 685.867 Pa.s, respectively. Microspheres were formed in the oil phase which consist of petroleum ether:sunflower oil:Span 80 in the rate of 75:20:5 and the stirring speed of 500, 1000, 1500 rpm. Produced microspheres are crosslinked 1, 3 and 6 (v/v, %) glutaraldehyde concentrations at -10, -16 and -24°C temperatures in cryogenic conditions. Interconnected porosity, pore diameters, average sphere diameter and surface morphology of chitosan cryogel microspheres were examined by scanning electron microscopy (SEM). Produced in the different process variables, average pore diameter of the microspheres are in the range with 197.72 ± 14.82 and 581.80 ± 47.76 μm . The chemical structure of the microspheres were examined by FT-IR. Also, the equilibrium swelling ratio, degree of crosslinking have been determined. The degree of crosslinking values of chitosan cryogel microspheres are changed in the range of 38.32 and 72.45%. Microspheres which are produced at the temperature of -10°C have the highest swelling ratio (72.20%) that that causes the starting of degradation, rapidly. Optimum production parameters of chitosan and glutaraldehyde concentrations are, 1 (w/v, %) and 3 (v/v, %), respectively. The microspheres produced by this process variables is suitable for injection.

Key Words: Tissue Engineering, Microspheres, Cryogelation, Chitosan, Glutaraldehyde

Advisor: Assist. Prof. Dr. Nimet KARAGÜLLE, Department of Chemical Engineering, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesinden yararlanma olanağı bulduğum, tez çalışmamın oluşmasında çok değerli katkılarda bulunan, güler yüzlü, sabırlı ve değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmalarımı yürütmekte altyapı oluşturmamda destek olan ve aldığım derslerle bana yol gösteren Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ayla ÖZER'e, değerli bölüm hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmamızın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi'ne proje kapsamındaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca büyük emek veren ve sevgisini esirgemeyen sevgili babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	4
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	4
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLEŞENLERİ	5
2.2.1. Hücre	5
2.2.2. Doku İskelesi (Scaffold).....	6
2.2.2.1. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler	7
2.3. KİTOSAN.....	9
2.4. GLUTERALDEHİT	11
2.5. MİKROKÜRELER.....	12
2.5.1. Mikroküre Üretim Teknikleri	15
2.5.1.1. Çözücü buharlaştırma yöntemi	15
2.5.1.2. Anyonlarla etkileşim.....	16
2.5.1.3. Mikropartiküler kaplama	17
2.5.1.4. Isıl çapraz bağlanma	17
2.5.1.5. Kimyasal çapraz bağlanma	17
2.6. HİDROJEL	19
2.7. KRİYOJEL	20
2.7.1. Kriyojel Yapısına Etki Eden Faktörler	21
2.7.2. Kriyojellerin Hidrojellerden Farkı.....	22
2.8. MİKROKÜRELERİN BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI	23

2.8.1. Kontrollü Etkin Madde (İlaç) Salımı Çalışmaları	23
2.8.2. Enjektelerde Edilebilir Doku İskelesi Çalışmaları	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. MATERYAL	27
3.1.1. Mikroküre Formunda Kriyojel Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
3.1.1.1. Kitosan	27
3.1.1.2. Gluteraldehit	27
3.1.1.3. Span 80	27
3.1.1.4. Petrol eteri	28
3.1.1.5. Bitkisel yağ	28
3.1.1.6. Asetik asit	28
3.1.1.7. Etanol	28
3.1.1.8. Ninhidrin çözeltisi	28
3.1.2. Mikroküre Formunda Kriyojel Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Cihazlar	29
3.2. YÖNTEM	29
3.2.1. Mikroküre Doku İskeleleri Üretimi Ön Çalışmaları	29
3.2.2. Kitosan Temelli Kriyojel Mikrokürelerin Üretilmesi	30
3.2.3. Mikroküre Formunda Üretilmiş Kriyojellerin Karakterizasyonu	31
3.2.3.1. FT-IR analizi	31
3.2.3.2. Mikroküre formundaki kriyojellerin şişme davranışı	31
3.2.3.3. Çapraz bağlanma derecesi	32
3.2.3.4. Zeta potansiyeli	33
3.2.3.5. SEM ile analiz	33
3.2.3.6. İn vitro degradasyon	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	35
4.1. KÜRE FORMUNDA KRIYOJEL DOKU İSKELELERİNİN ÖZELLİKLERİ	35
4.1.1. Malzeme ve Çapraz Bağlayıcı Seçimi	35
4.1.2. Yöntem Seçimi	38
4.1.3. Kitosan Mikrokürelerin Üretimi	41
4.1.4. Mikrokürelerin %Küre Verimlerinin ve Çaplarının Değerlendirilmesi	42
4.1.5. FT-IR Analizi	45
4.1.6. SEM İle Analiz	51
4.1.6.1. Kitosan konsantrasyonunun ve çözelti viskozitesinin gözenek morfolojisine ve küre büyüklüğüne etkisi	51
4.1.6.2. Gluteraldehit konsantrasyonunun gözenek morfolojisi ve küre büyüklüğüne etkisi	54

4.1.6.3. Farklı Kriyojelasyon Sıcaklıklarının Gözenek Morfolojisi ve Küre Büyüklüğüne Etkisi	56
4.1.6.4. Farklı karıştıma hızlarının küre morfolojisine etkisi	57
4.1.7. Kriyojel Mikrokürelerin Şişme Davranışı	60
4.1.8. Zeta Potansiyeli	61
4.1.9. Kitosan Mikrokürelerin Glutaraldehit ile Çapraz Bağlanması Sonrasında Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini	62
4.1.10. Kriyojel Mikrokürelerin İn Vitro Degredasyonu.....	65
4.1.11. Enjekte Edilebilir Kriyojel Mikroküreler	67
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Doku iskelelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan doğal veya sentetik polimerler	9
Çizelge 2.2. Biyoparçalanabilir doğal polimerlerle hazırlanan hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin karşılaştırılması	23
Çizelge 4.1. Kitosan çözeltilerinin konsantrasyon, yoğunluk ve viskozite değerleri.....	35
Çizelge 4.2. Kitosan viskozite molekül ağırlığı hesaplama değerleri	37
Çizelge 4.3.Farklı kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16°C, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v).....	43
Çizelge 4.4. Farklı glüteraldehit konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16°C, kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)	44
Çizelge 4.5. Farklı reaksiyon sıcaklıklarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)	45
Çizelge 4.6. Farklı kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16°C, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v).....	45
Çizelge 4.7. Kitosan konsantrasyonu değişimi ile gözenek ve küre boyutlarının değişimi	53
Çizelge 4.8. Glüteraldehit konsantrasyonu değişimi ile gözenek ve küre boyutlarının değişimi	55
Çizelge 4.9. Kitosan konsantrasyonu değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi.....	59
Çizelge 4.10. Glüteraldehit konsantrasyonu değişimi ile denge şişme oranlarının değişim	59
Çizelge 4.11. Kriyojelasyon sıcaklığı değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi	60
Çizelge 4.12. Karıştırma hızı değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi	61
Çizelge 4.13. Farklı formülasyonlarda hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin zeta potansiyel değerleri.....	61
Çizelge 4.14. Farklı formülasyonlarda hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma değerleri	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımında üç ana bileşen	5
Şekil 2.2. Kitinin kimyasal bağ yapısı, [(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-B-D-glukoz]10	
Şekil 2.3. Kitosanın kimyasal bağ yapısı, [B-(1-4)-2 amino-2-deoksi-D-glukoz].	10
Şekil 2.4. Kitosanın glutraldehitte çapraz bağlanma reaksiyonu.....	12
Şekil 2.5. Mikroküre hazırlama yöntemleri.....	15
Şekil 2.6. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikrokürelerin hazırlanma işlemi	16
Şekil 2.7. Kimyasal çapraz bağlama yöntemi.....	18
Şekil 2.8. Hidrojelin polimerik ağ yapısı.....	19
Şekil 2.9. Kriyojelin polimerik ağ yapısı.....	20
Şekil 2.10. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime	21
Şekil 2.11. PVA ve PLGA mikroküreleri	25
Şekil 3.1. Mikroküre formunda kriyojelllerin hazırlanma basamaklar	31
Şekil 4.1. Konsantrasyona karşı, spesifik viskozite/konsantrasyon grafiği.	37
Şekil 4.2. (A) Küre formunda hidrojel , (B) Küre formunda kriyojel	40
Şekil 4.3. Değişik formülasyonlarda hazırlanan bileşenler ile yağ fazının belirlenmesi: A) 50 mL petrol eteri, B) 37.5 mL petrol eteri-12.5 mL ayçiçeği yağı, C) 37.5 mL petrol eteri-10 mL ayçiçeği yağı-2.5 mL Span 80.	42
Şekil 4.6. Saf kitosanın FT-IR Spektrumu	46
Şekil 4.7. Saf ayçiçeği yağı ve saf Span 80'in FT-IR Spektrumları	47
Şekil 4.8. %0.5, %1 ve %2 (w/v) kitosan konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FTIR spektrumları (Glutraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, karıştırma hızı: 1000 rpm).....	48
Şekil 4.9. %1, %3 ve %6 (v/v) glutraldehit konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FTIR spektrumları (Kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, karıştırma hızı: 1000 rpm).....	49
Şekil 4.10. -10 ve -24°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FTIR spektrumları (Kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), glutraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), karıştırma hızı: 1000 rpm).....	50
Şekil 4.11. Kitosan konsantrasyonunun değişimi ile gözenek yapısının değişimini gösteren SEM fotoğrafları. A: %0.5 Kitosan, x500; B: %1 Kitosan, x500; C: %2 Kitosan, x500; D: %0.5 Kitosan, x5000; E: %1 Kitosan, x5000 ve F: %0.5 Kitosan, x5000 (Glutraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, karıştırma hızı: 1000 rpm).....	52
Şekil 4.12. Kitosan çözeltileri viskozitesi ile ortalama mikroküre çapı arasındaki değişim	54
Şekil 4.13. Glutraldehit konsantrasyonunun değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: %1 Glutraldehit, x500; B: %3 Glutraldehit, x500; C: %6 Glutraldehit, x500; D: %1 Glutraldehit, x5000; E: %3 Glutraldehit, x5000ve F: %6 Glutraldehit, x5000 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), karıştırma hızı: 1000 rpm, kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C).....	55

- Şekil 4.14. Kriyojelasyon sıcaklığı değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: -10°C, x5000; B: -10 °C, x10000; C: -16°C, x5000; D: -16°C, x10000; E: -24°C, x5000; F: -24°C, x10000 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), glutraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), karıştırma hızı: 1000 rpm)..... 57
- Şekil 4.15. Karıştırma hızı değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: 500 rpm, x100; B: 1000 rpm, x100; C: 1500 rpm, x100 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), glutraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C) 58
- Şekil 4.16. Ninhidrinin -NH₂ grubu ile verdiği mavi-mor kompleks. A: Saf ninhidrin çözeltisi, B: Çapraz bağlanmış mikrokürelerin ninhidrin ile verdiği kompleks (açık mavi), C: Çapraz bağlanmamış kitosanın ninhidrin ile verdiği kompleks (mavi- mor). 63
- Şekil 4.17. Ninhidrinin -NH₂ grubu ile verdiği reaksiyon 63
- Şekil 4.18. Kriyojelasyon sıcaklığı -10°C olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v, Glutraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Karıştırma hızı: 1000 rpm) 65
- Şekil 4.19. Kitosan konsantrasyonu %1 (w/v) olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, Glutraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Karıştırma hızı: 1000 rpm) 66
- Şekil 4.20. Karıştırma hızı 500 rpm olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, Glutraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v) 67
- Şekil 4.21. Mikroküre enjeksiyonu A, B, C: %2 (w/v) Kitosan konsantrasyonu; D, E, F: %1 (w/v) Kitosan konsantrasyonu (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, Glutraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v) 68
- Şekil 4.22. Mikroküre formunda enjekte edilebilir kitosan kriyojel doku iskeleleri..... 68

SİMGELER ve KISALTMALAR

- (NHN amin)_{ilk}**: Çapraz bağlanmamış mikrokürelerde serbest NH₂ miktarı (mol)
(NHN amin)_{son}: Çapraz bağlanmış mikrokürelerde kalan serbest NH₂ miktarı (mol)
[η]: İntrinsic viskozite
μ_{rel}: Bağıl viskozite
C: Konsantrasyon (mol/litre)
ECM: Extracellular matris
FT-IR: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometre
GAG: Glikozaminoglikan
K ve α: Polimer ve solvante bağlı olan sabitler
m_d: Kuru ağırlık (gram)
MHS: Mark - Houwink - Sakurada
M_v: Ortalama molekül ağırlığı (gram/mol)
m_w: Islak ağırlık (gram)
NHN: Ninhidrin
PEC: Poli elektrolit
PGA: Poli(glikolik asit)
PLA: Poli(laktik asit)
PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA: Poli(vinil alkol)
S/Y: Suda yağ
SEM: Taramalı elektron mikroskobu
Span 80: Sorbitan monooleate
t: Akış süresi (saniye)
UV: Ultraviolet
v: Hacim (mililitre)
w: Ağırlık (gram)
Y/S/Y: Yağda suda yağ
Y/S: Yağda su
μ_{sp}: Spesifik viskozite

1. GİRİŞ

Günümüzde her gün her yaştan yüzlerce insan kaza veya çeşitli felaketler sonucunda organ ya da doku kaybı nedeniyle tedavi olmaktadır. Doku mühendisliği tüm bu tedavilere yönelik olarak iyileştirme ve hayat kalitesini yükseltmek amacıyla doku ve organ fonksiyonlarını arttırmak ve yeniden sağlamak konusunda devrim yaratmayı amaçlayan bir bilim dalıdır. Tedavi amaçlı uygulanabilirliğinin yanı sıra geliştirilen organ ya da dokunun teşhis amaçlı kullanım sahası da bulunmaktadır.

Doku mühendisliği yaklaşımı mühendislik, tıp ve biyoloji prensiplerini kullanarak hücrelerin, doku iskelelerinin ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanımıyla doku onarımını ya da yenilenmesini sağlamaktır. Doku iskelesi, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde gerekli desteği sağlayan biyomateryallerdir.

Hastanın tedavisi yanında yaşam kalitesini artırmak, kullanılan ilaç dozunu azaltmak, dozlama aralığını uzatmak, hastayı yan ve zararlı etkilerden arındırmak ve ilacı hedef bölgeye göndermekle mümkündür. Bu doğrultuda en iyi yanıt veren taşıyıcı sistem, vücudun istenilen doku, hücre ya da organına gönderilebilme olanağı sağlayan ve enjekte edilebilen kontrollü salım sistemleridir.

Son yıllarda biyomedikal uygulamalarda amacına yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda, doku iskelelerinin ve taşıyıcı sistemlerin üretim teknikleri konusunda yoğun araştırmalar yapılmakta ve hazırlanan bu biyomateryallerin hasarlı ya da hasta bölgeye yerleştirilmesi (implantasyonu) sürecinin en az cerrahi operasyonla sağlanabilirliği amaçlanmaktadır. Bu hedef doğrultusunda atılan en büyük adım şüphesiz ki enjekte edilebilen doku iskelelerinin ve kontrollü ilaç salım sistemlerinin üretimi ve geliştirilmesidir.

Enjekte edilebilen doku iskeleleri ve kontrollü ilaç salım sistemleri birbiri ile bağlantılı, kontrol edilebilir gözenek yapısı ile yüksek gözeneklilik oranına sahip olmalıdır. İdeal bir doku iskelesinin yüzey özellikleri hücre yapışması ve çoğalması için elverişli olmalı, biyobozunur, biyouyumlu, mekanik özellikler açısından konak dokuya benzer olmalıdır. Aynı şekilde ilaç salım sistemleri için de, ilaç salım hızı, ilaç yükleme kapasitesi kontrol edilebilmelidir. Bu özelliklerin sağlanması, seçilen materyalin üretim yöntemine ve kullanılan malzemeye bağlıdır.

Doku iskeleleri doğal materyaller (kollajen, kitosan, jelatin) veya sentetik polimerlerden (poliglikolid, polilaktit, polilaktat glikolat) üretilebilirler. Doğal materyaller doğal hücresel çevreyi yakın olarak taklit edebilirler, sentetik polimerlerin ise materyal özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve doku iskelelerinde hem taşıyıcı olarak hem de sistemde salım hızını kontrol etmek üzere en yaygın olarak kullanılan materyallerden biri doğal polimerlerdir. Doğal polimerlerin en büyük avantajı, biyolojik olarak uyumlu olmaları, toksik etki göstermemeleri, biyolojik olarak parçalanma özelliğinin iyi olması ve etken maddenin salımı bittikten sonra vücuttan uzaklaştırılmasının gerekmemesidir. İdeal bir doku iskelesinin tüm özelliklerini taşıyan mükemmel doku iskelesi halen üretilmemiştir. Bunun için yeni malzemelerin ve üretim şekillerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Taşımış olduğu biyoyumluluk, biyobozunurluk, toksik olmama, hücre tutunması ve çoğalmasına olanak sağlama, antimikrobiyal etkinlik ve yaraların hızlı iyileşmesine katkı sağlama gibi özelliklerinden dolayı biyomedikal ile ilgili uygulamalarda sıklıkla tercih edilen ve doğal bir polimer olan kitosan, tercih edilmiştir.

Bu tez kapsamında, küre formunda kitosan kriyojel doku iskeleleri üretim tekniği incelenerek, üretim sürecini etkileyen faktörler ve enjekte edilebilen mikroküre formundaki doku iskelelerinin diğer doku iskelesi üretim tekniklerine göre avantajları üzerinde durulmuştur. Bu amaca yönelik olarak kriyojelasyon yöntemi ile çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda, karıştırma hızlarında ve kriyojelasyon sıcaklıklarında kitosan kriyojel doku iskeleleri hazırlanmıştır.

Kriyojeller monomerik veya polimerik başlatıcıların donmuş çözeltilerinde üretilen jel yapılarıdır. Kriyojeller tipik olarak birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden oluşan açık hücre yapısına sahiptir. Bu yapıları sayesinde farklı boyda çözünmüş maddenin difüzyonuna, nano veya mikro partiküllerin kütle transferine ve hatta mikroorganizma ve hücrelerin kütle transfer ve difüzyon mekanizmalarına destek olacak niteliktedir. Bu nedenle bu çalışmada kriyojel oluşma kavramından yararlanılarak, yüzeyleri pürüzsüz ancak gözeneksiz mikrokürelerin aksine, hücre ya da ilaç difüzyonunu kolaylaştıracak, birbirleriyle bağlantılı gözenekli kitosan mikrokürelerin üretimi amaçlanmıştır.

Küre formunda üretilen kitosan kriyojel mikroküre doku iskelelerinin karakterizasyonu; şişme testi, yüzey yükleri, çapraz bağlanma dereceleri, in vitro

degradasyon çalışması, kriyojellerin kimyasal yapısının tayini için FT-IR analizi, kriyojellerin morfolojisinin, gözenek boyutu ve ortalama küre çapının belirlenebilmesi için SEM ile analizleri yapılmıştır. Yapılan alışmalar incelenerek küre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin biyomedikal uygulamalarında kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır.

Çalışmadan elde edilen tüm bulguların ışığında mikroküre formunda kitosan kriyojel mikrokürelerin enjekte edilebilir, gözenekli, kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve doku hasarlarında kullanımı açısından uygun olduğu söylenebilir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

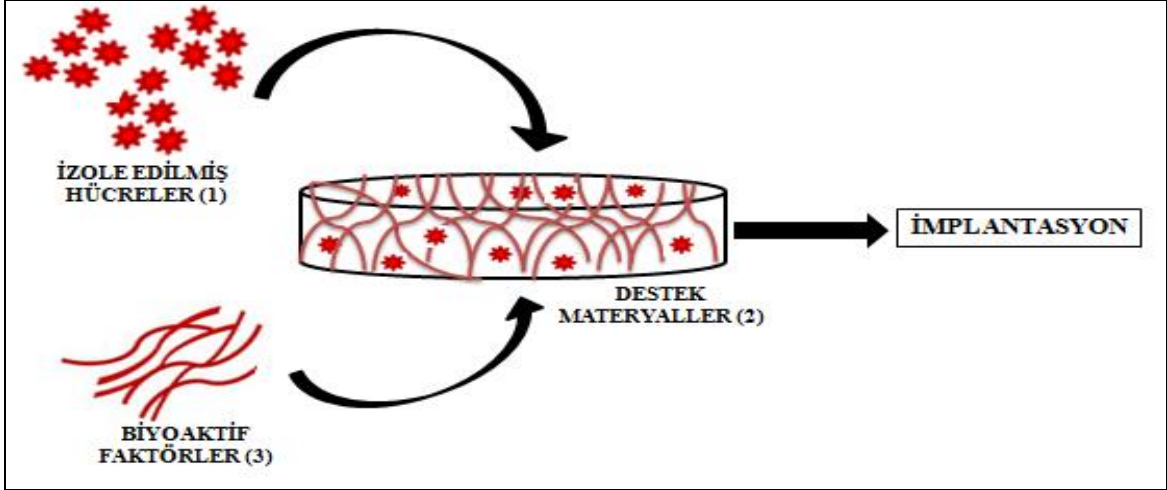
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği; çalışmayan, zedelenmiş - zarar görmüş veya doğuştan anormalliğe sahip organ veya dokuların fonksiyonlarının desteklenmesi, geliştirilmesi veya yeniden yapılanması için hücreler, doku ve organlarla ilişkili tıp, mühendislik ve biyoloji bilimlerinin bir arada yürütüldüğü disiplinler arası bir çalışmadır.

Hemen hemen tüm bilim dallarının “mühendislik” ekini alarak teknolojik boyut kazandıkları günümüzde, “doku mühendisliği” bu grubun ilk örneklerinden birini oluşturmaktadır (Deliloğlu ve ark., 2009). İlk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden Dr. Y. C. Fung tarafından NSF’nin (National Science Foundation) bir toplantısında dile getirilen doku mühendisliği terimi hücre biyoloji, protein kimyası ve mühendislik dallarının oluşturduğu disiplinler arası bir teknolojiyi tanımlamaktadır. Hemen ardından Nerem tarafından 1991’de “hücre mühendisliği” konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993’te Science dergisinde “doku mühendisliği” başlığı altında yayınlanan iki makale bilimsel çevrelerin dikkatini çekmiştir (Vacanti ve Langer, 1999, Lee ve ark., 1993).

Son yıllarda mühendislik ve yaşam bilimlerinde kullanılan yöntemleri bir araya getirerek uygulayan, doku yenilenmesi için yapay sistemlerin oluşturularak yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi umuduyla çok sayıda bilim adamının çalışmalarıyla hızla gelişmekte olan bu alan bugün doku mühendisliği olarak adlandırılmaktadır (Lee ve Money, 2001).

Doku mühendisliği, spesifik hücrelerin biyopsi yoluyla hastadan alınarak, kontrollü kültür ortamlarında, biyomimetik özellik gösteren iskelet yapılar (scaffold) üzerinde üretilmesi ve elde edilen bu yapının hastadaki hasarlı bölgeye yerleştirilerek yeni doku oluşumunun gerçekleştirilmesi fikrine dayanmaktadır. Bu amaçla doku mühendisliği yaklaşımı Şekil 2.1’de görüldüğü gibi üç ana bileşeni içerir: (1) hasarlı veya yok olmuş dokuyu oluşturan izole edilmiş hücreler; (2) taşıyıcı görevi yapan ve hücrelere destek olan materyaller; (3) hücre üremesi ve farklılaşması için uyumlu sitokinler ve diğeri biyoaktif faktörler (Deliloğlu ve ark., 2009, Ringe ve ark., 2001).



Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımında üç ana bileşen (Sarang ve ark., 2014)

Günümüzde birçok farklı alanda geleneksel tedavi yöntemlerine alternatifler sunan doku mühendisliği çalışmaları yürütülmektedir. Tıp, biyoloji ve malzeme teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde, doku mühendisliği klinik ihtiyacının, artan yaşlı nüfusu ile büyümesi ve bugünkü önemini koruyacağı düşünülmektedir.

2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLEŞENLERİ

2.2.1. Hücre

Doku mühendisliği uygulamalarının temelini oluşturan birimlerden biri olan hücre uygun dokudan izole edilerek, özellikleri belirlendikten sonra yeterli sayı ve kalitede laboratuvar koşullarında çoğaltılır.

Hücreler, proliferasyon, farklılaşma, hücre - hücre etkileşimi, biyomoleküler üretim ve hücreler arası matris oluşturma karakteristiklerine bağlı olarak doku rejenerasyonu ve iyileşmesinde kritik bir rol oynarlar. Doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerin kaynakları otojenik, allojenik veya zenojenik olabilir.

Otojenik hücreler, hastanın kendi sağlıklı dokularından elde edilir. Biyo uyumsuzluk problemi yoktur, ancak anında kullanım için yeterli miktarda bulunmayabilir. Hastanın sağlıklı bölgesinden alınan kendi hücrelerinin (otolog hücre) vücut dışında hazırlanan hücre kültürlerinde çoğaltılarak yine hastanın kendisine nakledilmesi doku mühendisliğinde "Altın Standart" olarak tanımlanır (Chantal ve ark., 2000).

Allojenik hücreler, başka bir insandan alınan hücrelerdir. Bu hücelere karşı biyouyumluluk problemi ve bağışıklık sisteminin reddi olabilir.

Zenojenik hücreler, başka bir türden alınan hücrelerdir. Bu hücelere karşı immün red olabilir. Bu hücreler yeterli miktarda elde edilebilir ancak beraberinde etik problemler getirirler.

Doku mühendisliği için ideal donör hücrelerde aranan özellikler şu şekilde sıralanabilir: kaynağına kolay ulaşılabilmesi, hücrelerin popülasyonları, fenotipleri ve fonksiyonları değişmeden artırılabilmesi, bir çok organa veya dokuya spesifik hücelere farklılaşacak veya trans farklılaşacak multipotent yapıya sahip olmalı ve en az immünolojik cevaba neden olmalıdır (Bölgen, 2008).

2.2.2. Doku İskelesi (Scaffold)

İnsan vücudu sistemlerden, sistemler organlardan, organlar dokulardan, dokular ise hücreler ve hücre dışı matristen (extra cellular matrix, ECM) oluşmaktadır. Hücre dışı matris, hücelere fiziksel bir destek sağlayan, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerini kontrol ederek hücrelerin tutunması, çoğalması, farklılaşması, biyolojik aktivitelerinin sağlanması ve matris oluşumu için biyokimyasal ve biyofiziksel uyarıları yapmaktadır (Bayramoğlu, 2009).

Doku iskeleleri ise ECM'yi taklit edecek biçimde tasarlanan, doğal materyaller (kollajen, kitin, kitosan, aljinat, hyoluronik asit, hidroksi apatit) veya sentetik polimerlerden (poliglikolid, polilaktit, polilaktat glikolat) ya da bu materyallerin bileşimi ile oluşan kompozit malzemelerden üretilen yapılardır. Doku iskeleleri, yapay bir "hücre dışı matris" olarak adlandırılabilirler (Deliloğlu ve ark., 2009).

İnsan vücudu gibi karışık ve hassas bir sistemde, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler oldukça çeşitlidir. Bir doku iskelesinin sahip olması gereken karakteristik özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Rezwan ve ark., 2006):

✓ Biyouyumluluk: Doku iskelelerinin hücre infiltrasyonunu ve vaskülarizasyonunu sağlaması, böylece ev sahibi doku ile bir bütünlük oluşturabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Doku iskelelerinin hidrofilik özellikleri ve yüzey yük

yoğunlukları da özellikle hücre yapışmasını ve yayılmasını etkileyen özelliklerdir (Burg ve ark., 2000).

✓ **Biyobozunurluk:** Hidrolitik veya enzimatik olarak vücut içerisinde bozunmalı, bozunma ürünleri ve biyodegradasyon hızı kontrol edilebilmeli ve bozunma ürünleri toksik etki göstermemelidir. Bozunma aşamalı olarak gerçekleşmeli yani bozunma hızı ile yeni doku oluşum hızı birbirine yakın olmalıdır.

✓ **Morfoloji:** Hasarlı dokunun anatomik şeklini ve hacmini sağlama, metabolik atıkların ve besin maddelerinin kolay difüzyonu, bütün tutunma alanı sağlanması açısından gözenekli olmalıdır. Doku iskelelerinin sahip olması gereken bir diğer özellik ise; birbiri ile bağlantılı, kontrol edilebilir gözenekli yapı sergilemeleridir. Gözeneklilik, hücrelerin doku iskelesinin iç bölgelerine yapışıp, yayılması ve üremesi, besinlerin aktarımı ve atıkların uzaklaştırılması ayrıca vaskülarizasyonun gerçekleşmesi için çok önemlidir. Gözenek boyutları ve şekilleri, gözeneklerin birbiri ile bağlantılı olması, geçirgenlikleri, iskelenin implante edileceği bölgeye uygun formda olmalıdır (Doğan ve ark., 2009).

✓ **Mekanik özellikler:** Doku oluşumunun tamamlanması süresince sağlam dokular arasında yük transferini sağlayacak mekanik özelliğe sahip olmalıdır. Özellikle kemik gibi yük taşıyan dokuların tedavisinde kullanılan doku iskelelerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de mekanik dayanımdır (Deliloğlu ve ark., 2009, Choong ve ark., 2004). Literatürde kortikal ve kanselöz kemik için sıkıştırma dayanım aralığı, sırasıyla, 100 - 230 MPa ve 2 - 12 MPa olarak verilmiştir (Lee ve Shin, 2007). Bu dayanım değerleri oldukça yüksektir ve ancak yoğun, gözeneklilik değerleri küçük olan doku iskelelerinin üretimi ile bu mekanik özellikler sağlanabilmektedir.

✓ **İşlenebilirlik:** Kolay, ucuz, tekrarlanabilir üretim özelliğine sahip olması, sterillenebilir olması, istenilen geometride üretilebilmesi büyük önem taşımaktadır. Özellikle klinik uygulamalara yönelik doku iskelesinin uzun raf ömrüne sahip olması ve uygulama kolaylığı sağlanması gerekmektedir.

2.2.2.1. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Biyomalzemeler; insan vücudundaki hasta, hasarlı ya da eksik dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan ve doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen doğal ya da sentetik yöntemlerle elde edilmiş malzemeleri içerir (Taşkın ve Gür, 2004).

Malzeme seçimi, doku mühendisliği ürünlerinin tasarımı ve geliştirilmesi açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Hedef uygulamada kullanılacak malzemede aranacak özelliklerden bazıları malzemenin biyobozunur olması ve implantasyon bölgesinde enfeksiyona sebep olmamasıdır. Malzeme hücre yapışmasını ve işlevini arttırıcı yüzey kimyasına sahip olmalıdır. Ayrıca, hücrelerin üremesi, farklılaşması ve göçünün yanı sıra besinlerin/hücrel atıkların difüzyonu için uygun gözeneklilik yapısına sahip olmalıdır (Gümüşderelioğlu ve ark., 2007). Doku iskelelerinin, dokularla uyumlu bir şekilde kullanılabilmesi için yüzey özelliklerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak doğal dokularla uyumlu olması gerekmektedir (Peter, 2004).

Doku iskelesi üretiminde kullanılan malzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler olarak gruplandırılmaktadır. Metallerin stabilitesi yüksektir ve sterilizasyonu kolaydır, ancak biyolojik ortamda korozyona uğrayabilmektedirler. Seramiklerin ve kompozit malzemelerin ise biyoyumluluğu çok yüksektir, fakat işlenmeleri ve şekillendirilmeleri zordur. Biyomalzemeler içinde en yaygın kullanım alanı olanlar ise, polimerik malzemelerdir.

Polimerler kolay işlenebilme, kullanım alanına yönelik çok değişik formlarda (lif, film, jel) ve kompozisyonlarda hazırlanabilmeleri ve doğal dokulara olan benzerlikleri nedeniyle biyomalzeme olarak doku mühendisliği uygulamalarında en çok kullanılan malzeme çeşididir. Yüzey özellikleri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olarak modifiye edilebilir. Polimerler, doku mühendisliği uygulamalarında etken madde salım sistemlerinde ve doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır (Hasırcı ve ark., 2001). Polimerler, kaynakları ve elde edilmiş biçimlerine göre canlı varlıklardan elde edilen doğal polimerler ve kontrol edilebilir şartlarda üretilen sentetik polimerler olarak iki gruba ayrılırlar. Sentetik polimerler, işlenebilirlik ve esneklik açısından, doğal polimerlerden oldukça üstün olsa da fizyolojik ortamdaki biyoyumlulukları doğal polimerlere göre daha azdır (Plieva ve ark., 2008). Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan bazı doğal veya sentetik polimerler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Doku iskelelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan doğal veya sentetik polimerler

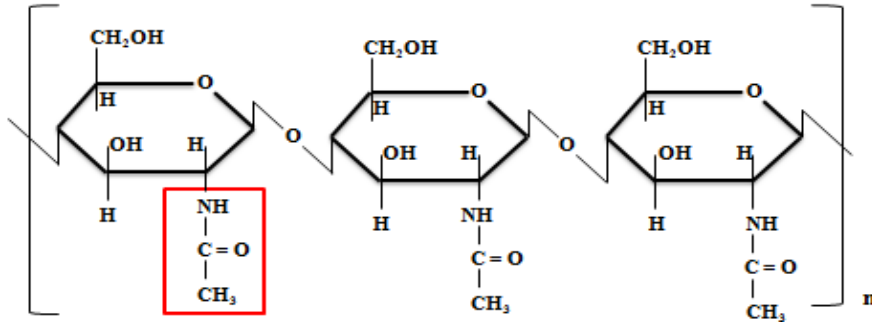
Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kitosan	Polivinilalkol, PVA
Aljinat	Polistiren
Jelatin	Poliakrilamid
Nişasta	Poliyeten
Kollajen	Poliüretan
Dekstran	Poliester
İpek	Poliakrilik asit

Doku mühendisliğinin temel hedefi, doğayı taklit ederek ona uygun malzemeler üretmektir. Bunun için en önemli kaynak, doğanın kendisinden elde edilen doğal polimerlerdir. Doğal polimerler vücuttaki hücre dışı matris (ECM) olan benzerlikleri, yüksek biyouyumlulukları, antijenik olmamaları, metabolize edilebilmeleri, biyolojik olarak parçalanabilme özelliklerinin daha iyi olması nedeniyle doku iskelesi üretiminde sentetik polimerlere göre avantajlara sahiptirler. En çok kullanılan doğal polimerler arasında aljinat (Zhensheng ve ark., 2005), jelatin (Neeraj ve ark., 2009), ipek (Coreia ve ark., 2012) ve kitosan (Zhensheng ve ark., 2005) verilebilir.

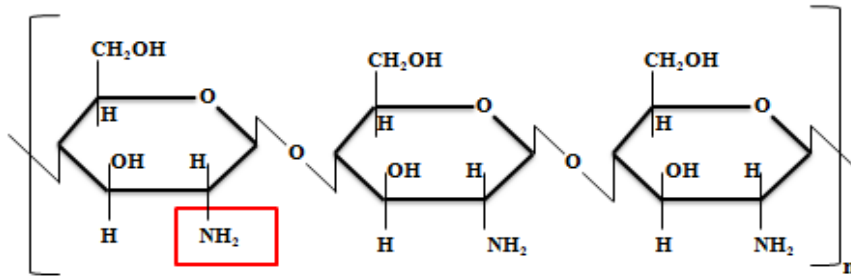
Bu tez çalışmasında doku iskelesi üretiminde biyomalzeme olarak doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır.

2.3. KİTOSAN

Kitosan, yengeç, karides, ıstakoz gibi deniz hayvanlarının ve böceklerin kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en fazla polisakkarit içeren Şekil 2.2'de kimyasal yapısı verilen kitinin yüksek sıcaklıkta NaOH gibi güçlü bir alkali sulu çözelti kullanılarak deasetilasyonu ile elde edilen ve (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan katyonik ve doğrusal yapıda bir biyopoliaminosakkarittir.



Şekil 2.2. Kitinin kimyasal bağ yapısı, [(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-B-D-glukoz]



Şekil 2.3. Kitosanın kimyasal bağ yapısı, [B-(1-4)-2 amino-2-deoksi-D-glukoz]

Kitosan kimyasal bağ yapısında taşıdığı serbest amin grupları ve hidroksil grupları sayesinde sentetik polimerlerden farklı olarak bir çok organik reaksiyon ile kolayca modifiye edilebilir (Şekil 2.3). Kitosan, kolaylıkla fiberlere, filmlere, kaplamalara, toz ve çözeltilere ek olarak kürelere dönüştürülebilir. Kitinin yarı kristal yapısında yüksek oranda bulunan hidrojen bağları nedeniyle çözünürlüğü oldukça düşüktür, bu nedenle birçok çözücüde çözünmemektedir. Yapısındaki amin gruplarından dolayı sulu zayıf asidik ortamda çözünür özelliğe sahiptir. Ayrıca serbest amin grupları, kitosana katyonik bir polielektrolit olma özelliği de kazandırmaktadır (Lalehbolaghi, 2013).

Kitosan yapısında bulunan glikozamin ve N-asetilglikozamin sayesinde hücre dışı matrisin de temel bileşeni olan glikozaminoglikanların (GAG) yapısına benzerlik gösterir. Kitosanın sahip olduğu bu içerik hücre yapışmasını ve çoğalmasını destekleyerek doku iyileşmesini olumlu yönde etkiler (Dağlı Durukan, 2012).

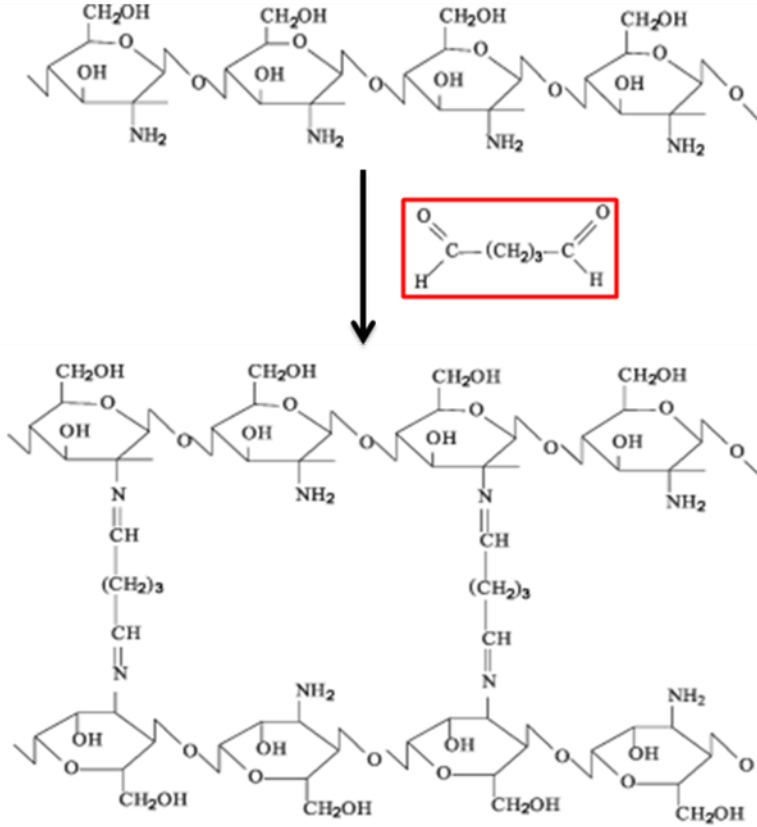
Kitosan, antijenik yapıda olmaması, biyobozunur olması ve canlı vücudu tarafından tamamıyla emilen zararsız ürünler (amino şekerler) halinde parçalanması, toksik olmaması, yüksek biyouyumluluğu, adsorpsiyon özellikleri ve çeşitli tekniklerle proses edilebilmesi sebebiyle biyomedikal uygulamalarda gözenekli doku iskelesi ve farmasötik

teknolojide ilaç salım sistemleri üretiminde uygun bir malzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Nicol, 1991). Bu uygulamalarda kitosan, mikroküre (Sinha ve ark., 2004), hidrojel (Narayan ve ark., 2010), film (Antonio ve ark., 2010) ve lif (Schiffman ve Schauer, 2007) gibi birçok formda hazırlanmaktadır.

2.4. GLUTERALDEHİT

Doku iskelesi üretiminde kullanılacak kitosanın mekanik özellikleri çok iyi değildir. Malzemenin bu özelliği, iki veya daha fazla molekülünün kovalent bağ ile kimyasal yolla çapraz bağlanması işlemi yapılarak geliştirilmektedir. Çapraz bağlanma sonucunda bağımsız polimer molekülleri birleşerek stabil, mekanik dayanımı yüksek yapılar oluştururlar. Doku iskelelerinin degradasyonu, gözenekliliği ve mekanik özellikleri çapraz bağlanmayla kontrol edilebilir.

Gluteraldehit kitosanın amino grupları arasında köprü kurarak kovalent bağlarla çapraz bağlanmasını sağlayan biyofonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ajanıdır. Şekil 2.4'de kitosanın amino grupları ile gluteraldehitin aldehit grupları arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu gösterilmektedir. Gluteraldehit reaktif olmayan fonksiyonel gruplar içerdiğinden ve çapraz bağlanmış biyomalzemenin enzimatik bozunması sırasında bu grupların serbest kalmasından dolayı toksik etki göstermeleri sebebiyle çapraz bağlanma sonucu oluşan malzemelerin bu moleküllerden arınması için çok iyi yıkanması gerekmektedir (Frank, 1993).



Şekil 2.4. Kitosanın glutaraldehit ile çapraz bağlanma reaksiyonu

2.5. MİKROKÜRELER

Mikroküreler sıvı ortamlarda serbestçe dolaşabilen birkaç μm 'den mm büyüklüklerine kadar değişen çap dağılımına sahip katı, küresel partiküller şeklindeki hücre veya ilaç yüklenebilen polimerik mikrotasıyıcı sistemlerdir. Bu partiküller kontrollü ilaç salımı ve doku mühendisliği uygulamaları için sentetik veya doğal polimerlerden hazırlanırlar. Bu polimerler arasında en önemlileri Poli(laktik asit) (PLA), Poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA), Poli(glikolik asit) (PGA), Polivinil alkol (PVA)'dür (Subrata ve ark., 2013). Bu polimerlerin dışında kollajen, jelatin gibi doğal poliamitler ve pektin, dekstran, kitosan gibi doğal polisakkaritlerde mikrotasıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Gürsoy, 2002).

Mikroküre üretiminde kullanılan polimerlerde aranan biyolojik, fiziksel ve mekanik özellikler şu şekilde özetlenebilir;

- ✓ Polimerin toksik olmaması

- ✓ Biyolojik çevreyle uyumu
- ✓ Kanserojen etki göstermemesi
- ✓ Temas ettiği dokulara zarar vermemesi
- ✓ Hücre içindeki ve hücre dışındaki ortam koşullarına dayanıklı olması
- ✓ Malzemenin şişme ve elastik özellikleri olması
- ✓ Büyüklük, geometri ve şekil özellikleri bakımından enjektör ucundan geçmeye uygun olması
- ✓ Kolay hazırlanabilmesi, raf ömrünün uzun olması
- ✓ Vücut sıvılarına karşı dayanıklı olması
- ✓ Hedef dokuya yada organa en kısa sürede ulaşabilmesi
- ✓ Kontrollü salım sistemleri için yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olması ve salım hızının kontrol edilebilmesi
- ✓ Çapraz bağlayıcılar ve toksik safsızlıklar gibi hazırlanmalarında kullanılan kimyasallardan tamamen uzaklaştırılabilmesi
- ✓ Birbirine yapışmadan bağımsız hazırlanabilmesi (Küçükbalcı, 2011).

Mikrokürelerin etki yerine hedeflendirilmesi pasif ve aktif hedeflenme olmak üzere iki farklı yolla sağlanabilmektedir. Pasif hedeflenme, mikrokürenin enjeksiyondan sonra vücuttaki doğal dağılımı ile oluşurken, aktif hedeflenme mikroküre yüzeyine bağlanan, spesifik tanıma özelliğine sahip biyomoleküller ile vücudun istenilen bölgesine hatta spesifik hücrelere yapılan hedeflemedir (Esirgen, 2007).

Mikrokürelerin eczacılık, kozmetik, biyoteknoloji, gıda ve sağlık sektörlerinde uygulama alanları oldukça geniştir. Bununla birlikte ilaç veya çeşitli biyomoleküllerin taşınımında kullanılan mikroküreler, kontrollü salım yapımları nedeniyle birçok tedavi edici uygulamada da umut vaat edici olmuştur (Esirgen, 2007). Son zamanlarda mikroküreler gelişen teknolojiyle birlikte doku mühendisliği uygulamalarında sahip oldukları cerrahi uygulama gerektirmeyen enjekte edilebilir özellik sayesinde de araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Fanga ve ark., 2014).

Enjekte edilebilir küre formundaki doku iskeleleri olarak adlandırılan bu sistemlerin sahip olduğu avantajlar;

- ✓ Cerrahi operasyon süresinin daha kısa olması,
- ✓ Cerrahi operasyon sırasında kas dokusuna verilen zararın en az olması

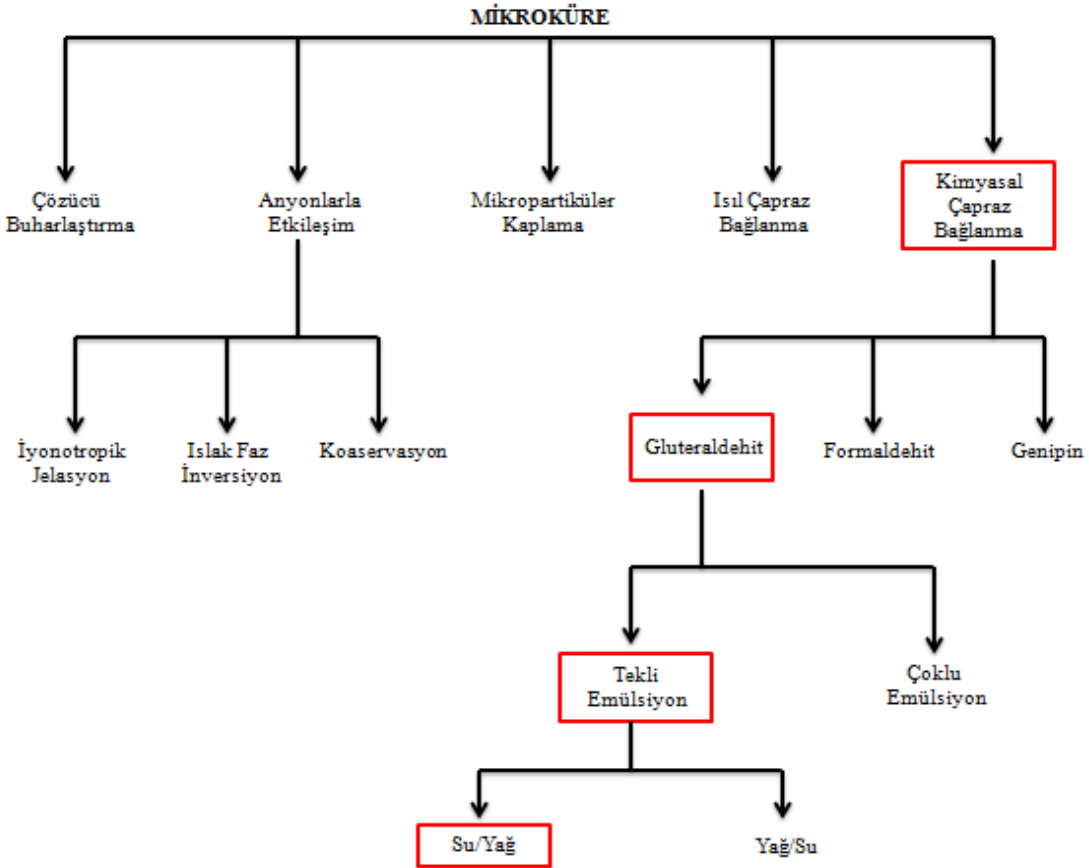
- ✓ Ameliyat sonrası ağrının daha az olması, yara boyutunun küçük olması
- ✓ Daha hızlı bir iyileşme sürecinin olması
- ✓ Minimum maliyetle gerçekleştiriliyor olması
- ✓ Hücre taşıyıcılığının yanı sıra hedef organ ya da dokuya kontrollü ilaç salımının da gerçekleştirilebilmesi
- ✓ Düzensiz şekil veya boyuttaki defektleri doldurabilmesi şeklinde sıralanabilir.

Yapılan araştırmalar sonucu mikroküresel sistemlerin kanser kemoterapisi, insülin ve diğer peptid/protein salım sistemleri, hormon salımı, bağışıklık kazandırma ve enfeksiyonların tedavisi (antiviral ajanlar, antibiyotikler, antifungal ajanlar, antiparazitler kullanılarak) alanlarında da uygulama çalışmalarının olduğu bilinmektedir (Gönül, 2004).

Kullanım amacına göre; geometrik şekilleri, boyut ve boy dağılımı, yoğunluğu, yüzey veya yığın yapısı, gözenekliliği, verimi, biyouyumluluğu, toksisitesi ve sterilizasyonu uygulama alanı seçiminde önemli ölçütlerdir (Küçükbalcı, 2011). Bunların yanı sıra şişme ve elastik özellikleri, çekme sıkıştırma ve kayma gerilimine karşı direnci, yırtılma özelliği gibi birtakım özelliklerinin bilinmesi, polimerin vücuttaki davranışını takip etmek açısından incelenen özelliklerindedir.

2.5.1. Mikroküre Üretim Teknikleri

Mikrokürelerin hazırlanmasına yönelik çeşitli çalışmalar incelendiğinde farklı doğal veya sentetik değişik gruplarda polimerlerin kullanılarak hazırlandığı pek çok tekniğin olduğu görülmektedir. Çeşitli kaynaklardan derlenen bu yöntemler Şekil 2.5'de özetlenmiştir.



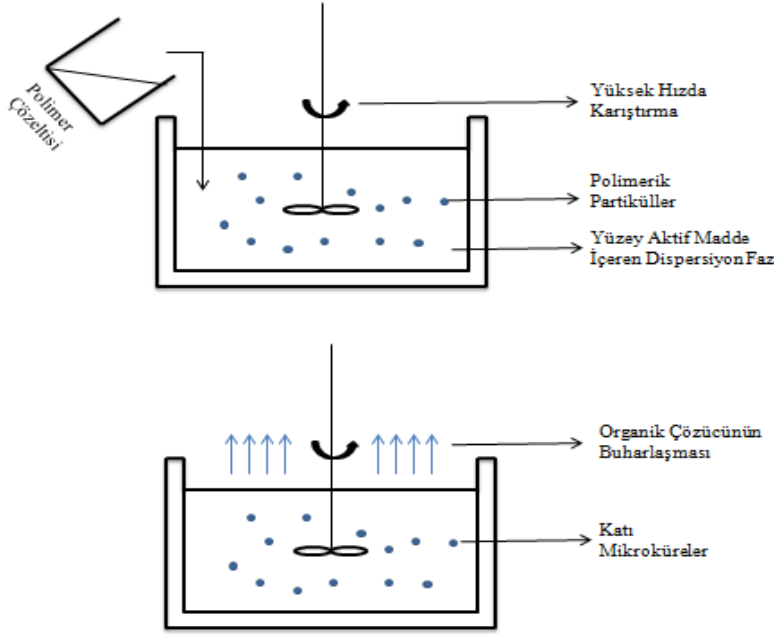
Şekil 2.5. Mikroküre hazırlama yöntemleri

Bunlar arasından kimyasal çapraz bağlanma yöntemi kolay uygulanabilirliği ve üretim verimi yüksekliği ile diğer yöntemlerden ayrılmaktadır (Baykara ve Yüksel, 1991)

2.5.1.1. Çözücü buharlaştırma yöntemi

Mikroküre hazırlanmasında organik çözücülerde çözünebilir polimerlerin kullanılmasıyla uygulanan bu yöntem sırasıyla emülsiyon ve süspansiyon oluşumu şeklinde iki aşamada gerçekleşmektedir. Hazırlanan polimer çözeltisi yüzey aktif madde

içeren ve polimer çözeltisi ile karışmayan sıvı fazda dağıtılır. Böylece emülsiyon oluşur. Karışımdaki organik çözücünün ısı ile uzaklaşması sağlanarak sistem bir süspansiyon şekline dönüşür. Çözücünün buharlaşması ile oluşan katı, küresel partiküller şeklindeki mikroküreler filtrasyonla ayrılır. Şekil 2.6'da bu yöntem şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikrokürelerin hazırlanma işlemi

2.5.1.2. Anyonlarla etkileşim

Bu yöntemin kapsadığı üç alt yöntem bulunmaktadır: iyonotropik jelasyon, ıslak faz inversiyon ve koaservasyon.

İyonotropik jelasyon; aljinik asit, dekstran sülfat, selüloz sülfati amino dekstran gibi poliyonik yapıdaki bir polimerin uygun bir çözücüde çözündürülerek kalsiyum, baryum, magnezyum gibi zıt yüklü bir çapraz bağlayıcı iyon ile reaksiyonu sonunda jelleşmesine dayanır.

Islak faz inversiyon; bu yöntemde, asidik asit içerisindeki kitosan çözeltisi, sıvı bir çapraz bağlayıcı olan sodyum tripolifosfat çözeltisine damlatılmıştır. Oluşan

mikroküreler %5 etilen glikol diglisidil eter ile çapraz bağlanmıştır. Son olarak mikroküreler yıkanmış ve gözenekli kitozan mikroküreleri oluşturmak için dondurularak kurutulmuştur. Koagülasyon ortamının pH'ının değiştirilmesi, kitosan mikrokürelerinin gözenek yapısını değiştirebilmiştir.

Koaservasyon, farklı yükteki iki polimerin birlikte nötralizasyonundan oluşan bir faz ayrımıdır. Sulu çözeltide belirli pH'ta ve belirli sıcaklıkta polimer emülsifiye edilir ve damlacıklar oluşturulur, daha sonra bu çözeltinin üzerine aynı koşullardaki zıt yüklü diğer polimer çözeltisi ilave edilir. İlave edilen polimer damlacıkların etrafını sarar, sıcaklığın değiştirilmesi ve çapraz bağlayıcı ajanın ilavesiyle zıt yüklü polimer, damlacıkların etrafında sertleşir ve mikroküreler oluşur.

2.5.1.3. Mikropartiküler kaplama

Bu yöntem, önceden oluşturulmuş mikropartiküllerin seçilen polimer (kitosan) ile kaplanması esasına dayanır.

2.5.1.4. Isıl çapraz bağlanma

Emülsiyon 80 - 190°C arasında belirli bir süre karıştırılarak ısıtılır. Bu işlemle protein moleküllerinin arasında ve moleküllerin içinde bulunan serbest sülfhidril grupları üzerinden disülfid bağları oluşturarak çapraz bağlanma sağlanır ve ardından sıcaklığın etkisiyle ortamdaki su buharlaşarak katı partiküller şeklindeki mikroküreler elde edilmektedir. Çapraz bağ oluşumu emülsiyonun sıcaklık derecesi ve uygulama süresi ile doğrudan etkilenmektedir (Anthony ve Yapel, 1985).

2.5.1.5. Kimyasal çapraz bağlanma

Bu yöntemde polimerin çözülmesiyle elde edilen su fazı, yağ fazı ile karıştırılarak bir emülsiyon oluşturulur ve oluşan bu emülsiyona gluteraldehit, fomaldehit, genipin gibi çapraz bağlayıcı bir ajanın ilave edilerek stabil mikroküre formunun oluşturulması esasına dayanır. Yöntemin aşamaları Şekil 2.7'de sunulmuştur.

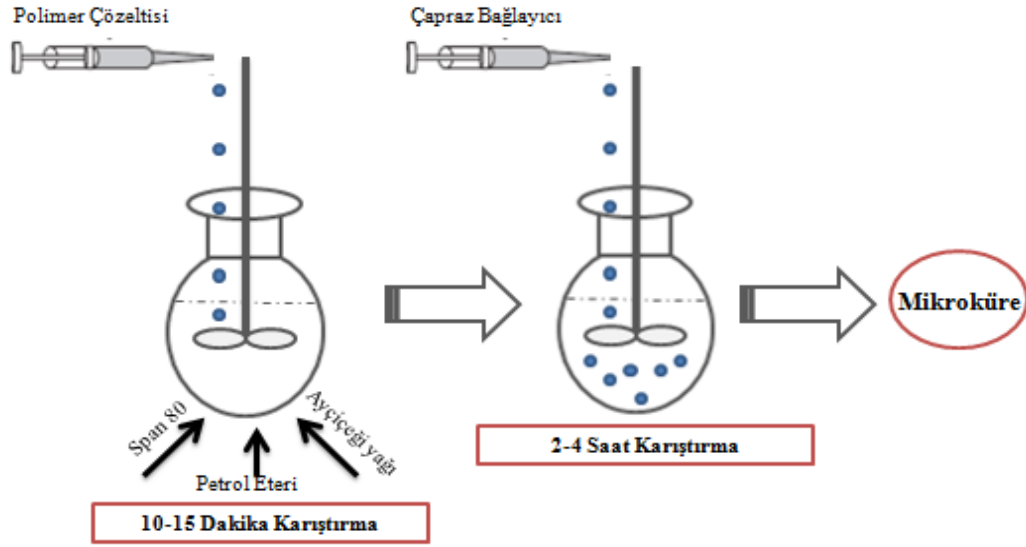
Organik ve sulu fazlardan oluşan bu teknikte, en az iki fazdan oluşan tekli emülsiyon (yağ/su veya su/yağ) veya üç fazdan oluşan çoklu emülsiyon (su/yağ/su veya yağ/su/yağ) şeklinde oluşturulan ortamlarda mikroküre sentezlenmektedir. Tekli

emülsiyonda, yağlı fazın damlacıkları sulu fazda dağılırsa, bu emülsiyon türü suda yağ (Y/S) sulu fazın damlacıkları yağlı fazda dağılırsa yağda su (S/Y) emülsiyon türü hazırlanır (Schmidt ve Lamprecht, 2009). Çoklu emülsiyonda, suda yağ (Y/S) birincil emülsiyon oluşumu ve birincil emülsiyonun yağ/su/yağ (Y/S/Y) emülsiyonu oluşturması için dış yağlı faza eklenmesi ve daha sonra çapraz bağlayıcı eklenmesi ve organik solventin buharlaşmasını içerir (Pavanetto ve ark., 1996). Emülsiyonlar birbiriyle çözünmeyen iki sıvıdan oluşan kolloidlerdir. Yüzey aktif madde varlığında biri diğerinin içerisinde disperse olur (Patravale ve Date, 2009).

Bu yöntemde emülsiyonun dış fazı olan yağ fazının oluşturulmasında zeytin yağı, ayçiçek yağı, pamuk tohumu yağı, hint yağı gibi bitkisel yağların dışında petrol eteri, toluen, kloroform gibi organik çözücüler ve sıvı parafin, balmumu gibi mumlu maddeler kullanılmaktadır (Li ve ark., 2008). Yağ fazı; aseton, kloroform, etil alkol gibi çözücüler kullanılarak uzaklaştırılır.

Mikroküreler hazırlanırken yağ fazı içinde dispersiyonun sağlanabilmesi için yüzey aktifleştirici maddeler (süfaktan) de kullanılmaktadır. Sıvı damlacıklar uygun bir süfaktan kullanılarak stabilize edilmektedir. Suda, sulu bir çözeltide veya susuz bir ortamda çözüldüklerinde sıvı yüzeyini küçülten daha doğrusu yüzey gerilimini azaltan maddelere yüzey aktif madde denir.

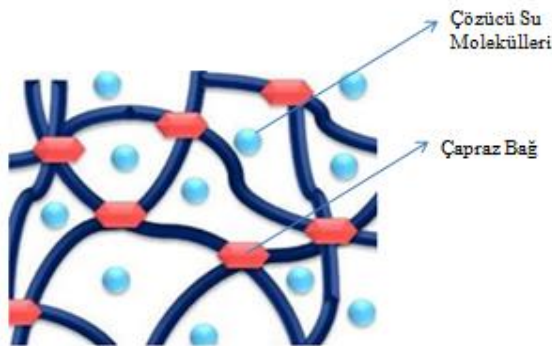
Bu yöntemde, örneğin, çapraz bağlama ajanının aldehit grupları polimerin işlevsel amino grubu ile çapraz bağlanarak damlacıkların sertleşmesi ile mikropartikül oluşumu sağlanır. Kullanılan çapraz bağlayıcı maddenin derişimine ve reaksiyon süresine göre elde edilen mikrokürelerin parçalanma süreleri, dolayısıyla etkin madde salımı süresi değişmektedir.



Şekil 2.7. Kimyasal çapraz bağlama yöntemi

2.6. HİDROJEL

Hidrojel su ile şişebilen, üç boyutlu çok miktarda su ve biyolojik sıvıları absorplayabilen, polimerlerin termal değişim, kimyasal çapraz bağlama ya da fotopolimerizasyon gibi değişik yöntemler kullanılarak kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla oluşan, hidrofilik ağ yapısındaki özel polimerlerdir. Hidrojellerin üç boyutlu ağ yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Hidrojel zincirleri arasındaki çapraz bağlanma; kovalent bağlar, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri veya fiziksel geçişler şeklinde olabilir (Peppas ve Mikos, 1986).



Şekil 2.8. Hidrojinin polimerik ağ yapısı

Hidrojeller, üç boyutlu yapılarını uygun koşullarda koruyan jeller olup çözünebilen bir polimerin su ile karıştırılması ve ortama çapraz bağlayıcı ajanın eklenmesi ile elde edilirler, çevreden gelen uyarılara, özelliklerini veya şeklini değiştirerek cevap verebilmeleri nedeniyle akıllı jeller olarak da nitelendirilebilmektedir (Yong ve Kınam, 2001).

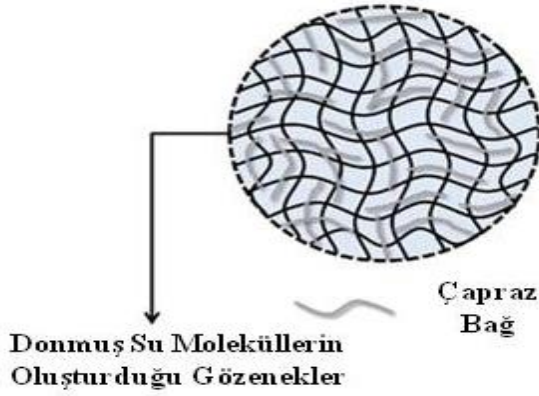
Hidrojeller; fizyolojik koşullarda, istenilen sürede, belirlenen şekillerine hızla ulaşırlar, biyouyumludurlar, biyolojik sistemlerin yapısına benzer olarak yapılarında su bulundurlar, çapraz bağlanmış hidrofilik polimer ağ yapısına sahiptirler, hücreleri barındırabilirler, immobilize edebilmelerinin yanı sıra su, besin ve metabolik atıkların difüzyonuna da olanak tanırırlar.

Hidrojeller, farmakolojide kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılmaktadır. Polimerik jeller gibi şekillendirilebilirler, en büyük avantajları ise enjekte edilebilmeleridir. Hidrojellerin hücrelerin immobilizasyonu için uygun üç boyutlu destek matris sağlayabildikleri kanıtlanmıştır. Ancak hidrojeller küçük gözenek çaplarına ve gözenek yapılarına bağlı olarak henüz üç boyutlu doku büyümesini tam anlamıyla destekleyememektedir. Bir çoğu biyobozunur değildir veya degradasyon hızları doku yenilenme hızı ile uyumlu olmadığından doku oluşumunu desteklemede yetersizdir.

2.7. KRIYOJEL

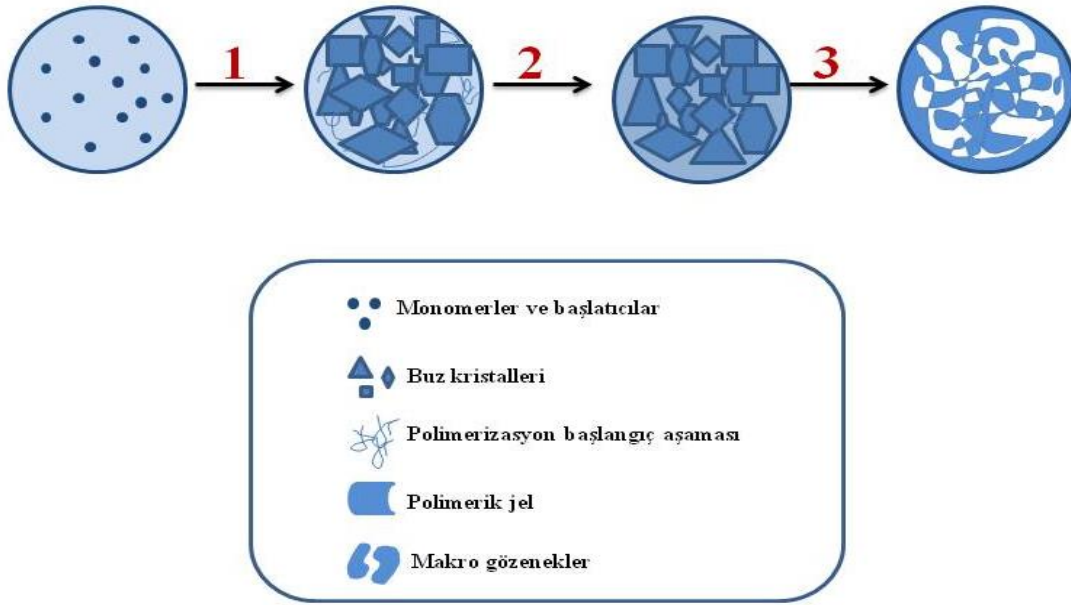
Hidrojellerin bir türü de biyoteknolojide büyük bir öneme sahip olan kriyojellerdir. Kriyojeller (ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda üretilen jeller), monomerik veya polimerik başlatıcıların donmuş çözeltilerinden üretilen, gözeneklilik derecesi kontrol edilebilen jel yapılarıdır (Plieva ve ark, 2008).

Kriyojeller tipik olarak birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden oluşan açık hücre yapısına sahiptirler. Kriyojelin ağ yapısı üzerinde görülen makro gözenekler, kriyojeller içerisinde difüzyonun etkin bir biçimde gerçekleşmesine ve nano ve mikro boyuttaki partiküllerin kütle transferine katkıda bulunur (Bölgen ve ark., 2008). Bu birbiri ile bağlantılı gözenekler Şekil 2.9'da görülmektedir.



Şekil 2.9. Kriyojelin polimerik ağ yapısı

Kriyojellerin oluşumu çözücünün donma noktasının altında gerçekleşir. Böylelikle zamanla çözücünün büyük bir kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafında donmamış sıvıda bulunan monomerler ve başlatıcılar polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapısı oluştururlar. Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev görür. Polimerleşmeden sonra donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve makrogözeneklere sahip polimer ağ yapısı elde edilir (Bereli ve ark., 2008). Kriyojel üretiminin şematik gösterimi Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime

Kriyojellerin süngerimsi yapısı, makrogözeneklere sahip olması, ince film, monolitik kolonlar, disk, boncuk gibi farklı şekillerde üretilme kolaylığı, mekanik kararlılıkları ile de bir araya gelerek bu jelleri biyoteknoloji ve biyomühendislik alanında benzersiz biyomalzemeler haline getirmiştir (Anuj Tripathi ve ark., 2010)

Kriyojelasyon prosesi; donma süresi, donma sıcaklığı, solüsyondaki polimerin başlangıç konsantrasyonu, çözücü cinsi, çözünen veya çözünmeyen katkı maddeleri, çapraz bağlayıcının türü ve konsantrasyonu, örnek boyutları gibi faktörlere bağlıdır (Plieva ve ark., 2005).

2.7.1. Kriyojel Yapısına Etki Eden Faktörler

Dondurma rejimi: Kriyojellerin makro gözenekleri yüzlerce mikrometre boyutunda olabilir. Gözenek boyutu kriyojenik rejime bağlı olarak değişir. Dondurma sıcaklığı ne kadar düşük olursa, daha fazla küçük boyutlu çözücü kristalleri oluşur ve böylece daha küçük boyutlu gözenekler oluşur (Lozinsky ve ark., 1989).

Düşük sıcaklıklarda, donmamış sıvı mikrofazın hacmi azalır ve böylece daha ince fakat daha yoğun gözenek duvarları oluşur. Bunun nedeni, jel başlatıcının kriyokonsantrasyonunun donmamış mikrofazda artması ve hacminin azalmasıdır. Dondurma

sıcaklığı ne kadar yüksek ise, büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyüktür ve bunun sonucu olarak, daha geniş gözenekli kriyojeller hazırlanır.

Ancak, yüksek dondurma sıcaklığı uygulanan kriyojelasyon rejimlerinde, çözeltinin donmayarak süper soğuk duruma gelme riski vardır. Bu yüzden, sıcaklık reaksiyon karışımını donduracak şekilde ayarlanmalı ve yüksek dondurma sıcaklıklarından kaçınılmalıdır (Plieva ve ark., 2005).

Çapraz bağlanma oranı: Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmış ise, yani yapıdaki çapraz bağ oranı ne kadar az ise, suda şişme o kadar fazladır. Çapraz bağlayıcının fazla kullanılması gözenekliliği ve gözenek boyutunu azaltacaktır. Fazla miktarda kullanılan çapraz bağlayıcı sonucunda, kriyojel muhteviyatında reaksiyona girmeden kalacak çapraz bağlayıcının tamamıyla uzaklaştırılamaması durumunda hücreler için toksik etki yaratabilecektir.

Konsantrasyonun etkisi: Başlangıç reaksiyonunun konsantrasyonu ne kadar yüksek ise daha yoğun ve kırılğan matrisler elde edilir, başlangıç konsantrasyonu azaltıldıkça matrisler daha elastik ve süngerimsi bir yapı göstermeye başlarlar. Konsantrasyonun yüksek olması gözenekliliği azaltarak gözenek boyutunu düşürecek şekilde etki göstermektedir (Kumar ve ark., 2006).

2.7.2. Kriyojellerin Hidrojellerden Farkları

Kriyojelasyon ile üretilen polimerik materyallerin morfolojik yapıları oda sıcaklığında hazırlanmış hidrojeller ile karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Hidrojel şeklini koruyabilen bir yapıya sahip değil iken, kriyojel üretildiği silindirik kabın şeklini alarak, muhafaza etmektedir. Mekanik mukavemet bakımından kıyaslandığında ise hidrojel mekanik özellik olarak çok zayıftır ve kuvvet uygulandığında eski şekline geri dönememektedir. Kriyojel ise polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek mekanik kuvvet altında dahi bütünlüğünü koruyarak, mekanik kuvvet kaldırıldığında eski şekline geri dönebilmektedir. Hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin sahip oldukları özellikler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Biyoparçalanabilir doğal polimerlerle hazırlanan hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin karşılaştırılması

Özellikler	Hidrojel	Kriyojel
Stabilite	Düşük	Yüksek
Mekanik dayanıklılık	Düşük	Yüksek
Gözeneklilik Derecesi	Düşük	Yüksek
Şekil	Jel	Sünger
Hazırlama Süresi	Kısa	Uzun

2.8. MİKROKÜRELERİN BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI

2.8.1. Kontrollü Etkin Madde (İlaç) Salımı Çalışmaları

Kontrollü ilaç salım çalışmalarına 1950'lerde tarım ilaçları ile başlanmıştır. 1960'larda denemeler tıp alanına da girmiştir. İlk çalışmalarda etken madde diyaliz tüpü veya silikon kauçuk içine konmuştur. 1970'lerde çalışmalar büyük molekülü ilaçların ($M_v > 600$) katı polimerlerden sürekli salımı yönünde olmuştur (Langer ve Folkman, 1976).

Genta ve ark. (1998), Su/Yağ tipi emülsiyon faz kimyasal çapraz bağlama yöntemi kullanarak glutraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan mikrokürelerin mukozaya yapışma özeliğini karakterize etmişlerdir. Glutraldehitin %7, 10, 15 ve 25 (v/v) konsantrasyonlarında %5'lik (w/v) kitosanın sıvı parafin:ayçiçek yağı:Span 80 bileşiminden oluşan yağ fazı içinde oda sıcaklığında hazırlanmışlardır. İlaç yüklenmemiş kitosan çözeltilerinden mikroküre oluşumu sağlanmamıştır.

Kumar ve ark. (2002), depo oluşturan etkin madde salım sistemi oluşturmak için, bovin serum albumin ve kitozana curcumin (%79.49 ile %39.66 arası) eklemiştir. Mikroküreler, doğal polimerlerin kimyasal çapraz bağlanmasıyla birleştirilen emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır. Çapraz bağlama ajanı konsantrasyonu, etkin madde salımında önemli etkiye sahip olmuştur.

Shu ve Zhu (2002), modifiye bir kitosan çapraz bağlama yöntemi geliştirmiştir; düşük ısıda koyulaştırılan kitosan/jelatin mikroküreleri, anyonlarla (sülfat, sitrat ve tripolifosfat) ve önceden hazırlanmış kitosan mikroküreleriyle çapraz bağlanmıştır. Sülfat ve sitrat ile çapraz bağlanan kitosan mikroküreleri deneysel gastrik sıvıda şişmiş ve

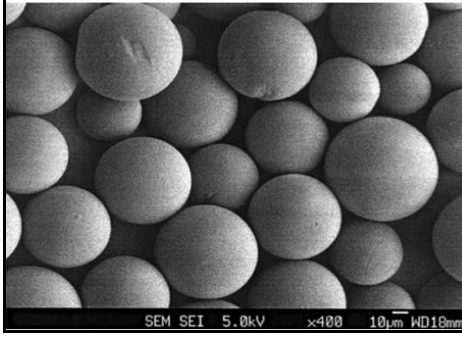
böylece model etkin madde (riboflavin) 5 saatte salınmıştır. İntestinal sıvıda ise mikroküreler büzülme göstermiş ve etkin madde salımı daha yavaş olmuştur (salım yüzdesi, 24 saatte %70'den azdır). Bununla birlikte, tripolifosfat/kitosan mikrokürelerinin şişmesi ve etkin madde salımı, genellikle ortam pH'sına karşı hassasiyet göstermemiştir. Tripolifosfat ve sitrat (veya sülfat) karışımı ile çapraz bağlanan kitozan mikroküreleri ise sadece iyi şekle sahip olmakla kalmayıp aynı zamanda gelişmiş pH hassas salım özellikleri göstermiştir. Bu sonuçlar, iyonik olarak çapraz bağlı kitosan mikrokürelerinin, mideye özel etkin madde salımında faydalı olabileceğini göstermektedir.

Roy ve ark. (2009), model ilaç olarak seçilen mefenamik asit yüklü kitosan mikroküreleri, sitrik asit ile kimyasal ve ısıl çapraz bağlama yöntemlerini bir arada kullanarak sentezlemişlerdir. Emülsiyon için yağ fazı, susam yağı:sıvı parafin:Span 85 ile oluşturulmuştur. Ortalama küre çapı 102.72 ± 3.99 ve 324.39 ± 2.93 μm aralığında değişen mikrokürelerde polimer, çapraz bağlayıcı, sürfaktan miktarı değişimlerinin mefenamik asit salım kinetiği üzerine etkisini incelemişlerdir.

2.8.2. Enjekte Edilebilir Doku İskelesi Çalışmaları

Maia ve ark. (2004), yüksüz mikroküreleri poli hidrosibütirat (PHB) polimeri ile yağ içinde su emülsiyonu oluşturarak, çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde etmişlerdir. Bu çalışmada, polimer ve işletme parametrelerinin mikroküre boyutu, yüzey alanı, zeta potansiyeli, yüzey morfolojisi ve mikroküre degradasyonu gibi mikroküre özelliklerini nasıl etkilediği üzerine değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuçlardan, mikroküre boyutunu etkileyen en önemli parametrenin emülsiyon faz içindeki sürfaktan miktarı olduğuna karar verilmiştir.

Kang ve ark. (2005), tarafından kırık doku mühendisliğinde minimum invaziv etki ile ortopedi operasyonlarında kullanılacak PLGA-PVA mikroküre enjekte edilebilir doku iskelesi hazırlanmıştır. In vivo deneylerde farelerin sırt bölgelerinde deri altına enjeksiyon uygulanarak hiyalin kırık doku oluşumu incelenmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen ve sırasıyla emülsiyon, evaporasyon, yıkama ve kurutma basamakları uygulandıktan sonra oluşan mikrokürelerin SEM görüntüleri Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11. PVA ve PLGA mikroküreleri

Huss ve ark. (2007), doku rejenerasyonu için biyolojik olarak parçalanabilir makro - gözenekli, küre formunda jelatin doku iskeleleri üretmişlerdir. Sekiz sağlıklı gönüllüyle yapılan invivo deneylerde, makro gözenekli jelatin kürelerin enjeksiyonu ile hyalüronik asit enjeksiyonu karşılaştırılmıştır. İmplantasyon bölgesi ve çevre dokulardan 2, 8, 12, ve 26 hafta sonra alınan örnekler (bağışıklık) histolojik sonuçlar bakımından analiz edilmiştir. Hyalüronik asit enjeksiyonu sonucu, mikroküreler ile deri dokusu arasındaki ara yüzeyde oluşan kolajen lifler ve hücreler sıkışmıştır. Bu da hedef bölgede doku yenilenmesine imkan vermemiştir. Makro gözenekli jelatin küreler ise 2 hafta sonra fibroblastlar ile dolmaya başlamıştır. 8 hafta sonra küreler tamamen deri dokuyu üreten fibroblastlar tarafından doldurulmuştur.

Zhao ve ark. (2010), kemik doku mühendisliği için kök hücre ile desteklenmiş mekanik olarak güçlü enjekte edilebilir doku iskeleleri üretmeyi amaçlamışlardır. Kalsiyum fosfat ve insan göbek kordonu mezankimal kök hücreleriyle kombine edilmiş hidrojel mikroküreler enjekte edilebilir özelliktedir. Enjeksiyondan sonra yapının süngerimsi kemik dokuya benzer mekanik özellik gösterdiği ve ortopedik ameliyatlarda kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Huang ve ark. (2012), hücre tutunmasına olanak sağlayan gözenekli poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) küreleri mikro akışkan bir tüp kullanarak yağda su emülsiyon fazı ile üretmişlerdir. Bu şekilde elde edilen ve ardından insan amniyotik sıvısı kök hücreleri (hAFSCs) ile mikro doku iskeleleri oluşturmak için kombine edilen küreler, özellikle oksijen ve besin ulaşımını kolaylaştıracak homojen ve birbirine bağlı gözenekli bir yapıya sahiptir. Küreler içinde farklılaşmış çoğalan hAFSC kök hücreleri, kürelerin gözenekli yapılarından dolayı üç boyutlu bir hücre dışı matrisin oluşumuna izin vermişlerdir.

Fang ve ark. (2014), PLGA ve kitosan polimerleri arasındaki elektrostatik etkileşimden yararlanarak ürettikleri polielektrolit enjekte edilebilir gözenekli mikroküreler ile kemik rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmada; -20°C'de %2 (w/v) konsantrasyona, ortalama küre çapı $47.5 \pm 5.4 \mu\text{m}$ olan mikroküreler üretmişlerdir. Ürettikleri mikroküreleri PLGA ile muamele ederek, aralarındaki elektrostatik kuvvetten yararlanarak PLGA kitosan mikrokürelere absorplanmıştır. Gözenekli yapıya sahip olan bu küreler kondrosit hücreleriyle iyi bir etkileşim göstermiş ve deri altına enjeksiyonla yerleştirilen kitosan/PLGA (PEC) mikrokürelerin, 8 hafta sonra kıkırdak matrisi ürettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, yeni gözenekli bir kitosan/PLGA (PEC) mikroküreleri kıkırdak doku mühendisliği için enjekte edilebilir doku iskelesi olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan materyaller aşağıda sunulmuştur.

3.1.1. Mikroküre Formunda Kriyojel Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Kitosan

Başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanına sahip olan kitosan, yengeç, karides gibi kabuklu deniz canlılarında bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir aminopolisakkarittir.

Bu çalışmada, yengeç kabuklarından elde edilen yüksek molekül ağırlığına ve yüksek viskozite özelliğine sahip kitosan (Sigma Aldrich, USA) kullanılmıştır.

3.1.1.2. Gluteraldehit

Gluteraldehit, proteinlerin çapraz bağlanmasında kullanılmasının yanı sıra; histokimya, enzim teknolojisi, kimyasal dezenfeksiyon ve sterilizasyon, biyomedikal, eczacılık bilimi ve deri endüstrisi gibi çeşitli alanlarda geniş kullanım alanına sahiptir.

Bu çalışmada kitosanın çapraz bağlanmasında gluteraldehit (%25, v/v, Merck Almanya) kullanılmıştır.

3.1.1.3. Span 80

Tıp ve ilaç biliminin yanı sıra kozmetik, boya, tekstil sanayinde kullanılan emülsiyonlaştırıcı ve sabiştirici bir ajandır. Bitkisel veya hayvansal kökenli normal bir yağ asidi olan oleik asit ve sorbitolden üretilir. Koyu sarı ile kahverengi arasında bir renge sahiptir ve görünüm olarak balı andırmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan Span 80 (Sorbitan monooleate), Croda (Türkiye) firmasından hibe ile sağlanmıştır.

3.1.1.4. Petrol eteri

Bu çalışmada emülsiyon oluşumunda yağ fazın bileşenlerinden biri olarak ve üretilen mikrokürelerin yıkanmasında kullanılan petrol eteri, Emir Kimya (Türkiye) firmasından alınmıştır.

3.1.1.5. Bitkisel yağ

Emülsiyon fazın oluşturulmasında bitkisel yağ olarak, ticari olarak satılan zeytinyağı ve ayçiçeği yağı kullanılmıştır.

3.1.1.6. Asetik asit

Asetik asit bir organik asittir, sirkeye ekşi tadını ve keskin kokusunu vermesiyle bilinmekte ve doğada karbonhidratların yükseltgenmesiyle oluşmaktadır. Polimer çözeltilerini hazırlama sürecinde kitosan, asetik asit (%100, v/v, glacial) (Merck, Almanya) içinde % 0.5, 1 ve 2 (w/v) konsantrasyonlarında çözülmüştür.

3.1.1.7. Etanol

Etil alkol olarak da bilinen etanol, renksiz ve yanıcı bir kimyasal bileşiktir. Bu tez çalışmasında, kriyojel mikrokürelerin yıkama işleminde etanol (Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır.

Deneysel kapsamında; çözeltilerin hazırlanmasında asetik asit ve distile su, oluşturulan mikrokürelerin yıkanmasında ise sırasıyla petrol eteri, etanol ve distile su kullanılmıştır.

3.1.1.8. Ninhidrin çözeltisi

Ninhidrin, kimyasal formülü $C_6H_4COC(OH)_2CO$, mol kütlesi 178.1 g olan, amino asitler, peptitler ve proteinlerin tanınmasında (mavi - menekşe renk) kullanılan renksiz kristal yapıda bir maddedir.

Bu tez çalışmasında, kitosan mikrokürelerin serbest halde bulunan amino ve karboksil gruplarıyla birlikte verdikleri reaksiyonlara dayanan çapraz bağlama derecesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Ninhidrin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar:

Sitrik asit (Emir Kimya, Türkiye)

Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich, ABD)

SnCl₂. 2H₂O (Sigma Aldrich, İsviçre)
Ninhidrin (Sigma Aldrich, Hindistan)
Etilen glikol monometiler (Sigma Aldrich, Almanya)
Etanol (Emir Kimya, Türkiye)
Glisin (Sigma Aldrich, Belçika)

şeklindedir.

3.1.2. Mikroküre Formunda Kriyojel Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan temel laboratuvar cihazları sırasıyla verilmiştir;
Kriyostat (WiseCircu WCR – P6 CFC 404 A, Wisd Lab. Inst., Almanya)
Mekanik karıştırıcı (Velp Scientifica, Digital Overhead Stirrer-DLS, İtalya)
Şırınga Pompası (New Era Pump Systems, NE-300, ABD)
UV spektrofotometresi (Chebios, Optimum-one Uv&Vis, İtalya)
Temel cihazların yanı sıra şu cihazlarda kullanılmıştır;
Isıtmalı su banyosu (Daihan Scientific CO. LTD., WiseBath WB-22, Kore)
Manyetik karıştırıcı (Heldolph Instruments, MR Hei-Standart, Almanya)
pH metre (Mettler Toledo, Portable pH meter SG-23, ABD)
Etüv (Elektro.mag, M420-P, Türkiye)
Analitik hassas terazi (Ohaus Corp. Pine Brook, AR2140, Çin)
Buzdolabı

Mikroküre formunda üretilen kriyojel doku iskelelerinin, küresel formu dağılma ortamı içinde emülsiyon Su/Yağ fazı oluşturularak sağlanmıştır. Kriyojenik koşullarda polimerizasyon ve çapraz - bağlama ile kriyojel mikrokürelerin üretimi tamamlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Mikroküre Doku İskeleleri Üretimi Ön Çalışmaları

Ön çalışmalarda, mikroküre üretiminde kullanılacak olan kitosanın farklı konsantrasyonlara sahip asetik asit çözeltilerindeki çözünürlüğü incelenmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanacak polimer çözeltilerinin

tümünün asetik asidin %6 (v/v)'lık sulu çözeltisiyle hazırlanmasına karar verilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler bir gece manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen çözeltiler elde edilmiştir.

Emülsiyon fazının oluşturulması için yapılan ön çalışmalarda, hazırlanan polimer çözeltilerinden küre oluşumuna yönelik denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucu emülsiyon yağ fazı petrol eteri, Span 80 ve ayçiçeği yağı kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.2. Kitosan Temelli Kriyojel Mikrokürelerin Üretilmesi

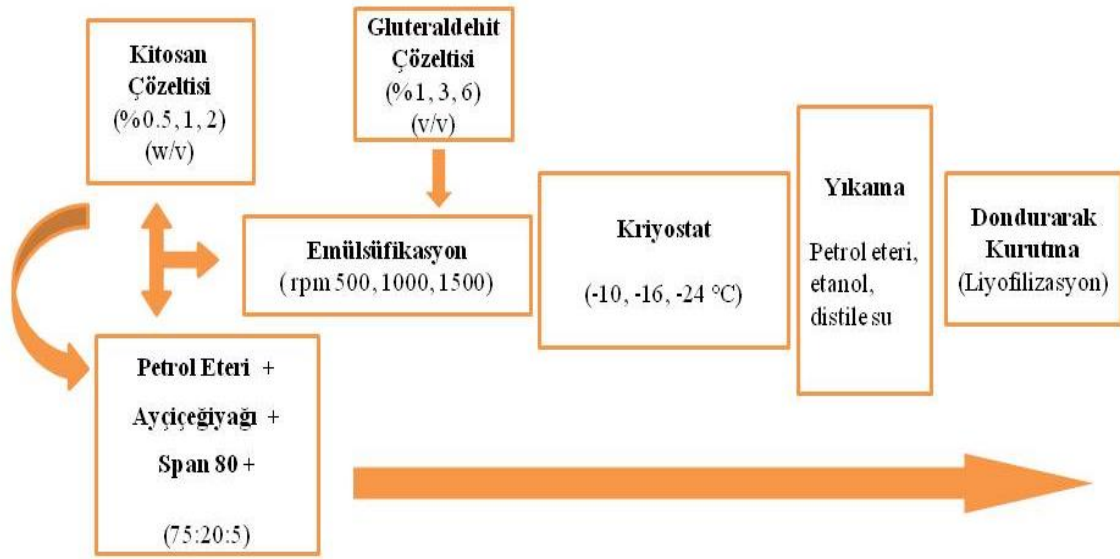
Bu çalışmada mikroküreler, dağılma ortamı içinde emülsiyon faz oluşturma tekniği ile elde edilmiştir. Kitosanın %6'lık (v/v) asetik asit çözeltisi içerisindeki çözünürlüğü, kitosan - glutraldehit çapraz bağlanması, dağılma ortamında emülsiyon fazın oluşumu, karıştırma hızının ya da sıcaklığın mikro kürelerin oluşumuna etkisi göz önüne alınarak, doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı uygulamalarında kullanılmaya elverişli olan ve elde edilen verilerin çeşitliliği irdelenerek optimum özellikleri taşıyan kriyojel mikroküreleri üretmek amacıyla polimer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı oranı, karıştırma hızı, reaksiyon sıcaklığı, dağılma ortamı bileşenleri gibi parametrelerin farklı varyasyonları denenerek mikroküre formunda kriyojel doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, %0.5, 1 ve 2 (w/v) konsantrasyonlarında kitosan, %1, 3 ve 6 (v/v) konsantrasyonlarında glutraldehit çözeltileri kullanılarak mikroküre formunda kriyojeller üretilmiştir. Reaksiyon sıcaklığı; -10, -16 ve -24°C, karıştırma hızı 500, 1000 ve 1500 rpm karıştırma hızı olacak şekilde değiştirilmiştir. Dağılma ortamı ise; 37.5 mL petrol eteri, 10 mL ayçiçeği yağı ve 2.5 mL Span 80'in (75:20:5) manyetik karıştırıcıda tamamen homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmasıyla oluşturulmuştur.

2 mL polimer çözeltisi şırıngaya alınarak; mekanik karıştırıcıda karıştırılarak oluşturulan dağılma ortamına oda sıcaklığında şırınga pompası yardımıyla damla damla ilave edilmiştir. Ekleme işlemi bittikten sonra karışıma farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1 mL glutraldehit çözeltisi hızlıca ilave edilip; kriyojelasyonun gerçekleşmesi için 2 saat kriyostatta bekletilmiştir. Dağılma ortamında donmuş olan örnekler, daha sonra 24 saat -16°C'de buzlukta bekletilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örneklerin

sıcaklığı oda koşullarına getirilmiştir. Örnekler sırasıyla; petrol eteri, etanol ve distile suyla yıkanarak reaksiyona girmemiş monomerlerin, çapraz bağlayıcı ve dağılma ortamını oluşturan emülsiyonlaştırıcıların tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Yıkanan mikroküre formundaki kriyojeller filtre kağıdından süzülerek sabit bir ağırlığa ulaşınca kadar kurutulmuştur. Mikroküre formunda kriyojel doku iskelesi hazırlama basamakları Şekil 3.1'de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1. Mikroküre formunda kriyojellerin hazırlanma basamakları

3.2.3. Mikroküre Formunda Üretilmiş Kriyojellerin Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan, kitosandan üretilen mikroküre formundaki kriyojeller aşağıda açıklanan yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.2.3.1. FT - IR analizi

Farklı konsantrasyonlardaki kitosan ve gluteraldehit kullanılarak, farklı koşullarda (sıcaklık, karıştırma hızı) üretilen mikroküre formundaki kriyojellerin kimyasal yapıları Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometre (FT - IR) (PerkinElmer (FT-IR/FIR/NIR, ATR) ile belirlenmiştir. FT - IR analizleri 400 - 4500 cm^{-1} spektrum dalga boyu aralığında yapılmıştır.

3.2.3.2. Mikroküre formundaki kriyojellerin şişme davranışı

Kriyojel mikrokürelerin şişme davranışlarının belirlenmesi için şişme oranları ölçülmüştür. Bir önceki basamaklarda üretilen mikroküre formundaki kriyojeller liyofilizatörde kurutulmuştur. Kriyojellerin kuru (m_d) ve şişmeden sonraki ağırlıkları (m_w) ± 0.0001 duyarlığa sahip bir hassas terazi ile ölçülmüştür. Tamamen kurumuş olan mikroküre formundaki kriyojeller, 10 mL saf su içeren bir behere konulup, 37°C'de 24 saat su banyosunda bekletilmiş ve şişmeleri sağlanmıştır. Daha sonra sulu ortamdan alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak tartımları yapılmıştır.

Şişme oranı (S_r) Eş.3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% S_r = ((m_w - m_d)/m_d)*100 \quad (\text{Eş. 3.1})$$

3.2.3.3. Çapraz bağlanma derecesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glutaraldehit çözeltileri ile kriyojenik koşullarda çapraz bağlanması gerçekleştirilen mikrokürelerin çapraz bağlanma dereceleri ninhidrin (NHN) çözeltisi ile belirlenmiştir. Ninhidrin çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır: Çözelti A: 1.05 g sitrik asit, 10 mL (1.00 M) NaOH ve 0.04 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ karıştırılarak 25 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır; Çözelti B: 1 g ninhidrinin 25 mL etilen glikol mono metileter'de çözülmesiyle hazırlanmıştır. A ve B çözeltileri birleştirilerek 45 dakika boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti mikrokürelerin çapraz bağlanma derecesinin belirlenmesinde kullanılmak üzere koyu renk şişede karanlıkta saklanmıştır.

Bu yöntem, kitosan mikrokürelerin glutaraldehit ile etkileştirilmesinden sonra glutaraldehit bağlanmadan kalan serbest $-\text{NH}_2$ grubu tayini için kullanılmıştır. Yöntemin esası, $-\text{NH}_2$ grubunun ninhidrinle verdiği reaksiyon sonucunda oluşan kompleksin etanol fazına alınarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Bunun için:

1. Derişimi 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL olan olan glisin çözeltileri hazırlanmıştır.

2. Hazırlanan çözeltilerden 100 µL tüplere alınarak ve üzerine 200 µL ninhidrin (% 2 (w/v)) çözeltisi eklenmiştir. Kör tüp için 100 µL su alınarak üzerine 200 µL ninhidrin çözeltisi eklenmiştir.

3. Tüpler 100°C'de 20 dakika süre ile su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur.

4. Her bir tüpe 50:50 etanol:su karışımından 5 ml eklenerek karıştırılmıştır.

5. Çözeltilerin absorpsansı köre karşı 570 nm'de okunmuştur.

Amino grubu belirlenecek kitosan mikrokürelerden 10 mg tartılarak üzerine 100 µL su eklendikten sonra standart çalışmasındaki basamaklar aynen uygulanmıştır. Örnekler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan kompleks etanol-su fazına alınarak absorpsansı 570 nm'de okunmuştur. Örneğin absorpsansı standart grafik kullanılarak değerlendirilmiştir. Numunenin çapraz bağlanma derecesi, daha sonra Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanır:

$$\% \text{ Çapraz Bağlanma Derecesi} = \frac{(\text{NHN amin}_{\text{ilk}} - \text{NHN amin}_{\text{son}})}{\text{NHN amin}_{\text{ilk}}} \times 100 \quad (\text{Eş. 3.2})$$

Burada (NHN amin)_{ilk} çapraz bağlanmamış kitosandaki serbest NH₂ 'nin mol sayısını, (NHN amin)_{son} ise gluteraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan mikrokürelerde kalan serbest NH₂'nin mol sayısını ifade etmektedir.

3.2.3.4. Zeta potansiyeli

Mikroküre formundaki kriyojellerin yüzey yükünün bir ölçüsü olan zeta potansiyel ölçümleri dağıtıcı ortam olarak su kullanılarak Zeta sizer ile yapılmıştır (Malvern, United Kingdom).

Tüm örneklerden 0.1 g tartılarak, örnekler ayrı ayrı beherler içindeki 2 ml saf su içine konulmuş ve 10 dakika karıştırılmıştır. İri tanelerin çökmesi için 5 dakika dinlendirildikten sonra zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Yapılan her ölçümde distile suyun pH değeri 6'da sabit tutulmuştur ve yeteri kadar (min. 10) taneciğin bir arada bulunmasına dikkat edilerek cihazın mikro işlemcisi tarafından hesaplanan ortalama zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir.

3.2.3.5. SEM ile analiz

Mikroküre formundaki kriyojellerin yüzeyleri elektrik iletkenliğini sağlayabilmek amacıyla vakum ortamında platin ile kaplandıktan sonra yüzey morfolojisi ve tanecik boyutunu belirlemek ve uygulanan işlemlerin gözenek yapılarına etkisinin görüntülenebilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Quanta 400F Field Emission, ABD) kullanılmıştır. SEM analizi öncesinde kriyojel mikrokürelerin gözenek yapılarını bozmadan, içerebilecekleri nemin tamamının uzaklaştırılması ve şişmiş haldeki gözenek büyüklüğünün belirlenebilmesi için liyofilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. 5 kV'da, 100, 500 ve 1000 büyütme oranlarında SEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.3.6. İn vitro degradasyon

Mikroküre formunda kitosan kriyojellerin degradasyonu distile su içinde ve 37°C'de izlenmiştir. Kriyojel mikroküre örnekleri eşit miktarlarda (2 mg) sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur, 5 ml distile su içeren kaplara konulmuştur. 30 gün sonunda, örnekler ortamdaki alınmış ve kurutulmuştur. Degradasyon sonucunda mikroküre yüzey ve gözenek morfolojisindeki değişim SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Daha sonra sürekli degradasyonu incelemek için tekrar distile su içine konulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanan küre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Bu veriler ışığında, proses ve çözelti değişkenlerinin mikroküre morfolojileri üzerine etkisi tartışılmıştır. İşlem değişkenleri olarak karıştırma hızı, sıcaklık, dağılma ortamı bileşenleri gibi değişkenler irdelenmiştir. Çözelti değişkenleri olarak ise çözeltilerin konsantrasyonu, viskozitesi, eklenen çapraz bağlayıcı miktarları incelenmiştir. Bu değişkenlere bağlı olarak sentezlenen mikroküre formundaki kriyojellerin karakterizasyonu; denge su içerikleri, yüzey yükleri, çapraz bağlanma dereceleri, in vitro degradasyon davranışları karakterize edilmiş; kimyasal yapıları ve gözenek morfolojileri FT - IR ve SEM ile incelenmiştir.

4.1. KÜRE FORMUNDA KRİYOJEL DOKU İSKELELERİNİN ÖZELLİKLERİ

4.1.1. Malzeme ve Çapraz Bağlayıcı Seçimi

Biyolojik olarak yenilenebilir olması, biyobozunur, biyoyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özelliklere sahip olması sayesinde doğal bir polimer olan kitosanın tez çalışmasında kullanılmasına karar verilmiştir. Kitosanın zayıf asitlerde çözüldüğü bilinmektedir (Tıǧlı ve ark., 2007). Bu nedenle çözücü ortam olarak asetik asit ile denemeler yapılmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltilerinin konsantrasyon, yoğunluk ve viskozite değerleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Kitosan çözeltilerinin konsantrasyon, yoğunluk ve viskozite değerleri

Konsantrasyon (% , w/v)	Yoğunluk (g/mL)	Viskozite (Pa.s)
0.5	1.0075	102.230
1.0	1.0088	234.513
2.0	1.0104	685.867

Kitosan çözeltilerinin viskozite değerleri emülsiyon faz oluşumunda meydana gelen damlacıkların boyutunu ve morfolojisini etkilemektedir. Bu viskozite değeri polimer çözeltisinin dağılma ortamına damlatılabilirliği açısından küre oluşumuna izin verecek özellikte olmalıdır. Asetik asit çözeltisinin farklı konsantrasyonlarıyla küre oluşumu dikkate alınarak yapılan denemeler sonucu tez çalışmasında kullanılan kitosan polimerinin %6'lık (v/v) asetik asit çözeltisi içerisinde çözülmesine karar verilmiştir.

Polimer çözeltilerinin viskoziteleri aynı derişimde hazırlanan küçük mol kütleli maddelerin çözeltilerinin viskozitelerinden çok daha yüksektir. Polimer çözeltilerinde, polimer zincirleri uygun çözücü içinde uzamış hallerinde bulunmaya eğilimlidirler ve bu eğilim viskoziteyi daha da arttırır. Bu yüksek viskozite özelliği, viskozite ölçümleriyle polimerin viskozite-ortalama mol kütlelerini bulma olanağı sağlar.

Hazırlanan polimer çözeltilerinin viskozitesi; çözücü ve polimer türünden, polimerlerin molekül ağırlığından, polimer derişiminden ve sıcaklıktan etkilenir. Kitosanın viskozite - ortalama mol kütleleri, polimer çözeltisinin viskozitesini belirleyen en önemli faktördür. Ostwald viskozimetresi ile sabit sıcaklıkta akma süreleri ölçülen farklı konsantrasyonlardaki kitosan çözeltilerinin viskozite ölçümleriyle, kullanılan kitosanın viskozite ortalama molekül ağırlığı (M_v) Eşitlik 4.1'de verilen Mark - Houwink - Sakurada (MHS) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin akma süreleri 3'er kez ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır (Mohammad ve ark., 2000).

$$[\eta] = K.M_v^\alpha \text{ (Mark-Houwink-Sakurada bağıntısı)} \quad (\text{Eş. 4.1})$$

$[\eta]$: İntrinsic viskozite

K ve α her bir polimer - çözücü sistemi için bellidir.

(27°C'de Kitosan - Asetik asit için $K= 1.38 \cdot 10^{-4}$, $\alpha= 0.85$)

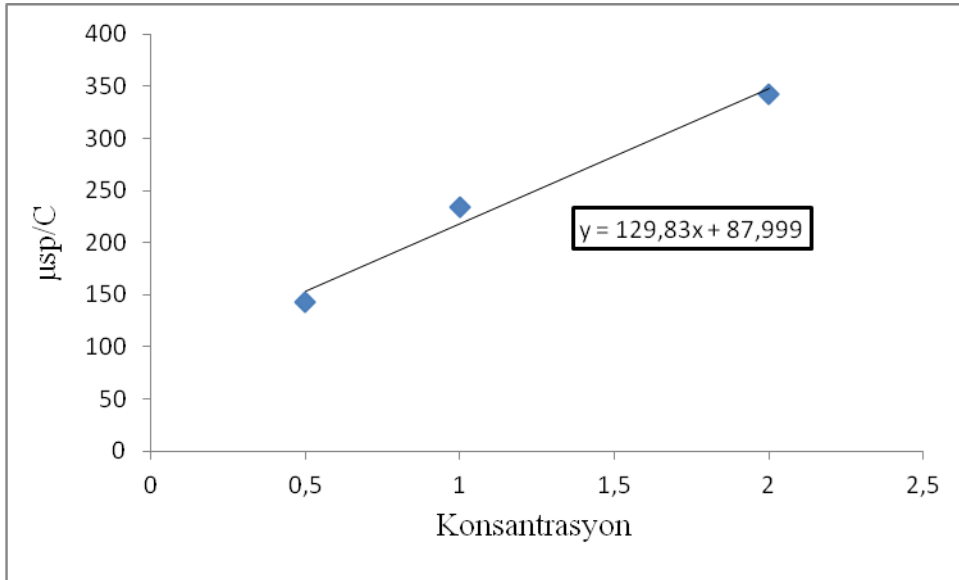
Çizelge 4.2. Kitosan viskozite molekül ağırlığı hesaplama değerleri

Konsantrasyon, C (%, w/v)	Akış Süresi, t (s)	Viskozite, μ_{rel}^* (Pa.s)	μ_{sp}^{**} ($\mu_{rel} - 1$)	μ_{sp}/C^{***}
0.5	5752.67	72.230	71.230	142.460
1.0	9818.33	234.513	233.513	233.513
2.0	22838.67	685.867	684.867	342.434

*: Bağlı viskozite

** : Spesifik viskozite

*** : İndirgenmiş viskozite



Şekil 4.1. Konsantrasyona karşı, spesifik viskozite/konsantrasyon grafiği

Şekil 4.1'de farklı kitosan konsantrasyonlarına karşı spesifik viskozite/konsantrasyon (μ_{sp}/C) grafiğinden elde edilen kayma değeri intrinsik viskoziteyi $[\eta]$ verir. $[\eta]= 87.99'$ dur. Eş. 4.1'de verilen denklemden yararlanılarak tez çalışmasında kullanılan kitosanın viskozite - ortalama molekül ağırlığı değeri $M_v=674353$ Dalton olarak hesaplanmıştır. Kitosanın yüksek molekül ağırlığına sahip olduğunu gösteren bu değer, hazırlanan kitosan çözeltilerinin yüksek viskoziteye sahip olmasına neden olmuştur.

Belirlenen viskozite değerlerinin polimer konsantrasyonu arttıkça arttığı görülmektedir. %2'den daha yüksek ve %0.5'den daha düşük konsantrasyonlarda

hazırlanan kitosan çözeltileriyle oluşturulan doku iskelelerinin morfoloji ve büyüklük kontrolü sağlanamamıştır.

Homojen şekil ve boyutlarda mikroküre oluşumu için polimer çözeltisi, uygun molekül ağırlığına sahip polimerlerle hazırlanmalı ve uygun viskoziteye sahip olmalıdır.

4.1.2. Yöntem Seçimi

Sunulan tez çalışmasında doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere geleneksel silindirik, film ya da disk şeklinde kitosan doku iskelelerinden farklı olarak düzensiz şekillerdeki yaraları doldurabilecek, enjekte edilebilir, küre formunda ve mikro boyutta doku iskeleleri sentezlenmiştir. Bu malzemelerin doku iskelesi olarak kullanılmasının yanı sıra kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı ajan olarak da kullanılmaya uygun olduğu görülmüştür.

Genta ve ark. (1998), oda sıcaklığında, glüteraldehit ile çapraz bağlanmış ilaç yüklü kitosan mikroküreleri farklı karıştırma oranlarıyla oluşturdukları ayçiçeği yağı ve Span 80 dağıtma ortamında hazırlamışlardır.

Huang ve ark. (2002), ilaç taşıyıcı sistem olarak genipin ile çapraz bağlanmış jelatin mikroküreleri oda sıcaklığında emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlamışlardır. Jelatin mikrokürelerin üretilmesinde kullanılan dağıtma ortamı mısır yağı ile sağlanmıştır.

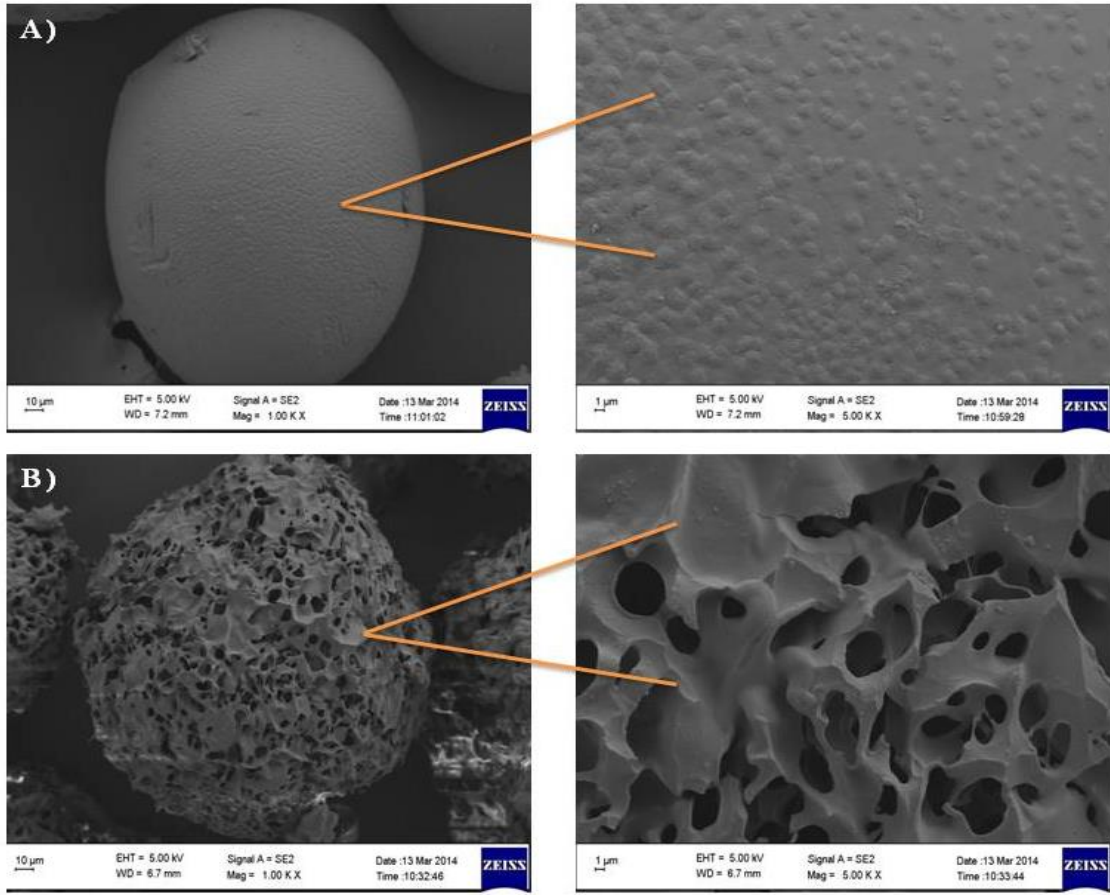
Senthil ve ark. (2012), sodyum aljinat mikroküreleri, Span 80, petrol eteri ve sıvı parafinden oluşan dağıtma ortamı içinde glüteraldehit ile emülsiyon faz kimyasal çapraz bağlama yöntemi ile üretmişlerdir. Anti kanser ilaç salım kinetiğinin incelendiği çalışmada, oda sıcaklığında hazırlanan gözeneksiz küreler kullanılmıştır.

Yapılan literatür araştırmasında emülsifikasyon ile oluşturulan kitosan mikrokürelerin glüteraldehit ile kriyojenik koşullarda kimyasal çapraz bağlanarak sentezlendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Kriyojelleşme (ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleşme), gözeneklilik derecesi kontrol edilebilen, gözenekli kriyojellerin oluşumuna olanak sağlar. Kriyojellerin süngerimsi yapısı ve makrogözeneklere sahip olması çeşitli büyüklükteki kütle aktarımının hem difüzyonla hem de taşınım ile rahat bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlar. Hidrojel mikrokürelerin oldukça pürüzsüz ancak gözeneksiz bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir.

Literatürde kitosanın emülsiyon fazda çapraz bağlanmasıyla oluşturulan mikrokürelerden ilaç salım sistemlerinde kullanılmak üzere salım kinetiğinin incelendiği pek çok çalışma yer almaktadır. Yuan ve ark. (2006), protein yüklü kitosan bazlı mikroküreleri genipin ile çapraz bağlayarak sentezlemişlerdir. Bu çalışmada, çapraz bağlamanın oda sıcaklığında ve uzun sürelerde (4, 8, 16 saat) gerçekleştiği gösterilmiştir. Gupta ve Jabrail (2006), kitosan mikroküreleri gluteraldehit ile oda sıcaklığında çapraz bağlayarak farklı deasetilasyon derecelerine sahip kitosanların ilaç salımına etkisini incelemişlerdir.

Oda sıcaklığında emülsiyon fazda kimyasal çapraz bağlanma ile üretilen bir hidrojel mikrokürenin birbirleriyle bağlantılı gözenekler oluşturamaması nedeniyle kitosan mikrokürelerin sentezinde kriyojelasyon tekniği kullanılarak etkin bir biçimde homojen ve eş dağılımlı bir gözeneklilik yapısı sağlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda %1, w/v'lik kitosan çözeltisinden üretilen mikrokürelerin çapraz bağlanma reaksiyonları oda sıcaklığında ve kriyojenik koşullarda ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de %3'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile çapraz bağlanarak oluşturulan mikroküre formunda hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.2. (A) Küre formunda hidrojel , (B) Küre formunda kriyojel

SEM fotoğraflarında da görüldüğü gibi oda sıcaklığında oluşturulan bir mikroküre formundaki hidrojin, küresel ve pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu gözlenmektedir. Ancak, mikrokürelerin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi birbirleriyle bağlantılı içsel bir gözenek yapısına sahip olmalarıyla mümkündür. Bu gözenek yapısı hücrelerin yapışp yayılması, besinlerinin aktarımı, üremesi, farklılaşması ve atıklarının uzaklaştırılması açısından çok önemlidir. Ayrıca, kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı ajan olarak kullanılacak mikrokürelerin, gözenekli yapıya sahip olması difüzyon mekanizması ve salım kinetiği açısından büyük öneme sahiptir. Sunulan tez çalışmasında kitosan mikrokürelerin sentezi için Su/Yağ tipi emülsiyon kimyasal çapraz bağlama ve kriyojelasyon yöntemi bir araya getirilerek içsel bağlantılı küre formunda doku iskeleleri sentezlenmiştir.

4.1.3. Kitosan Mikrokürelerin Üretimi

Kitosan mikrokürelerin yağda su (Su/Yağ) emülsiyon kimyasal çapraz bağlama yöntemi uygulanarak hazırlanması yönünde formülasyon çalışmaları yapılmış olup bu aşamada;

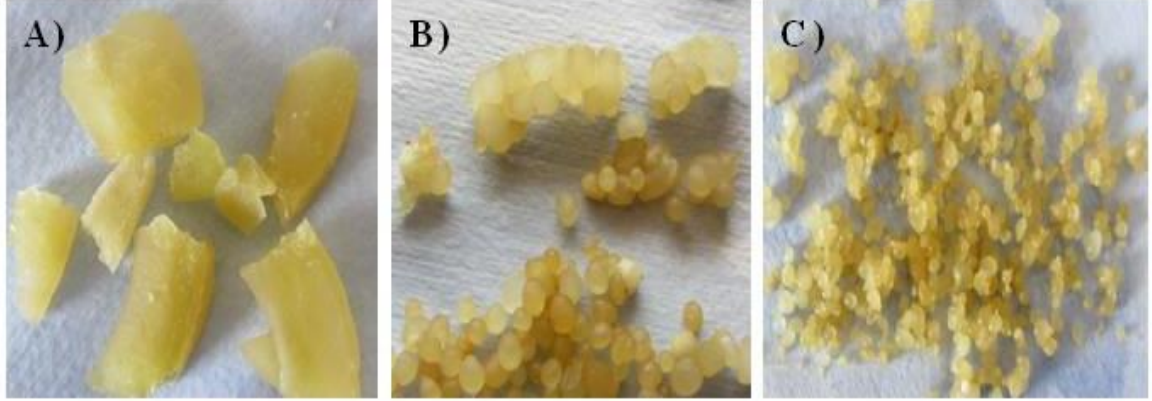
- Çapraz bağlayıcı ajan tipi ve konsantrasyonu,
- Çapraz bağlayıcı ekleme şekli,
- Emülsifikasyon süresi,
- Kriyojelasyon sıcaklığı,
- Polimer konsantrasyonu,
- Yağ fazı bileşenleri içeriği,
- Emülgatör (Span 80) miktarı,
- Karıştırma hızı ve süresi gibi parametreler

değiştirilerek formülasyona etkileri incelenmiştir.

Kitosan mikrokürelerin sentezlenmesi esnasında dağılma ortamının oluşturulmasında kullanılacak bileşenlerin emülsiyon oluşturarak küre oluşumuna izin vermesi gerekmektedir. Yapılan ön çalışmalarda, petrol eteri, sıvı parafin, Span 80, ayçiçeği yağı ve zeytin yağı ile denemeler yapılmıştır. Sıvı parafin ve zeytinyağı emülsiyon için uygun olmasına rağmen, kriyojelasyon esnasında donmuştur. Ek olarak, zeytinyağı ile hazırlanan mikrokürelerdeki yağ miktarı yıkama ile yeterince uzaklaştırılamamıştır. Sabit kitosan, glüteraldehit, sıcaklık, karıştırma hızı gibi proses değişkenlerinde yapılan çalışmalarda hazırlanan dağılma ortamları ile elde edilen yapılar Şekil 4.3'de sunulmuştur.

Bu yöntemde emülsiyonun dış fazı olarak kloroform, toluen ve petrol eteri gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Petrol eteri kullanılarak yapılan denemede emülsiyon için yağ fazı sağlanamamış ve topaklanma meydana gelmiştir. (Şekil 4.3, A). Yapılan literatür taramasında pamuk yağı, ayçiçeği yağı ve zeytin yağı gibi bitkisel yağlarında kullanılabileceği görülmüştür. Petrol eteri ve zeytin yağı ile yapılan denemelerde emülsiyon için yağ fazı sağlanmış ancak damlacıklar birbirine yaklaşarak kümeleşme meydana gelmiştir (Şekil 4.3, B). Sıvı damlacıkların uygun bir sürfaktan kullanılarak stabilize edilmesine karar verilmiştir. Bu nedenle emülgatör madde olarak Span 80

kullanılmıştır. Petrol eteri, ayçiçeği yağı, Span 80' in 75:20:5 oranlarında hazırlanan karışımı tüm deneylerde yağ fazı olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3, C).



Şekil 4.3. Değişik formülasyonlarda hazırlanan bileşenler ile yağ fazının belirlenmesi: A) 50 mL petrol eteri, B) 37.5 mL petrol eteri - 12.5 mL ayçiçeği yağı, C) 37.5 mL petrol eteri - 10 mL ayçiçeği yağı - 2.5 mL Span 80.

Emülsiyon sistemlerin topaklaşma, kümeleşme ve kremalaşma biçiminde üç farklı kararsızlıkları vardır. Oluşan emülsiyonlardan biri ilk emülsiyona oranla iç faz miktarınca daha yoğun olursa kremalaşma meydana gelir ve emülsiyon bozulur. Bu kararsızlıklar dikkate alınarak iç fazın (sulu polimer çözeltisi) dış faza (yağ fazı) oranı 1:25 olacak şekilde deneyler yapılmıştır.

Su/Yağ tipi emülsiyon kimyasal çapraz bağlama yönteminde, çapraz bağlama ajanının aldehit grupları kitosanın işlevsel amino grubu ile çapraz bağlanarak mikropartikül oluşumunu sağlar. Bu yöntemde yağ içinde su emülsiyonu; kitosan asetik asit sulu çözeltisinin yağ fazında emülsiyonu ile hazırlanmaktadır. Sıvı damlacıklar uygun bir sürfaktan kullanılarak stabilize edilmektedir. Stabil emülsiyonun glutaraldehit gibi uygun bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılarak çapraz bağlanması suretiyle, damlacıkların sertleşmesi sağlanır.

4.1.4. Mikrokürelerin %Küre Verimlerinin ve Çaplarının Değerlendirilmesi

Hazırlanan mikroküre formülasyonlarında yapılan in vitro kontrollerin başında ürün veriminin saptanması tayini gelmektedir. Değişik formülasyonlarda hazırlanan mikrokürelerin %küre verimleri Eşitlik 4.2 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Küre Verimi} = \frac{\text{Toplam Küre Miktarı}}{\text{Toplam polimer miktarı} + \text{Toplam çapraz bağlayıcı miktarı}} \times 100 \quad (\text{Eş. 4.2})$$

Elde edilen mikroküre formülasyonları ürün verimi açısından değerlendirildiğinde, %ürün veriminin %49.50 - 96.37 gibi bir aralıkta değiştiği görülmüştür. Ürün verimi değer aralığı, mikroküre üretimi için seçtiğimiz Su/Yağ (S/Y) tipi emülsiyon kimyasal çapraz bağlama yönteminin verim açısından uygunluğunun bir göstergesidir.

Çizelge 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da değişik formülasyonlarda hazırlanan kitosan mikrokürelerde (sırasıyla farklı kitosan konsantrasyonu, farklı çapraz bağlayıcı miktarı, farklı karıştırma hızı, farklı reaksiyon sıcaklığı) mikrokürelerin oluşum verimleri ve ortalama küre çapı değerleri görülmektedir. Kitosan kriyojel mikroküreler için gösterilen değerler incelendiğinde, mikroküre oluşumu verimlerinin ve ortalama küre çapının, kitosan miktarının artışıyla arttığı görülmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16°C, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v)

Kitosan Konsantrasyonu (w/v, %)	Küre Verimi (w/w, %)	Ortalama Küre Çapı (µm)
0.5	49.50	197.72 ± 14.82
1.0	69.11	220.11 ± 25.58
2.0	96.37	581.80 ± 47.76

Kitosan konsantrasyonunun değişmesiyle orantılı olarak mikroküre çaplarının değişmesinin sebebinin kitosan oranı arttıkça yapıdaki destek maddesi olan polimer miktarının artmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu da mekanik stabilitesi daha sağlam kürelerin oluşmasını sağlayarak, yıkama ve kurutma basamaklarında madde kaybını önlemiş ve küre verimini arttırmıştır.

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun yetersiz olması (%1, v/v), kitosanın daha az ve daha zayıf kovalent çapraz bağlanmasına sebep olarak, süngerimsi ve hafif partiküllerin

oluşmasını sağlamıştır. Yıkama sonrası, filtrasyon sürecinde askıda kalan bu mikroküreler madde kaybına neden olarak %küre verimini düşürmüştür. Aynı şekilde, çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun fazla olması da (%6, v/v), gluteraldehitin fazlasının reaksiyona girmeden uzaklaşması sonucu üretim verimini düşürmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı gluteraldehit konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16°C, kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)

Gluteraldehit Konsantrasyonu (v/v, %)	Küre Verimi (w/w, %)	Ortalama Küre Çapı (µm)
1.0	63.12	355.82 ± 29.84
3.0	69.11	220.11 ± 25.58
6.0	67.77	260.70 ± 31.38

Kitosan çözeltilisinin viskozitesinin uygunluğu, küresel yapının sağlanabilmesi, üretim veriminin yüksek olması ve ortalama küre çapının küçük olması (doku iskelelerinin enjekte edilmeye uygunluğu) açısından, kitosan ve gluteraldehit çözeltilerinin optimum üretim konsantrasyonlarının, sırası ile %1 (w/v) ve %3 (v/v) olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle reaksiyon sıcaklığı ve karıştırma hızı parametrelerinin üretilen mikroküreler üzerine etkisi incelenirken bu konsantrasyonlar sabit tutulmuştur.

Kriyojelasyon sıcaklığının değişmesiyle, mikroküre oluşumu verimlerinde ve ortalama küre çapında önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ek olarak, kitosan hidrojel mikroküre çapları, kitosan kriyojel mikroküre çaplarına oranla önemli ölçüde değişiklik göstermemiştir (Çizelge 4.5). Bunun en önemli nedeni, partikül stabilitesini sağlayan dağılma fazı bileşenlerinin, karıştırma hızının ve kitosan çözeltilisi viskozitesinin sabit tutulmasıdır. Reaksiyon sıcaklığı, yalnızca gluteraldehit ile çapraz bağlanmaya yani gözenek boyutuna etki eden bir değişkendir.

Çizelge 4.5. Farklı reaksiyon sıcaklıklarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)

Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Küre Verimi (w/w, %)	Ortalama Küre Çapı (µm)
+26 (Hidrojel)	79.23	255.01 ± 18.09
-10	73.80	207.59 ± 21.06
-16	69.11	220.11 ± 25.58
-24	67.77	260.70 ± 31.38

Dağılma ortamının homojenizasyonunu sağlayan önemli parametrelerden biri olan karıştırma hızının artması, bir süre sonra yağ fazında oluşan sulu partikülleri parçalayarak dağıtma ortamında kremalaşma sorununu meydana getirir ve emülsiyon bozulur. Emülsiyonun korunması ve mikroküre üretim verimi dikkate alınarak karıştırma hızı çalışma aralığının minimum 500 rpm, maksimum 1500 rpm olması gerekmektedir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Farklı kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin %küre verimlerinin ve çaplarının değerlendirilmesi (Karıştırma hızı: 1000 rpm, reaksiyon sıcaklığı: -16 °C, glüteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v)

Karıştırma Hızı (x rpm)	Küre Verimi (w/w, %)	Ortalama Küre Çapı (µm)
500	72.59	286.62 ± 37.33
1000	69.11	220.11 ± 25.58
1500	65.82	201.62 ± 18.74

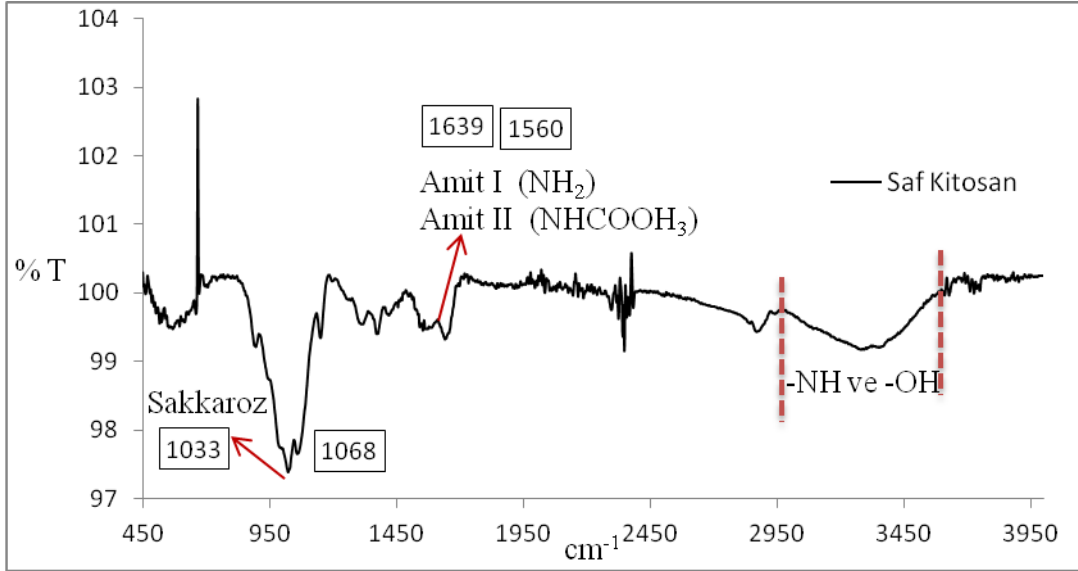
4.1.5. FT - IR Analizi

Farklı formülasyonlar kullanılarak sentezlenen kitosan mikrokürelerin fonksiyonel gruplarının kimyasal yapısının anlaşılması için üretilen kriyojeller FT - IR ile analiz

edilmiştir. Mikrokürelerin üretilmesinde kullanılan saf bileşenler de ayrıca FT - IR ile analiz edilmiştir. Kitosan, ayçiçeği yağı ve Span 80'e ait mevcut kimyasal bağları gösteren FT - IR analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de sunulmuştur.

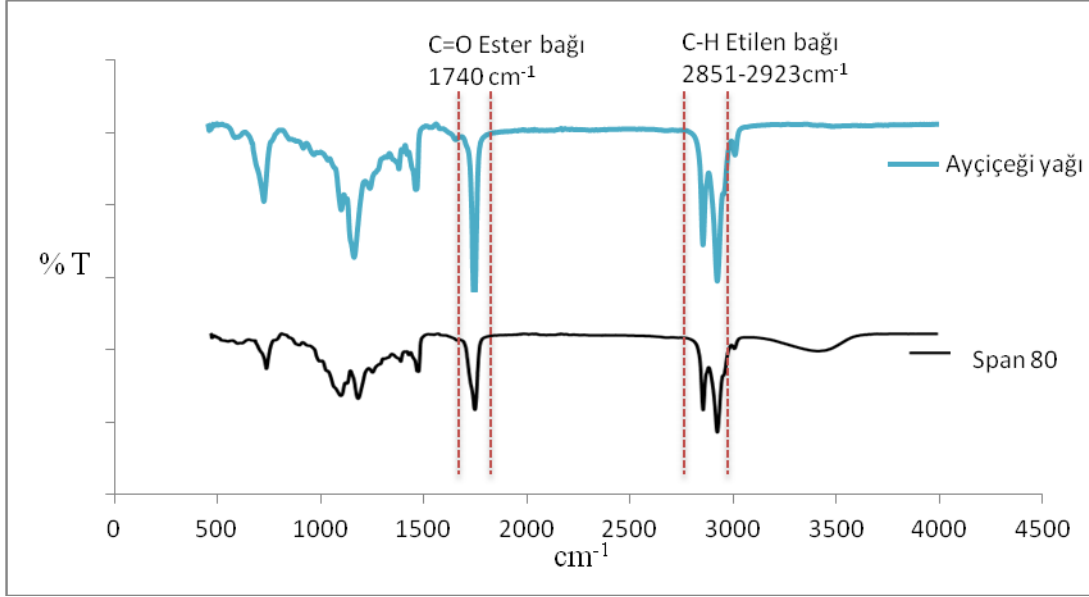
Katı haldeki kitosanın FT - IR diyagramı incelendiğinde; 1033 cm^{-1} ve 1068 cm^{-1} 'deki pikler sakkarid gruplarının (C=O titreşimlerine ait pikler) varlığını göstermektedir. 1639 cm^{-1} ve 1560 cm^{-1} de polimer zincirinde bulunan Amit I (NH_2) grubuna ve Amit II (NHCOOH_3) grubuna ait pikler görülmektedir.

$3500\text{ cm}^{-1} - 3300\text{ cm}^{-1}$ de kitosanda olması beklenen yayvan $-\text{NH}$ ve $-\text{OH}$ bandları görülmektedir.



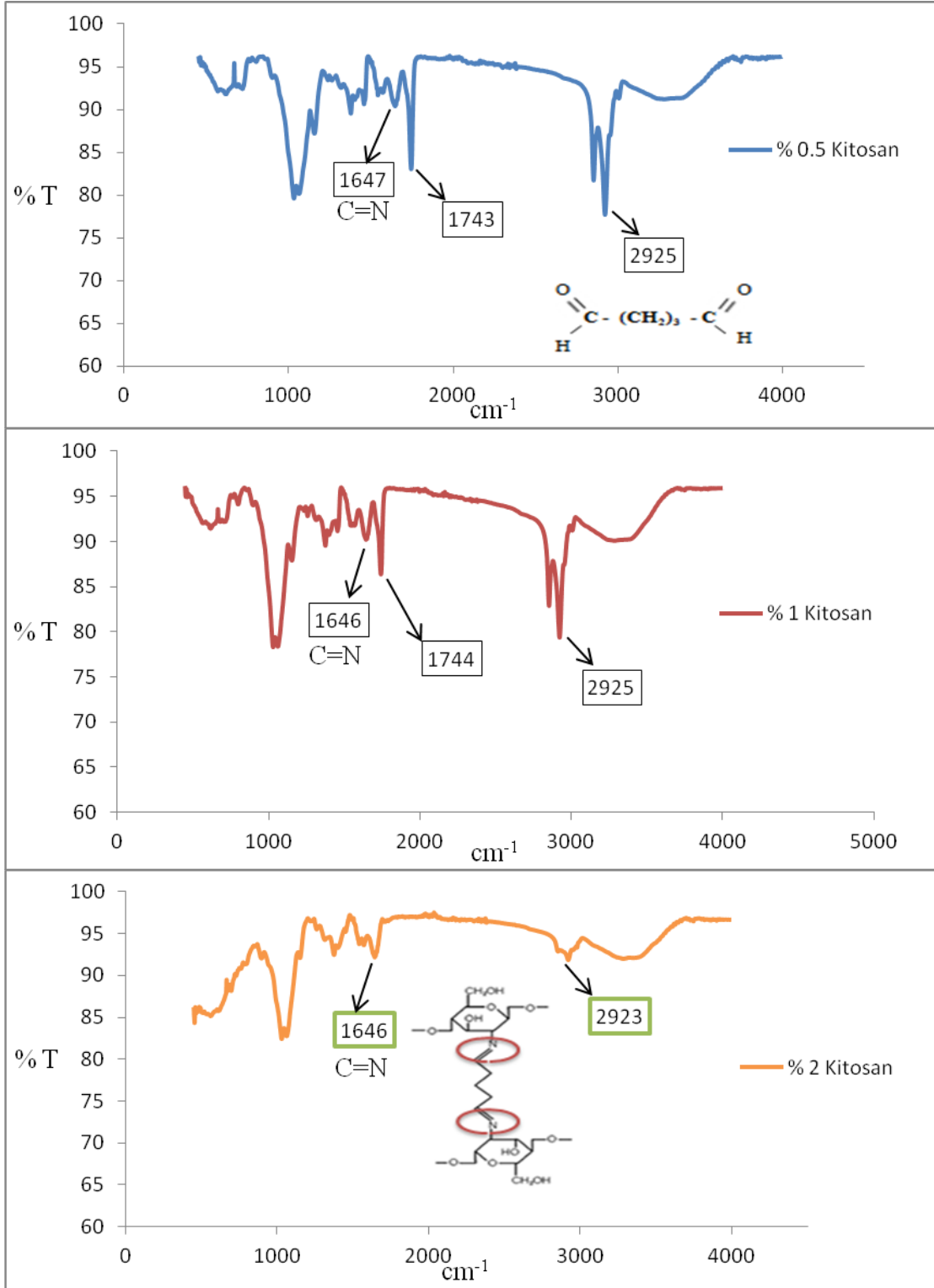
Şekil 4.6. Saf kitosanın FT - IR Spektrumu

Mikrokürelerin hazırlandığı yağ fazı bileşenlerinden olan Span 80 ve ticari olarak satılan rafine ayçiçeği yağı emülsiyonun oluşmasını sağlayan emülgatörlerdir (Capdevila ve ark., 2010). Bu bileşenlere ait FT - IR spektrumları Şekil 4.7'de sunulmuştur. Bu spektrumlar, üretilen mikrokürelerden yağ fazın yıkamayla uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı hakkında bilgi verecektir. FT - IR sonuçlarında, 1740 cm^{-1} bandında yağların sahip olduğu karakteristik lipid - ester (C=O) bağının varlığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, özellikle doymamış yağ asitlerinin sahip olduğu etilen bağı (C - H) $2851 - 2923\text{ cm}^{-1}$ band aralığında mevcuttur.



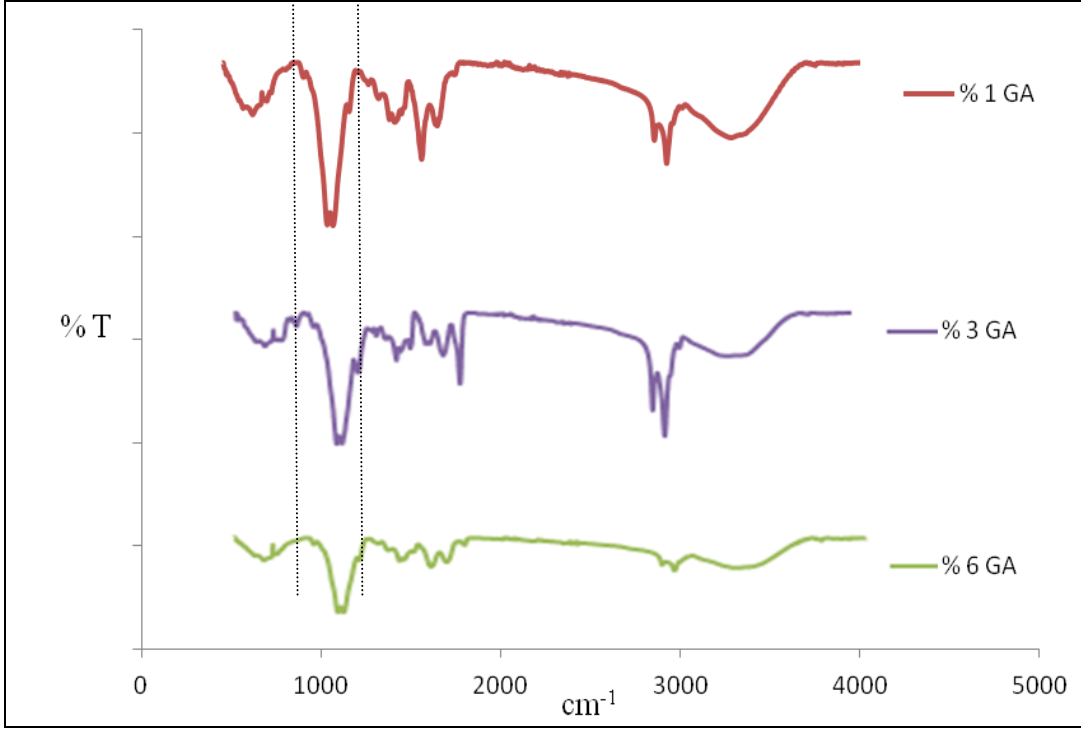
Şekil 4.7. Saf ayçiçeği yağı ve saf Span 80'in FT - IR Spektrumları

Farklı kitosan konsantrasyonuna %0.5, %1 ve %2, (w/v) sahip çözeltiler kullanılarak üretilmiş olan kriyojel mikrokürelere ait FT - IR diyagramları Şekil 4.8'de sunulmuştur. 1646 - 1647 cm^{-1} dalga boyları, kitosanın amino grupları ile glutraldehitin aldehit grupları arasındaki çapraz bağlanma sonucu oluşan amin (C=N) bağımlı ifade eder (Nazemi ve ark., 2014). FT - IR diyagramlarında yer alan bu pik, kitosan mikrokürelere glutraldehit ile oluşan çapraz bağların varlığını kanıtlanmıştır. 2923 - 2925 cm^{-1} band aralığında glutraldehite ait karakteristik pikler görülmektedir.



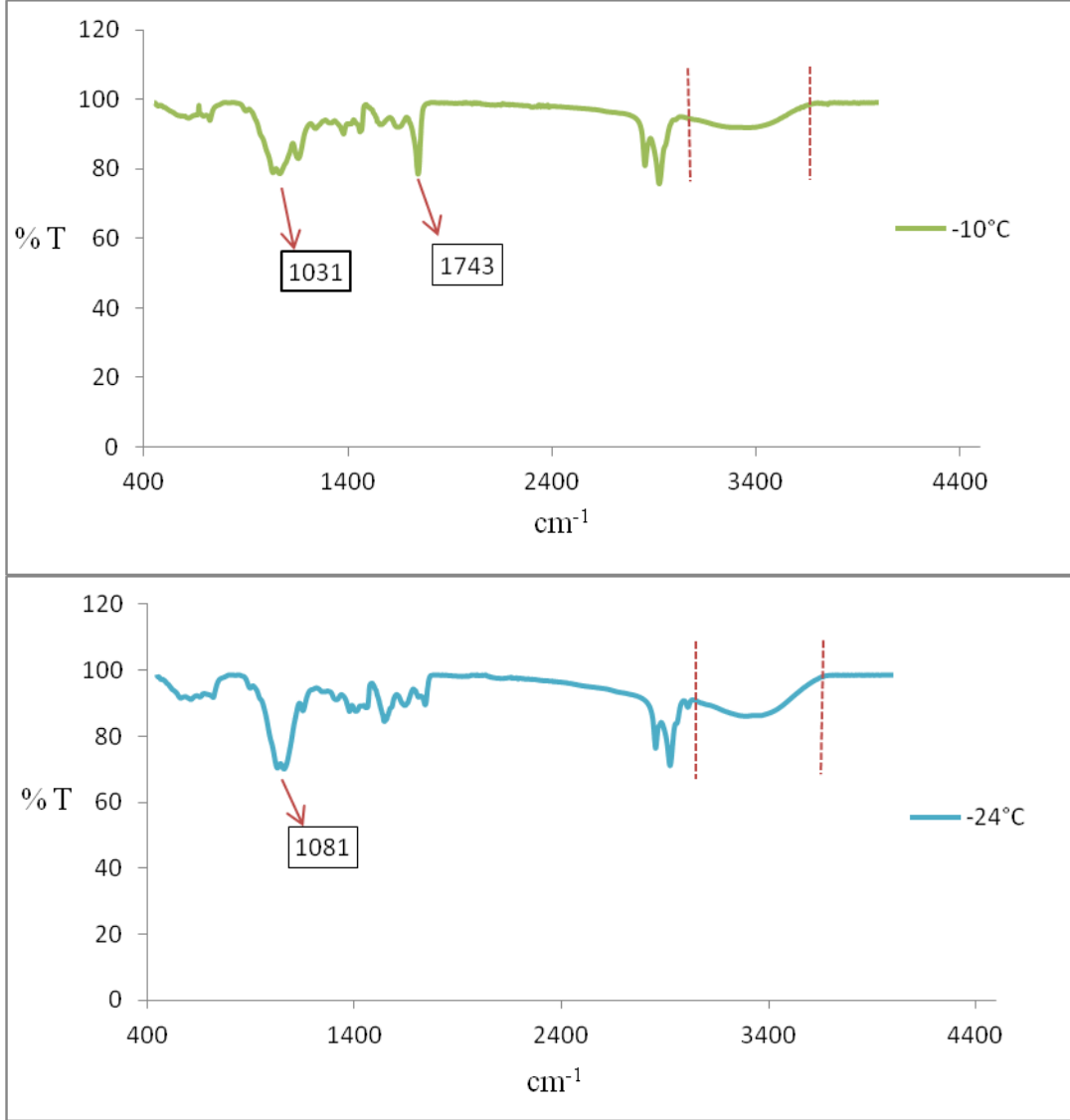
Şekil 4.8. %0.5, %1 ve %2 (w/v) kitosan konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FT - IR spektrumları (Glutaraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, karıştırma hızı: 1000 rpm)

Farklı gluteraldehit konsantrasyonuna sahip çözeltiler [%1, %3 ve %6, (v/v)] kullanılarak çapraz bağlanmış kitosan kriyojel mikrokürelerin FT - IR spektrumları Şekil 4.9'da sunulmuştur. Sırasıyla 1064, 1062 ve 1072 cm^{-1} band aralığında görülen ve kitosana ait karakteristik piklerden biri olan C=O bandına ait titreşimlerde gluteraldehit miktarının artmasıyla azalma görülmüştür. Bu da sabit miktardaki kitosanın gluteraldehit miktarının artmasıyla daha çok yerden bağlanması şeklinde açıklanabilir.



Şekil 4.9. %1, %3 ve %6 (v/v) gluteraldehit konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FT - IR spektrumları (Kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, karıştırma hızı: 1000 rpm)

Çapraz bağlanma reaksiyonunu etkileyen önemli parametrelerden biri olan reaksiyon sıcaklığının etkisi Şekil 4.10'da verilen FT - IR spektrumları ile incelenmiştir.



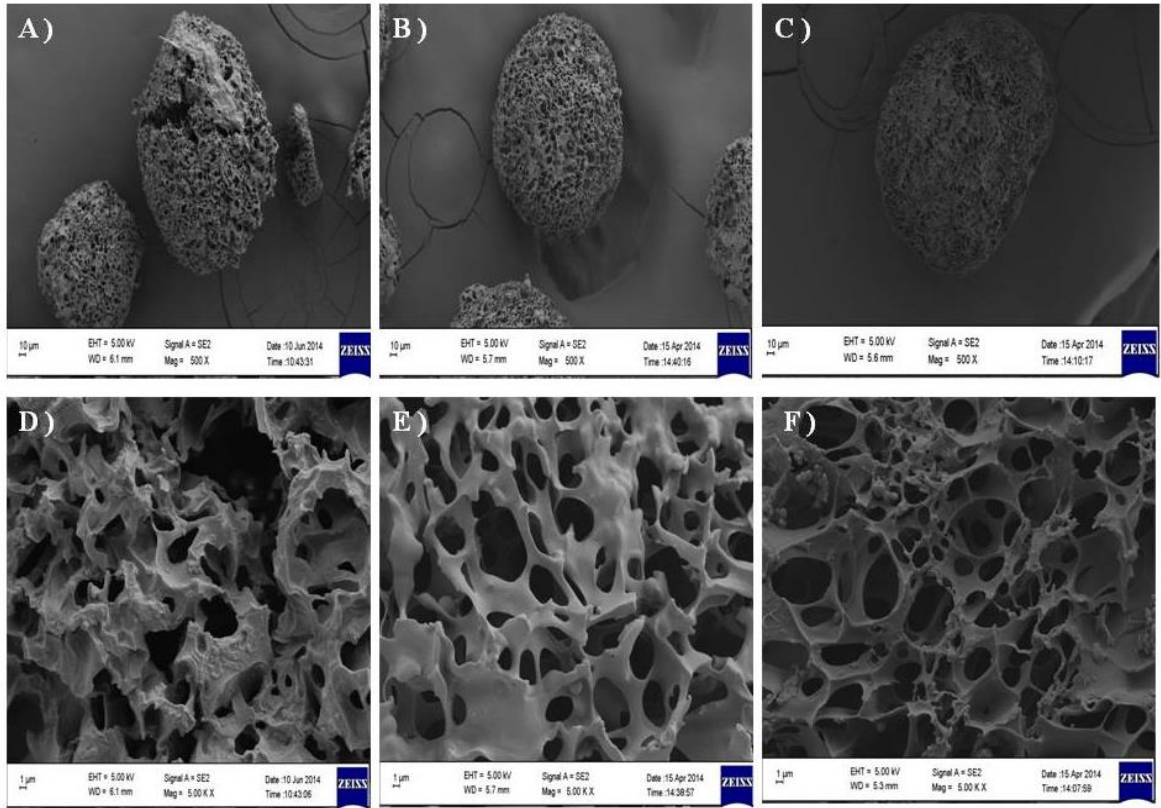
Şekil 4.10. -10 ve -24°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilmiş kriyojel mikrokürelerin FT - IR spektrumları (Kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), karıştırma hızı: 1000 rpm)

4.1.6. SEM ile Analiz

Tez kapsamında üretilen mikroküre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin morfolojik yapısını belirlemek için SEM görüntüleri çekilmiştir. Küre ve gözenek çapları 20 farklı ölçümün ortalaması ve standart sapması alınarak hesaplanmıştır. Maximum 10 uzunluk için SEM ölçüm programı, diğer 10 uzunluk için ise görüntülerde sol alt köşedeki uzunluk birimi baz alınarak küre ve gözenek çapları belirlenmiştir. Kriyojel mikroküreler üretildiklerinde hazırlandıkları çözücü ile şişmiş durumdadırlar. Oda sıcaklığında kurutulduklarında küreler çökmekte, sulu ortama koyulduklarında şişerek ilk üretildikleri orijinal şekle sahip olmaları çok zor olmaktadır. Dolayısıyla, kriyojellerin çökmeden yapılarını korumalarını sağlamak ve şişmiş haldeki gözenek yapılarını ortaya koymak için, kriyojeller dondurarak-kurutma işlemine tabii tutularak kurutulmuştur. Örnekler -80°C sıcaklıkta 1 gece bekletilmiş ve örneklerin tamamen donmaları sağlanmıştır. Donmuş örnekler tamamen kuruyuncaya kadar liyofilizatörde bekletilmiştir. SEM görüntüleri, tüm kitosan kriyojel mikrokürelerin birbiri ile bağlantılı olan gözenek yapısının varlığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7).

4.1.6.1. Kitosan konsantrasyonunun ve çözelti viskozitesinin gözenek morfolojisine ve küre büyüklüğüne etkisi

Tez çalışmasının bu kısmında, kitosan konsantrasyonunun kriyojel mikrokürelerin gözenek yapısı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Kitosan konsantrasyonu dışındaki tüm işlem parametreleri (gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C , karıştırma hızı: 1000 rpm) sabit tutularak yapılan deneylerde üç ayrı konsantrasyona sahip kitosan çözeltilerinden üretilmiş mikroküreler kullanılmıştır. Bunlar %0.5, %1 ve %2 (w/v) karışım oranlardaki farklı viskozite değerlerine sahip kitosan çözeltileridir. Bu çözeltilerden hazırlanan mikrokürelerin SEM görüntüleri incelendiğinde %1 (w/v) konsantrasyona sahip kitosan çözeltilerinden üretilmiş mikrokürelerin küresel şekillerinin, diğerlerine göre daha düzgün ve belirgin olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 4A, 4B, 4C). Kitosan konsantrasyonunun artışı ile mekanik olarak daha stabil küreler elde edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kitosan konsantrasyonunun değişimi ile gözenek yapısının değişimini gösteren SEM fotoğrafları. A: %0.5 Kitosan, x500; B: %1 Kitosan, x500; C: %2 Kitosan, x500; D: %0.5 Kitosan, x5000; E: %1 Kitosan, x5000 ve F: %0.5 Kitosan, x5000 (Gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C , karıştırma hızı: 1000 rpm)

SEM görüntülerinden de görüldüğü gibi (Şekil 4.11.D, 4.11.E, 4.11.F) çözeltilerdeki kitosan miktarı arttıkça kürelerin gözenek duvarlarındaki pürüzlülük azalmıştır. Ancak %0.5 (w/v) kitosan konsantrasyonunda hazırlanan kriyojel mikrokürelerin SEM görüntülerinde pürüzlü yapılar görülmektedir. Bu yapılar; çözelti sıcaklığı donma noktasına yaklaşırken, çözücü kristallerinin ilerlemesine karşı oluşan direnç sonucu meydana gelen yapılardır.

Çizelge 4.11'de farklı konsantrasyona sahip kitosan çözeltileri kullanılarak üretilmiş olan mikroküre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerine ait ortalama küre ve gözenek çaplarının değerleri verilmektedir. Kitosan konsantrasyonunun artışı ile ortalama gözenek çapının azaldığı görülse de, bu değişim önemli ölçüde değildir. Kitosan konsantrasyonunun artışı ile maksimum gözenek çapında azalma görülmüştür. Bölgen ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada silindirik kriyojellerde, benzer olarak polimer konsantrasyonunun azalması ile gözenek çaplarında artma olduğu belirtilmiştir. Bu artış,

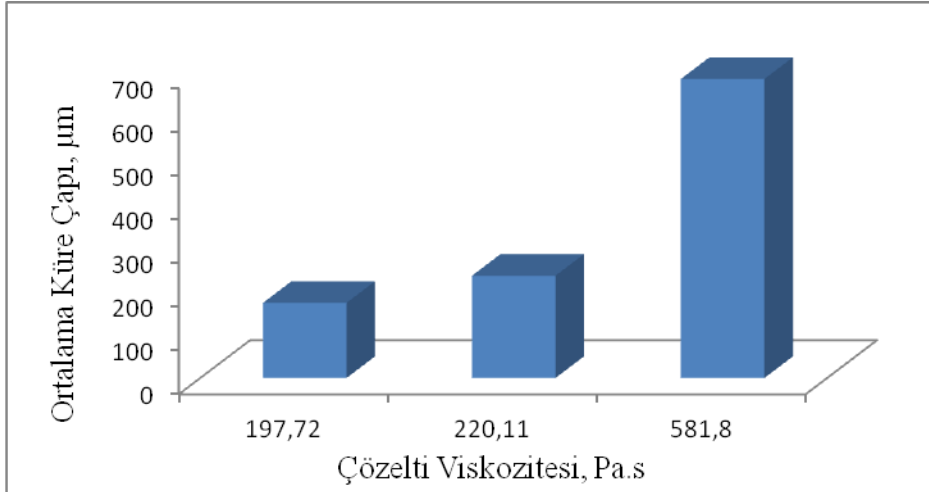
seyreltik çözeltilerde oluşan büyük buz kristallerine bağlı olabilir. Mikrokürelerin üretiminde kullanılan kitosan çözeltilerinin konsantrasyonunun artması ile ortalama küre çaplarında artış gözlenmiştir (Çizelge 4.7). Dini ve ark. (2003), gluteraldehit ile çapraz bağlanma sonucu oluşturdukları kitosan mikrokürelerde, kitosan konsantrasyonu artışı ile küre çaplarında benzer olarak bir artışın meydana geldiği sonucunu ortaya koymuşlardır. Bunun sebebi, mikroküre duvarlarında destek materyali olan kitosan polimerinin artışıyla, yüzey alanı daha büyük mikrokürelerin oluşması olarak açıklanabilir.

Çizelge 4.7. Kitosan konsantrasyonu değişimi ile gözenek ve küre boyutlarının değişimi

Kitosan Konsantrasyonu (%, w/v)	Minimum Gözenek Çapı (μm)	Maksimum Gözenek Çapı (μm)	Ortalama Gözenek Çapı (μm)	Ortalama Küre Çapı (μm)
0.5	4.480	10.040	6.7663 \pm 1.25	197.72 \pm 23.91
1	3.430	7.087	5.5056 \pm 0.63	220.11 \pm 25.58
2	2.766	9.363	5.0201 \pm 1.49	581.80 \pm 47.76

Diğer bir taraftan, kitosan çözeltileri viskozite değerlerine bakıldığında (Çizelge 4.1) ise çözeltideki kitosan miktarının artması ile birlikte viskozitenin arttığı görülmektedir. Buna bağlı olarak da Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi üretilen mikrokürelerin maksimum ve minimum gözenek çapları, çözeltideki kitosan konsantrasyonu arttıkça azalmıştır.

Şekil 4.12’de kitosan çözeltileri viskozitesi ile ortalama mikroküre çapı arasındaki değişim incelendiğinde, kitosan çözeltileri viskozitesi arttıkça ortalama küre çaplarının arttığı görülmektedir. Bu muhtemelen, partikül oluşumu esnasında meydana gelen damlacıkların boyutuna, çözelti viskozite etkisi nedeniyle olmuştur. Emülsiyon ile oluşturulan damlacıkların ortalama boyutu, polimer viskozitesi ile doğru orantılıdır. Benzer sonuçlar, Oliveira ve ark. (2005), tarafından %0.5 ve %2.5 (w/v) konsantrasyonlarındaki kitosan çözeltilerinden hazırlanan mikrokürelerin ortalama küre çapı değerlerinde de görülmüştür.



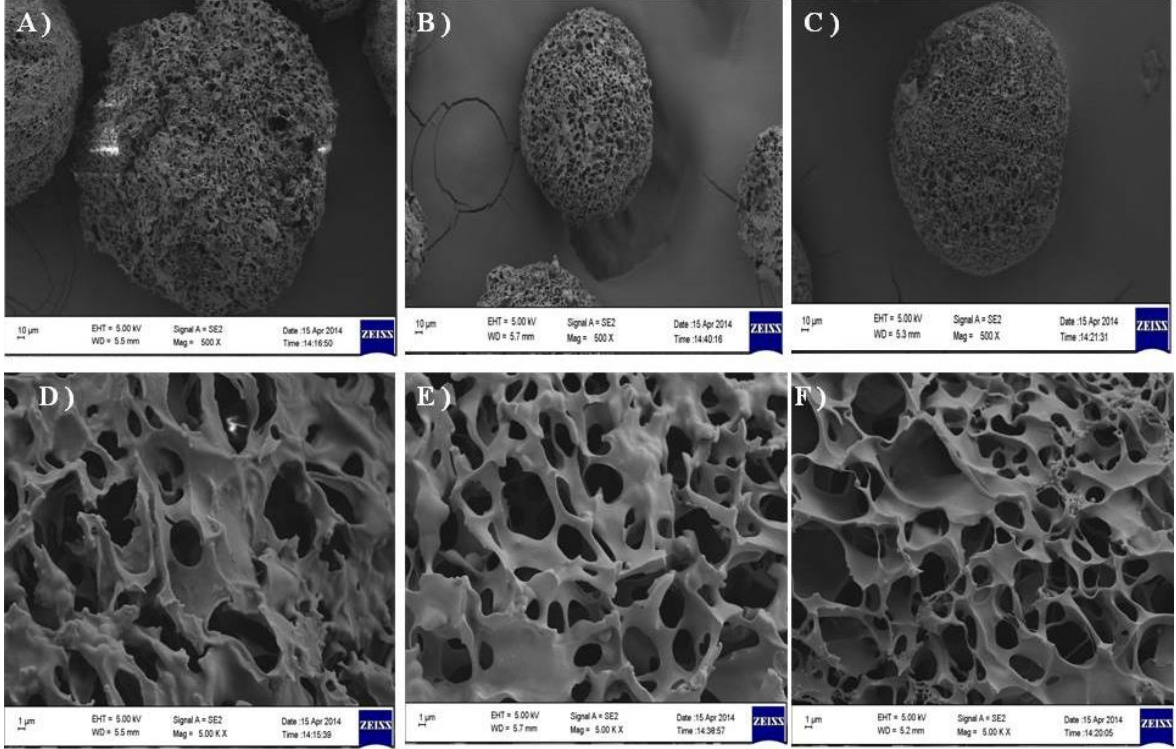
Şekil 4.12. Kitosan çözeltileri viskozitesi ile ortalama mikroküre çapı arasındaki değişim

4.1.6.2. Gluteraldehit konsantrasyonunun gözenek morfolojisi ve küre büyüklüğüne etkisi

Çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan gluteraldehit miktarının kitosan kriyojel mikroküreler üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, %1, %3 ve %6 (v/v) olmak üzere üç farklı gluteraldehit çözeltisi hazırlanmıştır ve diğer işlem parametreleri sabit tutularak (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), karıştırma hızı: 1000 rpm, kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C) kriyojel mikroküreler üretilmiştir. Şekil 4.6'da farklı gluteraldehit konsantrasyonuna sahip çözeltiler kullanılarak üretilen kriyojel mikrokürelerin SEM görüntüleri sunulmuştur. Gluteraldehit konsantrasyonu artışıyla gözenek boyutu azalsa da önemli ölçüde bir değişiklik olmamıştır. Azalan gözenek boyutu yüzey alanını azaltmakta, bu da kriyojelin şişme oranını düşürmektedir. %1 (w/v) kitosan konsantrasyonunda, %3 ve %6 (v/v) gluteraldehit konsantrasyonuyla çapraz bağlanarak hazırlanan mikrokürelerin denge şişme değerleri sırasıyla %61.62 ve %27.78 'dir. Benzer olarak, Gupta ve Jabrail (2005), koaservasyon yöntemi ile çapraz bağlanmış kitosan mikrokürelerin maksimum şişme derecesini %300 olarak belirlemişlerdir. Ancak, gluteraldehit konsantrasyonunun %2'den %12'e (v/v) arttırılmasıyla şişme derecesi % 150'e gerilemiştir.

Gluteraldehit konsantrasyonunun artması, gözenek boyutunu küçülterek gözenek boyutu dağılımını genişletmiştir. 20 tane gözenek boyutu ölçülüp ortalaması alınarak, ortalama gözenek çapı hesaplanmıştır. Ortalama gözenek çapı ölçümlerine göre; %1, %3

ve %6 (v/v) konsantrasyonuna sahip gluteraldehit çözeltileri kullanılarak hesaplanan kriyojel mikrokürelerin gözenek çapları ve küre çapları Çizelge 4.8’de verilmektedir.



Şekil 4.13. Gluteraldehit konsantrasyonunun değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: %1 Gluteraldehit, x500; B: %3 Gluteraldehit, x500; C: %6 Gluteraldehit, x500; D: %1 Gluteraldehit, x5000; E: %3 Gluteraldehit, x5000ve F: %6 Gluteraldehit, x5000 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), karıştırma hızı: 1000 rpm, kriyojelyasyon sıcaklığı: -16°C)

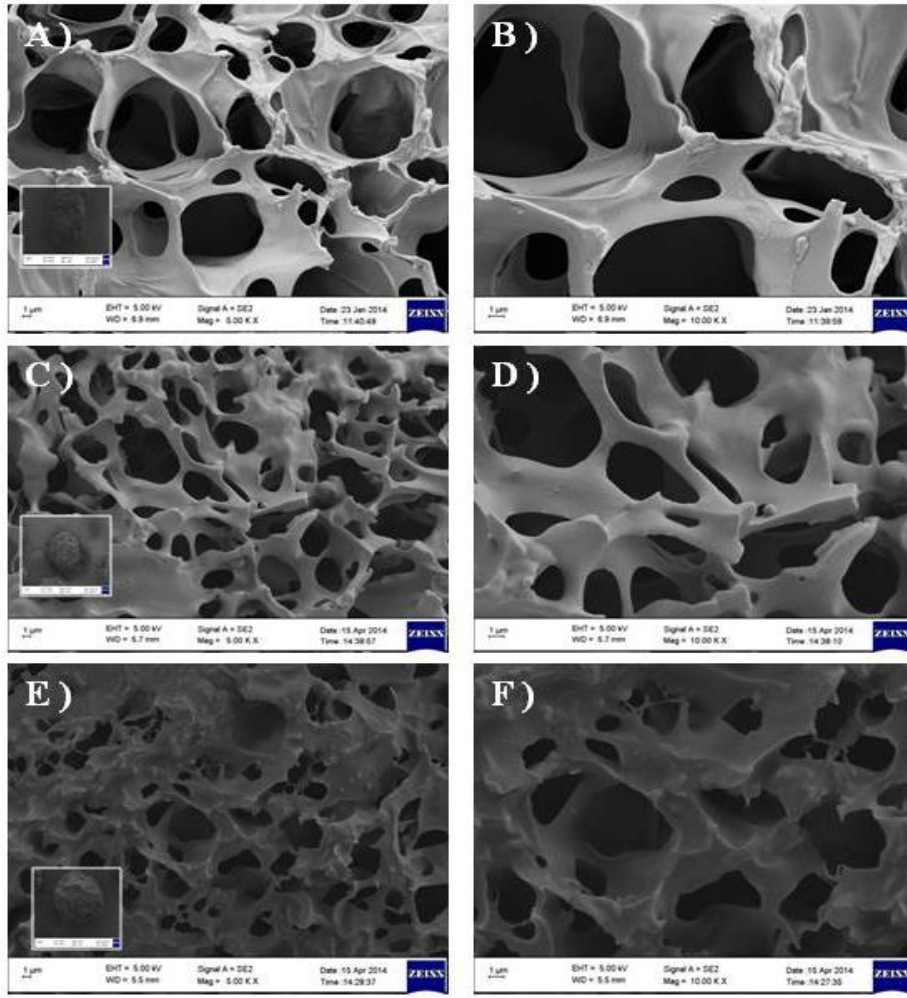
Çizelge 4.8. Gluteraldehit konsantrasyonu değişimi ile gözenek ve küre boyutlarının değişimi

Gluteraldehit Konsantrasyonu (%, v/v)	Minimum Gözenek Çapı (μm)	Maksimum Gözenek Çapı (μm)	Ortalama Gözenek Çapı (μm)	Ortalama Küre Çapı (μm)
1	3.427	7.673	7.3108 \pm 2.07	355.82 \pm 29.84
3	3.430	7.087	5.5056 \pm 0.63	220.11 \pm 25.58
6	2.766	9.363	5.0267 \pm 0.88	260.70 \pm 31.38

4.1.6.3. Farklı kriyojelasyon sıcaklıklarının gözenek morfolojisi ve küre büyüklüğüne etkisi

Tez çalışmasının bu bölümünde, kriyojelasyon sıcaklığının değişimi ile gözenek yapısının ve küre büyüklüğünün değişimi incelenmiştir. Kriyojelasyon sıcaklığı dışındaki işlem değişkenleri sabit tutularak (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), karıştırma hızı: 1000 rpm) kriyojelasyon sıcaklığı -10°C , -16°C ve -24°C olacak şekilde değiştirilmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi reaksiyon sıcaklığının azalması ile gözenek duvarları incelmıştır.

Kitosan çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan sulu asetik asit, kriyojelasyon sırasında işlem sıcaklıklarında dondurulur ve donmuş çözücünün kristalleri gözenek yapıcı olarak görev görür. Kriyojelasyon sıcaklığının artması, çözücü moleküllerini ani bir şekilde donduracağından, çözücü kristallerinin donma sırasında büyümesi ve diğer kristallerle birleşmesi için yeterli zaman sağlanamamıştır. Bu da kriyojelasyon sıcaklığının arttıkça, ortalama gözenek çapının küçülmesine neden olur (Çizelge 4.6). Fang ve ark. (2014), poli(L-glutamik asit) ve kitosanın arasındaki elektrostatik çekim kuvvetinden yararlanarak ürettikleri gözenekli polielektrolit mikrotayıcıların, farklı dondurma sıcaklıklarında gözeneklilik ve gözenek çapını incelemiştir. Benzer olarak, dondurma sıcaklığının arttıkça gözenek çapının azaldığı ortaya koyulmuştur. -15 , -20 , -25 , -54 ve -196°C dondurma sıcaklıklarında üretilen mikrokürelerin gözenek çapları sırasıyla 58.09, 44.98, 21.76, 14.56 ve $1.89\ \mu\text{m}$ şeklindedir.



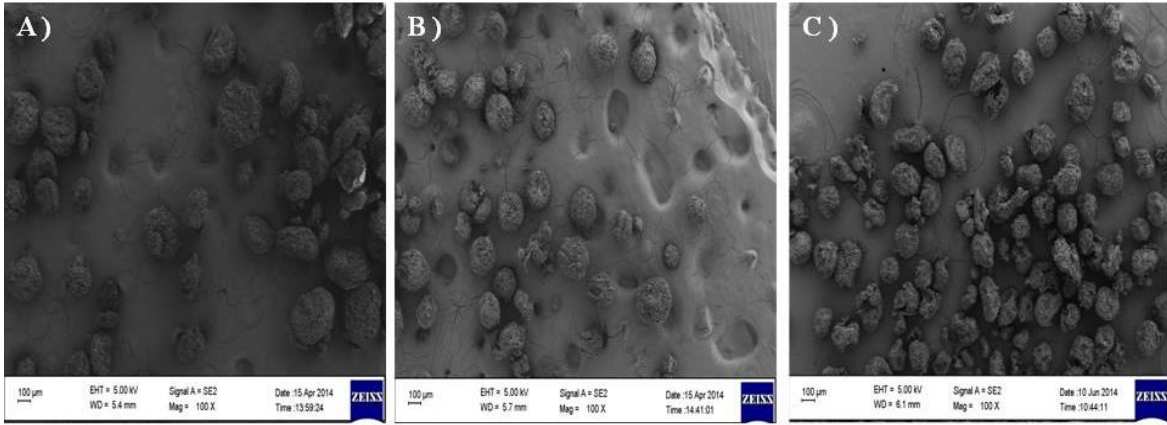
Şekil 4.14. Kriyojelasyon sıcaklığı değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: -10°C, x5000; B: -10°C, x10000; C: -16°C, x5000; D: -16°C, x10000; E: -24°C, x5000; F: -24°C, x10000 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), karıştırma hızı: 1000 rpm)

4.1.6.4. Farklı karıştırma hızlarının küre morfolojisine etkisi

Bu bölümünde, karıştırma hızının değişimi ile gözenek yapısının ve küre büyüklüğünün değişimi incelenmiştir. Karıştırma hızı dışındaki işlem değişkenleri sabit tutularak (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C) karıştırma hızı değiştirilmiştir. Farklı karıştırma hızları mikroküre doku iskeleleri gözenek boyutlarında belirgin bir değişiklik yaratmasa da ortalama küre çapını değiştirmektedir. Bu nedenle mikrokürelerin oluşturulmasında emülsiyonun karıştırma hızının küre boyutu ve şekli üzerine etkisi tartışılmıştır.

Karıştırma, mekanik karıştırıcı ile sağlanmıştır. Mekanik karıştırıcıda 500, 1000 ve 1500 rpm olmak üzere üç ayrı karıştırma hızı uygulanmıştır.

Şekil 4.15'de SEM fotoğrafları verilen mikrokürelerin karıştırma hızı arttıkça küre çaplarının azaldığı görülmektedir. Sırasıyla 500, 1000 ve 1500 rpm karıştırma hızları için hesaplanan ortalama küre çapları; 286.62 ± 37.33 , 260.70 ± 31.38 ve $201.62 \pm 18.74 \mu\text{m}$ ' dir.



Şekil 4.15. Karıştırma hızı değişimi ile gözenek yapısındaki değişimi gösteren SEM fotoğrafları. A: 500 rpm, x100; B: 1000 rpm, x100; C: 1500 rpm, x100 (kitosan konsantrasyonu: %1 (w/v), gluteraldehit konsantrasyonu: %3 (v/v), kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C)

4.1.7. Kriyojel Mikrokürelerin Şişme Davranışı

Kitosan kriyojel mikroküreler çapraz bağlı hidrofilik matrislerdir. Sulu ortamda çözünmez, fakat çapraz bağ derecesine bağlı olarak oluşan gözeneklilik yapısına ve matrisin hidrofilitesine bağlı olarak şişerler. Bu mikrokürelerin sulu ortamlarda hacimsel değişime uğrayıp uğramadıklarının tespiti, doku iskelelerinin uygulama alanlarının belirlenmesinde ve kontrollü salım sistemlerinde kontrol altında tutulması gereken taşıyıcı sistemlerin salım hızları ve salım sürelerinin saptanmasında belirleyici rol oynamaktadır.

Bu çalışmada; küre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin 24 saat 37°C 'de distile su içerisinde dengeye gelmesi için bekletilmesinden sonra gerçekleştirilen şişme testlerinin sonucunda elde edilen denge şişme oranları Çizelge 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de görüldüğü gibi %26.76 - 72.20 arasında değişmektedir. Buna ek olarak küre formunda kitosan hidrojel doku iskelelerinin denge şişme oranı değeri ise %18.30 'dur.

Artan kitosan konsantrasyonu ile çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit konsantrasyonunun sabit kalması, polimerik zincirin çapraz bağlanma noktasını azaltarak, daha gözenekli kriyojel doku iskeleleri elde edilmesini sağlamıştır. Artan kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak artan polimer miktarıyla daha az noktadan bağlanan kitosan, yüksek denge şişme değerlerine olanak vermiştir (Çizelge 4.9) (Thein ve ark., 2009).

Çizelge 4.9. Kitosan konsantrasyonu değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi

Kitosan Konsantrasyonu (% , w/v)	% Denge Şişme Oranı
0.5	38.06
1.0	61.62
2.0	67.00

Sabit kitosan konsantrasyonunda çapraz bağlayıcı ajan miktarının değişmesine bağlı olarak hazırlanan mikrokürelerin (Çizelge 4.10), dengedeki şişme oranlarının gluteraldehit miktarının artması ile azalma gösterdiği kaydedilmiştir. Bu sonucu şöyle açıklamak mümkündür. Bunun en önemli nedeni, çapraz bağlayıcı miktarının artması kriyojeldeki çapraz bağ yoğunluğunun artmasına ve dolayısıyla polimerik yapının daha sert olmasına yol açar. Yoğun çapraz bağların olduğu ortamda suyun difüzyonu zorlaşır ve kriyojelin şişme oranı azalır. Özellikle yapıya gluteraldehit ilavesiyle kitosan polimer zincirinde hidrofilik özellik gösteren serbest amin (-NH₂) gruplarının sayısının bağlanarak azalması, matrisin daha az su molekülü ile etkileşmesine neden olur. Bu da kitosanın hidrofilik amin gruplarının gluteraldehit konsantrasyonunun artışıyla daha çok ve daha güçlü kovalent çapraz bağlanmasına sebep olarak hidrofilikliği azaltarak şişme oranını düşürdüğü sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.10. Gluteraldehit konsantrasyonu değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi

Gluteraldehit Konsantrasyonu (%, v/v)	% Denge Şişme Oranı
1.0	65.62
3.0	61.62
6.0	27.78

Sabit işlem değişkenlerinde ve oda sıcaklığında hazırlanan hidrojel formunda üretilen kitosan mikrokürelerin gözenek boyutlarının ve içsel bağlantılarının göreceli olarak yok denecek kadar az olmasından dolayı şişme oranlarının kriyojel doku iskelelerine göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.11'e bakıldığında oda sıcaklığında üretilen küre formunda hidrojellerin denge şişme oranı kriyojenik koşullarda küre formunda üretilen bir kriyojellere göre daha düşüktür. Hidrojellerin su içinde şişebilmeleri için gereken zaman uzundur. Denge şişme oranının düşük çıkmasının sebebi, su içeriğinin 24 saat içinde henüz dengeye ulaşmadığı düşünülebilir. Bunun en büyük sebebi yoğun polimer zincirlerinin içerisine suyun yavaş bir şekilde difüzyonudur. Hazırlanan hidrojel doku iskelesi en düşük denge şişme oranına sahiptir. Ancak, gözeneklere sahip kriyojellerde şişme daha kısa sürede gerçekleşir. Yüksek gözeneklilik ve gözenek boyutu, matrisin yüzey alanını artırarak içine alabileceği su miktarını arttırmış ve bu sayede şişme oranının artmasına sebep olmuştur (Peter ve ark., 2009).

Çapraz bağlama sıcaklığının denge şişme oranına etkisi incelendiğinde ise, çapraz bağlama süresi arttıkça denge şişme oranı değerlerinin azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.11). Bu durumun reaksiyon sıcaklığı azaldıkça çapraz bağ yoğunluğunun artması ve polimer zincirlerinin hareketliliğinin azalması sonucu gerçekleştiği düşünülebilir.

Çizelge 4.11. Kriyojelasyon sıcaklığı değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi

Kriyojelasyon Sıcaklığı (°C)	% Denge Şişme Oranı
-10	72.20
-16	61.62
-24	31.09
+ 26 (Hidrojel)	18.30

Emülsiyon faz karıştırma hızının denge şişme oranına etkisi incelendiğinde, en iyi şişme optimum seçilen, %1'lik (w/v) kitosan çözeltisinden, 1000 rpm karıştırma hızında hazırlanan mikrokürelerde görülmektedir (Çizelge 4.4). 1500 rpm karıştırma hızında hazırlanan mikrokürelerin, ortalama küre çapı küçüldüğünden suyun gözeneklere oluşması daha zordur. 500 rpm'de ise, ortalama küre çapı daha büyük ve küresellik bozuktur. Bu, 24 saatlik sürenin şişmenin tamamlanması için yeterli olmadığı şeklinde açıklanabilir.

Çizelge 4.12. Karıştırma hızı değişimi ile denge şişme oranlarının değişimi

Karıştırma Hızı (rpm)	%Denge Şişme Oranı
500	28.05
1000	61.62
1500	26.76

Küre formunda üretilen kriyojel doku iskelelerinin belirlenen denge şişme oranlarına göre, canlı dokulara kuru halde implante edildiğinde hızlı bir şekilde vücut sıvılarını emerek boşluğu dolduracaklardır. Bu özellik doku iskelesinin implante edildiği bölgeye fiksasyonunu sağlayacaktır. Ayrıca doku iskelesi üzerine hücre ekilirken de

şışerek hücre süspansiyonunun kriyojel içine alınması, hücrelerin yerleşimini kolaylaştıracaktır.

4.1.8. Zeta Potansiyeli

Hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin zeta potansiyel değerleri Çizelge 4.13'de verilmiştir. Kitosan mikroküre formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri pozitif olarak bulunmuştur. Bu kitosanın çapraz bağlanmamış amino gruplarının protonlanması yani katyonik yapı gösterdiği anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.13. Farklı formülasyonlarda hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin zeta potansiyel değerleri

Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV)
%0.5 Kitosan	+35,21 ± 1.45
%1 Kitosan	+37.31 ± 2.01
%2 Kitosan	+53.20 ± 2.52
%1 Gluteraldehit	+39.86 ± 1.90
%3 Gluteraldehit	+37.31 ± 2.01
%6 Gluteraldehit	+31.18 ± 0.90
500 rpm	+37.30 ± 2.01
1000 rpm	+37.31 ± 2.01
1500 rpm	+36.67 ± 3.22
- 10°C	+38.33 ± 1.39
-16°C	+37.31 ± 2.01
- 24°C	+27.96 ± 2.70

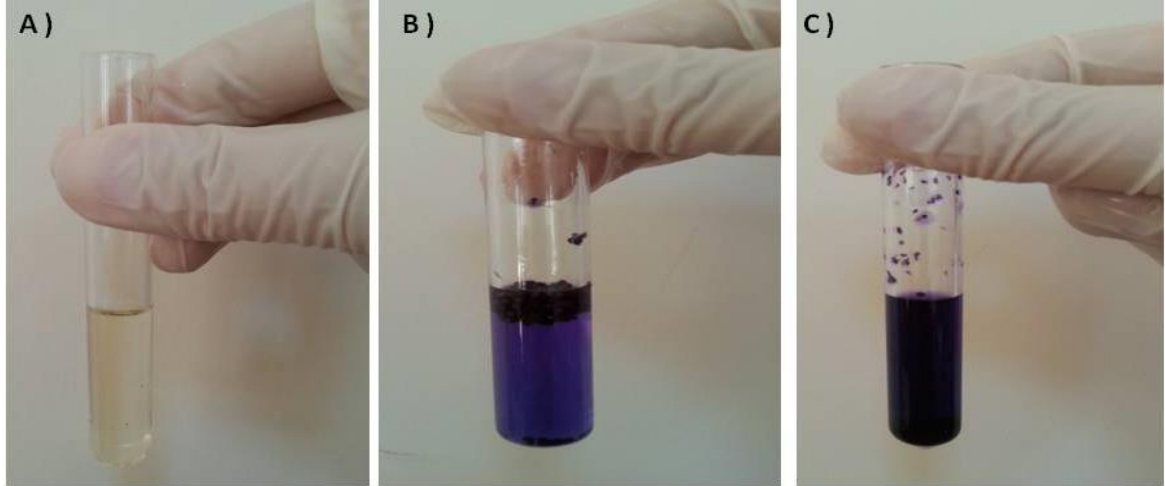
Zhang ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada galaktoz gruplarını kitosanın amin gruplarıyla birleştirerek yani fiziksel çökeltme ve koaservasyon yöntemlerini sırasıyla uygulayarak galaktozilat kitosan mikroküreleri sentezlemişlerdir. Galaktozilat kitosan mikroküreleri sırasıyla 0.54 ile 1.05 µm aralığında ortalama çapa ve +15 ile +17 mV arasında ortalama zeta potansiyeline sahip küresel mikrokürelerdir; pasif ve aktif peptik hedefleme için kullanılacağı ileri sürülmüştür.

He ve ark. (1999), püskürterek kurutma yöntemi hazırladıkları çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan kitosan mikrokürelerin küresel ve düzgün yüzeyli olduklarını saptamışlardır. Pozitif yüklü mikrokürelerin partikül büyüklüklerinin 2 - 10 µm olduğu, partiküllerin büyüklükleri ve zeta potansiyellerinin çapraz bağlama düzeyinden etkilendiği, çapraz bağlama ajanı miktarının azalması ile hem partikül boyutunun hem de zeta potansiyelin arttığını saptamışlardır.

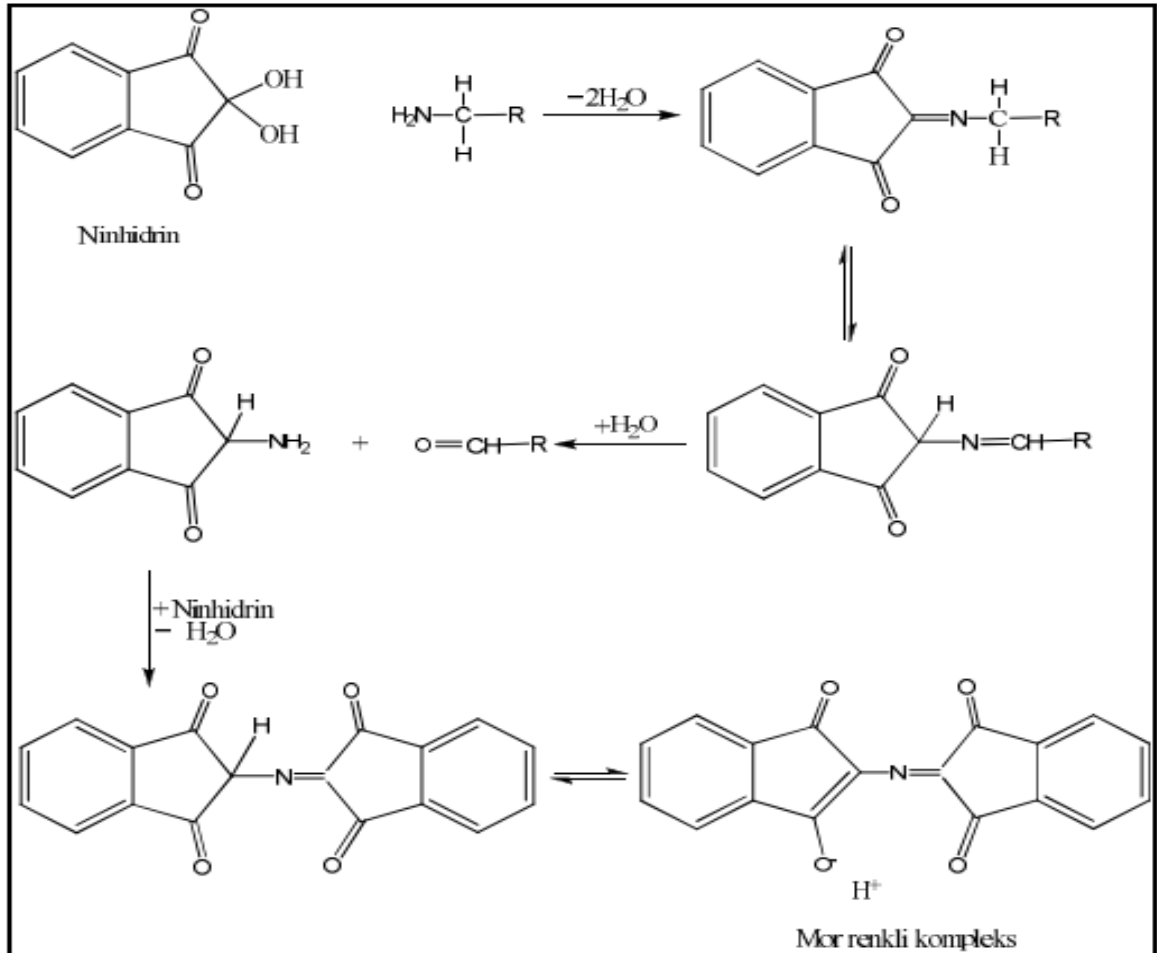
4.1.9. Kitosan Mikrokürelerin Glutaraldehit ile Çapraz Bağlanması Sonrasında Kalan Serbest Amino Gruplarının Tayini

Kitosanın glutaraldehit ile kriyojenik koşullarda çapraz bağlanması işlemi sonunda kitosanın, glutaraldehitin aldehit gruplarına bağlanan amin gruplarının miktarı ($-NH_2$ gruplarının miktarı) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bunun için öncelikle $-NH_2$ gruplarının belirlenmesi için farklı derişimlerde glisin kullanılarak standart oluşturulmuştur. Çapraz bağlanmamış kitosan yüzeyindeki $-NH_2$ grubu miktarı standart glisin grafiği kullanılarak bulunmuştur (Alptekin Ö., 2009).

Kitosan mikroküreler, Su/Yağ emülsiyonu kimyasal çapraz bağlama yöntemi ile glutaraldehit ile kriyojenik koşullarda muamele edilmiştir. Glutaraldehit muamelesinden sonra çapraz bağlanan mikroküreler, reaksiyona girmemiş glutaraldehit uzaklaşmaya kadar yıkanmıştır. Kitosana etkileşmeden ortamda kalan glutaraldehitin uzaklaştırılmasından sonra kitosan mikrokürelerde bulunan serbest $-NH_2$ miktarı ölçülmüştür. Şekil 4.17'de reaksiyonu verilen ninhidrin ve kitosana ait serbest amino grupları mavi - mor renkli bir kompleks oluşturur. Kitosanda serbest halde bulunan amino grupları azaldıkça, ninhidrin ile oluşan kompleksin rengi açılmaktadır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Ninhidrinin -NH₂ grubu ile verdiği mavi-mor kompleks. A: Saf ninhidrin çözeltisi, B: Çapraz bağlanmış mikrokürelerin ninhidrin ile verdiği kompleks (açık mavi), C: Çapraz bağlanmamış kitosanın ninhidrin ile verdiği kompleks (mavi - mor)



Şekil 4.17. Ninhidrinin -NH₂ grubu ile verdiği reaksiyon.

Küre formunda kitosan kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma dereceleri %38.32 ile %72.45 aralığında değişmektedir (Çizelge 4.14). Bu bize gluteraldehitin, düşük konsantrasyonlarda bile kitosan için uygun bir çapraz bağlayıcı olduğunu göstermektedir. Farklı formülasyonlarda hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma dereceleri incelendiğinde, kitosan konsantrasyonu artışıyla çapraz bağlanma derecesinin azaldığı görülmektedir. Bu, ninhidrinin reaksiyona girerek renk dönüşümünü sağlayacak serbest amino gruplarının sayısının, kitosan konsantrasyonu artışıyla arttığını göstermektedir. Sabit işlem basamaklarında, kriyojelasyon sıcaklığı ve karıştırma hızının değişiminde mikrokürelerin çapraz bağlanmasında, önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çizelge 4.14. Farklı formülasyonlarda hazırlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma değerleri

Formülasyon	Çapraz Bağlanma Derecesi
%0.5 Kitosan	%72.45
%1 Kitosan	%63.48
%2 Kitosan	%38.32
%1 Gluteraldehit	%38.36
%3 Gluteraldehit	%63.48
%6 Gluteraldehit	%70.82
500 rpm	%61.80
1000 rpm	%63.48
1500 rpm	%60.89
- 10°C	%67.34
-16°C	%63.48
- 24°C	%56.78

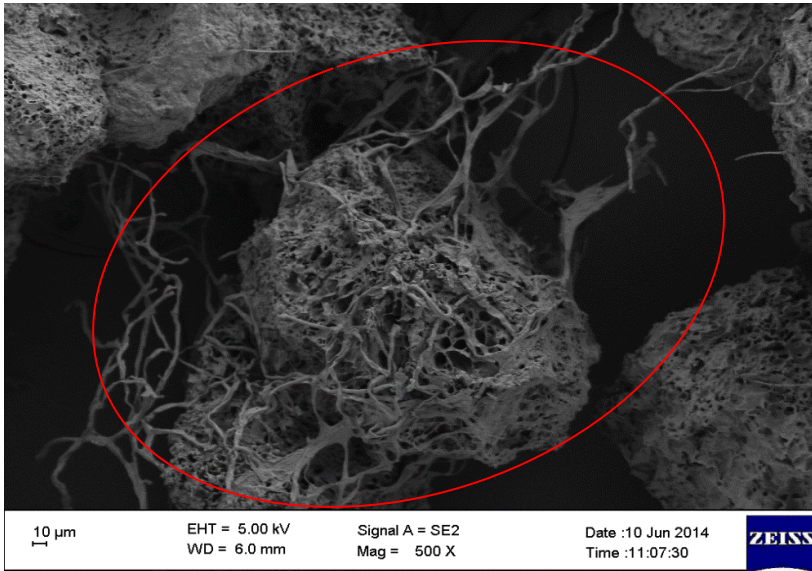
Benzer olarak, Yan ve ark. (2010), genipin ile çapraz bağlayarak ürettikleri kitosan/kolajen doku iskelelerinin çapraz bağlanma derecelerinin %63.93 ile %74.14 aralığında değiştiğini göstermişlerdir. Bunun bir sonucu olarak, çapraz bağlanma

noktalarının miktarının direk olarak üretilen doku iskelelerindeki serbest amino gruplarının miktarı ile ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır.

4.1.9. Kriyojel Mikrokürelerin İn Vitro Degradasyonu

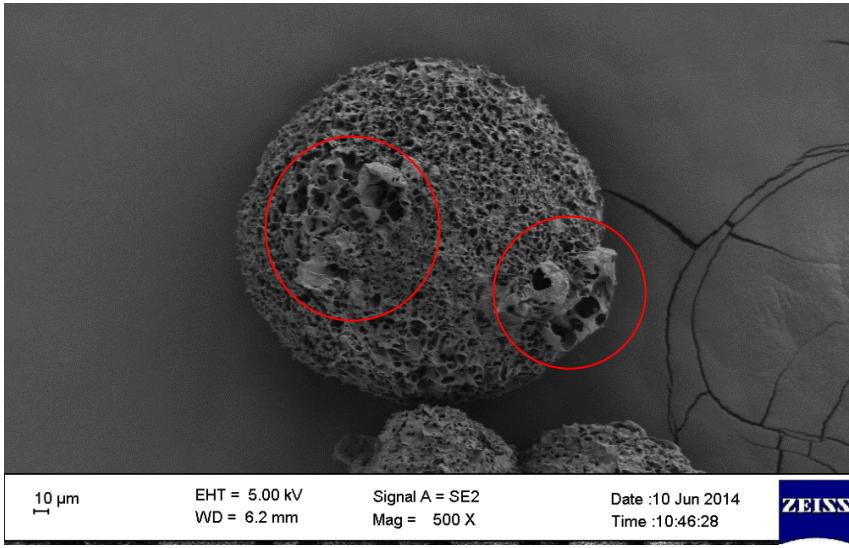
Kriyojellerin in vitro degradasyonu, distile su ile 37°C sıcaklıkta, su banyosunda 30 gün süre ile izlenmiştir. Kriyojel örnekleri sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur, 5 mL distile su içeren erlenlere konulmuştur. Kriyojel doku iskelelerine uygulanan degradasyon çalışması sonuçları SEM görüntüleri ile ifade edilmiştir.

Kitosan konsantrasyonu, karıştırma hızı ve kriyojelasyon sıcaklığı parametrelerinin incelendiği farklı deney gruplarından, 30 gün süre ile en fazla degrede olan örnekler seçilerek, SEM görüntüleri sunulmuştur (Şekil 4.18., 4.19. ve 4.20). Thein ve ark. (2009), kitosanın hidrofilik -NH₂ gruplarının (sabit çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda) kitosan konsantrasyonunun artışıyla artmasının hidrofiliği artırarak şişme oranını arttırdığı, şişme oranı yüksek olan kriyojellerin daha hızlı degrede olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer bir şekilde, -10°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen ve en yüksek şişme oranına sahip (%72.20) mikrokürelerin hızlı bir şekilde degradasyonunun başladığı görülmektedir (Şekil 4.18).



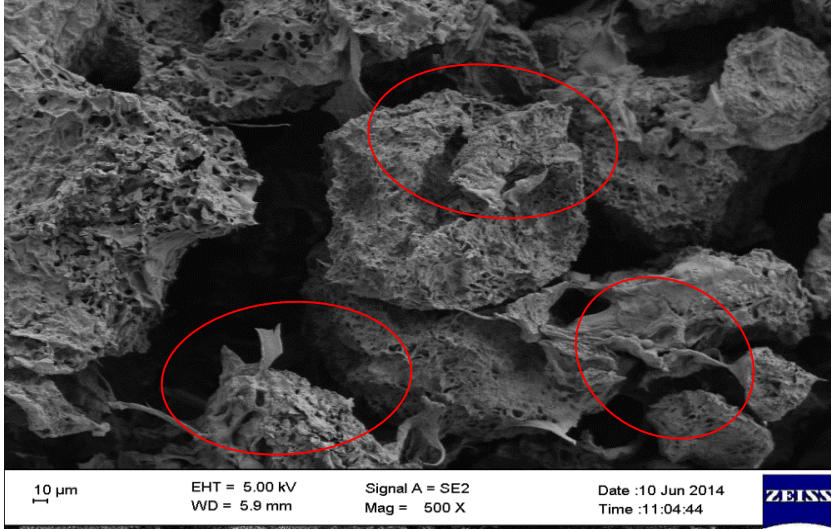
Şekil 4.18. Kriyojelasyon sıcaklığı -10°C olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v, Gluteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Karıştırma hızı: 1000 rpm)

Kitosan konsantrasyonu değişiminin incelendiği deney grubu içinde, %1 (w/v) kitosan konsantrasyonunda hazırlanan mikrokürelerin degradasyonu, küre yüzeylerinde görülen kabarma ve patlaklarla başlamıştır (Şekil 4.19). %0.5 (w/v) kitosan konsantrasyonunda hazırlanan küreler ise şekillerini korumuştur. Bu, kitosanın serbest amin ve glutraldehitin aldehit grupları arasındaki çapraz bağlanmış kovalent bağın kuvvetinin ve çokluğunun (Çapraz bağlanma derecesi: %72.45) bir göstergesi olarak, kitosanın suda daha uzun sürede hidrolize olarak geç degrede olmasına sebep olmaktadır (Tae, 1995).



Şekil 4.19. Kitosan konsantrasyonu %1 (w/v) olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C, Glutraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Karıştırma hızı: 1000 rpm)

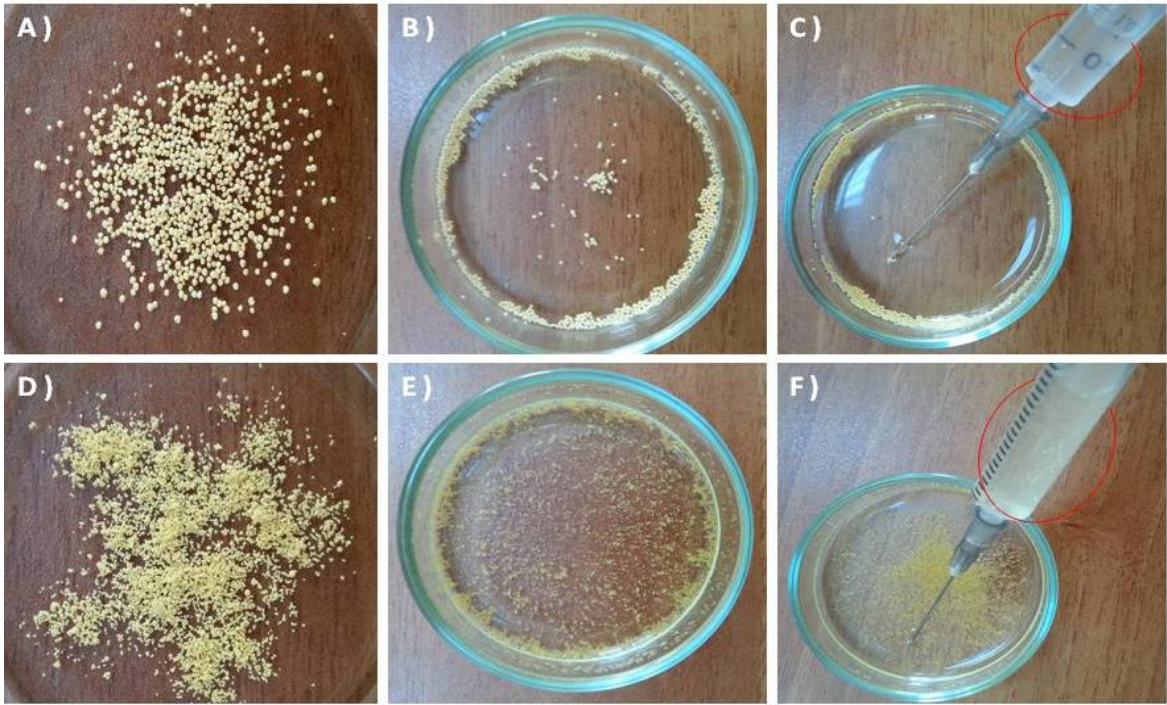
Karıştırma hızının etkisi incelenirse, özellikle 500 rpm gibi düşük karıştırma hızlarında üretilen mikrokürelerin küre duvarlarında belirgin kopmalar meydana gelmesede, küresel yapıları tamamen bozulmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Karıştırma hızı 500 rpm olan mikrokürelerin degradasyonu, x500 büyütme. (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C , Gluteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)

4.1.11. Enjekte Edilebilir Kriyojel Mikroküreler

Tez çalışmasının amacı; üretim verimi, gözenek buyutu, şişme oranı, degradasyonu, küre çapı kontrol edilebilen küre formunda enjekte edilebilir kitosan kriyojel mikroküreler üretmektir. Maksimum küre çapına sahip %2 ve optimum olarak seçilen %1 kitosan konsantrasyonu ile hazırlanmış mikrokürelerin şişmiş halde enjeksiyonunun sağlanıp sağlanmadığı incelenmiştir. Kuru halde $581.80 \pm 47.76 \mu\text{m}$ ortalama küre çapına sahip, %2 (w/v) konsantrasyonlu kitosan mikroküreler bir gece boyunca distile suyla muamele edilerek şişmeleri sağlanmıştır (Şekil 4.21.A ve B). Fildişi renk, iç çapı 0.75 mm, 19 G, iğne ucuna sahip basit bir enjektör ile yapılan denemede, şişmiş halde bulunan mikroküreler iğne ucundan geçmemiştir. Aynı işlemler 220.11 ± 25.58 ortalama küre çapına sahip %1 (w/v) konsantrasyondaki kitosan mikroküreler içinde yapılmıştır (Şekil 4.21.D, E ve F). Şişmiş halde bulunan bu mikroküreler kolaylıkla iğne ucundan geçmiştir. Bu, küre formunda üretilen kitosan kriyojel doku iskelelerinin enjekte edilebilir sistemler olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. Mikroküre enjeksiyonu A, B, C: %2 (w/v) Kitosan konsantrasyonu; D, E, F: %1 (w/v) Kitosan konsantrasyonu (Kriyojelasyon sıcaklığı: -16°C , Gluteraldehit konsantrasyonu: %3, v/v, Kitosan konsantrasyonu: %1, w/v)

Bu denemeler, küre formunda üretilen kitosan kriyojel doku iskelelerinin enjekte edilebilir sistemler olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Mikroküre formunda enjekte edilebilir kitosan kriyojel doku iskeleleri

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doku mühendisliği; sentetik veya biyolojik doku iskeleleri içinde hücrelerin, büyüme faktörleri ve hormonlar ile birlikte bulunduğu yapıların, hastalık ya da travma sonucu kaybedilen veya hasar görmüş dokuların yerine yerleştirilmesi ile bu dokuları yeniden oluşturulabilmeyi hedeflemektedir.

Doku onarımı için doku mühendisliği yaklaşımı en önemli alternatif olarak görülmektedir. Burada doku içindeki boşluğu doldurması ve yeni doku oluşumuna rehberlik etmesi için doğal veya sentetik polimerlerden yapılan gözenekli doku iskeleleri kullanılır. İdeal bir doku iskelesi gözenekli, biyobozunur, biyouyumlu, mekanik özellikler açısından hedeflenen dokuya benzer olmalıdır. Bu özellikleri büyük oranda taşıyan mükemmel doku iskelesi halen üretilmemiştir. Bunun için yeni malzemelerin ve üretim şekillerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Geliştirilmesi gereken en önemli problem, doku iskelesinin hasarlı bölgeye implantasyonu sırasında, hastaya minimum cerrahi etki ile yaklaşmaktır. Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında enjekte edilebilirliğe uygun doku iskelelerinin üretimi yaklaşımı benimsenmiştir.

Bu bilgiler ve doku mühendisliği alanında geliştirilmekte olan materyallerin bilimsel ve ekonomik değeri göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde bu malzemelerin üretilebilir duruma getirilmesi çok büyük önem sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, doğal bir polimer olan kitosandan, Su/Yağ tipi emülsiyon faz ile mikroküre formunda partiküller üretilerek; bu mikroküreler kriyojelasyon tekniği kullanılarak glüteraldehit ile kimyasal çapraz bağlama yöntemi ile kombine edilmiş ve üretilen kriyojel mikrokürelerin karakterizasyonu yapılmıştır. Literatürde Su/Yağ tipi emülsiyon faz oluşturularak üretilen kitosan mikrokürelerin kriyojenik koşullarda çapraz bağlanarak üretiminin tamamlandığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Kitosan, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri göz önüne alınarak temel polimer olarak seçilmiştir. Farklı kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin, viskozite değerleri ölçülmüştür. Kitosan miktarı arttıkça, çözelti viskozitesi artmıştır. Üretilen mikrokürelerde ürün verimi %49.50 – 96.37 aralığında değişmiştir.

FT - IR analizi ile; kitosanın 1639 ve 1560 cm^{-1} de polimer zincirinde bulunan Amit I ve Amit II grubuna ait karakteristik piklere sahip bir protein olduğu, kitosanın

gluteraldehit ile çapraz bağlanmasıyla moleküler yapısında değişiklikler meydana geldiği ve bunun 1064, 1062 ve 1072 cm^{-1} band aralığında görülen ve kitosana ait karakteristik piklerden biri olan C=O bandına ait titreşimlerde meydana gelen azalma ile tespit edilmiştir.

Bu çalışmada; üretilen tüm küre formunda kitosan kriyojeller %26.76 - 72.20 aralığında şişme özelliğine sahiptir. Gluteraldehit konsantrasyonu %3 (w/v) 'de sabit iken kitosan konsantrasyonu arttığında şişme oranı da artmıştır. Kitosan konsantrasyonu %1 'de sabit iken, gluteraldehit konsantrasyonu arttığında şişme oranı azalmıştır. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artması, kitosanın daha çok ve daha güçlü kovalent çapraz bağlanmasına sebep olarak, hidrofilikliğini azaltarak şişme oranını düşürmüştür.

Küre formunda üretilen kitosan kriyojel doku iskelelerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. %0.5, 1, 3 (w/v) kitosan konsantrasyonlarında hazırlanan mikrokürelerin SEM görüntülerinden, kitosan konsantrasyonu arttıkça gözenek çapının küçüldüğü, ortalama küre çapının ise arttığı görülmektedir. Gluteraldehit konsantrasyonu artışıyla, küre çaplarında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Enjekte edilebilirliğe uygunluk açısından, mikroküreler için en önemli parametre ortalama küre çapıdır. Üretilen mikrokürelerde, ortalama küre çapı 197.72 ± 23.9 ile 581.80 ± 47.76 aralığında değişmiştir.

Kitosan konsantrasyonu, gluteraldehit konsantrasyonu, karıştırma hızı ve kriyojelasyon sıcaklığının etkisinin incelenmesi üzerine farklı tipte üretilen kriyojel mikrokürelerin çapraz bağlanma dereceleri ve yüzey yükleri belirlenmiştir. Çapraz bağlanma derecesinin artması serbest halde bulunan amin gruplarının sayısının azaldığının göstergesidir. Buna paralel olarak, amin gruplarının neden olduğu pozitif yüzey yüklerininde artış görülmüştür.

Kitosan çözeltilisinin viskozitesinin uygunluğu, küresel yapının sağlanabilmesi, üretim veriminin yüksek olması ve ortalama küre çapının küçük olması (doku iskelelerinin enjekte edilmeye uygunluğu) açısından, kitosan ve gluteraldehit çözeltilerinin optimum üretim konsantrasyonlarının, sırası ile %1 (w/v) ve %3 (v/v) olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, mikroküre formunda üretilen kitosan kriyojel doku iskelelerinin şişebilme davranışları, hidrojel mikrokürelerle karşılaştırıldığında birbiri ile bağlantılı gözenekli yapılarına ek olarak in vitro degrede olabilmeleri, biyomedikal uygulamalarda

özellikle kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve enjekte edilebilir doku iskeleleri olarak kullanılabileceğinin göstergesidir.

KAYNAKLAR

- Alptekin Ö., "Katalazın euperjit, florisil ve cam desteklere kovalent olarak immobilizasyonu ve karakterizasyonu", Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2009).
- Anthony F., Yapel J., "Albumin microspheres: Heat and chemical stabilization, Methods in Enzymology, 7: 112-118, (1985).
- Antonio L., Damia M., Matthew B., Abhishek G., Sabine C. P., James H., " Photochemical tissue bonding with chitosan adhesive films", BioMedical Engineering OnLine, 9(47), (2010).
- Anuj T., Haider S., Seema R. J., Maria V., Natalia Z., Göran N., Hans J., Ashok K., " Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production", Enzyme and Microbial Technology, 5: 44-47, (2010).
- Baykara T., Yüksel N., "The Preparation of Prolonged Action Formulations in the Form of Semi Solid Matrix into Hard Gelatin Capsules of Oxprenolol, I- Thermocap Method", Drug. Dev. Ind. Pharm., 17(9): 1215-1227, (1991).
- Bayramoğlu G., "İzosiyanatoetil Metakrilat Modifiye, Biyoparçalanabilir, Enjekte edilebilir, Uv Işınları ile Hazırlanan Biyopolimerlerin Sentezi ve Hücre Kültür Çalışmaları", Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2009).
- Bereli N., Andaç M., Baydemir G., Say R., Galaev I.Y., Denizli A., "Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels", J. Chrom. A, 1190-18, (2008).
- Bölgen N., "Hema-Laktat-Dekstran Kriyojellerin Üretimi ve Doku Mühendisliğinde Uygulamaları", Hacettepe Üniversitesi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2008).

- Bölgen N., Vargel İ., Korkusuz P., Güzel E., Plieva F., Galaev I., Matiasson B., Pişkin E., "Tissue responses to novel tissue engineering biodegradable cryogel scaffolds: An animal model", Wiley InterScience, (2008).
- Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F., "Biomaterial developments for bone tissue engineering", Biomaterials, 21: 2347-2359, (2000).
- Capdevila M., Maestro A., Porras M., Gutiérrez J.M., "Preparation of Span 80/oil/water highly concentrated emulsions: Influence of composition and formation variables and scale-up", Journal of Colloid and Interface Science, 345(1): 27-33, (2010).
- Chantal E. H., Molly S. S., John E. D., " Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period", J Biomed Mater Res., 51(3): 376-82, (2000).
- Choong C., Triffitt J.T., Cui Z.F., "Polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering effects of a calcium phosphate coating layer on osteogenic cells", Food and Bioproducts Processing, 82: 117-125, (2004).
- Ciofani G., Raffa V., Mencias A., Cuschieri A., Micera S., "Magnetic alginate microspheres: system for the position controlled delivery of nerve growth factor", Biomedical Microdevices, 11: 517-527, (2009).
- Correia C., Bhumiratana S., Yan L., Oliveira A., Gimble J., Rockwood D., Kaplan D., Sousa R., Reis R., Vunjak-Novakovic G., "Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells", Acta Biomaterial, 8(7): 2483-2492, (2012).
- Dağlı Durukan M., "Mikrodalga-destekli kitosan/hidroksiapatit doku iskelesi üretimi ve in-vitro kemik doku mühendisliği", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2012).
- Deliloğlu Gürhan İ., Özen Ö., Sözer P., Lülecı İ., "Kök Hücreler ve Doku Mühendisliği", Sağlıkta Birikim Dergisi, 1(5): 143-168, (2009).

- Dini E., Alexandridou S., Kiparissides C., "Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications", *Journal of Microencapsulation*, 20(3): 375–385, (2003).
- Doğan G., Başal G., Elektrolif Çekim Yöntemine Göre Elde Edilen Biyopolimer Nanoliflerin İlaç Salınım Sistemleri, Yara Örtüsü ve Doku İskelesi Olarak Kullanımı, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2): 58-70, (2009).
- Eghbalilalehbolaghi E., "Yara iyileştirmeye yönelik fonksiyonel biyopolimerlerin hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2013).
- Esirgen S., "Kitosan mikrokürelerden etkin madde salımını etkileyen parametrelerin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (2007).
- Fang J., Zhang Y., Y. Shifeng, Liu Z., He S., Cui L., Yin J., " Poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration", *Acta Biomaterialia*, 10: 276–288, (2014).
- Frank W. K., "NTP Technical Report on Toxicity Studies of Glutaraldehyde", United States Department of Health and Human Services Public Health Service National Institutes of Health, (1993).
- Genta I., Costantinib M., Asti A., Conti B., Montanarib L., "Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres", *Carbohydrate Polymers*, 36: 81-88, (1998).
- Gönül N., "Diltiazem Hidroklorür Yüklenmiş Mikrokürelerin Modifiye / Kontrollü Salım Yapan Tablet Formülasyonlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi", Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, (2004).

- Gupta K.C., Jabrail F.H., " Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres", *Carbohydrate Polymers*, 66(1): 43–54, (2006).
- Gümüşderelioğlu M., Maviş B., Karakeçili A., Kahraman A. S., Cakmak S., Tıgılı S., Demirtaş T., Aday S., "Doku Muhendisliğinde Nanoteknoloji", *Bilim ve Teknik Yeni Ufuklar*, (2007).
- Gürsoy A.Z., "Kontrollü Salım Sistemleri", *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*, İstanbul, (2002).
- Hasırcı V., Lewandrowski K., Gresser J.D., Wise D.L., Trantolo, D.J., "Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application", *Journal of Biotechnology*, 86: 135–150, (2001).
- He P., Davis S. S., Illum L., "Chitosan microspheres prepared by spray drying", *Int J Pharm*, 87: 53-65, (1999).
- Huang C., Wei H., Yeh Y., Wang J., Lin W., Lee T., Hwang S., Choi S., Xia Y., Chang Y., Sung H., "Injectable PLGA porous beads cellularized by hAFSCs for cellular cardiomyoplasty", *Biomaterials*, 33(16): 4069-4077, (2012).
- Huang L.C., Chang W.H., Lin K.J., Sung H.W., " Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies", *J Biomed Mater Res A.*, 65(2): 271-82, (2003).
- Huss F.R., Junker J.P., Johnson H., Kratz G., "Macroporous gelatine spheres as culture substrate, transplantation vehicle, and biodegradable scaffold for guided regeneration of soft tissues: In vivo study in nude mice" *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, 60(5): 543-55, (2007).
- Jianjun F., Yun Z., Shifeng Y., Zhiwen L., Shiming H., Lei C., "Poly(l-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration", *Acta Biomaterialia*, 10(1): 276–288, (2014).

- Kang S.W., Jeon M.S., Kim B.S., "Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres as an Injectable Scaffold for Cartilage Tissue Engineering", *Tissue Eng.*, 11(3): 438-447, (2005).
- Kathuria N., Tripathi A., Kamal K., Kumar A., "Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, 5: 406–418, (2009).
- Kumar A., Bansal V., Nandakumar K.S., Galaev I.Y., Roychoudhury P., Holmdahl R., Mattiasson B., "Integrated Bioprocess for the Production and Isolation of Urokinase from Animal Cell Culture using Supermacroporous Cryogel Matrices", *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4), (2006).
- Küçükbalcı G., "Sıcaklık ve pH Duyarlı Aljinat Bazlı Mikrokürelerin Tasarımı ve İndometasin Salımında Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011).
- Lalehbolaghi E., "Yara iyileştirmeye yönelik fonksiyonel biyopolimerlerin hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2013).
- Langer R. and Folkman J., "Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules", *Letters to Nature*, 263: 797-800, (1976).
- Lee K.Y. and Mooney D. J., "Hydrogels for Tissue", *Chemical Reviews*, 101(7), (2001).
- Lee S.H., Shin H., "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 339–359, (2007).
- Lee, J., Kaibara M., Sasabe I., Suzuki Y., Kusakabe M., "Selective adhesion and proliferation of cells on ion-implanted polymer domains", *Biomaterials*, 14: 71-93, (1993).

- Li F., Li J., Zhang S.S., "Molecularly imprinted polymer grafted on polysaccharide microsphere surface by the sol-gel process for protein recognition", *Talanta*, 74: 1247–1255, (2008).
- Lozinsky V.I., Faleev N. G., Zubov A. L., Ruvinov S. B., Antonova T. V., Vainerman E. S., Belikov V. M., Rogozhin S. V., " Use of PVA-cryogel entrapped *Citrobacter intermedius* cells for continuous production of 3-fluoro-L-tyrosine", *Biotechnology Letters*, 11(1): 43-48, (1989).
- Luis S., Christopher Z., Amanda W. L., Megan J. F., Jan P.S., "Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors", *J Tissue Eng Regen Med.*, 4(7): 514–523, (2010).
- Maia J.L, Santanal M. A., Ré M.I., " The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process", *Braz. J. Chem. Eng.*, 21(1), (2004).
- Mohammad R. K., Joseph A., Ge' rard C., "Intrinsic Viscosity–Molecular Weight Relationship for Chitosan", *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 38: 2591–2598, (2000).
- Narayan B., Jonathan G., Miqin Z., " Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1): 83-99, (2010).
- Nazemi K., Moztarzadeh F., Jalali N., Asgari S., Mozafari M., "Synthesis and Characterization of Poly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles-Loaded Chitosan/Bioactive Glass Scaffolds as a Localized Delivery System in the Bone Defects", *BioMed Research International*, 2014: 9 pages, (2014).
- Neeraj K., Anuj T., Kamal K.K., Ashok K., "Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, 5(1): 406-418, (2009).
- Nicol S., "Life after death for empty shells", *New Science*, 129: 46-48, (1991).

- Oliveira B.F., Santana I. M.A., Ré M.I., "Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization", *Braz. J. Chem. Eng.*, 22(3), (2005).
- Peppas N.A., Mikos A.G., "Preparation methods and structure of hydrogels", *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, 1(27), (1986).
- Peter X. Ma., "Scaffolds for Tissue Fabrication", *Materials*, 35-38, (2004).
- Plieva F.M., Karlsson M., Aguilar R., Gomez D., Mikhalovsky S., Galaev I.Y., "Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels", *Soft Matter.*, 1: 303-309, (2005).
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Cryogel applications in microbiology. *Trends in Microbiology*, 16(11): 543-551, (2008).
- Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R., "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 27(18): 3413-3431, (2006).
- Ringe J., Kaps C., Burmester GR., Sittinger M., "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs", *Naturewissenschaften*, 89: 338-351, (2001).
- Sarang S., Dhirendra S., Shibani G., Vivek S., "Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(1): 309-315, (2014).
- Schiffman J., Schauer C., "One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers", *Biomacromolecules*, 9: 2665, (2007).
- Schmidt C., Lamprecht A., "Nanocarriers in Drug Delivery-Design, Manufacture and Physicochemical Properties", Pan Stanford Publishing, (2009).

- Sinha V., Singla A., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S., "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs", *Int J Pharm.*, 15(274): 11-33, (2004).
- Subrata D., Sora S., Alexandar S., Young K., Byong T., " Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration", *International Journal of Pharmaceutics*, 443: 87-94, (2013).
- Tae G. P., "Degradation of poly(lactic-co-glycolicacid) microspheres: effect of copolymer composition", *Biomaterials*, 16: 1123-1130, (1995).
- Taşkın M. and Gür K.A., "Metalik Biyomalzemeler ve Biyouyum", *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, (2004).
- Thein H. and Misra R. D. K., "Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol:5, Page: 1182-1197, (2009).
- Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioǧlu, M., "In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(9): 1665-1674, (2007).
- Vacanti J.P. and Langer R., "Tissue engineering: the design and fabrication of Living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation", *Lancet*, 354: 32-36, (1999).
- Yan L.P., Wang Y., Ren I., Wu G., Sofia G. C., Jia-Bing F., Wang L., Pei Hong J., Joaquim M.O., " Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications", *Journal of Biomedical Materials Research*, 95(2), (2010).

Yuan Y., Chesnutt B.M., Utturkar G., Haggard W.O., Yang Y., Ong J.L., Bumgardner J.D., " The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release", *Carbohydrate Polymers*, 68: 561–567, (2007).

Yong Q. and Kınam P., "Environment-sensitive polymer hydrogels", *J. Adv. Drug Del. Rev.*, 53: 321-339, (2001).

Zhang H., Oh M., Allen C., "Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery", *Biomacromolecules*, 5: 2461-8, (2004).

Zhensheng L., Hassna R. R., Kip D. H., Demin X., Miqin Z., "Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 26(18): 3919-3928, (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Didem DEMİR

Doğum Tarihi: 19/09/1988

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen-Matematik	75. Yıl Cumhuriyet Lisesi (Y.D.A)	2002-2006
Lisans	Kimya Mühendisliği	Fırat Üniversitesi	2007-2011
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2011 - Devam ediyor

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Stajyer	Levent Kimya A.Ş. (Antalya)	08.2009
Stajyer	Ado Çim Çimento Beton Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Antalya)	08.2010
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü	2011- Devam ediyor

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Çayırhan Linyiti ile Ceviz Ağacı Odunun Birlikte Yakılması, Fırat Üniversitesi, 2011. (Bitirme Projesi)
2. Demir, D., Kılıç, Ö., Taşar, Ş., Duranay, N., Yılğın M., "Çayırhan Linyiti ve Ceviz Odununun Birlikte Yakılması", VI. Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu (Yeks), 21-22 Ekim 2011, Kayseri. (Bildiri, Sunum)
3. Vaseashta A., Demir D., Bolgen N., " Removal of Antibiotics from Wastewater by Using Polymeric Cryogels" , NATO Advanced Research Workshop, Technological Advances in CBRNE Sensing and Detection for Safety, Security, and Sustainability, Yerevan, Armenia, 2012. (e- poster sunumu)
4. Vaseashta A., Demir D., Yıkar E., Bolgen N., "Electrospun Nanofibrous Membranes for Removal of Antibiotics from Wastewater", NATO Advanced Research Workshop Technologies Advances in CBRNE Sensing and Detection for Safety, Security and Sustainability, Yerevan, Armenia, Sept. 29-01 2012. (e-poster sunumu).
5. Bolgen N., Demir D., Vaseashta A., "Development of Polymeric Cryogels as Potential Matrices for Removing Antibiotics from Wastewater", Advanced Sensors for Safety and Security NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics 2013, syf 243-249. (Kitapta Bölüm)
6. Bolgen N., Demir D., Vaseashta A., "Synthesis of Chitosan and Gelatin Cryogels for Antibiotic Removal from Wastewater", NANOSMAT, Granada, Spain, Eylül 22-25 2012. (Bildiri, Poster)
7. Demir D., Bolgen N., Vaseashta A., "Nanofibers for Detection of VOCs", NATO Advanced Study Institute on Nanoscience Advances in CBRN Agents Detection, Information and Energy Security, Sozopol, Bulgaria, 29.05-06.06.2014, syf 36. (Bildiri, Poster/Sunum)