

**ELEKTROSPİNNİNG YÖNTEMİ İLE  
JELATİN/KİTOSAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ,  
BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE  
KAPLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**ESRA YIKAR**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERSİN  
HAZİRAN – 2013**

**ELEKTROSPİNNİNG YÖNTEMİ İLE  
JELATİN/KİTOSAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ,  
BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE  
KAPLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**ESRA YIKAR**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

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

**MERSİN  
HAZİRAN – 2013**


Esra YIKAR tarafından Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE danışmanlığında hazırlanan “Elektrospinning Yöntemi ile Jelatin/Kitosan Nanofiberlerin Üretimi, Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

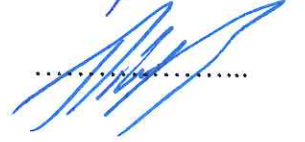
Prof. Dr. T. Koray PALAZOĞLU



Doç.Dr. Bahadır K. KÖRBAHTİ



Yrd.Doç.Dr. Nimet KARAGÜLLE



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30/07/2013 tarih ve 2013.14/428 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN  
Enstitü Müdürü



# ELEKTROSPİNNİNG YÖNTEMİ İLE JELATİN/KİTOSAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ, BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE KAPLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Esra YIKAR

## ÖZ

Bu tez çalışmasının amacı, özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, jelatin ve jelatin/kitosan çözeltilerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin elektrosinning metodu ile üretilmesi, biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonudur. Çözücü olarak asetik asit, formik asit ve diklorometan (1/7/2, hacim oranı) sisteminin kullanıldığı, çözeltiliye uygulanan voltajın 13 kV ve polimer çözeltisini içeren şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklığın 10 cm olarak sabit tutulduğu ve besleme hızının 0,3 ml/h olduğu sistemde jelatin polimerinin konsantrasyonu %15 - 30 aralığında değiştirilerek (%15, %20, %25, %30) elektrosinning yöntemi ile nanofiberleri içeren doku iskeleleri üretilmiştir. Ayrıca toplam konsantrasyon içerisinde jelatin ve kitosan yüzdeleri 25 ve 5 olacak şekilde ayarlanarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskeleleri 3 gün boyunca glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış ve 3, 6, 18, 30 saat zaman aralıklarında sentetik vücut sıvısı içerisinde bekletilerek biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanmışlardır. 0,3 ml/h ve 0,5 ml/h besleme hızı ile üretilen jelatin nanofibröz doku iskelelerinin ortalama nanofiber çapları  $158\pm 23$  –  $371\pm 26$  ve  $107\pm 14$  –  $395\pm 45$  nm arasında değişkenlik göstermiştir. Jelatin/kitosan kompozisyonu ile elde edilen nanofibröz doku iskelelerinde ortalama nanofiber çapı  $781\pm 99$  nm olarak ölçülmüştür. Sentetik vücut sıvısı içerisinde 3, 6, 18 ve 30 saat süreler boyunca kaplanan nanofibröz doku iskeleleri incelendiğinde, kaplama süresi arttıkça numunelerde ağırlık artışı olduğu ve kaplama süresi arttıkça nanofibröz doku iskelesi yüzeyine tutunan iyonların konsantrasyonunun arttığı ortaya koyulmuştur. *In vitro* degradasyon çalışmaları, farklı jelatin konsantrasyonlarındaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 7 gün sonunda tamamıyla degrades olmadığını ve formunu koruduğunu ortaya koymuştur. % 15 ve %30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 7 gün sonunda sırası ile %27' si ve %7,4'ü degrades olmuştur. Bu tez çalışmasında, klinik uygulamalarda kemik doku onarımında kullanılmak üzere, kimyasal, fiziksel ve *in vitro* degradasyon profilleri karakterize edilmiş jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz doku iskeleleri elektrosinning yöntemi ile üretilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doku Mühendisliği, Elektrosinning, Kemik Doku İskelesi, Jelatin, Kitosan, Hidroksiapatit

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

## PRODUCTION OF GELATIN / CHITOSAN NANOFIBERS WITH ELECTROSPINNING METHOD, COATING WITH BIOMIMETIC HYDROXYAPATITE AND CHARACTERIZATION

Esra YIKAR

### ABSTRACT

The aim of this thesis study is, the production of nanofibrous scaffolds obtained from gelatin and gelatin/chitosan solutions, their coating with biomimetic hydroxyapatite and characterization, especially for use in bone tissue engineering applications. In the system, the concentration of gelatin polymer was changed between %15-30 (%15, %20, %25, %30) scaffolds containing the nanofibers were produced, acetic acid, formic acid and dichloromethane (1/7/2, volume ratio) was used as solvent, applied voltage was 13kV, syringe tip to collector distance was 10 cm, feeding rate was 0,3 ml/h. In addition, nanofibrous scaffolds were prepared by changing the gelatin/chitosan percentages in the solution as 25/5. Scaffolds were crosslinked in the glutaraldehyde vapour for 3 days and coated with biomimetic hydroxyapatite at 3, 6, 18, 30 hours, respectively, by incubating them in simulated body fluid. The average nanofiber diameters of the nanofibrous scaffolds changed between  $158\pm 23$  –  $371\pm 26$  and  $107\pm 14$  –  $395\pm 45$  nm, respectively, as the feeding rates were 0,3 ml/h and 0,5 ml/h. The average nanofiber diameter of the nanofibrous scaffolds prepared from gelatin/chitosan composition was measured as  $781\pm 99$  nm. As the scaffolds coated in simulated body fluid for 3,6,18 and 30 hours were analysed, it was demonstrated that the weight of the samples and the ion concentration on the samples increased. *In vitro degradation* studies demonstrated that, at the end of 7 days, nanofibrous scaffolds prepared from solutions containing different gelatin concentrations did not degrade totally and kept their form. At the end of 7 days, the nanofibrous scaffolds prepared from solutions containing %15 and %30 gelatin concentrations, degraded %27 and %7,4, respectively. In this thesis study, the gelatin and gelatin/chitosan nanofibrous scaffolds were produced by electrospinning and their chemical, physical properties and *in vitro* degradation profiles were characterized to be used in bone tissue regeneration in clinical applications.

**Key Words:** Tissue Engineering, Electrospinning, Bone Tissue Scaffold, Gelatine, Chitosan, Hydroxyapatite,

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

## **TEŞEKKÜR**

Engin bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, tez çalışmamın gerçekleştirilmesi ve sonuca ulaştırılması için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yol gösterici olan, değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE'ye,

Aldığım derslerle bana yol gösteren, bilimsel bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayla ÖZER'e, Sayın Doç. Dr. Bahadır K. KÖRBAHTI'ye, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ferda GÖNEN'e, Fen Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Nazmiye GÖKÇEL'e, tez çalışmamda manevi katkılarından ve yardımlarından dolayı Araş. Gör. Didem DEMİR'e,

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için destek sağlayan, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi' ne ve Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)' a

Desteklerini ve anlayışlarını esirgemeyen Toros Tarım San.ve Tic.A.Ş. Kıdemli Genel Müdür Yardımcısı Sayın Mehmet İÇÖZ'e, değerli müdürüm Sayın Mete BAYHAN'a,

Hayatımın en büyük desteği ile her zaman yanımda olan ve olacağını bildiğim Serkan EKİZ'e,

Bana uçmayı öğreten, bazen bu, onlardan uzaklaşmam anlamına gelse de kanatlarımı elimden almayan; çocuklarına duydukları sevgiyi onlara duydukları güvenle perçinleyen; her başarımın asıl sahipleri, hayatımın en vazgeçilmezleri canım anneme, babama ve tüm sıkıntılarımı paylaşarak her zaman yanımda olan kardeşlerime, bütün aileme tüm kalbimle, Sonsuz teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI .....</b>	<b>5</b>
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ .....	5
2.1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı .....	5
2.1.2. Kemik Doku Mühendisliği.....	7
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ .....	8
2.2.1. İdeal Doku İskelesinin Karakteristik Özellikleri.....	9
2.2.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri .....	10
2.2.3. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Polimerler.....	13
2.2.3.1. Sentetik Seramikler .....	13
2.2.3.2. Doğal Polimerler .....	14
2.2.3.3. Sentetik Polimerler.....	15
2.3. JELATİN .....	17
2.4. KİTOSAN .....	17
2.5. HİDROKSİAPATİT (HA) .....	19
2.6. SENTETİK VÜCUT SIVISI .....	20
2.7. KEMİK.....	20
2.8. ÇAPRAZ BAĞLANMA .....	22
2.9. NANOFİBER ÜRETİM YÖNTEMLERİ .....	23
2.9.1. Çekme .....	23
2.9.2. Kalıp Sentez Yöntemi .....	24
2.9.3. Faz Ayrımı .....	25
2.9.4. Kendiliğinden Birleşme .....	25
2.9.5. Çift Bileşenli Ekstrüzyon .....	26
2.9.6. Elektrsopinning .....	26

2.10. ELEKTROSPİNNİNG .....	26
2.10.1. Tarihsel Gelişimi .....	26
2.10.2. Elektrosinning Yöntemini Mekanizması .....	27
2.10.3. Elektrosinning Yöntemine Etki Eden Parametreler .....	29
2.10.3.1. Çözelti Özellikleri .....	30
<i>Moleküler Ağırlık ve Viskozite</i> .....	30
<i>Yüzey Gerilim Kuvveti</i> .....	30
<i>Çözelti İletkenliği</i> .....	31
<i>Çözücünün Dielektrik Sabiti</i> .....	31
<i>Çözücünün Uçuculuğu</i> .....	31
2.10.3.2. İşlem Parametreleri .....	32
<i>Uygulanan Voltaj</i> .....	32
<i>Çözelti Akış Hızı</i> .....	33
<i>Çözelti Sıcaklığı</i> .....	34
<i>Toplayıcı Altlık</i> .....	34
<i>İğne Ucu ile Altlık Arasındaki Mesafe</i> .....	34
2.10.3.3. Çevre Koşulları .....	35
<i>Nem</i> .....	35
<i>Atmosfer cinsi</i> .....	35
<i>Basınç</i> .....	36
2.10.4. Doku Mühendisliği Uygulamaları .....	36
<i>Yara örtücüleri</i> .....	38
<i>İlaç Salınımı</i> .....	38
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>39</b>
3.1. MATERYAL .....	39
3.1.1. Nanofiberlerin Üretiminde Kullanılan Materyaller .....	39
3.1.1.1. Jelatin .....	39
3.1.1.2. Kitosan .....	39
3.1.1.3. Glutaraldehit .....	39
3.1.1.4. Asetik Asit .....	40
3.1.1.5. Formik Asit .....	40
3.1.1.6. Diklorometan .....	40
3.1.1.7. Gama Yüksek Gerilim Cihazı .....	40
3.1.1.8. Şırınga Pompası .....	40
3.1.2. Sentetik Vücut Sıvısı Hazırlamada Kullanılan Materyaller .....	40
3.1.1.10. Gama Yüksek Gerilim Cihazı .....	40
3.2. YÖNTEM.....	41
3.2.1. Jelatin ve Jelatin/Kitosan İçeren Nanofiberlerin Üretimi.....	41
3.2.2. Üretilen Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Membranların Çapraz Bağlanması .....	42
3.2.3. Sentetik Vücut Sıvısının Hazırlanması (Simulated Body Fluid, SBF) .....	42



3.2.4. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Membranların Sentetik Vücut Sıvısında Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması.....	44
3.2.5. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu .....	44
3.2.5.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Analizi.....	44
3.2.5.2. SEM ile Analiz.....	44
3.2.5.3. EDX ile Analiz.....	45
3.2.5.4. HA kaplama ile ağırlık artışının izlenmesi.....	45
3.2.3.5. In Vitro Degredasyon Çalışmaları .....	45
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>46</b>
4.1. JELATİN VE JELATİN/KİTOSAN DOKU İSKELELERİNİN ÖZELLİKLERİ .....	46
4.1.1. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi .....	46
4.1.2. Jelatin Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması.....	54
4.1.2.1. Jelatin Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu ..	54
4.1.2.2. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin FTIR analizi .....	55
4.1.2.3. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işlemi öncesinde SEM ile analizi .....	57
4.1.2.4. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işlemi sonrasında SEM ile analizi .....	60
4.1.2.5. Besleme hızı değiştirilerek elde edilen jelatin nanofibröz doku iskeleleri .....	62
4.1.2.6. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonu .....	66
4.1.2.7. Ağırlık Artışının İzlenmesi .....	66
4.1.2.8. FTIR ile analiz.....	67
4.1.2.9. SEM ile analiz .....	70
4.1.2.10. EDX ile analiz .....	72
4.1.2.11. <i>İn vitro</i> degradasyonun incelenmesi .....	77
4.1.3. Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması.....	78
4.1.3.1. Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	78
4.1.3.2. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin FTIR analizi .....	78
4.1.3.3. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin SEM ile analizi.....	79
4.1.3.4. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin EDXS ile analizi.....	81
4.1.3.5. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin degradasyonu.....	82
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>	<b>84</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>99</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Elektro-eğirme yönteminde fiber üretimine etki eden parametreler.....	29
Çizelge 3.1. SBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar .....	43
Çizelge 4.1. Jelatin polimerinden elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları .....	47
Çizelge 4.2. Kitosan polimerinden elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları .....	48
Çizelge 4.3. Jelatin ve kitosan polimerlerinden %80 veya %90 konsantrasyonda asetik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları .....	50
Çizelge 4.4. Jelatin/kitosan(farklı oranlarda) polimerlerinden %90 konsantrasyonda asetik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları .....	52
Çizelge 4.5. Jelatin polimerlerinden asetik asit ve formik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları .....	53
Çizelge 4.6. Çözücü özellikleri .....	54
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki jelatin polimerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin ortalama nanofiber çapları.....	60
Çizelge 4.8. 0,5 ml/h besleme hızı kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin fiber çapları.....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Jelatin'in kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.2. Kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi .....	18
Şekil 2.3. Polimerin çapraz bağlanması.....	22
Şekil 2.4. Çekme yöntemi .....	24
Şekil 2.5. Kalıp sentez yöntemi .....	25
Şekil 2.6. Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi .....	28
Şekil 2.7. Taylor konisinin oluşumuna etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi ..	29
Şekil 3.1. Elektrosinning düzeneği .....	42
Şekil 4.1. Toplayıcı üzerinde biriken opak, çözücüsü buharlaşmış polimer tozlarının görüntüsü .....	49
Şekil 4.2. Çapraz bağlama işlemi (a)öncesi ve (b)sonrasında nanofibröz membranların görüntüleri .....	55
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları .....	56
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları .....	56
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin .....	57
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin.....	58
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x100000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin.....	59
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama sonrası SEM görüntüleri, x7000. (a) %15 jelatin, (b) %30 jelatin.....	60
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş çapraz bağlama sonrası nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000. (a) %15 jelatin, (b) %30 jelatin.....	61
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin .....	62
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin .....	63
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinde boncuk oluşumunun SEM görüntüleri, x7000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin .....	64
Şekil 4.13. %20 konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinde boncuk oluşumunun SEM görüntüleri, x9000.....	65

Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarındaki jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin fiber çaplarına besleme hızının etkisi .....	65
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sırasında gerçekleşen ağırlık artışları .....	66
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 3 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları .....	67
Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 6 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları .....	68
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 18 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları .....	68
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları .....	69
Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplanması sonrası SEM görüntüleri, x60000 (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin .....	70
Şekil 4.21. %30 konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası SEM görüntüleri, x60000 (a) 3 saat, (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat .....	71
Şekil 4.22. Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrasındaki iyon yüzdeleri (A=% 15, B=%20, C=%25, D=%30), 30 saat sonunda .....	72
Şekil 4.23. %15 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat .....	73
Şekil 4.24. %20 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat .....	74
Şekil 4.25. %25 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat .....	75
Şekil 4.26. %30 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat .....	76
Şekil 4.27. Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin degradasyonu.....	77
Şekil 4.28. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları. GA: numunelerin glutaraldehit ile çapraz bağlandığını; HA 30 saat: numunelerin 30 saat boyunca HA ile kaplandığını ifade etmektedir.....	79
Şekil 4.29. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) x7000 (b) x60000 (b) x100000.....	80

Şekil 4.30. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000 (a) çapraz bağlama sonrası (b) 30 saat HA kaplama sonrası .....	80
Şekil 4.31. Jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplama sonrası EDXS görüntüleri, (a) %30 jelatin (b) jelatin/kitosan .....	81
Şekil 4.32. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrasındaki iyon yüzdeleri .....	82
Şekil 4.33. Jelatin/kitosan çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş ve HA kaplanması sonrası degradasyonu .....	83

## **1. GİRİŞ**

Doku mühendisliği, hasarlı dokunun fonksiyonel olarak benzerinin geliştirilmesi için; biyoloji, tıp ve mühendislik disiplinlerini kapsayan, gelişmekte olan bir alandır. Bu alan, sağlığı yeniden inşa etmek ve hayat kalitesini yükseltmek amacıyla, doku ve organ fonksiyonlarını iyileştirmek, yeniden sağlamak veya arttırmak konusunda devrim yaratma potansiyeline sahiptir.

Hastadan alınan sağlıklı hücreler üretilen doku iskeleleri üzerine yerleştirilerek hücre-doku iskelesi kompleksi oluşturulur ve doku iskelesi üzerinde bu hücrelerin üremesi sağlanır. Oluşturulan hücre-doku iskelesi yapıları vücuttaki hasarlı bölgeye yerleştirildiğinde o dokunun görevini ve işlevini alarak doku rejenerasyonunu gerçekleştirir.

İdeal bir doku iskelesi 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, biyoyumlu, mekanik özellikler açısından konak dokuya benzer olmalıdır. Bu özelliklerin sağlanması, seçilen doku iskelesi üretim yöntemine ve kullanılan malzemeye bağlıdır.

Doku iskeleleri doğal polimerler (jelatin, kitosan, kollajen, aljinat) veya sentetik polimerlerden (poliglikolid, polilaktit, polilaktat glikolat) üretilirler. Doğal materyaller doğal hücresel çevreyi yakın olarak taklit edebilirler, sentetik polimerlerin ise materyal özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır. İdeal bir doku iskelesinin tüm özelliklerini taşıyan mükemmel doku iskelesi halen üretilenmemiştir. Her dokunun kimyasal bileşimi, fiziksel özellikleri, hücreleri ve iyileşme mekanizmaları birbirinden ayrı olduğu için, farklı dokuların rejenerasyonunun amaçlandığı doku mühendisliği çalışmalarında, farklı stratejiler geliştirilerek, farklı yolların izlenmesi gerekmektedir.

Konvansiyonel polimerik fiberlerin çapları genellikle 10-100 mikrometre aralığındadır. Nanofiberlerde ise çap 10-100 nanometre aralığına indirilmiştir. Boyutun nano ölçeğe çekilmesi nanofiberlere, yüzey alanı/hacim oranının çok yüksek olması (mikrofiberlerin  $10^3$  katı), sertlik ve çekme gerilimlerinin artması gibi özellikler kazandırır. Bu özellikleri nedeniyle polimerik nanofiberler ve bunlardan hazırlanan örgüsüz yapılar tıbbi uygulamalar başta olmak üzere bir çok yeni uygulama alanına sahiptir. Nanofiber elde etmek için çeşitli yöntemler vardır. Örneğin: klasik fiber çekme, şekil verici olarak nanoporöz kullanarak nanofiber üretme, faz ayırma ve kendiliğinden düzene girme. Bu yöntemler çok kademeli adımlardan oluşan prosesler içerir ve sürekli üretim zordur. Bu yöntemler arasında basit, hızlı, sürekli ve büyük boyutta üretime imkan veren “elektrospinning” yöntemi hemen hemen her polimerden nanofiber üretilmesine olanak verir. Polimerleri çözüldükten ve eriyikten “electrospinning” yöntemiyle nanofiber haline dönüştürmek mümkündür. Dokulardaki hücre dışı matris (extracellular matrix) fibröz bir yapıdan oluştuğu için, elektrospinning yöntemi ile üretilen nanofiberler hücre dışı matrisi son derece iyi taklit edebilmektedir. Ayrıca fiber boyutunun nano düzeyde olması, elektrospinning ile üretilen yapılara, üstün mekanik özellikler ve geniş bir yüzey alanı kazandırmaktadır. Elektrospinning yöntemi ile üretilmiş doku onarımında kullanılacak doku iskeleleri, kemik doku onarımında kullanılmak üzere potansiyel birer adaydırlar.

Kemiğin organik kısmının temelini tip I kolajen oluşturur. Jelatin, kolajenin termal denatürasyonu veya kimyasal/fiziksel degradasyonu sonucu elde edilen doğal bir biyopolimerdir. Jelatin, antijenik olmaması, biyobozunur olması, çeşitli tekniklerle proses edilebilmesi, iyi mekanik özellikleri sebebiyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Jelatin, kemiğin doğal bileşeni olan kolajen ile hemen hemen aynı kompozisyonuna sahiptir. Jelatin, yapısında bulunan glisin, prolin ve hidrokisprolin aminoasit dizilimleri sayesinde hücresel tutunmayı dolayısı ile yeni kemik dokusu oluşumunu arttırmaktadır.

Kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen, polisakkaritten oluşan doğal bir biyopolimerdir. Kitosan biyopolimerinde bulunan polisakkarit ana zinciri,

yapısal olarak kemiğin bağ dokusunu oluşturan glikozaminoglikanlarla benzer yapıdadır. Kitosan, içeriğinin kemik bağ dokusundaki glikozaminoglikanlara benzerliği, yani kimyasal özellikleri sayesinde, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlamaktadır. Ayrıca, biyouyumluluğu, antimikrobiyal aktivitesi, biyobozunur olması, antijenik olmaması, diğer materyallerle kompozit oluşturabilmesi gibi özellikleri sayesinde de biyomedikal uygulamalarda kullanım alanı bulmuştur. Kitosanın fonksiyonel grupları, kalsiyum esaslı birçok materyal ile kompozit oluşturabilmesi sayesinde ortopedik ve periodontal uygulamalarda kullanım alanı bulmuştur. Bu şekilde oluşturulan polimer matris kalsiyum esaslı bileşik sistemlerinin, sert doku yerine kullanılabilirlikleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bu tip kompozitlerin avantajı, polimerin hidroksiapatit ile kombinasyonunun matris emildikçe implantta kemiksi gelişim sağladığı gösterilmiştir. Kalsiyum-kitosan esaslı kompozitler, kemik protezlerinde kaplama yapılarak vücuda implante edilerek kemik hücrelerini güçlendirmektedir. Bu şekilde kalsiyum bileşiklerinin migrasyonu da polimer matrisine bağlanması nedeniyle engellenmektedir. Diğer bir kullanım alanı ise direkt kemik veya sert doku ile yer değiştirmesi şeklindedir. Ayrıca, kemikte zamanla aşınma sonucu meydana gelen boşlukları doldurabilmektedir.

Kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturan kalsiyum fosfat esaslı hidroksiapatit, tıp ve dişçilikte kullanılan bir biyoseramik malzeme olup, biyouyumluluğu nedeniyle yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılmaktadır. Polimerlerin, sentetik vücut sıvıları içinde biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması yöntemi özellikle kemik dokusu onarımında kullanılacak doku iskelesi üretimi uygulamaları için son yıllarda son derece ilgi çekici bir metod haline gelmiştir. Fizyolojik koşulları yani insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonunu taklit eden sentetik vücut sıvısı sayesinde polimer yüzeyleri kemik dokusundakine benzer şekilde hidroksiapatit ile kaplanabilmekte ve biyoaktivite kazanabilmektedir. Vücut sıvısını taklit eden sentetik sıvılar sayesinde apatit ile kaplanmış malzemeler hem içerik olarak hem de mikro yapı olarak



biyolojik sistemde (kemikte) yer alan inorganik fazı taklit etmekte ve kemik hücresi tutunmasını arttırmaktadır.

Bu çalışmada, kemik doku onarımında kullanılacak, jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin elektrospinning tekniği ile üretimi, sentetik vücut sıvısı sayesinde biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonu hedeflenmektedir. Jelatin/kitosan polimer sisteminin ve hidroksiapatit inorganik bileşenin seçilmesinin nedeni doğal kemik içeriğini taklit etmektir. Vücut sıvısını taklit eden sentetik sıvılar sayesinde apatit ile kaplanmış doku iskelesi mikro-yapı olarak biyolojik sistemde (kemikte) yer alan inorganik fazı taklit edecektir. Nanofiberler üretilen doku iskelelerine mekanik ve fiziksel üstünlükler kazandırmanın yanı sıra hücrelerin yapışması ve çoğalması için daha geniş bir yüzey alanı oluşturulmasını sağlayacaktır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği; sentetik veya biyolojik matrisler içinde canlı hücrelerin, biyolojik aracı moleküllerin ve büyüme faktörlerinin birlikte bulunduğu yapıların hastalara yerleştirilmesi ile hastalık ya da travma sonucu kaybedilen veya hasar görmüş dokuları yeniden oluşturulabilmeyi hedeflemektedir.

Doku mühendisliğinde; klasik biyomateryal uygulamalarından farklı olarak sadece kaybedilen dokulara ait boşlukların doldurulması değil, dokunun oluşum ve rejenerasyon mekanizmalarını anlayarak fonksiyon görebilen dokuların elde edilebilmesi hedeflenmektedir. Doku mühendisliği uygulamaları ile vücut içine yerleştirilen yapılar vücudun geri kalan doğal dokuları gibi fiziksel ve biyolojik uyarılara ve değişimlere karşı cevap vererek uyum gösterebilir. Bu özellik doku mühendisliği ile oluşturulan yapıların canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamalarına kıyasla en önemli üstünlüğüdür. Canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamaları doku içerisinde zamanla yıkıma uğrayabilirler veya fiziksel niteliklerini kaybedebilirler. Doku mühendisliği uygulamalarıyla elde edilen yapılar ise dış etkenlere ve fizyolojik gereksinimlere yanıt vererek, ekstrasellüler matris yapısını yeniden şekillendirerek istenilen niteliklerini koruyabilirler [Salgado vd., 2004].

#### 2.1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı

“Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden Dr. Fung tarafından Birleşik Devletler Ulusal Bilim Kurumu’nda (National Science Foundation, NSF) gerçekleştirilen bir toplantıda kullanılmıştır. Doku mühendisliği, yapay organ ve/veya doku yaratmak ya da işlevini yitirmiş dokuların yenilenmesi sağlamak için malzeme ve mühendislik bilimini, yaşam bilimleri ile bir araya getiren disiplinler arası bir bilim dalıdır [Langer ve Vacanti, 1993].

Doku mühendisliğinde temel prensip, hastadan veya başka bir vericiden alınan hücrelerin bir doku iskelesi üzerine ekilmesi, dokuların üç boyutlu olarak vücuttaki doğal formuna en uygun şekilde vücut dışında hücre/doku kültür ortamında

üretilmesi, üretilen dokuların hasarlı dokuların yerine vücuda implante edilmesidir. Daha sonra doğal doku yenilenme süreci başlamakta, kan damarları yapının içine nüfus etmekte ve doku iskelesi bozunurken yerine yeni dokunun oluşmasına kılavuzluk etmektedir. Doku mühendisliğinin temel prensibi;

- Hücrelerin izole edilmesi,
- uygun hücre kültüründe sayılarının çoğaltılması,
- büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte uygun bir doku iskelesine ekimi
- kültür ortamına koyma,
- hazırlanan dokunun hasarlı bölgeye implante edilmesi

Doku iskelesi, hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına olanak sağlayan hücre dışı matris (“extracellular matrix”, ECM) olarak bir çatı oluşturmaktadır [Agrawal ve Ray, 2001; Sachols vd., 2003]. Gerçek dokuda bulunan ECM, hücreler için fiziksel destek sağlamasının yanı sıra, hücre gelişmesi ve farklılaşması gibi çok önemli işlevleri yerine getirmektedir. Geniş çaplı bir doku hasarında, hasarlı bölgeye yalnızca hücrelerin yerleştirilerek söz konusu hasarın giderilmesi mümkün değildir. Bu nedenle yapay bir ECM oluşturacak bir iskeletin hücrelerle birlikte bu bölgeye yerleştirilmesi gerekmektedir. Yeni doku geliştikten ve hücreler yeni ECM oluşturabilecek kapasiteye ulaştıkları zaman iskeleye gerek kalmayacaktır. Bu sebeple doku iskelesinin en büyük özelliği biyobozunur olmasıdır.

Son yıllarda estetik cerrahide ve hasarlı ya da kayıp doku veya organ tedavisinde kullanılan yapay protezlerde önemli ilerlemeler olmasına rağmen, organ veya dokuların transplantasyonu, halen en kabul gören tedavi yaklaşımıdır. Hastaların kendilerinden alınan dokular ile gerçekleştirilen uygulamalarda, cerrahi müdahaleler hastalarda operasyon sonrası morbiditenin artmasına ve buna bağlı olarak sağlık sisteminde yüksek maliyetlere neden olmaktadır [Zimmerman vd., 2001]. Ayrıca, doku kaynağının sınırlı olması ve cerrahi müdahale sonrası hastalarda enfeksiyon görülme olasılığı da söz konusu diğer kısıtlamalardır. Farklı bireylerden ya da bazı hayvanlardan alınan dokular da alternatif doku kaynakları olarak kullanılabilir. Ancak, sınırlı sayıda donör bulunması, uygulama sonrasında bağışıklık sisteminin vereceği cevaplar ve buna bağlı etkiler, bu kaynakların kullanımında da sorunlara neden olmaktadır [Shin vd., 2003]. Uygulamalarda

karşılaşılan sorunlar hücre ve doku iskelelerinin kullanıldığı “doku mühendisliği” yaklaşımlarının gelişmesine yol açmıştır.

Doku mühendisliği uygulamalarında hasarlı dokunun yenilenmesi ya da tamirinde çeşitli stratejiler mevcuttur. Birinci yaklaşımda doku oluşumu için sadece biyomalzemeler kullanılmaktadır. Diğer bir yaklaşımda ise hastanın kendisinden ya da uygun bir donörden izole edilen hücrelerin hasarlı bölgeye doğrudan enjekte edilerek doku onarımının yerinde sağlanması amaçlanmaktadır. Ancak bu uygulamalar doku kaybının büyük olduğu durumlarda kullanılamamaktadır. Bu durumda, doku mühendisliğinin üçüncü ve en gerçekçi stratejisi ön plana çıkmaktadır. Bu stratejide hasarlı dokunun yenilenmesi ya da tamiri, fonksiyonları onarmaya ve ana doku ile iletişimi desteklemeye yardımcı olmak amacıyla tasarlanmış doku iskeleleri (scaffold) ile sağlanmaktadır. Bu doku iskeleleri, hücrelerin çoğalmalarına, farklılaşmalarına ve böylelikle fonksiyonlarını sürdürmelerine olanak sağlayan yapay bir hücre dışı matris olarak gerekli desteği sağlamaktadır [Thein-han ve Misra, 2009]. Uygun kaynaktan sağlanan ve hücre kültüründe istenilen sayıya çoğaltılan hücreler biyosinyal molekülleri ile birlikte söz konusu doku iskelelerine ekilmektedir. Ardından, elde edilen yapı, doku hasarının bulunduğu bölgeye implante edilmektedir [Gümüşderelioğlu, 2007].

Mevcut teknolojide doku mühendisliği üzerine yapılan çalışmalarda kısa vadede büyük gelişmeler beklenmektedir. Tıp, biyoloji ve malzeme teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde doku mühendisliği alanının gelecekte de bugün sahip olduğu önemi koruyacağı öngörülmektedir. Günümüzde doku mühendisliği prensipleri kullanılarak geliştirilen çeşitli organ ve doku sistemleri mevcuttur. Damar, sinir, karaciğer, kalp, nefes borusu, deri, idrar kesesi, kas, kornea, kemik ve kıkırdak dokuları bu dokular arasında sayılabilir.

### 2.1.2. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik doku mühendisliği, kemik onarımı ve yenilenmesi için sunduğu yeni ve gelişimci yaklaşımıyla hızla yayılan bir çalışma alanı olmaktadır. Genel olarak kemik doku mühendisliği yaklaşımı, yukarıda açıklandığı gibi doku hücreleri ve biyolojik ajanların bir araya gelerek doku iskeleleriyle beraber kullanımı olarak

tanımlanır. Gelişmiş bir doku iskelesi yüksek kalite, güvenilirlik, süreklilik ve maliyet etkinliği sunmalıdır. Ayrıca, tedavi ve ameliyat dönemleri içinde gelişecek durumlara karşı ihtiyaçları karşılamalıdır. Kemik doku iskeleleri için konuma bağlı olarak istenen bir diğer özellik ise gözenekliliktir.

Üç boyutlu bir doku iskelesi, hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması için gerekli desteği sağlamalı ve genel olarak doğal kemik dokusunun şekline uygun tanımlanmalıdır.

Kemik yenilenmesi için geliştirilen birçok doku mühendisliği uygulaması ümit vericidir. Bunun yanında, üretilen doku iskelelerinin etkinliğinin araştırılması için yapılan *in vitro* kültür çalışmalarından ve hayvan deneylerinden elde edilen ektopik modellerin, insan vücudunda her zaman bekleneni vermemesi kemik doku mühendisliği çalışmalarının en önemli sorunudur. Doku iskeleleriyle üretilen yapay kemik yamalarıyla ilgili çözülmeye çalışılan bir diğer problem ise damarlanmanın sağlanamamasıdır. Kemik doku mühendisliğindeki gelişmeler ve ileriye dönük eğilimler, karşılaşılan sorunların, kemiğin doğal yapısını taklit eden biyomalzemelerin tasarımı ile çözüleceği öngörülmektedir.

## 2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ

Doku mühendisliği uygulamalarının temel elemanları; hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler, bu hücrelerin fonksiyonlarını destekleyen veya yönlendiren büyüme ve farklılaşma faktörleri ve bu iki elemanın içinde yer aldığı, oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskelesidir.

Doku mühendisliği uygulamalarında; hedef dokunun oluşturulması için kullanılan hücrelerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkinlikleri büyük oranda içinde buldukları doku iskelesinin özelliklerine bağlıdır. Doku iskelesi, üç boyutlu bir yapı oluşturarak elde edilecek hedef dokunun formunu belirler, hücrelere fiziksel destek oluşturur ve hücrelerin tutunarak fonksiyon görmeleri için uygun bir ortam sağlar. Doku iskeleleri aynı zamanda; su, büyüme faktörleri, sitokinler ve besinler için rezervuar oluşturur [Salgado vd., 2004; Nakahara vd., 2004].

### 2.2.1. İdeal Doku İskelesinin Karakteristik Özellikleri

Doku uyumluluğu: Doku iskeleleri, uygulandıkları konak dokuda istenilen biyolojik etkileri sağlarken kimyasal özellikleri ile toksik etki göstermemeli ve immün yanıtı neden olmamalıdır.

Doku iskelesinin gözenekli bir yapıya sahip olması yani alan/hacim oranının yüksek olması gereklidir. Hücrelerin, gözenekler içine yerleşmesi, uygun bir dağılım göstermeleri ve çevre dokulardan kaynaklanan yeni damar oluşumu gözenekli yapı sayesinde sağlanabilir. Birbirine bağlı gözeneklerden oluşan doku iskelesinin yapısı, metabolizma ile ilgili besin ve ürünlerin giriş çıkışını sağlar. Böylece doku iskelesi içerisinde yerleştirilmiş olan hücrelerin canlılıklarını koruyabilmeleri sağlanabilir. Besinlerin difüzyonu kan damarlarından 150-200 µm'lik bir mesafeye kadar etkin olarak sağlanabilmektedir. Uygun gözenekli yapıya sahip olmayan doku iskeleleri içinde yer alan mezenşimal kök hücrelerin büyük bir kısmı hipoksik koşullar nedeniyle canlılıklarını yitirebilirler. Ancak artan gözeneklilik ile birlikte mekanik özellikler zayıflayacağından, doku iskelesinin bu niteliklerinin çok iyi dengelenmesi gereklidir [Salgado vd., 2004].

Gözenek boyutu: Gözenek boyutunun çok küçük olması hücrelerin bu alanlara migrasyonunu, yeni damar oluşumunu ve atık ürünlerin ortamdan uzaklaştırılmasını engelleyebilir. Doku mühendisliğinde ideal gözenek boyutunun 100-500 µm arasında olması gerektiği bilinmektedir [Ikada, 2006].

Yüzey özellikleri: Doku iskelesinin yüzey özellikleri hücrelerin bu materyaller üzerine tutunmaları ve çoğalmalarını etkiler. Fibrin proteinlerinin biyomateryalin yüzeyine bağlanabilmesi hücrelerin de biyomateryale tutunabilmesini sağlar. Pürüzlü yüzeylerin hücre ataçmanı için düzgün yüzeylere göre daha uygun olduğu, yani daha iyi osteokonduktif özellik sağladığı bilinmektedir [Salgado vd., 2004].

Mekanik özellikler ve biyobozunurluk: İn vivo uygulamalarda doku iskelesinin mekanik özellikleri, hedef dokuya benzer olmalıdır. Materyalin biyobozunurluğu ise oluşturulması hedeflenen dokunun gelişim hızına paralel

olmalıdır. Örneğin yavaş gelişim gösteren kemik dokusu oluşturmak amacıyla hazırlanan doku iskelesinin erken dönemde yıkıma uğraması defekt bölgesinin mekanik olarak zayıf kalmasına neden olabilir. Benzer şekilde deri dokusu oluşturmaya yönelik doku iskelesinin geç yıkıma uğraması yara iyileşme sürecini olumsuz etkileyebilir [Ikada, 2006].

Doku iskelesinin kimyasal ve yapısal özellikleri, büyüme ve farklılaşma faktörü uygulamalarının etkinliklerinin belirlenmesinde de önemli bir rol oynar. Büyüme faktörlerinin doku içindeki yarılanma sürelerinin çok kısa olması doku iskelesinin uygun bir taşıyıcı olarak fonksiyon görmesini gerektirmektedir. Böylece büyüme faktörlerinin biyolojik aktiviteleri korunmuş olur. Doku iskelesinin büyüme faktörü için kontrollü salım sistemi oluşturması daha düşük miktarlarda büyüme faktörünün kullanılmasının etkin olması açısından son derece önemlidir. Büyüme faktörü için uygun salım kinetiğini oluşturabilen doku iskelelerinin kullanılması, biyolojik etkileri doz ve uygulama süresine göre değişiklik gösterebilen faktörlerden seçici olarak faydalanılmasını sağlar.

### 2.2.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku iskelesi üretim yöntemleri arasında fiber bağlama, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma, faz ayrımı ve dondurarak kurutma gibi geleneksel yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin kullanımıyla birbirinden farklı fiziksel özelliklere sahip doku iskelelerinin üretimi mümkündür.

#### *Fiber bağlama (Fiber bonding)*

Fiber bağlama yöntemi en eski doku iskelesi üretim yöntemleri arasında yer almaktadır. Bu yöntem, biyoparçalanır bir polimer olan poli laktik-ko-glikolik asit (PGA) ameliyat ipliklerinin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Ancak PGA ameliyat iplikleri kullanılarak elde edilen örülmemiş ağ dokuları mekanik dayanım açısından yeterli değildir [Thomson vd., 2000].

- *Çözücü dökümü- parçacık uzaklaştırma*

Bu yöntemde polimer uygun çözücü içinde çözündürüldükten sonra bu çözeltinin içine porojen adı verilen katı parçacıklar ilave edilir. Sodyum klorür, şeker, jelatin ve parafin porojen olarak kullanılabilen maddelerdir. Daha sonra bu karışım, yapışmayacağı düz bir yüzeye dökülür ve çözücü uzaklaştırılır. Böylece içinde porojenlerin bulunduğu membran formunda katı polimerik yapı elde edilir. Bu yapı porojen maddenin içinde çözüneceği herhangi bir çözücü ile etkileştirildiğinde porojen yapıdan uzaklaştırılır. Sodyum klorür, şeker ve jelatin için çözücü olarak su, parafin için hekzan kullanılmaktadır. Bu işlem sonrasında porojenlerin terk ettiği bölgeler gözenek olarak kalır. Dolayısıyla bu yöntemle, gözenek boyutu ve özellikleri kontrol edilebilen membran formundaki doku iskeleleri üretilmiş olur.

- *Membran laminasyonu (Membrane lamination)*

Membran laminasyonu, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yönteminde üç boyutlu doku iskelelerinin üretilmemesi probleminin aşılması için geliştirilmiştir. Bu yöntemde, polimer için uygun olan bir çözücü, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiş olan polimerik membranların arasına sürülüp üst üste dizilerek üç boyutlu doku iskeleleri elde edilir. Üst üste dizilerek birbirine yapıştırılan membranların por özellikleri aynı olmalı ve yapıştırma bölgeleri ayırt edilmeyecek kadar düzgün olmalıdır. Yapıştırma için kullanılan bazı organik çözücülerin çok toksik olması ve doku iskelesinin biyoyumluluğunu etkilemesi bu yöntemde bazı sınırlamalar getirmektedir [Thomson vd., 2000].

- *Eriyik kalıplama (Porogen leaching)*

Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yönteminde üç boyutlu doku iskelelerinin üretilmemesi probleminin aşılması için geliştirilen bir diğer yöntem eriyik kalıplama yöntemidir. Bu yöntemde, çözücü kullanılmadan polimer ve porojen katı halde karıştırıldıktan sonra, karışım istenilen geometriye sahip kalıba dökülür. Kalıba ısı uygulanarak polimer eriyik hale getirilir. Sonrasında doku iskelesi, porojenin içinde çözüneceği çözücü ile etkileştirilerek porojen yapıdan uzaklaştırılır



ve istenilen geometriye sahip, üç boyutlu ve porlu doku iskeleleri üretilmiş olur [Thomson vd., 2000].

- *Faz ayırımı (Phase separation)*

Bu yöntemde, polimer çözeltisi soğutulduktan sonra ayrılmış olan çözücü fazı yapıdan uzaklaştırılır ve geriye kalan polimerlerce zengin faz katılarak doku iskelesini oluşturur. Faz ayırımı yöntemi, sıvı-sıvı ve katı-sıvı faz ayırımı olmak üzere ikiye ayrılır. Sıvı-sıvı faz ayırımında polimer, düşük donma noktası sıcaklığına sahip ve kolay süblimleşebilen bir çözücü içinde çözündürülür ve sonrasında bu çözelti çözücünün donma noktasının altına soğutulur. Donan çözücü yapıdan vakumlu kurutma ile süblimleştirilerek porlu doku iskelesi üretilmiş olur. Katı-sıvı faz ayırımında ise polimer uygun çözücüde çözündürüldükten sonra sistem soğutulur ve çözücü kristalleri oluşur. Çözücü kristalleri yapıdan vakumlu kurutma yöntemi ile uzaklaştırıldıktan sonra porlu iskeleleri üretilmiş olur [Thomson vd., 2000].

- *Dondurarak kurutma (Freeze-drying)*

Sünger formundaki üç boyutlu doku iskelelerinin üretimi için kullanılan bu yöntemde hazırlanan polimer çözeltileri uygun şartlar altında dondurulup, daha sonra liyofilize edilmektedir. Liyofilizasyon işlemiyle polimer çözücüsü uzaklaştırılarak makro porlu doku iskeleleri elde edilmiş olur. Bu yöntemle yüksek spesifik por yüzey alanına sahip kalın doku iskeleleri üretmek mümkündür.

- *Emülsiyon dondurarak kurutma (Emulsion freeze-drying)*

Bu yöntemde hidrofobik polimer çözeltisinde sulu faz eklenerek emülsiyon hazırlanır. Bu emülsiyon dondurulduktan sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutulur ve çözücünün uzaklaştırılmasını takiben sünger formundaki üç boyutlu doku iskeleleri hazırlanmış olur.

### 2.2.3. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Polimerler

Doku iskelesi olarak kullanılacak biyomateryal; doku ile uyumlu, uygun gözenek yapısına, gözenek boyutuna, yüzey özelliklerine, mekanik özelliklere ve biyobozunurluğa sahip olmalıdır. Doku mühendisliği çalışmalarında; sentetik seramikler (trikalsiyumfosfat, hidroksiapatit), sentetik polimerler (polilaktikasit, poliglikolik asit, kaprolakton), inorganik sığır kemiği (Bio-Oss) ve doğal polimerler (kollajen, kitosan, hyaluronik asit) doku iskelesi olarak kullanılmaktadır [Riminucci ve Bianco., 2003; Sittinger vd., 2004].

Kemik doku mühendisliğinde; günümüze kadar çeşitli metaller, seramikler ve polimerler gibi doğal veya sentetik materyaller kullanılmıştır. Metaller ve seramiklerin çoğu doku içinde yıkıma uğramadıklarından doku mühendisliği için uygun değildirler.

#### 2.2.3.1. Sentetik Seramikler

Sentetik seramiklerden hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) osteokondüktif özellikleri iyi olduğu için kemik dokusunda meydana gelen kayıpların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ancak, mekanik dayanıklılıklarının düşük olması ve bozunma hızlarının değişken olması bu biyomateryallerin önemli dezavantajlarıdır. Allojenik ve ksenojenik inorganik kemik matrisi, osteokondüktif özelliğinin yanında, BMP içerdiği için osteoindüktif özelliğe de sahiptir ve bu özellikleri nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Ancak, hastalık geçişi ve immun reaksiyon oluşturma riskleri vardır ve içerdikleri BMP miktarları da kemik matrisinin elde edildiği donörün sistemik durumuna bağlı olarak önemli farklılıklar gösterebilmektedir [Weng vd., 2006; Salgado vd., 2004].

Asıl özellikleri osteokondüktif olmalarıdır ve kısmen osteoindüktif etkileri vardır. Kemik iliği hücreleriyle birlikte veya tek başlarına yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kırılgan yapıları ve fiziksel özelliklerinin zayıf olması nedeniyle geniş kemik defektlerinde kullanılmazlar. Ayrıca biyobozunurluk sürelerinin öngörülemez olması da sorun yaratmaktadır. Hızla yıkıma uğramaları nedeniyle

mekanik özellikleri zayıflayabilir ve ortama salınan kalsiyum veya fosfora bağlı olarak hücreler üzerinde toksik etki yaratabilirler. Bu nedenlerle sentetik ve doğal polimerler doku mühendisliği için daha uygun materyaller olarak kabul edilmektedirler [Salgado vd., 2004].

#### 2.2.3.2. Doğal Polimerler

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak ideal doku iskelesi arayışında doğal bir polimer olan kitosan da yoğun olarak araştırılan biyomateryallerden biridir.

Doğal biyobozunur polimerler doğal malzeme bazlı polimerler olup; polisakkaritler (nişasta, alginat, kitin/kitosan, hiyaluronik asit ve türevleri) veya proteinler (soya, kollojen, fibrin jeller ve ipek) ve destekleyici olarak kullanılan lignoselülozik doğal fiberler gibi biyofiberler olmak üzere sıralanabilir.

Kollajen fibröz bir proteindir ve doğal hücre dışı matrisin temel bileşenlerinden biridir. Memelilerde en çok bulunan proteindir ve deri, kemik, tendon, kıkırdak, kan damarı ve kalp kapakçıklarının temel yapı elementidir [Kose vd., 2005; Taylor vd., 2006]. Moleküler ve kimyasal yapıları birbirlerinden farklı 25 tip kollajen tanımlanmıştır. Bunların arasında tip I kollajen, in vitro osteoblastik farklılaşma ve in vivo osteogenezis için uygun bir çevre oluşturmaktadır. Doğal bir polimer olarak, tip I kollajen, özellikle deri gibi yumuşak dokuların tedavisi ve benzeri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır [Kose vd., 2005]. Sentetik polimerlerle karşılaştırıldığında; kollajen, hücre yapışmasına olanak sağlayacak çok daha saf bir yüzeye ve yararlı biyolojik özelliklere sahiptir. Bu sebepten dolayı, kollajenin kendisi ve/veya bir kompozitin bileşeni olarak doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, biyomedikal cihazlara uygulandığında gösterdiği antijenik ve immünojenik reaksiyon, düşük işlenebilirlik, potansiyel patojen buluşturması, mekanik özelliklerinin zayıflığı ve biyobozunma kontrolünün zorluğu gibi nedenlerden dolayı kollajenin kullanımı ile ilgili soru işaretleri bulunmaktadır [Kose vd., 2005].

Kollajenin çapraz bağlanması ve diğer biyomateryallerle hazırlanan hibrit yapılarla bu sorunların üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Ma ve arkadaşları, kollajen molekülleri arasında bir köprü vazifesi görecektir, suda çözünen çapraz bağlayıcı ajanlar olan karbodiimid, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimide (EDAC) ve Nhidrokisuccinimid (NHS) amino asit (glutamik asit ve lizin) varlığında kullanmışlardır. In vitro yapılan çalışmada, kollajenin biyobozunma derecesinin lizin eklendiğinde belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Diğer biyopolimer ve biyoseramiklerle hazırlanan kollajen bazlı kompozitler, hibrit biyomalzemeler ve kollajene göre özellikle mekanik güç ve hücre tutunması bakımından avantaj sağlamaktadırlar [Chang ve Tanaka, 2002; Chen vd., 2001].

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, glukosamin ve N-asetilglukosamin içeren kitosan diğer önemli doğal biyopolimerdir. HA/kitosan jelatin doku iskeleleri üretilmiş ve it vitro çalışmalar hücre dışı matrislerin sentezlenebileceğini ve kemik gibi yapılara şekillendirilebildiği gösterilmiştir[Zhao vd., 2002].

Kitosanın; yara iyileşme sürecinde olumlu biyolojik etki gösterebilme ve çeşitli yöntemlerle farklı fiziksel özelliklere sahip yapılar halinde üretilebilme potansiyeli vardır. Bu özellikler, kitosanın doku iskelesi üretiminde uygun bir biyomateryal olabileceğini göstermektedir.

Doku mühendisliği için kullanılan diğer bir doğal malzeme ise nişastadır. Nişasta, kemik implantından, doku iskelelerinin üretimine ve ilaç salım sistemlerine kadar geniş bir biyomedikal uygulama alanına sahiptir. Nişasta, pratikte farklı uygulamalarda farklı özelliklere sahip doku iskelesi olarak kullanabilmek için selüloz asetat, hidroksiapatit, poli(etilen-vinil-alkol) ve poli(laktik asit) gibi diğer biyomalzemeler ile birleştirilmektedir [Levy vd., 2004].

#### 2.2.3.3. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, çok farklı formlarda hazırlanabilmelerine rağmen biyolojik özellikleri bakımından yetersiz kalabilmektedirler. Uygulanan hücrelerin sentetik polimerlere ataçmanlarının yetersiz düzeyde olması, hücresel fonksiyonları olumsuz etkileyebilmekte ve böylece implante edilen yapı ile konak dokuların

bütünleşmesi sağlanamamaktadır. Bu nedenle bazı sentetik polimerler hidroksiapatit ve arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) oligopeptidleri gibi yapılarla modifiye edilerek ilgili sorunların aşılmasına çalışılmaktadır.

En çok kullanılan sentetik biyobozunur polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polianhidritler, polifumaratlar (PF), poliortoesterler, polikaprolakton ve polikarbonatlar olarak sıralanabilir.

Doymuş alifatik poliesterler doku mühendisliğinde üç boyutlu doku iskeleleri için en sık kullanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir. Bu grup içerisinde poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri poli(laktik-ko-glikolit) (PLGA) yer almaktadır. PDLLA ortopedik biyomedikal malzemeler konulu araştırmalarda incelenmektedir, Mükemmel hücre içi uyumluluğu nedeniyle osteokondüktif özellik taşımaktadır. Düşük molekül ağırlıklı PDLLA gelişim faktörü, antibiyotik veya thrombin inhibitör uygulamalarında ilaçlarla birleştirilerek ilaç salım sistemlerinde ve doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır [Luu vd., 2003].

Özellikle Elektrospinning ile üretilen PLGA nanofiberlerinden elde edilen doku iskeleleri mekanik olarak çok güçlü bir yapı oluşturmuştur. Doku iskelesi boyunca yer alan nanofiberler hücre yapışmasını ve yeni ECM oluşumunu güçlendirmiştir. PLGA ve PLA-PEG blok ko-polimerinden elde edilen örgüsüz, nano fiberlere sahip doku iskelelerine plasmid DNA başarılı şekilde tutturulmuş ve doku mühendisliği için gen transferi uygulamalarında kullanılmıştır[Luu vd., 2003].

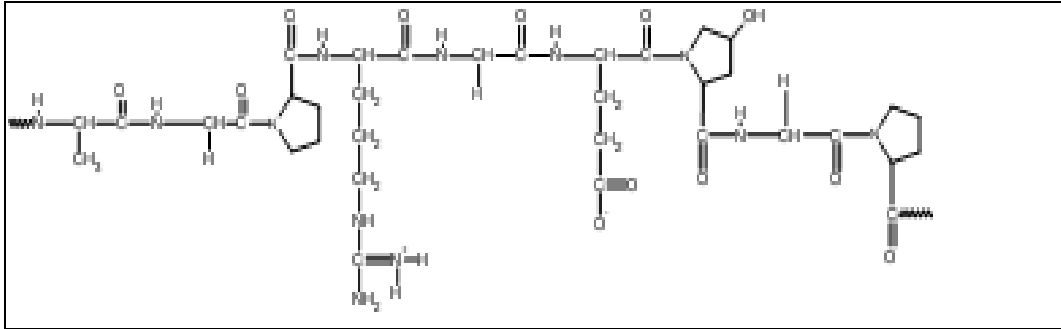
Kapsamlı bir şekilde yürütülmüş olan in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda, PCL birçok medikal ve ilaç salım cihazı için FDA tarafından onaylanmıştır. PCL, yumuşak ve sert doku uyumluluğundan dolayı dikiş ipliği, yapışma bariyeri, ilaç salım cihazı, kemik ve deri yaması olarak kullanılmaktadır. Elektrospinning yöntemi ile biyobozunur PCL membranları hazırlanmış, in vitro ve in vivo olarak karakterize edilmiş ve bu membranların antibiyotik yüklü formları tavşanlarda karın boşluğuna yapışmayı önleyici biyomalzeme olarak denenmiştir [Bölgen vd., 2007].

### 2.3. JELATİN

Jelatin, yarı saydam, kırılğan kokusuz ve suda çözünebilen bir proteindir. Deri, kemik gibi bağ dokularında en bol bulunan kollajenin fiziksel, kimyasal veya ısıl bozunması ile elde edilen hayvansal kaynaklı doğal bir polimerdir. Jelatin, ısıtıldığında erir ve soğutulduğunda tekrar katı hale gelir. Su ile temas ettiğinde koloidal jel oluşturur [Kabiri vd., 2011; Kumari vd., 2010].

Çok sayıda fonksiyonel yan gruba sahip olan jelatin, jelleşme özelliğine sahiptir ve oldukça kolay bir şekilde çapraz bağlanabilir. Jelatin, kollajenin asidik veya bazik hidrolizi ile elde edilebilir [Kabiri vd., 2011; Kumari vd., 2010].

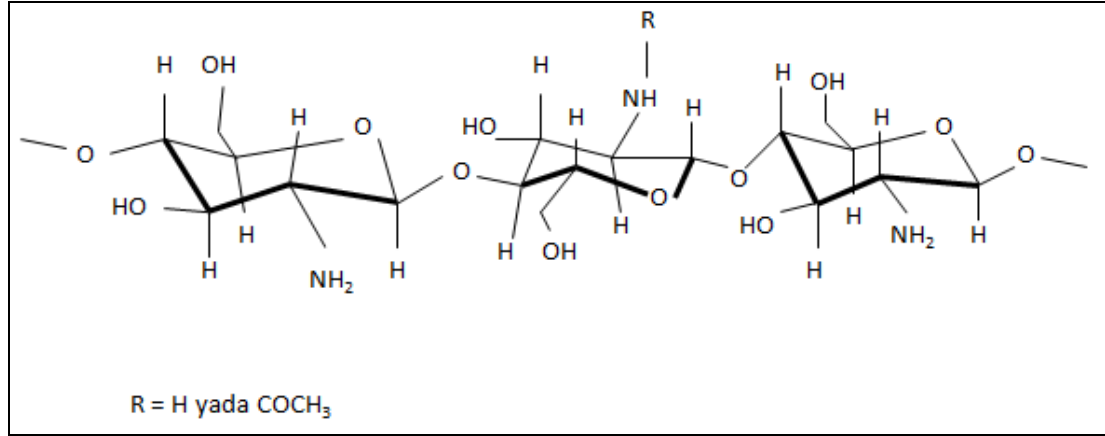
Jelatin, biyouyumlu toksik olmama, biyoetkin ve biyobozunur olma gibi özelliklere sahip olması nedeni ile önemli bir biyomedikal malzemedir. İlaç kapsülleme, kan durdurucu etkin madde, yara örtü zarı ve ilaç salınım sistemlerinde yaygın olarak kullanılır [Kabiri vd., 2011; Kumari vd., 2010].



Şekil 2.1. Jelatin'in kimyasal yapısı [Kumari vd., 2010]

### 2.4. KİTOSAN

Doğal bir polimer olan kitosan, kabukluların dış iskeleti ile fungusların hücre çeperinde bulunur ve  $\beta$ -[1→4]-bağlı, farklı sayıda rastgele konumlanmış N-asetilglikozamin ve D-glikozamin kalıntılarında oluşur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi

Kitosan iyi belirlenmiş tek bir yapıya sahip değildir ve moleküler ağırlığı, asetilasyon derecesi ve sekansı değişebilmektedir. Bu yapısal farklılıklardan dolayı, kitosanın özellikleri de farklılık göstermektedir. Fiziksel özellikler ve kitosana verilen biyolojik cevap, deasetilasyon derecesine ve moleküler ağırlığa bağlıdır. Deasetilasyonun derecesi, N-asetilglukozamin ünitelerinin molar fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır [Elder vd., 2003].

Biyobozunur, katyonik bir polimer olan kitosanın kaynağına ve hazırlanma yöntemine göre ortalama molekül ağırlığı 50-1000 kDa arasında değişmektedir. Ticari olarak bulunan kitosanın deasetilasyon derecesi ise % 50-90 arasındadır [Suh ve Matthew, 2000]. Daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan bazlı materyaller, daha fazla asetamid grubuna sahip olan materyallere göre az nem absorplama, yavaş parçalanma ve yüksek gerilme kuvvetine sahip olma eğilimindedir. Ayrıca daha yüksek derecede deasetillenmiş kitosan substratlarının hücre yapışmasını daha düşük derecede asetilenmiş olanlara göre iyi bir şekilde desteklediği bildirilmiştir. Kitosan yarı-kristalin bir polimerdir ve kristalinite derecesi, deasetilasyon derecesinin bir fonksiyonudur [Elder vd., 2003].

Kitosanın biyolojik olarak yenilenebilir olması; biyobozunur, biyouyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri, bu polimerin ve bu polimer kullanılarak elde edilen komplekslerin yara örtü malzemesi, ilaç dağıtım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca polimer,

immobilizasyon desteği, hemostatik ajan ve biyomateryal olarak da potansiyel kullanıma sahiptir.

Kitosan zayıf asitlerde çözülebilmektedir ve bunun sonucunda yüksek yük yoğunluğuna sahip, katyonik bir polimer oluşmaktadır. Bu özelliğinden dolayı kitosan, birçok anyonik polimerle polielektrolit kompleksler oluşturabilmektedir. Kitosanın makrofajlar üzerinde uyarıcı ve nötrofiller üzerinde de kemoatraktif özellikler gösterdiği bilinmektedir. Bu özelliklerin yanında antibakteriyel ve hemostatik özellikleri de kitosanın yara iyileşmesine yönelik uygulamalarda kullanılma potansiyelini arttırmıştır [Elder vd., 2003; Suh ve Matthew, 2000; Khor ve Lim, 2003].

## 2.5. HİDROKSİAPATİT (HA)

Kimyasal formülü  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  olan kalsiyum tuzudur. Oksijen ile tepkimeye girmediği için yanmaz. Doğada elmastan sonra bilinen en sert moleküldür. Çelik burlarla veya zımparalamayla aşındırılmaz, sadece elmas ile aşındırılabilir. Esnekliği az, neredeyse tamamen kırılıgandır.

Biyoaktif yapıda bir biyomateryaldir. Tatsız ve kokusuzdur. Organik çözücülerde çözünmez. Asit çözücüler hariç inorganik çözücülerde de çözünmez. Hidroksil iyonlarıyla (asit) yapı taşlarına ayrışabilir.

Kemiğin inorganik kısmının temelini kalsiyum fosfatlar oluşturur. Kalsiyum fosfatlar sentetik kemik benzeri olarak kullanılmaktadır. Ticari formlarda bulunan hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) tek başına veya polimerler ile kombine edilerek doku mühendisliği ile ilgili araştırmalarda kemik onarımı sağlamak için kullanılmaktadır. HA sert dokularla mükemmel biyoyumluluğu, yüksek osteokondüktivitesi, düşük degradasyon hızı ve yüksek mekanik mukavemeti ile sert doku oluşumunda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Kalsiyum fosfatlar, sert dokularla iyi biyoyumluluk göstermelerinin yanı sıra yeni kemik dokusunun oluşumunda olumlu etkiler göstermektedirler.



## 2.6. SENTETİK VÜCUT SIVISI

Kokubo ve Takadama yaptıkları çalışmada kalsiyum hidroksiapatiti, nanoboyutlarda yüksek kimyasal homojenlik ve saflıkta çeşitli tuzların özgün bir kompozisyona sahip “Sentetik Vücut Sıvısı (SBF-Simulated Body Fluid)” çözeltilerinde uygun oranlarda çözülmesi ile başlanarak, insan vücudu sıcaklığı olan 37°C’de ve yine insan vücudu pH değeri olan 7.4’te, biyomimetik koşullarda yürütülen özgün bir kimyasal sentez yöntemi ile elde etmiştir [Kokubo ve Takadama, 2006].

Malzemelerin kemik-bağlanma yeteneği, iyon konsantrasyonu neredeyse insan kan plazmasına eşit olan ve SBF adı verilen bir çözelti sayesinde belirlenmektedir. Bu çözelti içerisinde, malzeme yüzeyinde apatit oluşumu, malzemenin biyoaktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi açısından oldukça önemlidir [Kokubo ve Takadama, 2006 ; Lööf vd., 2008]. Yöntem kısaca, malzemenin belirli sürelerde SBF içerisinde bırakılması, daha sonra farklı yüzey analiz teknikleri ile HA tabakasının varlığının ve bu tabakanın ne kadar süre içerisinde oluştuğunun belirlenmesine dayanmaktadır [Lööf vd., 2008].

Jalota ve arkadaşları, herhangi bir muamele görmemiş, NaOH ile muamele görmüş ve SBF ile kaplanmış titanyum köpükler elde etmişler ve bu yapılar içerisinde SBF-kaplı yüzeylerin en yüksek protein üretimi ve hücre bağlanma özelliklerine sahip olduğunu göstermişlerdir [Jalota vd., 2006, 2007, 2008].

Taş ve Bhaduri ise insan kan plazmasının 10 katı kadar kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip olan bir çözelti (10X SBF) hazırlayarak kaplama oluşum kinetiğini desteklemiş ve aynı zamanda kaplama süresini de azaltmışlardır. Bu yöntem sayesinde, Ti6Al4V yüzeylerinde 2-6 saat içerisinde kemik-benzeri apatitik kalsiyum fosfat oluşumunu sağlamışlardır [Taş and Bhaduri, 2004].

## 2.7. KEMİK

Kemiğin organik kısmının temelini tip I kollajen oluşturur. Jelatin, kollajenin termal denatürasyonu veya kimyasal/fiziksel degradasyonu sonucu elde edilen doğal

bir biyopolimerdir. Jelatin, antijenik olmaması, biyobozunur olması, çeşitli tekniklerle proses edilebilmesi, iyi mekanik özellikleri sebebiyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Jelatin, kemiğin doğal bileşeni olan kollajen ile hemen hemen aynı kompozisyona sahiptir.

Kemiğin inorganik kısmının temelini kalsiyum fosfatlar oluşturur. Kalsiyum fosfatlar sentetik kemik benzeri olarak kullanılmaktadır. Ticari formlarda bulunan hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) tek başına veya polimerler ile kombine edilerek doku mühendisliği ile ilgili araştırmalarda kemik onarımı sağlamak için kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfatlar, sert dokularla iyi biyouyumluluk göstermelerinin yanı sıra yeni kemik dokusunun oluşumunda olumlu etkiler göstermektedirler. Kemik dokusu, kalsiyum fosfatlar ve kollajenin kimyasal ve biyolojik olarak birbirine bağlanması ile oluşmuş bir kompozit olarak değerlendirilmektedir.

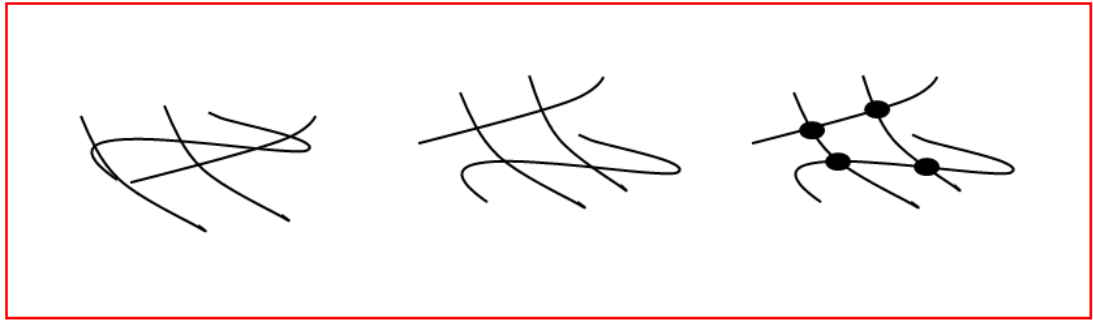
Kemik matrisi organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir malzemedir. Kemiğin ağırlıkça %65'ini inorganik bileşenler, %25'ini organik bileşenler ve %10'unu su oluşturmaktadır. Organik matris, tendon ve ligament gibi fibroz dokulara benzeyen bir yapıdadır. Ağırlıklı olarak kollajen tip 1'den oluşan bu matriste az miktarlarda kollajen tip V ve tip XII bulunmaktadır. Kollajen bileşenler kemiğe şekli ve gerilmelere olan direncini vermektedir. Organik matriste kollajenlere ek olarak osteokalsin, glikoproteinler, proteoglikanlar ve sialoproteinler gibi non-kollajen proteinler de bulunmaktadır [Buckwalter vd., 1995]. Bu proteinlerin matrisin organizasyonunda, kemik mineralizasyonunda ve kemik hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesinde etkisi olduğu bilinmektedir [Sikavitsas vd., 2001].

Kemiğin mineralize inorganik matrisi ise iyon rezervuarı olarak görev yapmaktadır ve kemiğe sertlik özelliğini ve sıkıştırmalara karşı olan direncini vermektedir. Yapılan araştırmalar, kemik mineralinin saf hidroksiapatitten değil, karbonat ve fosfat içeren, karbonat apatitten oluştuğunu ortaya koymuştur.

Organik ve inorganik fazların bir bütünlük kurmasıyla oluşan kompozit yapı, kemiğe gerekli yük taşıma kapasitesini ve kırılmaya karşı olan yüksek direncini kazandırmaktadır [Stevens, 2008; Buckwalter vd., 1995].

## 2.8. ÇAPRAZ BAĞLANMA

Çapraz bağlanma sonucunda bağımsız polimer molekülleri birleşerek stabil, mekanik dayanımı yüksek yapılar oluştururlar. Şekil 2.3.'te polimerin çapraz bağlanma sonucu aldığı yeni form gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Polimerin çapraz bağlanması

Doku iskelelerinin degradasyonu, gözenekliliği ve mekanik özellikleri çapraz bağlanmayla kontrol edilebilir. Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılara, formaldehit, glutraldehit, genipin, trisodyum sitrat, 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) karbodiimide hidroklorid, divinilsülfan, 1,4 bütandiol, diglisid eter örnek verilebilir. Çapraz bağlayıcılar çoğu zaman toksik etki göstermeleri sebebiyle çapraz bağlanma sonucu oluşan jellerin bu moleküllerden arınması için ekstrakte edilmesi veya çok iyi yıkanması gerekmektedir.

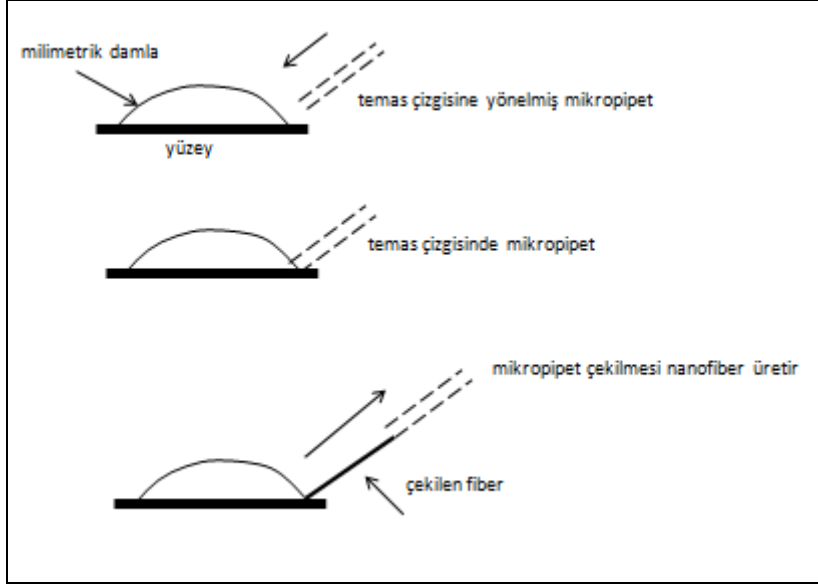
Glutraldehit ( $\text{OHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ), jelatinin serbest amin gruplarını bağlayacak lysine ve hidrosilysine olmak üzere iki tane fonksiyonel gruba sahiptir [M. Chul Chang vd., 2003].

## 2.9. NANOFİBER ÜRETİM YÖNTEMLERİ

Konvansiyonel lif üretim teknikleri ve bu tekniklerde kullanılan düze çapları, nanolif üretimine uygun değildir. Nanolif üretimi için farklı teknikler mevcuttur. Bunlardan bir kısmı laboratuvar ölçeğinde üretim teknikleridir, endüstriyel uygulamaları yoktur; bir kısmı da endüstriyel uygulamaya yöneliktir. En yeni ve en avantajlı nanolif üretim tekniği olarak bilinen elektro çekim tekniği ile ise hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel olarak nanolif üretimi gerçekleştirilebilmektedir.

### 2.9.1. Çekme

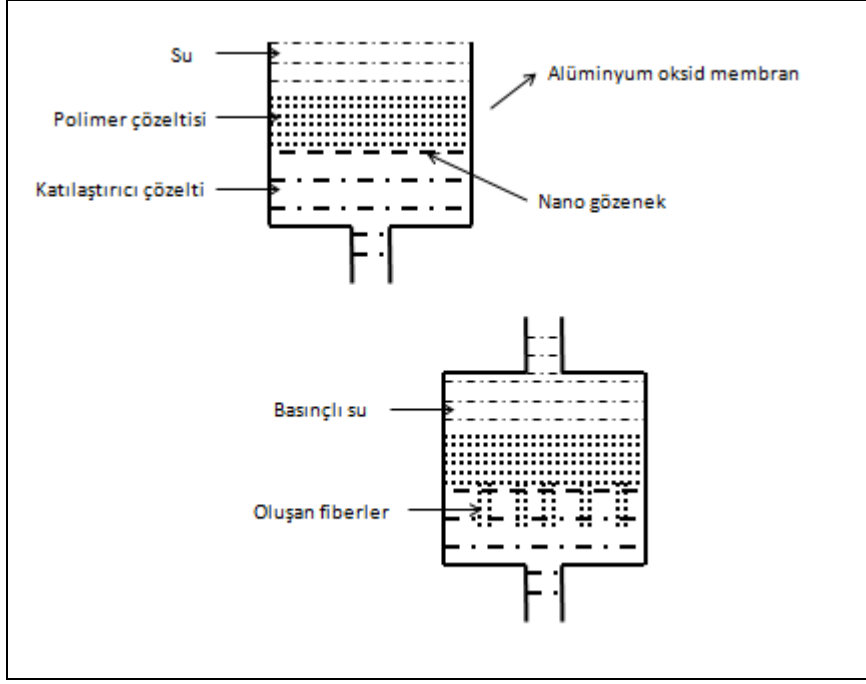
Çekme (Drawing), yöntemi kuru üretim yönteminin moleküler düzeydeki şekli olarak görülebilir [Hatipoğlu, 2006]. Bu yöntemle uzun ve tek nanofiberler elde edilebilir. İşlemden bir mikromanipülator (mikroskop altında hassas işlem yapmaya yarayan bir cihaz) yardımıyla bir mikropipet çözeltinin yüzey ile temas ettiği çizgiye daldırılır ve mikropipet sıvıdan belirli bir hızla çekilir. Bu metodta çözücünün buharlaşmasıyla vizkozite artışı olur ve bunun sonucu olarak fiberlerin parçalanması gerçekleşir. Bu nedenle viskoelastik çözeltilere ihtiyaç duyulur ki kohesif kuvvetler parçalanmayı önlesin. 100 nm altında fiberler elde edilemez. Ayrıca nanofiber çapı da kontrol edilemez. İşlem şematik olarak Şekil 2.4.' de görülmektedir [Ramakrishna vd., 2005]. Çekme az ekipmana ihtiyaç duymasıyla avantajlı, fakat süreksiz bir işlem olması açısından pratik olarak uygulama alanı yoktur.



Şekil 2.4. Çekme yöntemi

### 2.9.2. Kalıp Sentez Yöntemi

Kalıp sentez yöntemi (Template Synthesis), ilk defa Possins tarafından bulunmuş ve Williams ile Guardian tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde nanofiberler, nano gözenekli zarların gözeneklerinden geçirilen çeşitli özel malzemelerle elde edilirler (Şekil 2.5.). Membranlar 5-50 mm kalınlığında olup, silindirik gözeneklere sahiptir. Her bir gözenek, istenen nano yapının sentezlendiği beherler olarak görülebilir. Malzemeye ve gözeneğin kimyasal yapısına bağlı olarak, nano silindirler, nano boru(tüp) ya da fiberler şeklindedir [Jayaraman vd., 2004].



Şekil 2.5. Kalıp sentez yöntemi

### 2.9.3. Faz Ayrımı

Adından da anlaşılacağı gibi bu metotta bir faz ayrımı gerçekleşir. İşlem genel olarak beş aşamada yapılır:

- Polimerin çözülmesi
- Jellenme
- Çözücü ekstraksiyonu
- Soğutma
- Soğutma-Kurutma

### 2.9.4. Kendiliğinden Birleşme

Kendiliğinden birleşme (self assembly) yönteminde atom ya da moleküller kendiliğinden zayıf ve non-kovalent etkileşimlerle (H-bağı, hidrofobik kuvvetler...) belirli yapılar düzenlenirler [Zhang vd., 2005].

### 2.9.5. Çift Bileşenli Ekstrüzyon

Çift bileşenli fiberler aynı fiber içinde birlikte bulunan iki polimerin ayrı düzeden çıkması olarak tanımlanabilir. Yöntemde istenilen oranda karışmış iki polimerin- biri diğerinin eriği içinde süspanse edilir- aynı anda ekstürüzyonu gerçekleştirilir. Ayrıca istenirse bir bileşen ısı ya da çözücü ile ortamdan uzaklaştırılabilir [Materials Science&Engineering, 2004].

### 2.9.6. Elektrospinning

Nanofiber üretim yöntemleri arasında en etkili ve en kolay uygulanabilen metod *Elektrospinning* (Elektrodokuma / elektroegirme) yöntemidir.

## 2.10. ELEKTROSPİNNİNG

### 2.10.1. Tarihsel Gelişimi

Elektrospinning işleminin temelleri yaklaşık olarak 400 yıl öncesine; “*Elektro-hidrokinamik atomizasyon ya da püskürtme* (Electrohydrodynamic atomization or spraying(EHD))”olarak bilinen, bir sıvı damlasına elektrik uygulanması işlemine dayanır. Kapilerin ucunda buluna yarı küresel damlaya elektrik verildiğinde; damlanın yüzey gerilimini yenerek bir koni şekline aldığı ve hemen ardından da ufak damlalara ayrılan bir jet halinde kapilerden ayrıldığı belirlenmiştir.

Elektrospinning yöntemi yeni bir teknoloji değildir. Bu yöntem 1600’lü yıllarda, William Gilbert’in manyetizma üzerine çalışırken elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır. Çalışmasında bir su damlasını elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir mesafede, bir koni biçiminde çekildiğine işaret etmiştir. İşte bu elektrospray ve elektrospinning işleminin tarihinin başladığı noktadır [Kataphinan vd., 2005].

Elektrostatik eğirme olarak da bilinen bu teknik ile 1700’lü yıllardan bu yana çalışmalar yapılmaktadır. 1745 yılında Bose, aerosolları, akışkan damlalarına yüksek

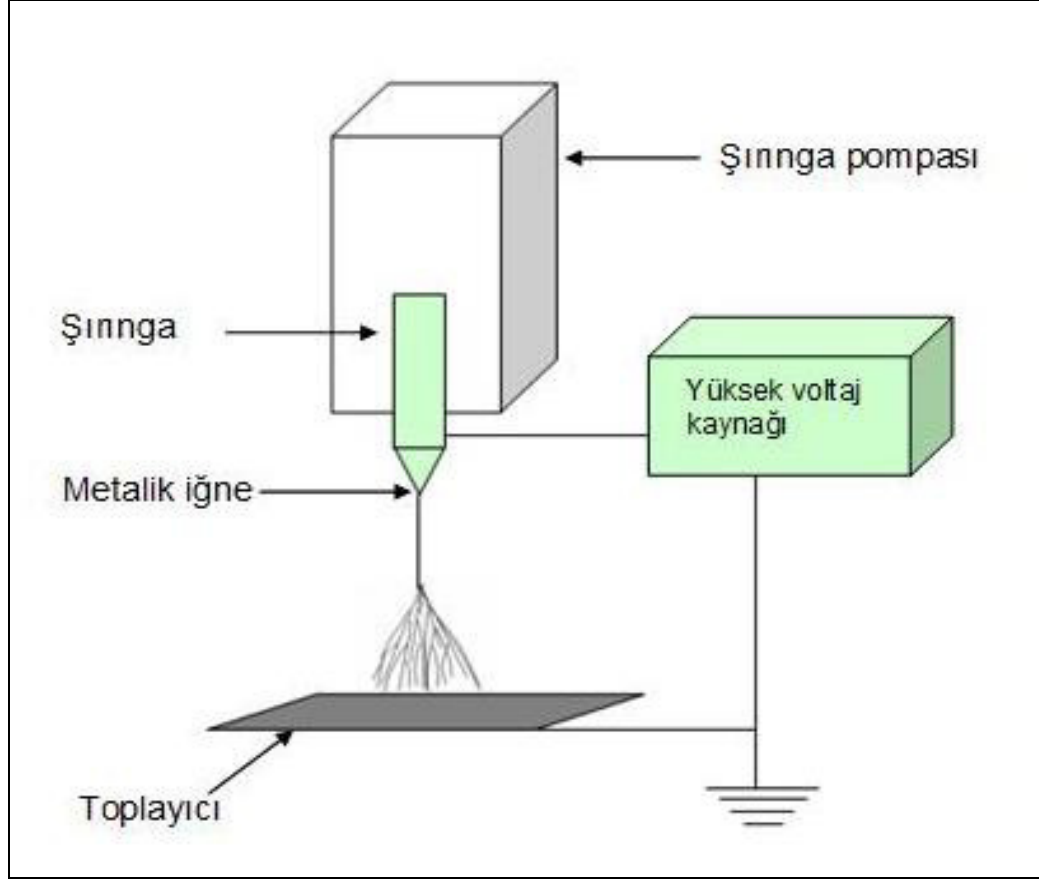
elektrik potansiyelinin uygulanması sonucu elde edilen yapılar olarak tanımlamış ve ardından 1882’de Lord Rayleigh kaç adet yükün damlacıktaki yüzey geriliminin üstesinden geldiği sorusuna cevap bulmuştur. 1902 ve 1903 yıllarında elektriksel yük uygulanması ile sıvıların püskürtülmesi için kullanılan cihazların ilk patentleri Cooley ve Morton tarafından alınmıştır [Greiner ve Wendorff, 2007]. 1934 yılında Anton Formhalas, çözeltilen mikrometre çaplarında selüloz asetat fiberler üretmiş ve patentini almış fakat yöntem ticari olarak kullanılmamıştır. 1960’lara gelindiğinde Taylor tarafından jet oluşumu ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. 1969 yılında Taylor, koni şeklinde olan ve iğne ucunda elektrik alan sebebiyle oluşan polimer damlasının şekli ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Bu yıllardan sonra polimer damlacığının konik şekli araştırmacılar tarafından Taylor konisi olarak anılmaya başlanmıştır [Subbiah vd., 2004; Lyons ve Ko, 2005]. 1971 yılında Baumgarten ve ekibi ilk kez bir mikron altındaki fiberlerin üretimini gerçekleştirmiş ve bu yıllardan itibaren araştırmacılar nanofiberlerin morfolojisi ile ilgili çalışmalar yapmaya başlamıştır [Lyons ve Ko, 2005]. 1987’ de Hayati ve ekibi deneysel koşullar ve elektrik alanın fiber kararlılığına etkisini araştırmışlardır. On yıllık bir sürecin ardından araştırmacılar Elektrospinning tekniği ile üretilen nanofiberlerin, filtreleme, koruyucu kıyafetler katalizör altlıklar gibi uygulama alanlarında yüksek verim ile kullanımını sağlamak amacıyla çalışmalara başlamışlardır.

Bu teknik ile ilgili akademik çalışmalar 1990’ lı yıllarda Reneker ve grubunun çalışmaları ile hız kazanmıştır. Bu yöntemin araştırmacılar açısından ilgi çekici olmasının bir sebebi de birçok bilim ve mühendislik alanlarına hitap ediyor olmasıdır [Subbiah vd., 2004].

## 2.10.2. Elektrospinning Yönteminin Mekanizması

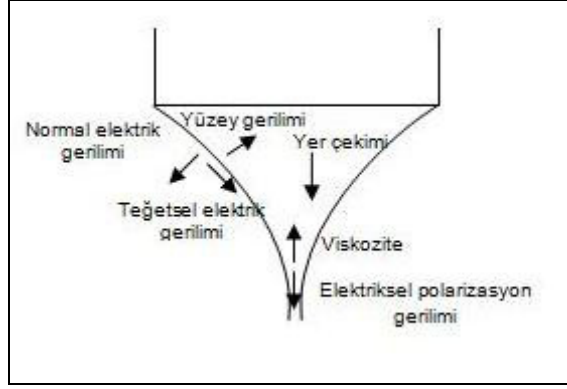
Elektrospinning yöntemi, dolu ve boşluklu içyapılı, sürekli, düzenli çapta ve polimer, metal oksitler veya seramikler gibi çeşitli malzemelerden nanofiber üretimine olanak sağlamaktadır. Diğer yöntemlerden farklı olarak bu yöntem ile bir boyutlu nanoyapıların oluşturulması; polimer çözeltisinden oluşan viskoelastik jetin tek eksenli uzaması olayına bağlıdır.





Şekil 2.6. Elektrosinning sisteminin şematik gösterimi

Elektrosinning sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler yüksek voltaj kaynağı, metalik iğne ve toplayıcı altlıktır (Şekil 2.6.). Alternatif akım kullanımının da yaygın olmasına karşın Elektrosinning yönteminde genellikle doğru akım kullanılmaktadır. Metalik iğne içerisinde polimer çözeltisi bulunan bir şırınganın ucunda yer almaktadır. Şırınga pompasının kullanımı ile çözelti iğneye doğru sabit ve kontrol edilebilir bir hızla beslenir. Genellikle 1–30 kV arası yüksek gerilim uygulandığı zaman iğne ucunda asılı duran polimer damlacığı elektriklenir ve indüklenmiş olan yük damlacık yüzeyine eşit olarak dağılır [Dan ve Xia, 2004; Sigmund vd., 2006].



Şekil 2.7. Taylor konisinin oluşumuna etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi

İşlem sırasında iğne ağzından çıkan damlacığa etki eden kuvvetler; yerçekimi, yüzey gerilmesi ve elektriksel gerilme kuvvetleridir (Şekil 2.7.). Bu kuvvetler birbirini dengeleyerek iğne ucunda Taylor konisi oluşturur ve tüm kuvvetlerin birbirini dengelemesine bağlı olarak damla veya sıvı jet meydana gelir. Bu elektriklenmiş jet hızla uzayarak uzun ve ince ipliksi yapı oluşur. Sıvı jetin devamlı uzaması ve çözücünün buharlaşması sonucunda fiber çapı mikrometre seviyesinden yüz nanometre gibi küçük değerlere düşer. Böylece nanometre mertebesinde sürekli fiberler elde edilir [Sigmund vd., 2006; Kowalewsk vd., 2005].

### 2.10.3. Elektrosinning Yöntemine Etki Eden Parametreler

Elektrosinning yöntemi yüksek yüzey alanı / hacim ve uzunluk/çap oranına sahip gözenek boyutu kontrol edilebilen ve çapı 10 ile 100 nm aralığında değişen nanofiber ve nanotüp üretimine olanak sağlamaktadır. Ayrıca; bu yöntem ile fiber üretim parametreleri değiştirilerek farklı yapıda nanofiber üretmek mümkün olmaktadır. Fiberlerin yapısını ve boyutunu belirleyen parametreler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Elektrosinning yönteminde fiber üretimine etki eden parametreler

Çözelti Özellikleri	İşlem Parametreleri	Çevre Koşulları
Moleküler ağırlık ve viskozite	Uygulanan voltaj	Sıcaklık
Yüzey gerilim kuvveti	Akış hızı	Nem
İletkenlik	Çözelti sıcaklığı	Atmosfer cinsi
Dielektrik sabiti	İğne-altlık mesafesi	Basınç

#### 2.10.3.1 Çözelti Özellikleri

Elektrospinning sırasında kullanılacak çözeltinin özellikleri elde edilecek fiber yapısını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu özellikler viskozite, yüzey gerilimi, çözelti iletkenliği ve çözeltinin dielektrik sabitidir [Ramakrishna vd., 2005].

#### *Moleküler Ağırlık ve Viskozite*

Çözelti hazırlama aşamasında yoğunlaştırıcı olarak kullanılan polimerlerin moleküler ağırlığı çözelti viskozitesini etkilemektedir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerler kullanılarak hazırlanan çözeltilerin viskoziteleri de yüksek olmaktadır. Bu nedenle Elektrospinning sırasında fiber üretimini sağlayacak şekilde uygun moleküler ağırlıkta polimerler kullanılmalıdır. Ayrıca çözelti viskozitesini arttırmak için polimer konsantrasyonu da değiştirilebilir.

Üretim sırasında kullanılan çözeltinin viskozitesinin çok yüksek değerde olması iğne ucunun tıkanmasına çok düşük olması da çözeltinin yerçekimi etkisi ile iğne ucundan damlamasına ve üretimin engellenmesine neden olur. Bunun için çözelti viskozitesi çok iyi ayarlanmalıdır. Ayrıca çözelti viskozitesinin üretim sırasında sıvı jetin parçalanması sonucu oluşan ve istenmeyen bir durum olan boncuksu yapı oluşumu üzerinde etkisi vardır. Düşük viskoziteli çözeltilerden üretilen fiberlerin üzerinde boncuk meydana gelmektedir. Çözelti viskozitesi arttırıldığında boncukların şekli küreden elipse dönüşmekte ve giderek yok olmaktadır. Çözelti viskozitesinin etkilediği diğer bir özellik ise fiber çapıdır. Yüksek viskoziteli çözeltilerden daha kalın fiberler elde edilmektedir [Deitzel vd., 2001].

#### *Yüzey Gerilim Kuvveti*

Elektrospinning sırasında fiber üretiminin gerçekleşebilmesi için elektrostatik kuvvetlerin yüzey gerilim kuvvetini yenmesi gerekir. Ayrıca yüzey gerilim kuvveti üretim sırasında boncuk oluşumuna da neden olabilir. Çözücü moleküllerinin konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgelerde yüzey gerilim kuvvetinin etkisi ile moleküller bir araya toplanarak küresel şekil meydana getirirler. Yüksek viskoziteye

sahip çözeltilerde çözücü molekülleri ile polimer molekülleri arasındaki etkileşim nedeni ile boncuk oluşumu engellenmiş olur.

### *Çözelti İletkenliği*

Elektrospinning işlemi sırasında oluşan jetin yüzeyindeki yüklerin birbirini itmesi nedeni ile jet üzerinde uzama meydana gelir. Eğer çözelti iletkenliği arttırılırsa jet üzerinde daha fazla yük taşınabilir. Çözeltinin iletkenliği iyon ilavesi ile arttırılabilir. Eğer çözelti tam gerilme göstermez ise boncuk oluşumu gözlemlenir. Çözeltiye tuz ilavesi yapılarak jetin üzerinde meydana gelen gerilme ve uzama arttırılmış olur ve aynı zamanda boncuk oluşumu da engellenir. Zong ve ekibi iyonların fiber morfolojisine etkisini araştırmışlardır ve poli-D-laktit (PDLA) fiberlerin üretimi için hazırlanan çözeltilere  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve  $\text{NaCl}$  iyonik tuzları ilavesi yaparak boncuksuz ve daha küçük çaplara sahip fiberler elde edildiğini gözlemlemiştir [Zong vd., 2002]. Çözelti içerisinde iyonların bulunması çözeltinin iletkenliğini artırır ve Elektrospinning işlemi ile fiber üretimi için gerekli kritik voltajın düşmesini sağlar ve altlık üzerinde daha geniş bir alanda fiber oluşumuna olanak sağlar.

### *Çözücünün Dielektrik Sabiti*

Elektrospinning işlemine çözücünün dielektrik sabitinin de büyük bir etkisi vardır. Çözeltinin dielektrik sabiti yüksek olması, boncuklu yapının oluşumunu engellediği gibi daha düşük çapta fiber üretimine neden olur. N-N Dimetilformamit (DMF) gibi çözücüler ilave edildikleri çözeltinin dielektrik özelliklerini artırır ve fiber morfolojisinin daha iyi olmasını sağlar. Jetin kararsızlığı çözücünün dielektrik sabitinin artması ile artmaktadır. Bu artış daha geniş bir bölgede ve daha küçük çaplarda fiber birikimini sağlar [Ramakrishna vd., 2005].

### *Çözücünün Uçuculuğu*

Çözücünün hızlı bir şekilde buharlaşması ve jetin incelirken hızlı şekilde faz ayrışmasının meydana gelmesi önemli bir faktördür. Çözücünün buhar basıncı, buharlaşma hızı ve kuruma süresi için önemli bir etkidir. Lee ve ekibi polivinil

klorür (PVC) fiberlerin üretiminde çözücünün hacimsel oranının fiber çapı ve morfolojisi üzerine etkisini araştırmış ve ortalama fiber çapının tetrahidrofuran (THF) / N-N Dimetilformamit (DMF) karışımından oluşan çözücüde DMF miktarının artışı ile azaldığını belirlemiştir. Megelski ve ekibi ise polistren (PS) fiberlerin üretiminde THF/DMF karışımını farklı oranlarda kullanmış ve daha yüksek uçuculuğa sahip olan karışımlar ile yapılan çalışmalarda daha yoğun bir fiber oluşumu gözlemlemiştir [Ramakrishna vd., 2005; Subbiah vd., 2004].

### 2.10.3.2. İşlem Parametreleri

Elektrospinning işlemindeki diğer bir önemli faktör de işlem parametreleridir. Bu parametreler işlem sırasında uygulanan voltaj, çözeltinin akış hızı, çözeltinin sıcaklığı, fiberlerin toplandığı altlık cinsi, kullanılan iğnenin çapı ve iğne ucu ile toplayıcı altlık arasındaki mesafedir.

#### *Uygulanan Voltaj*

Elektrospinning işleminin en temel parametresi çözeltiliye uygulanan yüksek voltajdır. Yüksek voltaj çözeltiliye elektrik alandan etkilenebilmesi için gerekli olan yükü ve iğne ucu ile altlık arasında elektrik alanının oluşmasını sağlar. 6 kV kritik bir voltaj değeridir. 6kV' dan daha düşük voltaj değerlerinde çözeltinin iğne ucunda Taylor konisi şeklini alması ve nanofiber oluşumu imkansızdır. 6 kV' un üzerindeki voltaj değerleri jetin voltajın uygulandığı yönde hareket etmesine neden olur. Jet üzerindeki yüklerden kaynaklanan itici kuvvetlerin etkisi ile viskoelastik çözelti gerilir. Eğer gerilim arttırılırsa çözelti üzerinde daha fazla yük birikimi olur ve daha hızlı jet oluşumu meydana gelir. Fakat bu durum Taylor konisinin kararsız olmasına neden olur [Ramakrishna vd., 2005].

Elektrospinning işlemi sırasında yüksek gerilim uygulandığında çözelti üzerinde biriken yük miktarı artarken, bu yüklerin meydana getirdiği itici kuvvet de artar. Böylelikle jet üzerinde meydana gelen gerilim yani uzama artar ve daha ince fiber elde edilir. Düşük viskoziteye sahip bir çözeltiliye yüksek voltaj uygulanması durumunda işlem sırasında ikinci bir jet oluşumu meydana gelir bu durum fiber çapında düşüğe neden olur. Fiber çapını etkileyen diğer bir durum ise

Elektrospinning jetinin havada kaldığı süredir. Bu sürenin uzun olması fiberlerin toplayıcı yüzeye birikmeden önce daha uzun süre gerilmesi ve uzamasına neden olur. Böylece düşük voltaj uygulanması durumunda jetin hızının ve elektrik alanının azalması jetin havada kaldığı süreyi artırarak daha ince fiber oluşumunu sağlar.

Yüksek voltajın boncuklu yapı oluşumuna yoğun bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, boncuk şekli de voltaj artışı ile küresel hale geçer. Yüksek voltaja bağlı olarak artan jet geriliminin daha az boncuk oluşumuna neden olduğu bazı çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bazı çalışmalarda gözlemlenen voltaj artışı ile boncuk yoğunluğunun arttığı durumlar jetin kararsızlığının artması ile açıklanmaktadır [Ramakrishna vd., 2005].

Yüksek gerilim fiberlerin fiziksel görünüşünün yanı sıra kristal yapısına da etki etmektedir. Uygulanan elektrik alan polimer moleküllerinin daha düzenli bir şekilde dizilmelerine neden olur ve fiberlerin kristal yapısını etkiler. Fakat polimer moleküllerinin belirli bir şekilde dizilebilmeleri için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Bu süre polimer damlasının iğne ucundan çıkıp altlık üzerine ulaşmaya kadar geçen zamandır. Eğer gerilim arttırılırsa bu süre kısalacağı için kristalleşme için gerekli süre olmayabilir. Bu nedenle voltaj ne çok yüksek ne de az olmalıdır, belirli bir kritik değerde ayarlanmalıdır [Ramakrishna vd., 2005].

Elektrospinning işleminde genellikle doğru akım (DC) voltaj kaynakları kullanılmakta olup, alternatif akım (AC) voltaj kaynaklarının da kullanılması mümkündür. Çözeltinin yüklenmesi jet oluşumu, gerilim ve eğme kararsızlığına yol açar. AC kaynaklarda, çözeltinin yüklenmesi ve jet oluşumu voltaj değişiminden önce gerçekleşir. DC kaynaklarında jette daha az eğme kararsızlığı ve gerilim oluşur ve elde edilen fiberlerin çapları daha kalındır [Ramakrishna vd., 2005].

### *Çözelti Akış Hızı*

Çözelti akış hızı Elektrospinning için gerekli çözelti miktarını belirler. Elektrospinning için uygun çözelti akış hızının kritik değeri Taylor konisinin kararlı olduğu değerdir. Akış hızı bu kritik değeri geçtiğinde fiber çapı ve boncuk oluşumu da artar. Megelski ve ekibi PS fiberlerin çaplarına, akış hızı artışının etkisini

incelemiştir. Artan akış hızı ile fiber çapları 90 nm'den 150 nm'ye arttığını ve yapıda daha çok boncuk oluştuğunu belirlemiştir [Subbiah vd., 2004].

### *Çözelti Sıcaklığı*

Çözelti sıcaklığının yüksek olması çözeltinin Elektrospinning işlemi sırasında buharlaşma hızını artırırken viskozitesinin azalmasına neden olur. Yüksek sıcaklığa sahip çözeltilerden daha düzgün fiberler elde edilir. Artan sıcaklık, polimer moleküllerinin hareketliliğinin artmasına ve sonuçta kolombik kuvvetlerin çözeltinin gerilimini artırmasına sebep olur. Ayrıca, yüksek sıcaklık yapılan çalışmalarda enzim, protein gibi çözeltilere eklenen biyolojik materyallerin fonksiyonelliğini yitirmesine sebep olabilir [Ramakrishna vd., 2005].

### *Toplayıcı Altlık*

Elektrospinning işleminde iğne ucu ile altlık arasında elektrik alan oluşturulması gerektiğinden altlıkların iletken olması gerekir. Bu nedenle altlık olarak alüminyum folyo gibi iletken malzemeler kullanılır. İletken olmayan bir altlık kullanılırsa toplayıcı üzerine daha az fiber birikimi gerçekleşir [Ramakrishna vd., 2005].

### *İğne Ucu ile Altlık Arasındaki Mesafe*

İğne ucu ile altlık arasındaki mesafe fiberin havada kalma süresi ve elektrik alanının büyüklüğünü etkilemektedir. İğne ucu ile altlık arasındaki mesafe arttıkça fiberin havada kalma süresi artarken elektrik alanın şiddeti azalmaktadır. Fiberlerin havada kalma süresi fiberin altlığa ulaşmadan önce yapısındaki çözücünün buharlaşması açısından önemlidir. İğne ucu ile altlık arasındaki mesafe arttıkça çözücünün buharlaşması için daha uzun bir süre açığa çıkar. Buchko ve ekibi yaptıkları çalışma sonucu mesafenin çok küçük olduğu durumlarda iğne ucu ile toplayıcı arasında oluşan elektrik alan kuvvetine bağlı olarak boncuksu yapı oluşumu gözlemlemiştir. İğne ucu ile altlık arasındaki mesafe azalması uygulanan voltajın artması ile benzer etkiye sahiptir. Önceki kısımlarda bahsedildiği üzere elektrik alan kuvvetinin artması jetin kararsızlığının artmasına ve bu durumda boncuksu yapının

oluşumuna neden olur. Mesafenin artması, jetin havada kalma süresinin ve uzamasının artmasına neden olur ve ortalama fiber çapında azalma meydana gelir. Mesafenin çok fazla olması halinde ise fiber oluşumu gözlemlenmeyebilir. Bu nedenle fiber üretimi için en uygun elektrik alan kuvveti belirlenmelidir [Ramakrishna vd., 2005].

### 2.10.3.3. Çevre Koşulları

Jeti çevreleyen atmosfer koşulları üretilen fiberin yapısı açısından önemli etkiye sahiptir. Bu koşullar nem, atmosfer cinsi ve basınçtır [Subbiah vd., 2004].

#### *Nem*

Çevre koşullarından nem fiber yapısını önemli ölçüde etkilemektedir. Yüksek nemli ortamlarda gerçekleştirilen üretimlerde su moleküllerinin fiber üzerinde yoğunlaşması nedeni ile gözenekli fiber yapısı meydana gelmektedir. Nem miktarının artması oluşan gözeneklerin boyutunun ve derinliğinin artmasına sebep olmaktadır. Ortamın nemi aynı zamanda üretim sırasında çözücünün fiberden buharlaşma hızını da etkilemektedir. Nemsiz ortamlarda çözücünün buharlaşma hızı daha yüksek olmaktadır [Ramakrishna vd., 2005].

#### *Atmosfer cinsi*

Elektrospinning işleminin yapıldığı ortam koşulları fiber üretiminin gerçekleşmesi açısından önemlidir. Gazların elektrik alan altındaki davranışları farklılık göstermektedir. Örneğin, helyum gazı elektrik alan altında parçalanmakta ve Elektrospinning işleminin gerçekleşmesine engel olmaktadır. Bununla beraber Freon-12 gibi yüksek parçalanma voltajına sahip gaz ortamında üretilen fiberler benzer üretim koşullarında hava ortamında üretilen fiberler iki katı büyüklüğünde çapa sahiptir [Ramakrishna vd., 2005].



## *Basınç*

Düşük basınçlı ortamlarda gerçekleştirilen Elektrospinning istenilen bir işlem değildir. Çünkü iğne ucundaki çözelti düşük basınçta işlem gerçekleştirilemeden toplayıcı üzerine düşer. Ayrıca düşük basınç, jet üzerindeki elektrik yüklerinin kolay boşalması nedeni ile Elektrospinning işlemini olanaksız kılmaktadır [Ramakrishna vd., 2005].

### 2.10.4. Doku Mühendisliği Uygulamaları

Doku mühendisliği en heyecan verici disiplinler arası araştırma alanlarından biridir ve son yıllarda bu alanda oldukça yayın çıkmaktadır. Doku mühendisliği, yaşayan hücreler kullanılarak, bunların hücre dışı çevreleriyle ya da genetik olarak değiştirilerek vücut içi implantasyonlar için biyolojik değiştirilebilir parçalar geliştirmeyi ve/veya dokuların daha etkin bir şekilde büyütülmesini içerir. Amaç onarmak, yenilemek, olduğu gibi devam etmesini sağlamak ya da o doku veya organın özelliklerini iyileştirmektir.

Bu amacı gerçekleştiren teknolojiler üç alana ayrılabilir; hücre teknolojisi, iskele yapım teknolojisi ve in vivo (canlı içi) kullanımı için teknolojiler. iskele yapım teknolojisi; hücre büyütülmesi için üç boyutlu iskele yapılarının tasarımı, üretimi ve karakterizasyonu ile in vitro (yapay koşullarda) ve in vivo kültürlerinin gerçekleştirilmesini içerir.

Bir iskele yapısının fonksiyonel olarak etkili olabilmesi için, yeni dokunun doğru tasarım parametrelerini sağlaması gerekmektedir. Polimer bazlı bir iskele yapısı için birkaç kabul gören temel gereksinimler vardır [Ma, 2004]. Öncelikle iskele yapı uygun gözenek boyutu dağılımına sahip yüksek gözeneklilikte olmalıdır. İkinci olarak geniş bir yüzey alanı gereklidir. Yeni doku gelişimine uygun olarak bozunan, biyobozunur polimerlerin tercih edilmesi de üçüncü gereksinimdir. Dördüncü parametre ise yeni doku oluşumu sırasında iskele yapının, gözeneklerin kapanmasını önleyecek kadar mekanik bir dayanıma sahip olmasıdır. Son olarak iskele yapı toksik olmamalı ve hücrenin yapışmasına, çoğalmasına izin verecek şekilde biyoyumlu olmalıdır.

Bugüne kadar Elektrospinning yöntemi ile doku büyütülmesi için yapılmış yüzlerce nanofiber ağ yapısına dair makaleler çıkmıştır. Kullanılan nanofiberler; sentetik, doğal, biyobozunur ya da biyobozunmaz polimerlerden sentezlenmiştir. Hücre kültürü; kaslar, kemikler, kırık dalkar, deri, sinir dokuları, damarlar gibi çeşitli dokular için gerçekleştirilebilmiştir.

İlk defa kolajen nanofiberler kas hücrelerinin kültürü için kullanılmıştır [Matthews vd., 2002]. Kemik dokusu çalışmaları da kas çalışmaları kadar eskidir. Hücre büyütülmesi poli(laktit-ko-glikolik asit) (PLGA) nanofiberler ile sağlanmıştır [Li vd., 2002].

Kemik dokusunun üzerine çalışmalarda PCL çok fazla çalışılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin( MSCs) PCL ağ yapısının içine doğru bir hafta içinde yayıldığı ve minerilizasyon ve tip I kolajenin 4 hafta içinde oluştuğu gözlemlenmiştir. Bir in vivo deneyi de yine MSC 'nin kültürünün yapıldığı PCL yapısı ile farelerin omentası (karın içerisinde, bağırsakları örten oluşum) içinde gerçekleştirilmiştir [Shin vd., 2004]. 4 hafta sonra kemik şeklinde bir görüntüye dönüşmüştür. Saf PCL dışında, PCL/jelatin karışımı, ve PCL 'nin kalsiyum karbonat nano parçacıkları ve hidroksiapatit (HAP) nano parçacıkları ile olan kompozitleri de kemik doku mühendisliğinde kullanılmıştır. %50 jelatin ilavesi mekanik dayanımı ve yüzey ıslanabilirliğinin geliştirdiği ve dolayısıyla hücre tutunması ve hücre büyümesini iyileştirdiği belirlenmiştir. İnorganik nano partiküller içeren PCL 'nin daha iyi kemik oluşumunu destekleyeceği düşünülmüştür. PCL yüzeyi kalsiyum fosfat ile kaplanarak kemik gibi bir yapı oluşturulmuş ve bu yapı daha iyi ıslanabilirlik sağlamıştır [Duan vd., 2007].

İpek fibroin nano fiberleri de kemik dokuları için kullanılmıştır. İpek nanofiberlerin yüksek biyouyumluluğu ile kemik oluşumunu hiçbir tahriş olmadan gerçekleştirmiştir. Ayrıca kemik dokusu geliştirmek için daha birçok polimerik nanofiber çalışılmıştır.

Elektrospinning yönteminin doku mühendisliği uygulamalarından biri de kan damarı hücrelerinin oluşturulmasıdır. Kan damarları için endotelial hücreler (damarın iç çeperindeki hücreler) elektrodokunmuş yüzeyler ile çalışılmıştır.

### *Yara örtücüler*

Yara iyileşmesi deri dokularının doğal olarak yenilenmesi işlemidir. Bir kişi yaralandığında birçok karmaşık biyokimyasal olay hasarı onarmak için gerçekleşir. Bu olaylar şu şekilde sınıflandırılabilir; yangı(canlı dokunun hasara verdiği yanıt ve kızarıklığa neden olur), çoğalma, fazların yeniden madellenmesi ve epitelyum dokunun oluşumu. Doğal olarak vücut derin deri kesiklerinin onaramaz. Deri yanıklar ve yaralanmalarda yeniden doku onarımı için yeterli hücre yoktur (yara uçları hariç). Sonuç olarak yeni epitel dokunun oluşması zaman alır ve iz kalması meydana gelir [Marler vd., 1998].

Yara örtüsünün görevi yarayı koruyup yara bölgesinden fazla vücut sıvılarının dışarı atılmasını, dış mikroorganizmaların bulaşmasını önlemeyi yaranın görünümünü düzeltmeyi ve bazende yaranın daha hızlı iyileşmesini sağlamaktır. Bu görevler için yara örtücü fiziksel bir bariyer olmalı ancak aynı zamanda da oksijen ve nemin geçişine izin vermelidir [Marler vd., 1998].

Elektroğrılmış nano fiberler yara örtücü materyaller için çok uygun adaylardır. Bunu gözeneklerinin yaradan sıvıların atılmasını sağlaması, oksijen ve nemin girişine elverişli olması, mikroorganizmaları önlemesi ve elde edilen fiberlere ilaç eklenebilmesine borçludur.

### *İlaç Salınımı*

Kontrollü salınım ilaçların dağıtımında etkili bir yoldur. Kontrollü salınım ilacın teslim edilmesinin kinetiklerini dengeleyebilir, toksisiteyi azaltabilir ve hastanın daha rahat etmesine neden olabilir. Kontrollü salınım sisteminde aktif madde bir taşıyıcıya yüklenir ve bu taşıyıcının canlı içinde aktif molekülün bilinen bir hızda salınımını sağlar. Elektroğrılmış nano fiberlerin ilaç salınımında kullanılmasının çeşitli avantajları vardır. İlaç yüklemesi Elektrospinning işlemi sırasında kolaylıkla yapılabilir. Geniş yüzey alanı ve kısa difüzyon geçiş uzunluğu nano fiber ilaç sistemine örneğin bir filme oranla daha hızlı bir salınım sağlar [Yih ve Al-Fandi, 2006].

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. MATERYAL**

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan materyaller aşağıda verilmektedir.

##### **3.1.1. Nanofiber Üretiminde Kullanılan Materyaller**

###### **3.1.1.1. Jelatin**

Genellikle gıda sanayiinde yiyeceklerin dayanıklılığını arttırmak için jelleştirme ajanı, yapı sağlayıcı, bağlama ajanı, koyulaştırıcı vs. olarak kullanılır. Bunun yanında, eczacılık, fotoğrafçılık ve kozmetikte de ürün yapımında kullanılır. Jelatin, kollajenin termal denatürasyonu veya kimyasal/fiziksel degradesyonu sonucu elde edilen doğal bir biyopolimerdir.

Bu çalışmada kullanılan jelatin, mikrobiyoloji uygulamalarında kullanılan jelatindir ve MERCK (Almanya) firmasından alınmıştır.

###### **3.1.1.2. Kitosan**

Bu çalışmada kullanılan Kitosan; düşük molekül ağırlıklı (low molecular weight) ve yüksek viskoziteli (highly viscous) Sigma – Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

###### **3.1.1.3. Gluteraldehit**

Doku iskelesi üretiminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasının yanı sıra tıpta dezenfeksiyon ve sterilizasyon için kullanılır. Bu çalışmada kullanılan gluteraldehit, %25 sulu çözelti formundadır ve Merck (Almanya) firmasından alınmıştır.

#### 3.1.1.4. Asetik Asit

Bu çalışmada kullanılan Asetik asit; Sigma – Aldrich (Almanya) firmasından alınan %100 saflıktaki glacial asettir.

#### 3.1.1.5. Formik Asit

Bu çalışmada kullanılan Formik asit Pancleac firmasından temin edilmiştir.

#### 3.1.1.6. Diklorometan

Bu çalışmada kullanılan Diklorometan Carlo Erba firmasından alınmıştır.

Tüm deneylerde distile su kullanılmıştır.

#### 3.1.1.7. Gama Yüksek Gerilim Cihazı

Gama yüksek gerilim cihazı (ES40P, Amerika) elektrospinning deneylerinde gerilim kaynağı olarak kullanılmıştır. 0 – 40 kV çalışma aralığına sahiptir.

#### 3.1.1.8. Şırınga Pompası

Elektrospinning deneyleri sırasında polimer besleme hızını ayarlayabilmek için New Era Pump System (NE-300) tekli şırınga pompası kullanılmıştır. Bu şırınga pompası ile farklı iç çaplara sahip şırıngalar kullanılabilir. Ayrıca ml/h, ml/min, µl/min, µl/hr gibi farklı debilerde besleme yapabilmektedir.

#### 3.1.2. Sentetik Vücut Sıvısı Hazırlamada Kullanılan Materyaller

Sentetik vücut sıvısı hazırlanırken NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, HCl, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> kullanılmıştır.

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Jelatin ve Jelatin/Kitosan İçeren Nanofiberlerin Üretimi

Doku iskeleleri elektrosponning yöntemi ile üretilmiştir. Ön çalışmalarda, jelatin ve kitosan farklı polimer konsantrasyonlarında hazırlanarak farklı çözücülerde çözülmüştür. Ön çalışmalar sırasında jelatin konsantrasyonu % 2 - %10 (w/v), kitosan konsantrasyonu ise % 0,25 - %5 (w/v) aralığında değiştirilmiştir. Çözücü olarak asetik asit %1 derişimden saf haline kadar kullanılmıştır. Çözücü olarak asetik asitin yanında formik asit ve diklorometan da farklı oranlarda kullanılmıştır.

Ön çalışmalardan sonra, nanofiberlerin elde edildiği bir sonraki aşama çalışmalarına geçilmiştir. Jelatin 10 ml distile suda mekanik karıştırıcı ile 600 rpm'de 1 saat karıştırılarak çözülmüştür. Jelatin içeren çözeltiler % 15, 20, 25 ve 30 (w/v) konsantrasyonda hazırlanmıştır. Çözücü 10 ml asetik asit, 70 ml formik asit ve 20 ml diklorometan karıştırılarak hazırlanmıştır.

Elektrosponning deneyleri 5x5 alüminyum toplayıcı plaka ve 2,5 ml şırınga kullanılarak yapılmıştır. Elektrosponning ön deneyleri sırasında toplayıcı ve polimer çözeltilerini içeren şırınga iğnesi ucu arasındaki mesafe 8 – 15 cm arasında, besleme hızı 0,3 – 1,2 ml/h arasında, uygulanan gerilim (voltaj) ise 13 – 25 kV arasında değiştirilerek, bu parametrelerin oluşan nanofibröz membran üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Bu denemeler sonrasında optimum olarak 0,3 ml/h besleme hızı, 10 cm toplayıcı-şırınga ucu arası mesafe ve 13 kV gerilim sabit tutularak polimer çözeltilerinden elektrosponning yöntemi ile membranlar elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan elektrosponning düzeneğinin fotoğrafı Şekil 3.1.' de verilmiştir. Şekil 3.3' de görüldüğü gibi elektrosponning deney düzeneği yüksek gerilim kaynağı, şırınga pompası, toplayıcı, ve polimer çözeltilerini içeren şırıngadan oluşmaktadır.



Şekil 3.1. Elektrosinning düzeneği

### 3.2.2. Üretilen jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz membranların çapraz bağlanması

Bir önceki aşamada elde edilen jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz membranlar, sulu ortamda hızlıca çözüldüğünden, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, fizyolojik ortamda stabil kalabilen membranların elde edilmesi için glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Glutaraldehit, 10 ml ve % 25 sulu çözelti formunda kullanılmıştır. Çapraz bağlama işlemi cam bir fanusda, glutaraldehit buharı altında doku iskelelerinin 3 gün oda sıcaklığında bekletilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Sentetik Vücut Sıvısının Hazırlanması (Simulated Body Fluid, SBF)

Sentetik vücut sıvısı hazırlanırken NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, HCl, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> kullanılmıştır. Belirtilen kimyasallar Kokubo ve Takadama tarafından belirtilen miktarlarda kullanılarak SBF çözeltisi hazırlanmıştır [Kokubo ve Takadama, 2006]. Çözeltinin hazırlanması için aşağıda verilen yöntem kullanılmıştır:

### Sterilizasyon Basamağı

1. Kullanılacak olan tüm malzemeler 2 saat seyreltik HCl çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.
2. Tüm malzemeler ultra saf suyla yıkanmıştır.
3. Malzemeler musluk suyu ile de çalkalandıktan sonra 3 kez yeniden ultra saf su ile yıkanmıştır.
4. Malzemeler kurumaya bırakılmıştır.

### Çözeltinin Hazırlanması

1. 500 ml' lik beher (polietilen) içine 375 ml ultra saf su eklenmiştir.
2. Beher karıştırıcıya konularak, 36,5 °C' de tutulmuştur.
3. Suyun içerisine Çizelge 3.1 de belirtilen kimyasal maddeler eklenerek karıştırma işlemine devam edilmiştir.

Çizelge 3.1. SBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,228 g
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305 g
6	HCl	40 cm <sup>3</sup>
7	CaCl <sub>2</sub>	0,278 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
9	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057 g
10	1 kmol/m <sup>3</sup> HCl	pH ayarlaması için

Çizelge 3.1.' de yer alan kimyasalların her birinin tek tek çözeltiliye eklenip, tamamen çözülüp homojen olarak dağılması sağlanmıştır.

4. (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> 1'er gramdan az olacak şekilde yavaş yavaş eklenmiştir.
5. 9.kimyasal da konulduktan sonra beherin sıcaklığı ve pH'ı kontrol edilmiştir. Bu çözeltinin pH'ının yaklaşık 7,5 olduğu tespit edilmiştir.
6. 1 kmol/m<sup>3</sup> HCl çözeltisiyle pH 7,40' a getirilmiştir.
7. Hazırlanan çözeltili daha sonra 500 ml'lik balon jöjeye alınmıştır.
8. Hacim 500 ml olmadığından saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
9. Çözelti oda sıcaklığında 20 °C' de tutulmuştur, soğuduktan sonra eksilen hacim 500 ml' ye tekrardan tamamlanmıştır.



### Stabilitesi

Hazırlanan çözeltiden 50 ml ayrılarak 36,5 °C’ de inkübatörde 2-3 gün tutulmuştur, çökme gerçekleşmemiştir.

### 3.2.4. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Membranların Sentetik Vücut Sıvısında Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması

Bir önceki basamakta hazırlanan sentetik vücut sıvısından 20 ml alınarak erlenlere koyulmuştur. Membranların biyomimetik hidroksiapatit ile kaplama işlemi 3, 6, 18 ve 30 saat sürelerinde 37 °C’de su banyosunda (WiseBath, WB-22 model) bekletilerek yapılmıştır.

### 3.2.5. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu

#### 3.2.5.1. FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Analizi

FT-IR analizi Perkin – Elmer Spectrum 100 (ABD) marka-model cihaz ile yapılmıştır. Farklı bileşen ve konsantrasyonlarda üretilen jelatin ve jelatin/kitosan doku iskelelerinin kimyasal yapısının tayini FT-IR ile analiz edilmiştir.

#### 3.2.5.2. SEM ile Analiz

Doku iskelelerinin morfolojisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission, Zeis marka, Supra 55 model) kullanılmıştır. Doku iskelesi örneklerinin yüzeyi elektrik iletkenliğini sağlayabilmek için örnekler altın/paladyum ile kaplanmıştır ve SEM görüntüleri elde edilmiştir. SEM, 5 kV da çalıştırılmıştır. SEM görüntüleri üzerinde Lucia 32G görüntülü analiz sistemi kullanılarak nanofiber çapları ölçülmüştür. On (10) farklı nanofiberin çapları ölçülerek tek tek standart sapmaları hesaplanarak nanofiberlerin standart sapmaları ile çapları bulunmuştur.

Taramalı elektron mikroskobuyla 7000, 60000 ve 100000 büyütme oranlarında SEM görüntüsü elde edilmiştir.

### 3.2.5.3. EDS ile Analiz

Taramalı electron mikroskobu ile seçilmiş bir noktada X-ışın haritalanması yapılarak bu gölgelerde kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır.

EDS analizi yapılmadan önce doku iskelesi örnekleri altın/paladyum ile kaplanmıştır. EDS analizi ile bir nokta üzerinde kimyasal analiz yapılarak o noktadaki iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir.

### 3.2.5.4. HA kaplama ile ağırlık artışının izlenmesi

SBF içerisinde HA kaplanan doku iskelelerinin 3, 6, 18 ve 30 saat sonunda kurutularak ağırlıkları ölçülmüştür. Her bir zaman dilimi sonunda doku iskelelerinin ilk ağırlığına göre % ağırlık artışı tespit edilmiştir.

### 3.2.5.5. In Vitro Degredasyon Çalışmaları

Doku iskelelerinin degredasyonu distile su ve 37 °C' de, su banyosunda (WiseBath, WB-22 model) takip edilmiştir. Doku iskeleleri sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur, 25 ml distile su içeren erlenlere konulmuştur. Belirli zaman dilimlerinde (1,4,7 gün), örnekler ortamdaki alınmış, kurutulmuş ve ağırlıkları ölçülmüştür. Ağırlık ölçümleri yapılarak doku iskelelerinin degredasyon profilleri tespit edilmiştir. Degredasyonun izlenmesine devam edilirken her seferinde erlenlere taze distile su konulmuştur.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanan jelatin ve jelatin/kitosan temelli nanofiberlerden oluşan doku iskelelerinin üretimi, biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonu ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Sentezlenen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir.

### 4.1. JELATİN VE JELATİN/KİTOSAN DOKU İSKELELERİNİN ÖZELLİKLERİ

#### 4.1.1. Jelatin ve Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi

Elektrospinning yöntemi kullanılarak nanofibröz doku iskelelerinin üretiminde prosesi etkileyen başlıca parametreler, kullanılan polimerin cinsi ve molekül ağırlığı, çözelti konsantrasyonu, kullanılan çözücünün cinsi, çözeltinin besleme hızı, polimer çözeltisine uygulanan gerilim (voltaj) ve çözeltinin yer aldığı şırınga iğnesinin ucu ile toplayıcı arasındaki mesafedir. Bu parametrelerin değişimi elektrospinning yöntemi ile üretilen malzemenin nanofiberler içerip içermemesini, üretilen nanofiberlerin içerisinde boncuk (“bead”) denilen yapıların oluşup oluşmamasını, üretilen nanofiberlerin çaplarını ve çap kalınlığının homojen veya heterojen oluşunu, dolayısı ile malzemenin gözenekliliğini ve mekanik özelliklerini, degradasyon süresini, *in vitro* ortamda hücrelerle olan etkileşimini ve *in vivo* ortamda çevre dokularla olan iletişimini etkilemektedir. Elektrospinning yöntemi ile üretilen membran şeklinde nanofibröz doku iskeleleri geleneksel yollarla üretilen diğer membran doku iskelelerine göre üstün özellikler taşımaktadırlar. Bunlardan en önemlileri, içerdikleri nanofiberlerden dolayı yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları (hücrelerle etkileşimlerinin son derece iyi olmasını sağlar) ve mekanik özelliklerinin son derece iyi olmasıdır (doku mühendisliği uygulamalarına uygun olmalarını sağlar). Bu çalışmanın ilk bölümünde jelatin ve jelatin/kitosan temelli nanofibröz doku iskelelerinin üretimi için optimizasyon ön çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, kullanılan çözücünün cinsi ve konsantrasyonu, polimer

konsantrasyonu, jelatin/kitosan oranları, polimer çözeltisinin besleme hızı, polimer çözeltisine uygulanan gerilim, polimer çözeltisinin yer aldığı şırınga iğnesinin ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe değiştirilmiştir. Yapılan optimizasyon ön çalışmaları aşağıda yer alan çizelgelerde sunulmuştur. Çizelge 4.1 de çözücü olarak %1 asetik asit kullanılarak yapılan, besleme hızı, uygulanan gerilim (voltaj) ve polimer çözeltisini içeren şırınga iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe değiştirilerek jelatin polimeri ile yapılan optimizasyon çalışmaları verileri sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Jelatin polimerinden elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları verileri

Jelatin konsantrasyonu (% w/v)	Besleme Hızı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
6	1,2	18	10
2	0,8	16	10
2	1,2	18	10
10	1,2	18	10
8	1,2	18	10
8	0,8	20	10
8	0,6	20	10
12	1,2	20	10
12	1,2	20	10
12	1,1	20	10
14	1,1	20	10
14	1,2	22	12
18	1	22	10
14	1,2	22	10
14	1	22	10
13	1	21	10
14	1	20	10
14	0,8	20	12
12	0,8	20	12
12	0,8	18	12
14	0,8	22	12
14	0,8	20	12
14	0,8	22	12
14	0,8	22	12
12,5	0,8	16	12

Çizelge 4.2.' de çözücü olarak %1 asetik asit kullanılarak yapılan, besleme hızı, uygulanan gerilim (voltaj) ve polimer çözeltisini içeren şırınga iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe değiştirilerek kitosan polimeri (yüksek viskoziteli) ile yapılan optimizasyon çalışmaları verileri sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Kitosan polimerinden elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları verileri

Kitosan konsantrasyonu (% w/v)	Besleme Hızı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
1	0,6	16	10
1	0,6	18	10
1	0,6	20	10
1	0,6	22	10
1	0,8	16	10
1	0,8	18	10
1	0,8	20	10
1	0,8	22	10
1	1	16	10
1	1	18	10
1	1	20	10
1	1	22	10
1	1,2	16	10
1	1,2	18	10
1	1,2	20	10
1	1,2	22	10
2	0,6	16	10
2	0,6	18	10
2	0,8	16	10
2	0,8	18	10
2	1,2	16	10
2	1,2	18	10
2	1	16	10
2	1	18	10
2	1,2	16	10
2	1,2	18	10

Jelatin polimeri ile yapılan ön çalışmalar sırasında, toplayıcı yüzey üzerinde oluşan opak malzemenin çözücüsü buharlaşmış polimer tozlarından ibaret olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Kitosan polimeri (yüksek viskoziteli) ile yapılan çalışmalarda ise çözeltinin viskozitesi çok yüksek olduğundan polimer çözeltisi toplayıcıya ulaşamamıştır. Kitosan polimeri ile ancak %2 konsantrasyonda çözelti hazırlanabilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda polimerin çözülmesi mümkün olmamıştır.



Şekil 4.1. Toplayıcı üzerinde biriken opak, çözücüsü buharlaşmış polimer tozlarının görüntüsü

Çizelge 4.3.' de %80 veya %90 konsantrasyonda asetik asitin çözücü olarak kullanıldığı sistemde jelatin ve kitosan polimerleri ile yapılan optimizasyon ön çalışmaları verileri sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Jelatin ve kitosan polimerlerinden %80 veya %90 konsantrasyonda asetik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları verileri

% Polimer (w/v)	Çözücü, % asetik asit	Besleme Hızı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
10 jelatin	80	1	13	10
10 jelatin	80	1	13	10
10 jelatin	80	1	15	10
10 jelatin	80	1	15	10
10 jelatin	80	1	16	10
10 jelatin	80	0,8	16	10
10 jelatin	80	0,8	18	10
10 jelatin	80	0,6	18	10
10 jelatin	80	1	13	10
10 jelatin	90	1	13	10
10 jelatin	90	1	15	10
12 jelatin	90	1	13	10
0,25 kitosan	90	0,8	16	10
0,75 kitosan	90	1	20	10
0,25 kitosan	90	1	20	10
1 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	15	10
1 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	16	10
0,5 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	15	10
0,5 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	18	10
0,5 kitosan 12 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	18	10
0,5 kitosan 8 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	18	10
0,5 kitosan 8 jelatin ile hacimsel olarak 1:5 oranında karıştırıldı	90	1	20	8
0,5 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:6 oranında karıştırıldı	90	1,2	18	8
0,5 kitosan 10 jelatin ile hacimsel olarak 1:6 oranında karıştırıldı	% 90	1,2	20	8
10 jelatin	% 80	1	13	10
10 jelatin	% 80	1	13	10

Geng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada % 2,5, % 6, % 7, % 8 ve % 10 (w/v) konsantrasyonlarındaki kitosan polimerinin % 90 lık asetik asit içerisindeki çözeltilerini hazırlamışlardır. Ayrıca çözücü konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla da % 10, % 30, % 50, % 70 ve % 90 lık asetik asit içerisinde % 7 (w/v) konsantrasyonunda kitosan çözeltisi hazırlayarak elektrospinning metodu ile nanofiber üretimi çalışmaları yapmışlardır [Geng vd., 2005].

Gu ve arkadaşları, % 6 - % 12 (w/v) arasında değişen konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerini % 50 - % 90 konsantrasyon aralığındaki asetik asitte hazırlayarak, polimer çözeltisinin konulduğu şırınga(2,5 ml'lik metal kılcal aparatı olan) ile toplayıcı arası mesafeyi 10 cm ve polimer çözeltisine uygulanan voltajı 13 kV' da sabit tutarak elektrospinning metodu ile nanofibröz yapıların üretimi çalışmaları yapmışlardır [Gu vd., 2009].

Homayoni ve arkadaşları, % 90 konsantrasyondaki asetik asit ile % 1 ve % 2,75 (w/v) konsantrasyonlar da kitosan çözeltileri hazırlamışlardır. Bu çözeltiler ile 17 kV voltaj uygulayarak elektrospinning metodu ile nanofiber üretimi çalışmaları yapmışlardır. [Homayoni vd., 2009].

Çizelge 4.4.' de %90 konsantrasyonda asetik asitin çözücü olarak kullanıldığı sistemde jelatin ve kitosan polimerlerinin farklı oranlarda karıştırıldığı çözeltiler ile yapılan optimizasyon ön çalışmaları verileri sunulmuştur.



Çizelge 4.4. Jelatin/kitosan(farklı oranlarda) polimerlerinden %90 konsantrasyonda asetik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları verileri

% Polimer (w/v), Çözücü, % asetik asit	Jelatin / Kitosan Karışım Oranı ( v/v )	Besleme Hızı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	15	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	18	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	20	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1	22	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	15	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	18	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	20	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1	22	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	15	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	18	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	20	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	22	8
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1,2	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1,2	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1,2	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	3:1	1,2	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1,2	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1,2	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1,2	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	4:1	1,2	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1,2	15	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1,2	18	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1,2	20	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1,2	22	10
10 jelatin, 0,5 kitosan, 90	5:1	1	25	8

Yapılan ön optimizasyon çalışmalarında nanofibröz membran elde edilemediğinden çözücü cinsi değiştirilmiştir.

Schueren ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, elektrosinning metodu ile nanofibröz membran elde etmek için, % 8 PCL ve % 10 kitosan çözeltilerini 1:3, 3:7, 5:5, 7:3 oranlarında asetik asit ve formik asiti karıştırarak hazırlamışlardır [Schueren vd., 2012].

Çizelge 4.5.' de asetik asit ve formik asit çözücülerinin 1:9 oranında karıştırılarak çözücü olarak kullanıldığı sistemde farklı jelatin konsantrasyonlarındaki çözeltiler ile yapılan optimizasyon ön çalışmaları verileri sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Jelatin polimerlerinden asetik asit ve formik asit çözücüsü kullanılarak elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri elde edilmesi ile ilgili yapılan optimizasyon çalışmaları verileri

Jelatin Konsantrasyonu (%, w/v)	Çözücü, Asetik asit/Formik asit (v/v)	Besleme Hızı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
10	1:9	0,6	13	15
10	1:9	0,3	13	15
7,5	1:9	0,3	13	15
10	1:9	0,3	13	15
12,5	1:9	0,3	13	15
15	1:9	0,3	13	15
10	1:9	0,3	13	12,5
15	1:9	0,3	13	12,5
12,5	1:9	0,3	15	12,5
10	1:9	0,5	15	12,5
10	1:9	0,5	15	10
10	1:9	0,3	15	10
15	1:9	0,3	15	15
10	1:9	0,3	15	15

Nanofibröz membranlar toplayıcı altlık üzerinden ayrılabilir formda elde edilememiştir. Kullanılan çözücülerin özellikleri incelendiğinde dielektrik sabitlerinin düşük olduğu görülmüştür.

Kundu ve Bhardwaj'ın çalışmalarında çözücüler ve özellikleri hakkında oluşturdukları çizelgenin sonuçları aşağıda sunulmuştur (Çizelge 4.6.)

Çizelge 4.6. Çözücü özellikleri [Kundu ve Bhardwaj, 2010]

Çözücü	Yüzey Gerilimi (mN/m)	Dielektrik Sabiti	Kaynama noktası (°C)	Yoğunluk (g/ml)
Kloroform	26,5	4,8	61,6	1,498
Dimetilformamide	37,1	38,3	153	0,994
Hekzafloroizopropanol	16,1	16,7	58,2	1,596
Trifloroetanol	26,4	7,5	66,78	0,886
Aseton	21,1	27	56,1	1,393
Su	25,2	21	100	0,786
Metanol	72,8	80	64,5	1,000
Asetik asit	22,3	33	118,1	0,791
Formik asit	26,9	6,2	100	1,049
Diklorometan	37	58	40	1,210
Etanol	27,2	9,1	78,3	1,326
Trifloroasetik asit	21,9	24	72,4	0,789

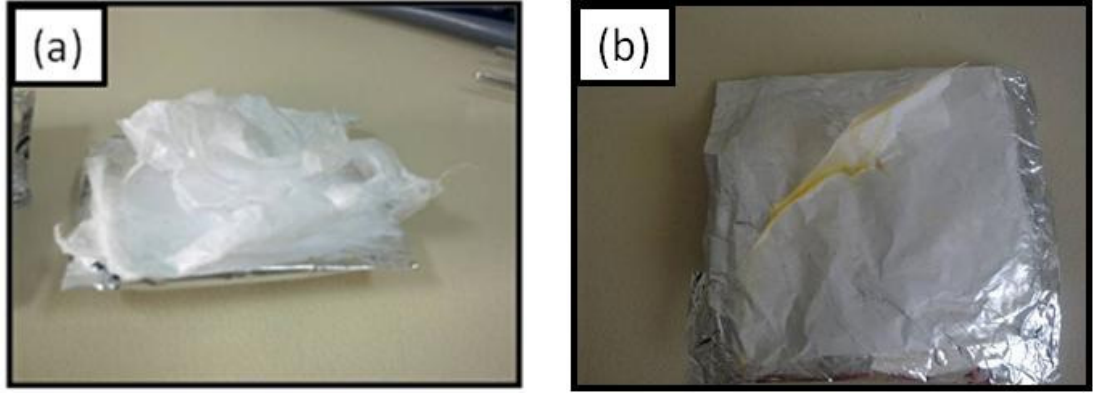
#### 4.1.2. Jelatin Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması

##### 4.1.2.1. Jelatin Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Yapılan ön optimizasyon çalışmaları sonunda, çözücü olarak asetik asit, formik asit ve diklorometan (1/7/2, v/v/v) sisteminin kullanıldığı, çözeltiliye uygulanan voltajın 13 kV ve polimer çözeltisini içeren şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklığın 10 cm olarak sabit tutulduğu ve besleme hızının 0,3 ml/h olduğu sistemde jelatin polimerinin konsantrasyonu %15 - 30 aralığında değiştirilerek (%15, %20, %25, %30) elektrospinning yöntemi ile nanofiberleri içeren doku iskeleleri üretilmiştir.

Üretilen nanofibröz, membran şeklinde doku iskeleleri, jelatinin suda çözünür olmasından dolayı, su ile temas ettiği anda çözünmekte, nanofibröz

dokusu bozulmaktadır. Bu tez çalışmasında üretilen malzemelerin ileriye yönelik kullanım amacı doku mühendisliği uygulamalarıdır ve üretilen doku iskelelerinin fizyolojik ortamda istenilen süre boyunca (hücrelerle etkileşime geçip, yeni doku oluşumuna izin verecek süre kadar) mekanik stabiliteğini koruması gerekmektedir. Bu amaçla, jelatin nanofiberlerinden oluşan doku iskeleleri çapraz bağlanma olayına tabii tutularak, bunların mekanik stabiliteği artırılmıştır. Elektrosinning yöntemi ile üretilen nanofiber içeren doku iskeleleri çapraz bağlama işlemi için içerisinde 10 ml % 25'lik glutaraldehit bulunan kapalı cam fanus da 3 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çapraz bağlama işlemi glutaraldehit buharında gerçekleşmiştir [Chen vd., 2010; Zhang vd., 2006]. Çapraz bağlama işleminden önce ve sonraki nanofibröz membranların görüntüleri Şekil 4.2.' de sunulmuştur.

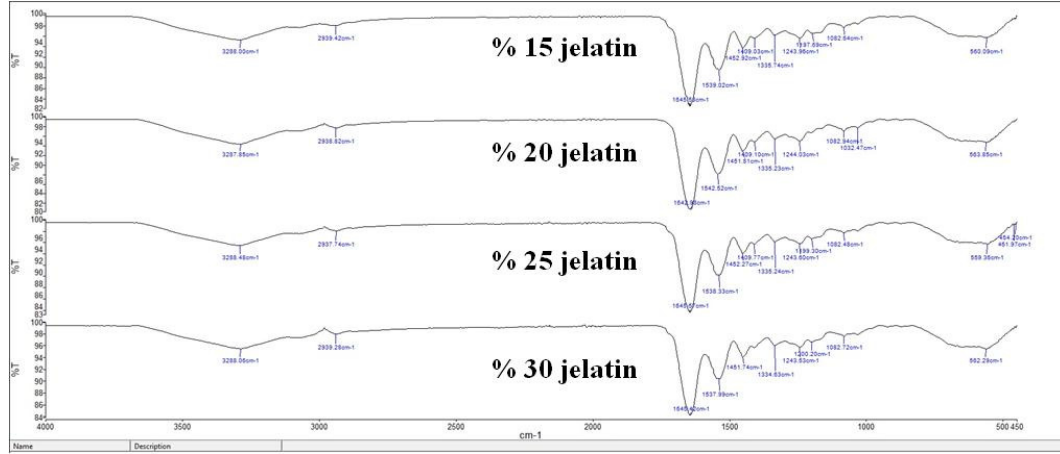


Şekil 4.2. Çapraz bağlama işlemi (a)öncesi ve (b)sonrasında nanofibröz membranların görüntüleri

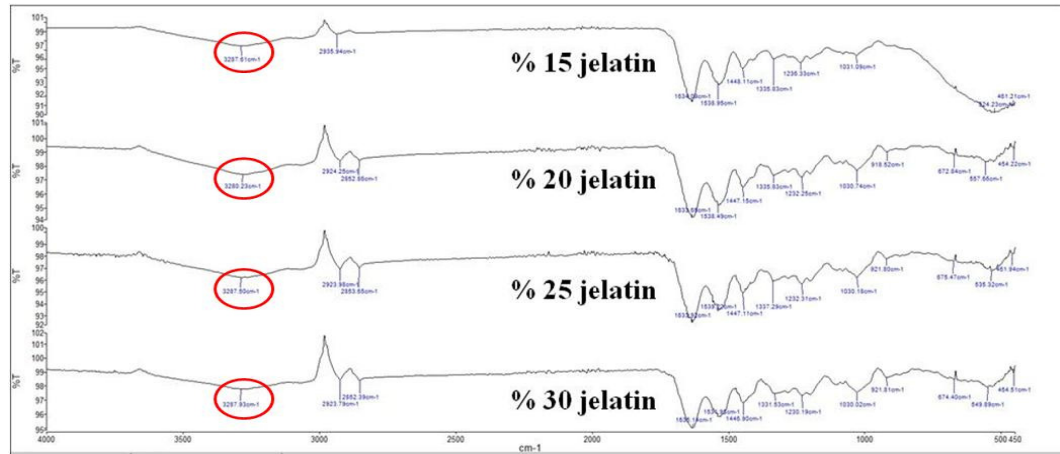
#### 4.1.2.2. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin FTIR analizi

Nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işlemi öncesi ve sonrasında  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında FTIR analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürde yer alan saf jelatin ve glutaraldehitin FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır.

Farklı jelatin (% 15, % 20, % 25, % 30) konsantrasyonları kullanılarak üretilmiş olan nanofibröz doku iskelelerine ait çapraz bağlama öncesi ve sonrası FTIR spektrumları Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları

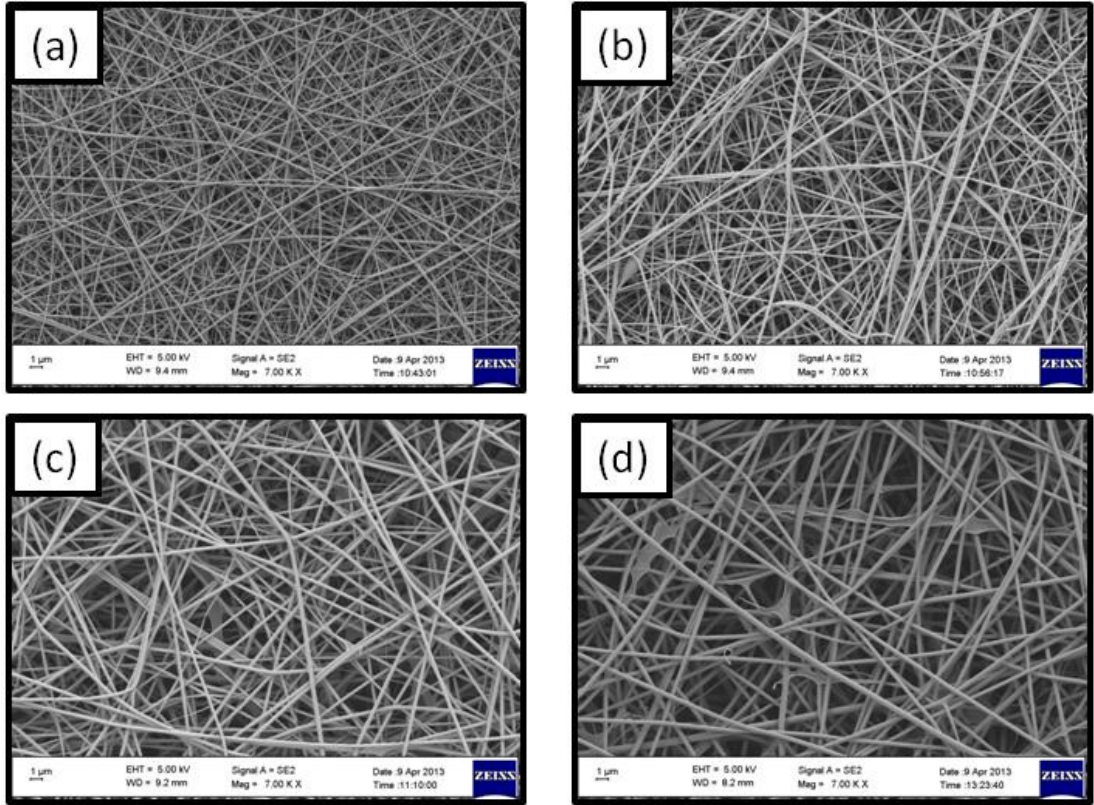


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları

Elde edilen FTIR spektrumları incelendiğinde, jelatinin glutaraldehit ile çapraz bağlanma reaksiyonuna bağlı olarak spektrumların farklı olduğu görülmektedir. Jelatinin serbest amin grupları ile glutaraldehitin (OHCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO) aldehit grupları bağlanarak çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleşir [Olde vd., 1995]. Jelatinin çapraz bağlanmasıyla moleküler yapısında oldukça büyük değişiklikler gerçekleşir. 3280-3285 cm<sup>-1</sup> bandı aralığında C=N bağı görülebilmektedir [Matsuda vd., 1999]. Şekil 4.4.'de de benzer şekilde C=N bağı 3278-3290 cm<sup>-1</sup> bandı aralığında görülmekte ve çapraz bağlanmanın varlığını ortaya koymaktadır [Matsuda vd., 1999].

#### 4.1.2.3. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işlemi öncesinde SEM ile analizi

Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işleminden önceki morfolojisi SEM kullanılarak belirlenmiştir. Nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 4.5.' de sunulmuştur.

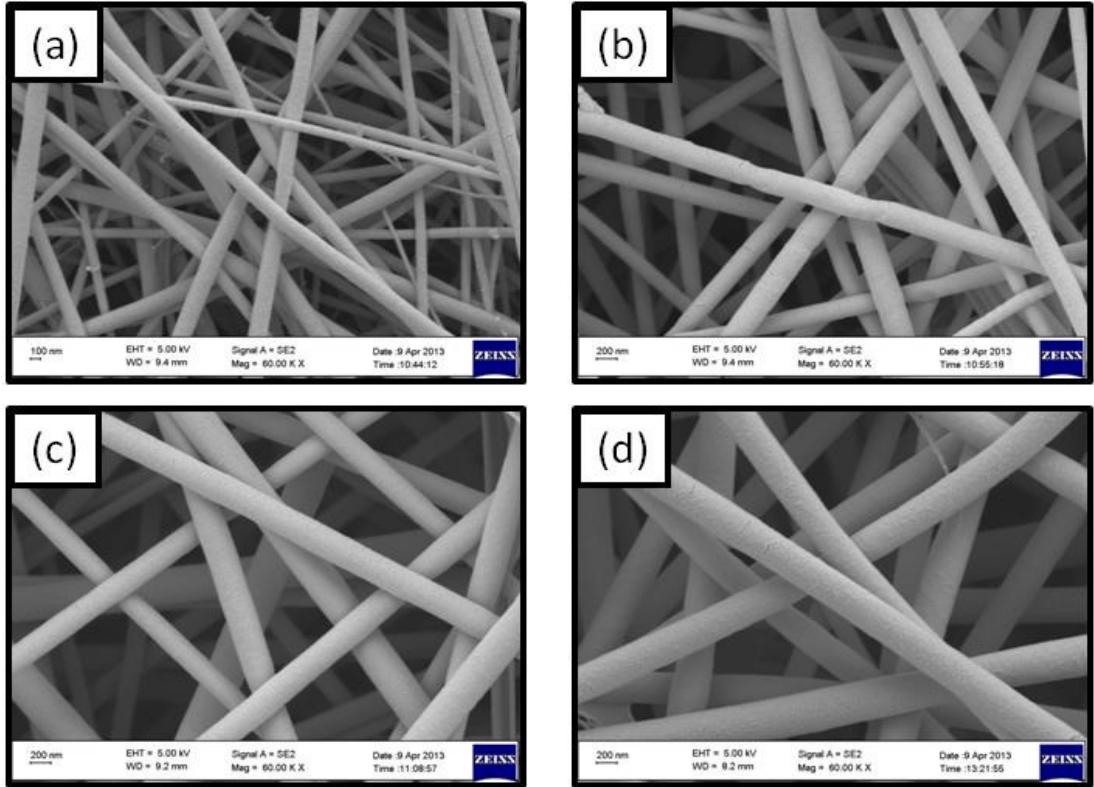


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

Huang ve arkadaşları, jelatin polimerinden elektrosinning yöntemi ile nanofibröz doku iskelesi üreterek optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada fiber çapları 100 – 350 nm arasında değişen, bazen boncuk oluşumu gözledikleri nanofibröz yapılar elde etmişlerdir [Huang vd., 2004]. Gu ve arkadaşları, elektrosinning yönteminin çözücü konsantrasyonu ve polimer konsantrasyonu gibi parametrelerinin etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır.

Yaptıkları bu çalışmada, konsantrasyonu % 6 – % 12 arasında değişen jelatin polimeri ile 13 kV voltaj uygulamasını sabit tutarak elektrosinning metodu ile nanofibröz doku iskeleleri üretmişlerdir. Ürettikleri nanofibröz doku iskelelerinin fiber çapları jelatin konsantrasyonunun değişimine göre 77 – 147 nm arasında değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir [Gu vd.,2009].

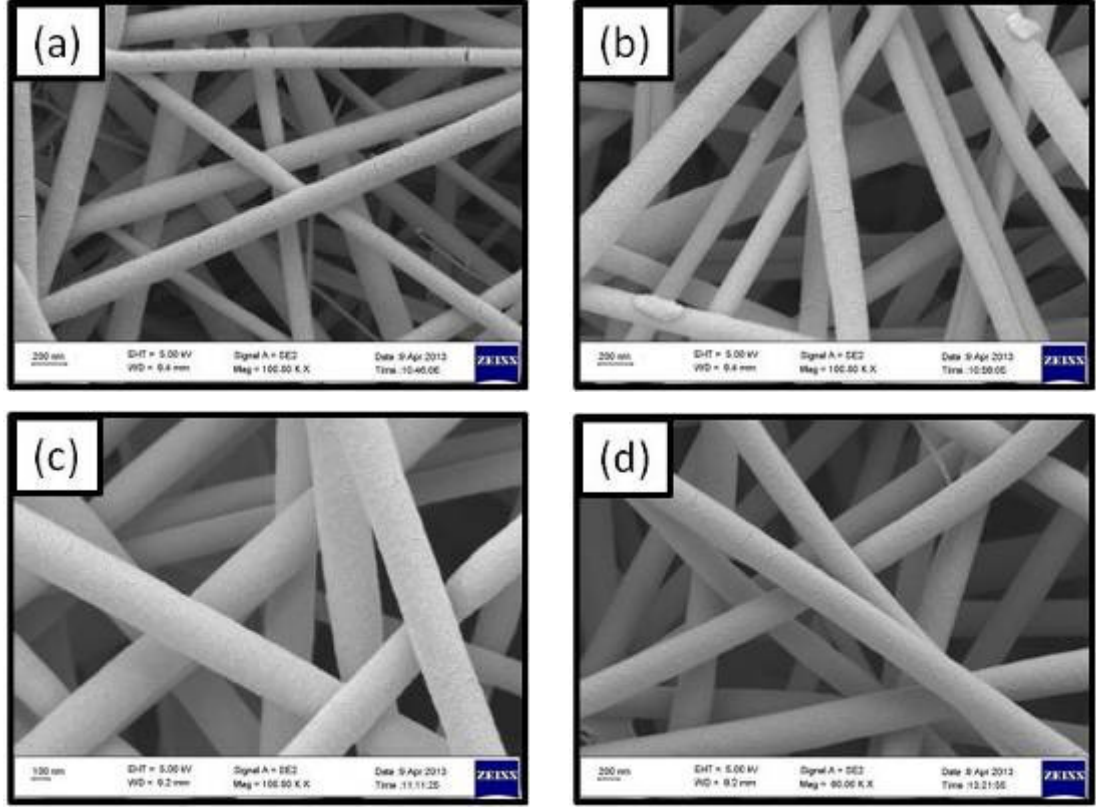
Şekil 4.6.’ da farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin daha yüksek büyütme ile çekilmiş (60000X) SEM görüntüleri sunulmuştur. Sunulan şekilde çözelti konsantrasyonunun arttıkça nanofiber çaplarının arttığı düşük büyütmede (7000X) çekilmiş olan SEM görüntüleri ile kıyaslandığında daha belirgin şekilde görülmektedir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

Bu gözlemin doğruluğu, nanofiber çaplarının ortalaması hesaplanarak kalitatif olarak da kanıtlanmıştır. Bu hesaplama yapılırken 100000X büyütme ile

çekilen Sem görüntüleri üzerinde Lucia 32G görüntülü analiz sistemi kullanılarak 10 tane nanofiberin çapları ölçülmüş ve bunları ortalaması alınmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x100000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

Elektrosinning yöntemi ile elde ettiğimiz nanofibröz doku iskelelerinin fiber çapları  $158\pm 23$  –  $371\pm 26$  nm arasında değişerek literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.7.). Bölgen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, poli  $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) polimerinin çözeltisi ile elektrosinning yönteminin proses parametrelerini değiştirerek nanofibröz doku iskeleleri üretmişlerdir. Kullandıkları polimer çözeltilerinin konsantrasyonu arttıkça ürettikleri nanofibröz doku iskelelerinin fiber çaplarının arttığını ortaya koymuşlardır [Bölgen vd., 2005].

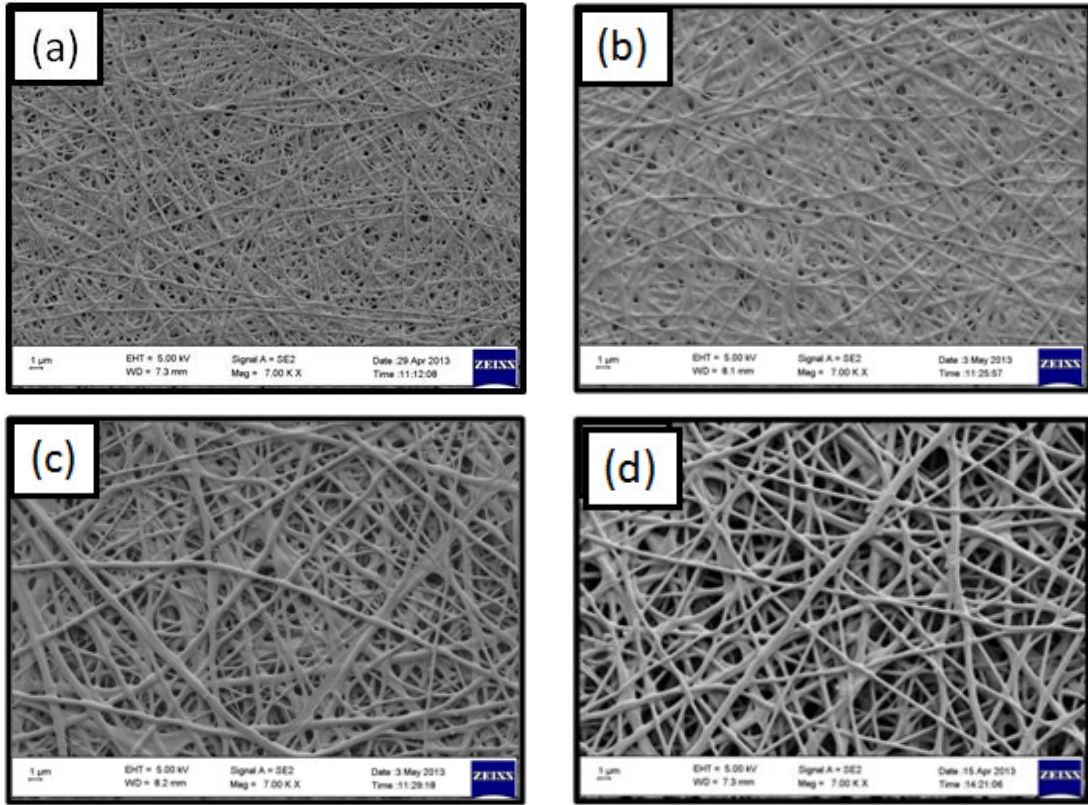


Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki jelatin polimerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin ortalama nanofiber çapları

% Jelatin (w/v)	15	20	25	30
Ortalama çap (nm)	158	196	286	371
Standart sapma $\pm$	23	19	37	26

#### 4.1.2.4. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama işlemi sonrasında SEM ile analizi

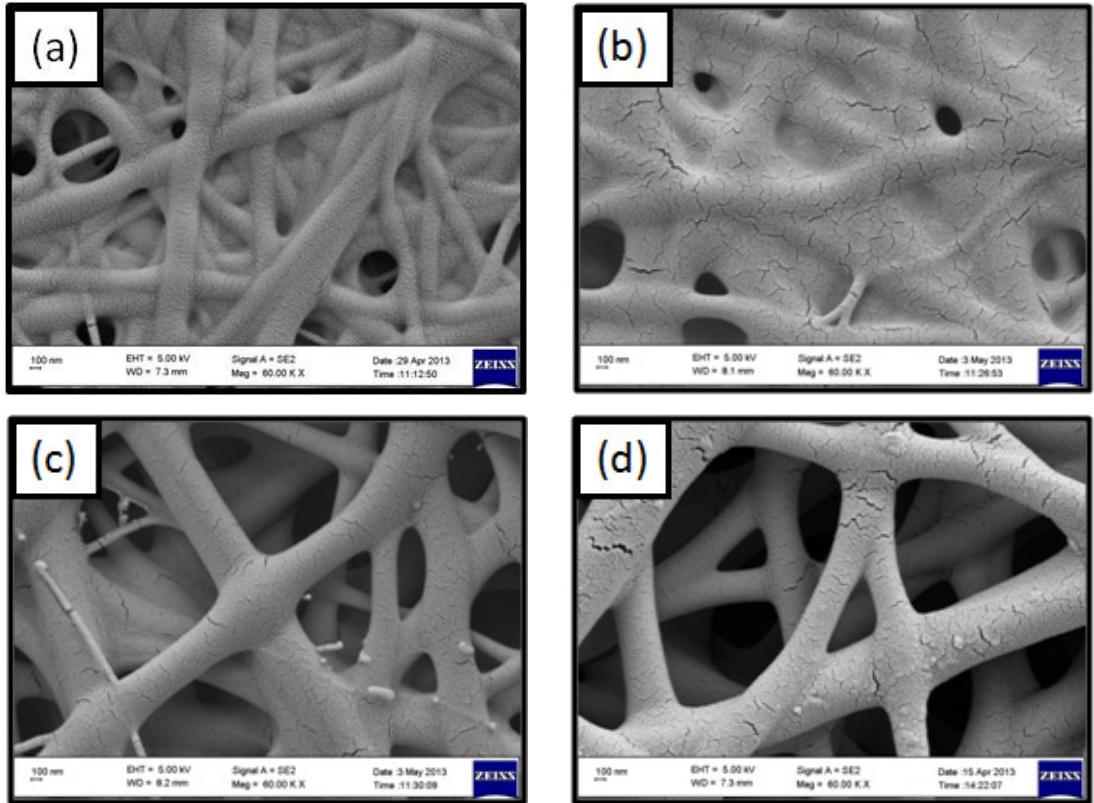
Şekil 4.8.' de farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama sonrası SEM (7000X) görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama sonrası SEM görüntüleri, x7000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

Çapraz bağlama işlemi sonrasında % 15 jelatin ve % 30 jelatin konsantrasyonundaki jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin Şekil 4.9.' da daha yüksek büyütmede (60000X) SEM görüntüleri incelendiğinde nanofiberlerin çapraz bağlayıcı ile bağlandığı daha net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca jelatin konsantrasyonu arttıkça fiberler arasındaki bağların düşük jelatin konsantrasyonuna göre daha az olduğu gözlenmektedir. Bunun jelatin konsantrasyonunun artmasına karşılık kullanılan glutaraldehit miktarının sabit kalmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, doku iskelelerinde bulunan fiberlerin belirli noktalardan birbirine yapışarak çapraz bağlanmasının mekanik dayanımı arttırdığını ortaya koymuşlardır. Doku iskelelerindeki fiberlerin çapraz bağlama öncesi suya dayanıklılığının olmadığını, ancak çapraz bağlama sonrasında suya dayanıklı doku iskeleleri olduğunu belirtmişlerdir [Zhang vd., 2006].

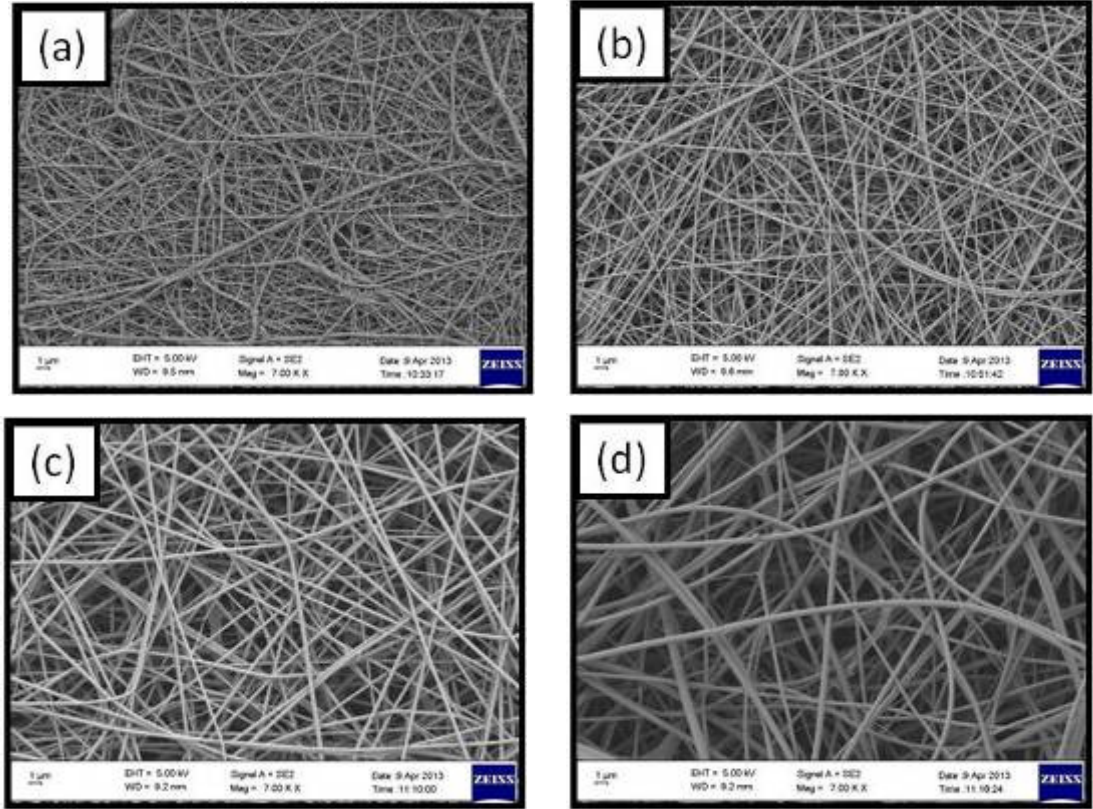


Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş çapraz bağlama sonrası nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

#### 4.1.2.5. Besleme hızı değiştirilerek elde edilen jelatin nanofibröz doku iskeleleri

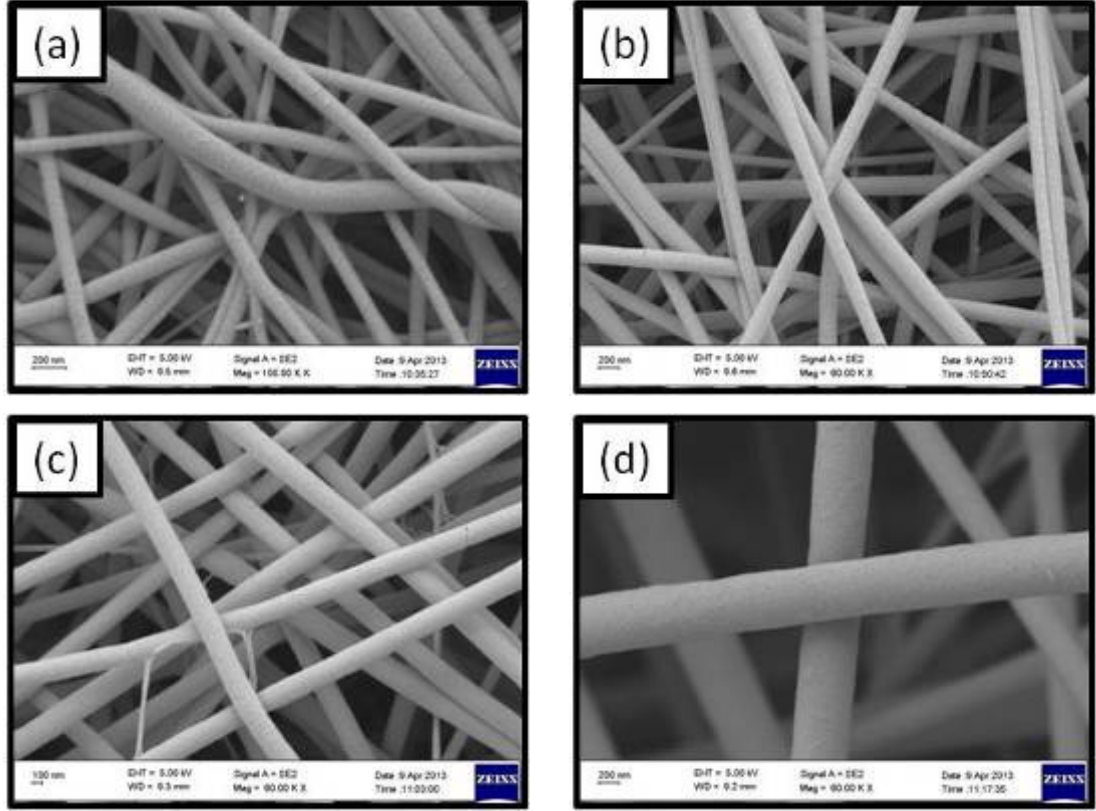
Proses parametrelerinden biri olan besleme hızının nanofiber çapı üzerine etkisini incelemek amacıyla, çözücü olarak asetik asit, formik asit ve diklorometan (1/7/2, v/v/v) sisteminin kullanıldığı, çözeltiliye uygulanan voltajın 13 kV ve polimer çözeltisini içeren şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklığın 10 cm olarak sabit tutulduğu ve besleme hızının 0,5 ml/h olduğu sistemde jelatin polimerinin konsantrasyonu %15 - 30 aralığında değiştirilerek (%15, %20, %25, %30) elektrosinning yöntemi ile nanofiberleri içeren doku iskeleleri üretilerek, çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin morfolojik yapıları SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

Şekil 4.11.' de farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden 0.5 ml/h besleme hızı kullanılarak elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin daha yüksek büyütme ile çekilmiş (60000X) SEM görüntüleri sunulmuştur.

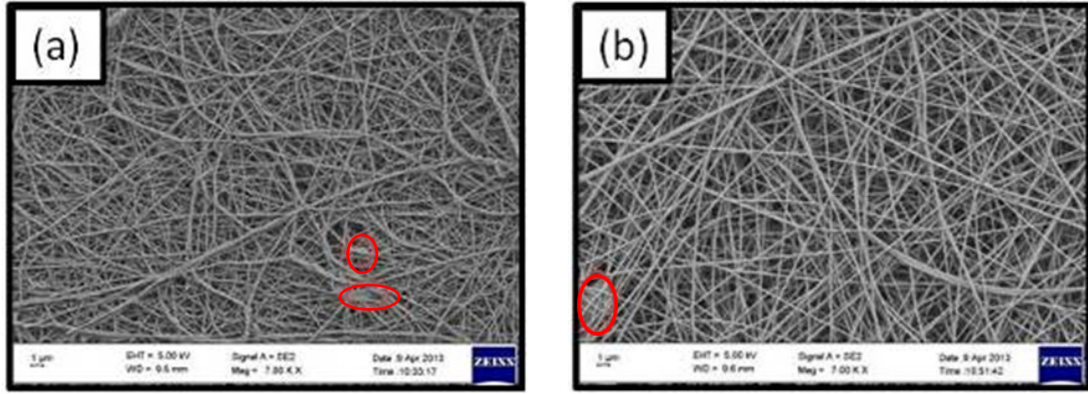


Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x60000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin

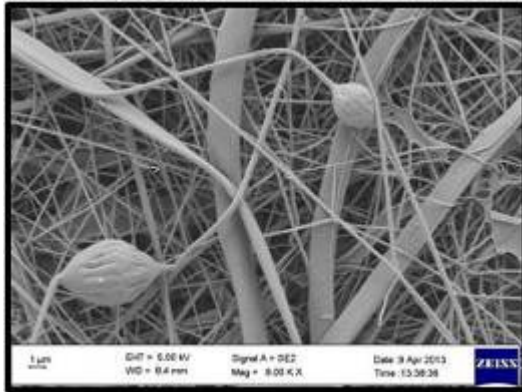
Besleme hızı 0,5 ml/h de sabit tutularak üretilen nanofibröz doku iskelelerinde küçük miktarlarda boncuk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.12., Şekil 4.13.). Üretilen nanofibröz doku iskelesinin nanofiber çapları ise  $107\pm14 - 395\pm45$  nm arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.8.). 0,5 ml/h besleme hızı kullanılarak %15, %20, %25 ve %30 jelatin içeren çözeltilerden elde edilmiş nanofibröz yapıların ortalama nanofiber çaplarının, 0,3 ml/h besleme hızı kullanılarak üretilmiş olan nanofiberlerin ortalama çapları ile yakın değerler gösterdiği görülmüştür. Bu karşılaştırmanın sonucu Şekil 4.14.' de belirgin bir şekilde görülmektedir.

Elektrosinning yöntemi proses parametrelerinde besleme hızının düşük olması çözücünün buharlaşması için yeterli zamanı sağlamasından dolayı tercih edilir [Kundu vd., 2010]. Yüksek besleme hızının uygulanmasında polimer çözeltisinin toplayıcıya ulaşmak için uygun kurutma süresinin olmaması nedeniyle boncuklu fiber oluşumu meydana gelmektedir [Zuo vd., 2005; Yuan vd., 2004; Kim vd., 2005]

Beachley ve Wen yaptıkları çalışmada elektrosinning prosesini etkileyen parametrelerin üretilen nanofibröz doku iskelelerindeki fiber çapı ve uzunluğuna etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda besleme hızının değiştirilmesinin fiber çapının ve uzunluğunun optimize edilmesine önemli bir etkiye bulunmadığını, yalnızca ihtiyaçtan fazla polimerin kullanılmasına sebep olduğunu ortaya koymuşlardır [Beachley ve Wen, 2009].



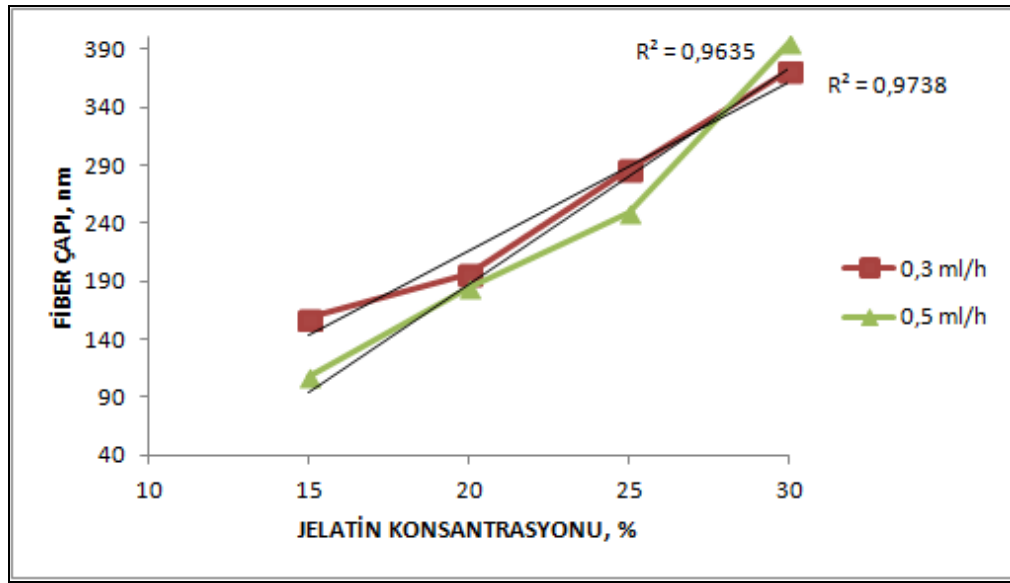
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş nanofibröz doku iskelelerinde boncuk oluşumunun SEM görüntüleri, x7000, 0.5 ml/ besleme hızı. (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin



Şekil 4.13. %20 konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinde boncuk oluşumunun SEM görüntüleri, x9000

Çizelge 4.8. 0,5 ml/h besleme hızı kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin fiber çapları

% Jelatin (w/v)	15	20	25	30
Ortalama çap (nm)	107	184	249	395
Standart sapma ±	14	27	20	45



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarındaki jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin fiber çaplarına besleme hızının etkisi

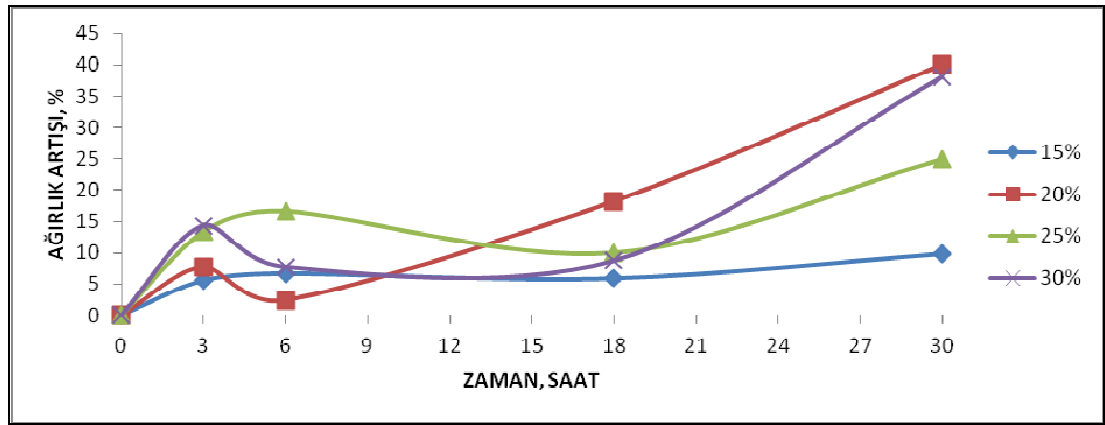
#### 4.1.2.6. Jelatin Nanofibröz doku iskelelerinin biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonu

Kemiğin orjinal biyolojik içeriğinin taklit edilmesi yaklaşımı bu tezin temel taşlarından birisini oluşturmaktadır. Doğal dokunun biyolojik ve/veya fiziksel bakımdan taklit edilmesi yaklaşımı (yani “biomimetic”), son yıllarda, doku mühendisliği ile ilgili araştırmalarda önemli yer tutmaktadır.

Fizyolojik koşulları yani insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonunu taklit eden sentetik vücut sıvısı sayesinde polimer yüzeyleri kemik dokusundakine benzer şekilde hidroksiapatit ile kaplanabilmekte ve biyoaktivite kazanabilmektedir. Vücut sıvısını taklit eden sentetik sıvılar sayesinde apatit ile kaplanmış malzemeler hem içerik olarak hem de mikro yapı olarak biyolojik sistemde (kemikte) yer alan inorganik fazı taklit etmekte ve kemik hücresi tutunmasını arttırmaktadır.

#### 4.1.2.7. Ağırlık Artışının İzlenmesi

Sentetik vücut sıvısı içerisinde belirli sürelerde (3-6-18-30 saat) hidroksiapatit ile kaplanan nanofibröz doku iskelelerinin ağırlık artışı takip edilmiştir (Şekil 4.15.).



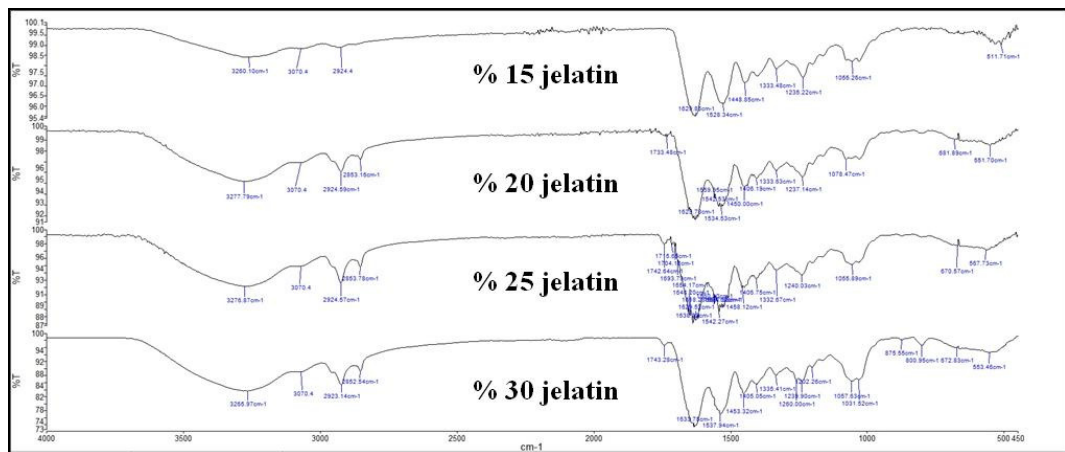
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sırasında gerçekleşen ağırlık artışları

Şekil 4.15 de görüldüğü üzere, 30 saatlik kaplama işlemi sonrasında, tüm örneklerin ağırlığında bir artış meydana gelmiştir. 3, 6 ve 18. Saatlerde meydana gelen bazı örneklerdeki azalma profilinin örneklerden parça kopması veya degradasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Cai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, SBF içerisinde HA kaplama süresinin artmasıyla nanofibröz doku iskelelerindeki meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. HA kaplama süresi arttıkça nanofibröz doku iskelelerinde ağırlık artışı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca SBF çözeltisi içerisindeki iyon konsantrasyonunun arttırılarak 5XSBF olarak hazırladıkları çözeltide de HA kaplama profilini incelemişler ve 5XSBF çözeltisinde kaplanan

Şekil 4.15 de görüldüğü üzere, 30 saatlik kaplama işlemi sonrasında, tüm örneklerin ağırlığında bir artış meydana gelmiştir. 3, 6 ve 18. Saatlerde meydana gelen bazı örneklerdeki azalma profilinin örneklerden parça kopması veya degradasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Cai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, SBF içerisinde HA kaplama süresinin artmasıyla nanofibröz doku iskelelerindeki meydana gelen değişiklikleri incelemiştir. HA kaplama süresi arttıkça nanofibröz doku iskelelerinde ağırlık artışı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca SBF çözeltisi içerisindeki iyon konsantrasyonunun artırılarak 5XSBF olarak hazırladıkları çözeltide de HA kaplama profilini incelemişler ve 5XSBF çözeltisinde kaplanan doku iskelelerinin ağırlıklarının daha hızlı arttığını tespit etmişlerdir [Cai vd., 2011]. Bu çalışma kapsamında yaptığımız incelemede farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden hazırlanan örneklerin farklı nanofiber çaplarının, HA ile kaplama sonucunda ağırlık değişimi üzerine anlamlı bir düzeyde etkisinin olmadığı görülmüştür.

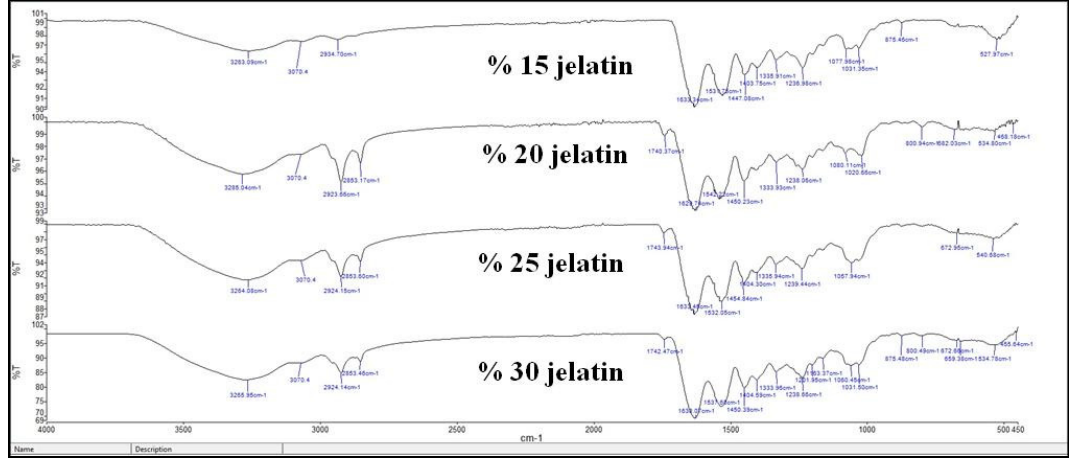
#### 4.1.2.8. FTIR ile analiz

Sentetik vücut sıvısı içerisinde 3, 6, 18 ve 30 saat bekletilerek hidroksiapatit ile kaplanan nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları Şekil 4.16., 4.17., 4.18. ve 4.19.'de sunulmuştur.

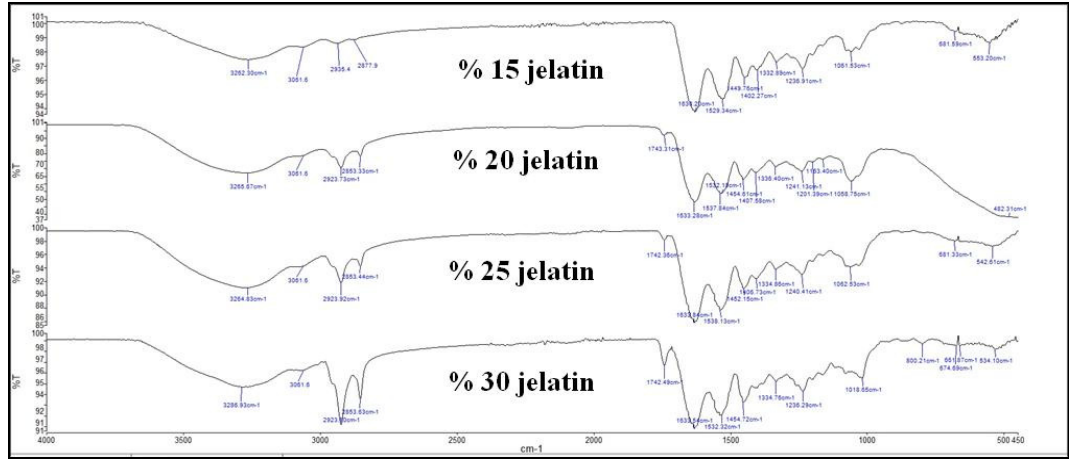


Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 3 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları

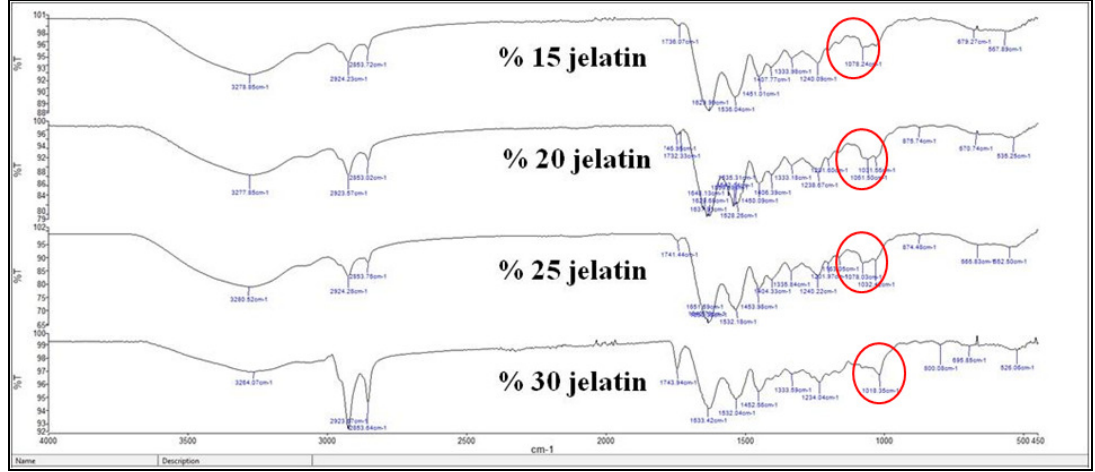




Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 6 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları



Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 18 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplanması sonrası FTIR spektrumları

Hidroksiapatitin FTIR spektrumunda görülen  $3572\text{ cm}^{-1}$ , bandında  $-\text{OH}$ ,  $961\text{ cm}^{-1}$   $\gamma_1$  fosfat ve  $1017\text{ cm}^{-1}$   $\gamma_3$  fosfat bandı yer almaktadır [Han. vd., 2006].  $1086\text{ cm}^{-1}$  bandına gözlenen pik  $\text{C}=\text{O}$  bağlarından gelmektedir [Li vd., 2009].

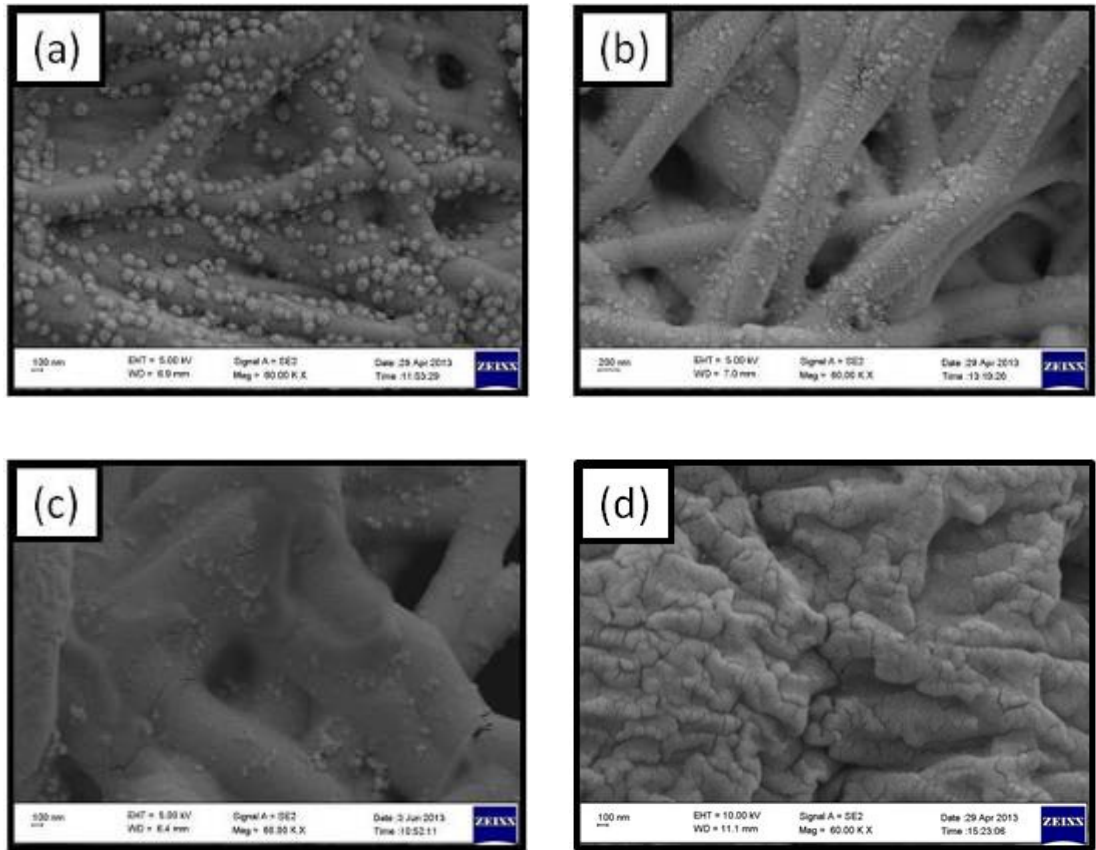
HA kaplanmış jelatin doku iskelesinde  $3347\text{-}3422\text{ cm}^{-1}$  bandında, jelatinin  $1631\text{ cm}^{-1}$  bandında yer alan amid I jelatin/HA formunda  $1633\text{-}1638\text{ cm}^{-1}$  bandında yer almaktadır. Çapraz bağlı jelatin/HA formunda Fermi rezonans ortaya çıkmasından dolayı açık bir frekans esnemesi gözlenmez.  $962\text{-}1088\text{ cm}^{-1}$  spektrum aralığında görülen fosfat bandı, jelatin makromolekülleri ve hidroksiapatit kristalleri arasında gerçekleşen stokiometrik olmayan apatit kompozisyonunun neden olduğu organik-inorganik etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır [Chang vd., 2003].

P-O bağına karşılık gelen  $500\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler, numunelerin yüzeylerinde çöken kalsiyum fosfat tabakasının, HA kristallerine dönüştüğünü göstermektedir. SBF öncesi grafiklerle karşılaştırıldığında, P-O piklerinin şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Bu sonuç, sentetik vücut sıvısı içerisinde numunelerin bekleme süreleri uzadıkça HA oluşumunun arttığını göstermektedir. Literatürde,  $600\text{ cm}^{-1}$  civarında P-O bağlarının olduğu ve sentetik vücut sıvısında bekleme süresi arttıkça piklerin şiddetlerinin arttığını belirtmişlerdir. Sentetik vücut sıvısı içerisindeki iyon

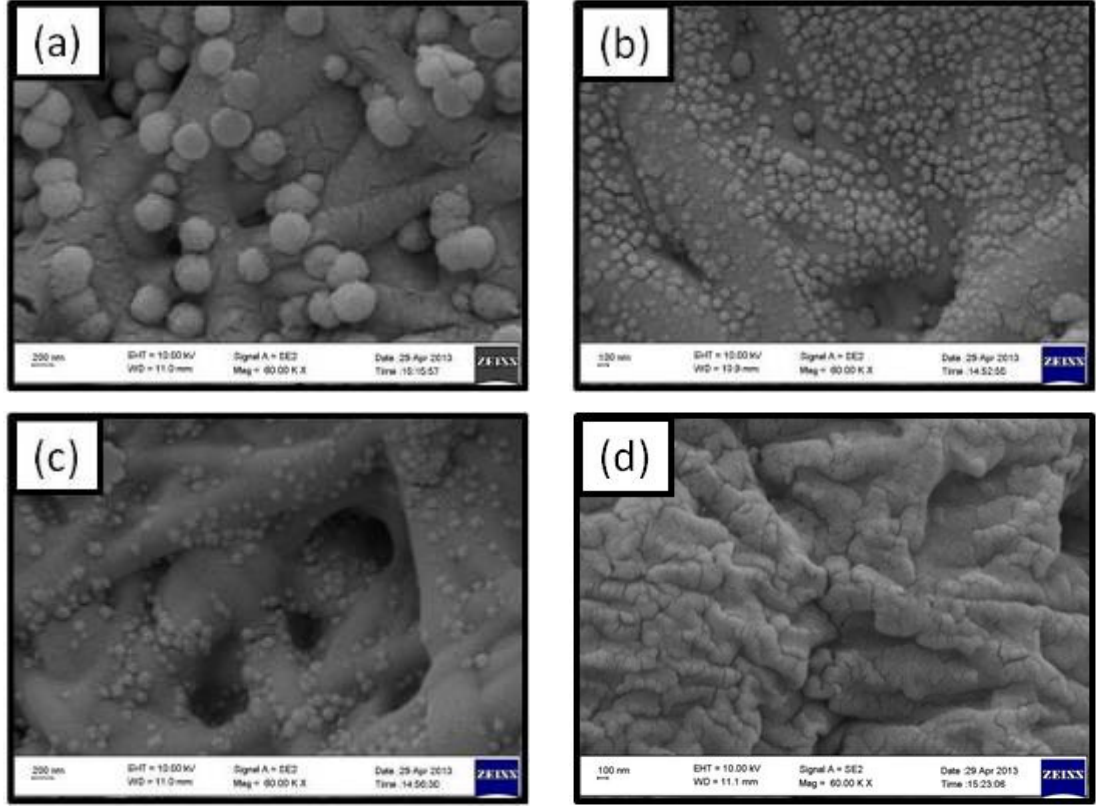
konsantrasyonu da arttığında P-O piklerinin şiddetlerinin arttığını belirtmişlerdir [Müller ve Müller, 2006; Jalota vd., 2008].

#### 4.1.2.9. SEM ile analiz

Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplanması sonrası SEM (60000X) görüntüleri Şekil 4.20. ve 4.21' de sunulmuştur.



Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplanması sonrası SEM görüntüleri, x60000 (a) %15 jelatin, (b) %20 jelatin (c) %25 jelatin (d) %30 jelatin



Şekil 4.21. %30 konsantrasyonda jelatin çözeltilerinden elde edilmiş ve 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası SEM görüntüleri, x60000 (a) 3 saat, (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat

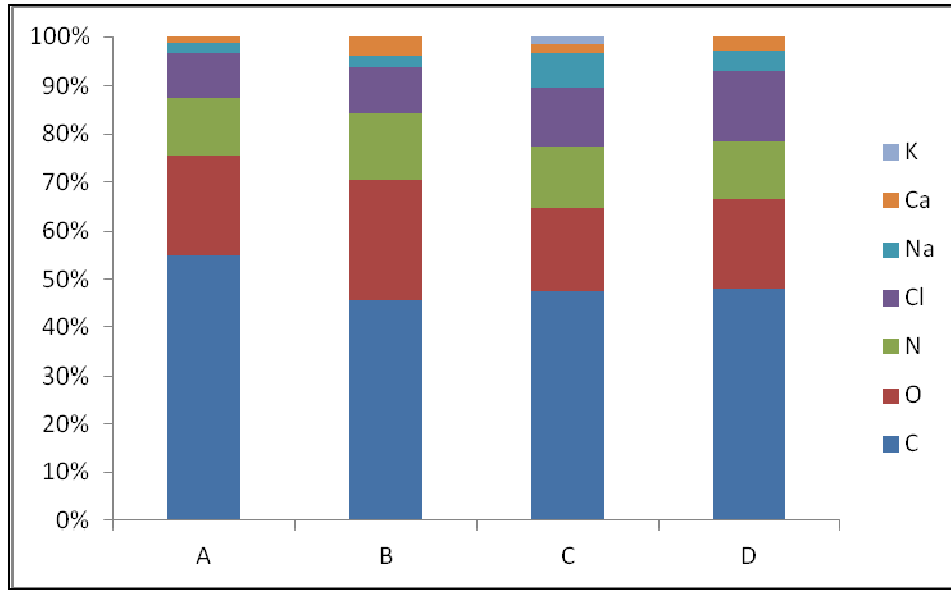
Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplama süresinin değişiminin gösterildiği SEM görüntüleri incelendiğinde; kaplamanın 3 saat sonunda da oluştuğu ve kaplama süresi arttıkça kaplama miktarının arttığı görülmüştür. SBF'nin kullanıldığı biyomimetik prosesin en büyük dezavantajı, kaplama için gereken uzun sürelerdir [Resende vd., 2008]. Bunun yanında birçok çalışma, 2X (SBF reçetesindeki kimyasalların miktarının 2 katına çıkarılması)'den daha fazla iyon konsantrasyonu kullanılarak kaplama miktarının artırılabilceğini ve kaplama süresinin kısaltılabileceğini ortaya koymuştur. Taş ve arkadaşları ise  $Ti_6Al_4V$  yüzeylerde 2-6 saat içinde kemik benzeri apatitik kalsiyum fosfat çökmesini sağlamışlardır [Taş vd., 2004].

Kokubo ve arkadaşları, dokunmamış karboksimetillenmiş kitin fabrik yapılarla yaptıkları çalışmalarda apatit yoğunluğunun daldırma zamanı ile arttığını

göstermişlerdir. Fiberlerin üzerinde 3 gün içerisinde apatit tabakanın oluştuğunu gözlemlemişlerdir [Kokubo vd., 2004].

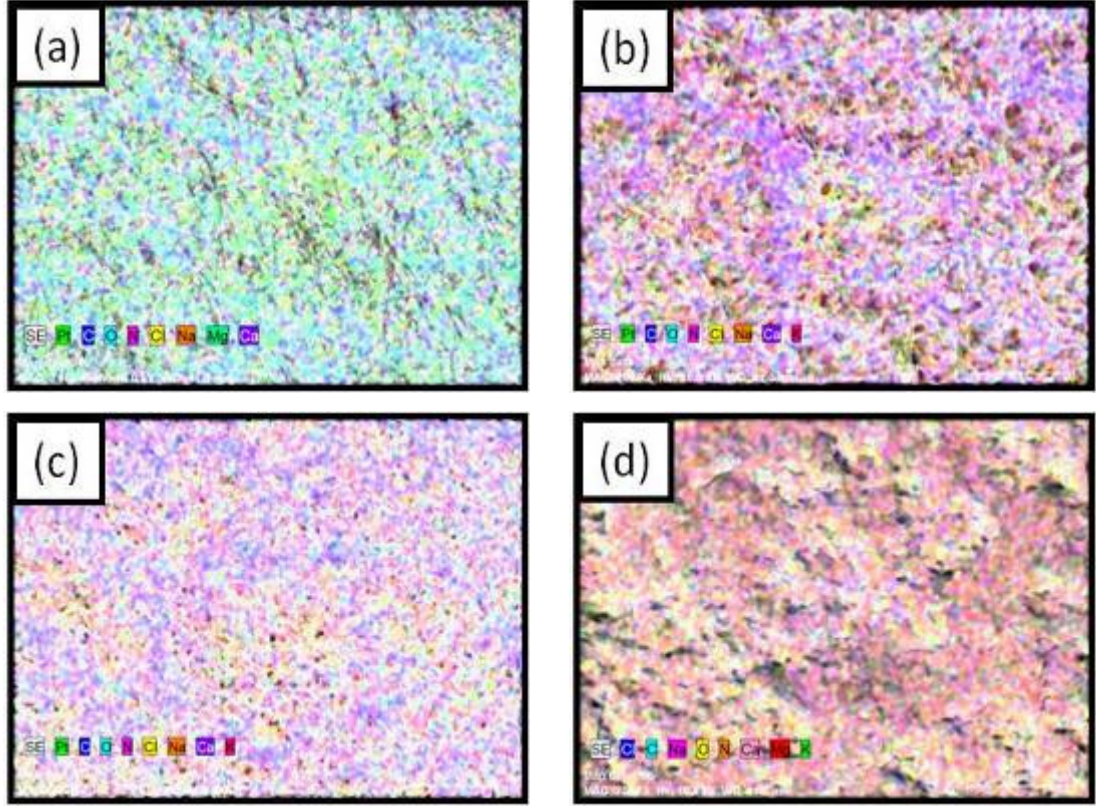
#### 4.1.2.10. EDX ile analiz

Taramalı elektron mikroskobu ile seçilmiş bir noktada X-ışın haritalanması (EDX) yapılarak bu gölgelerde kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır. EDX analizi ile bir nokta üzerinde kimyasal analiz yapılarak o noktadaki iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir. Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin sentetik vücut sıvısı içerisinde 30 saat süreyle hidroksiapatit kaplanması sonucunda yüzeyde bir noktada biriken iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 4.22.).

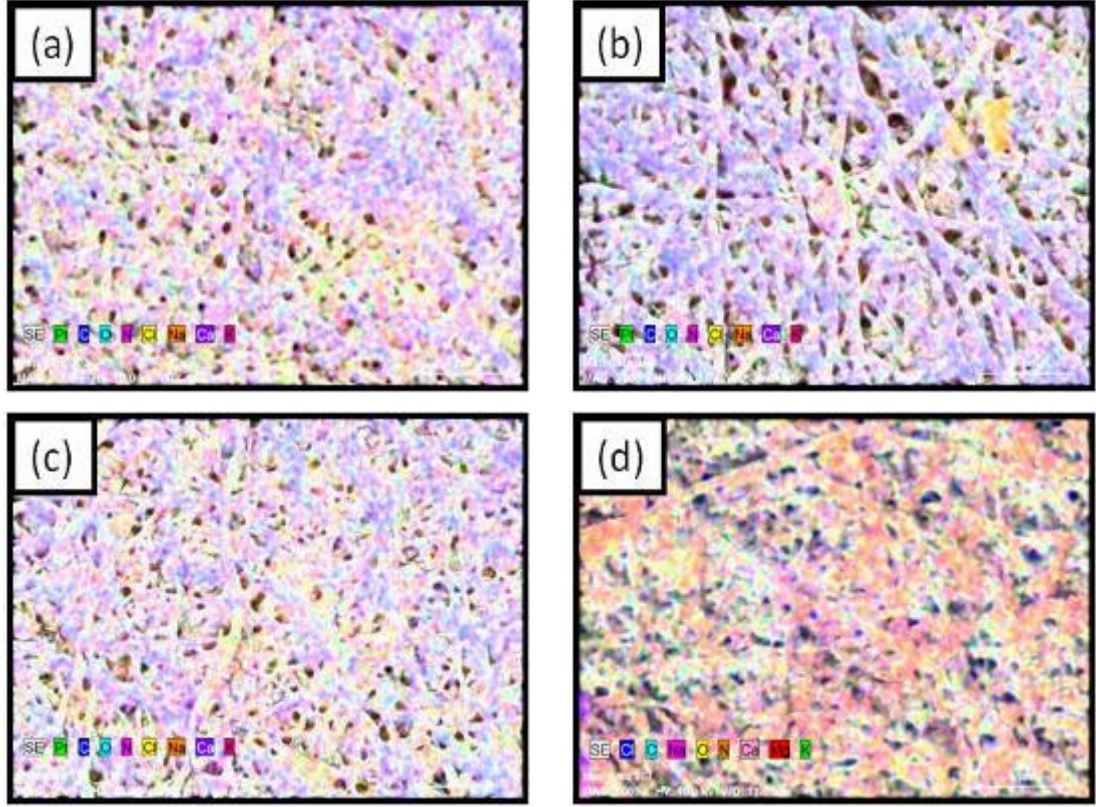


Şekil 4.22. Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrasındaki iyon yüzdeleri (A=%15, B=%20, C=%25, D=%30), 30 saat sonunda

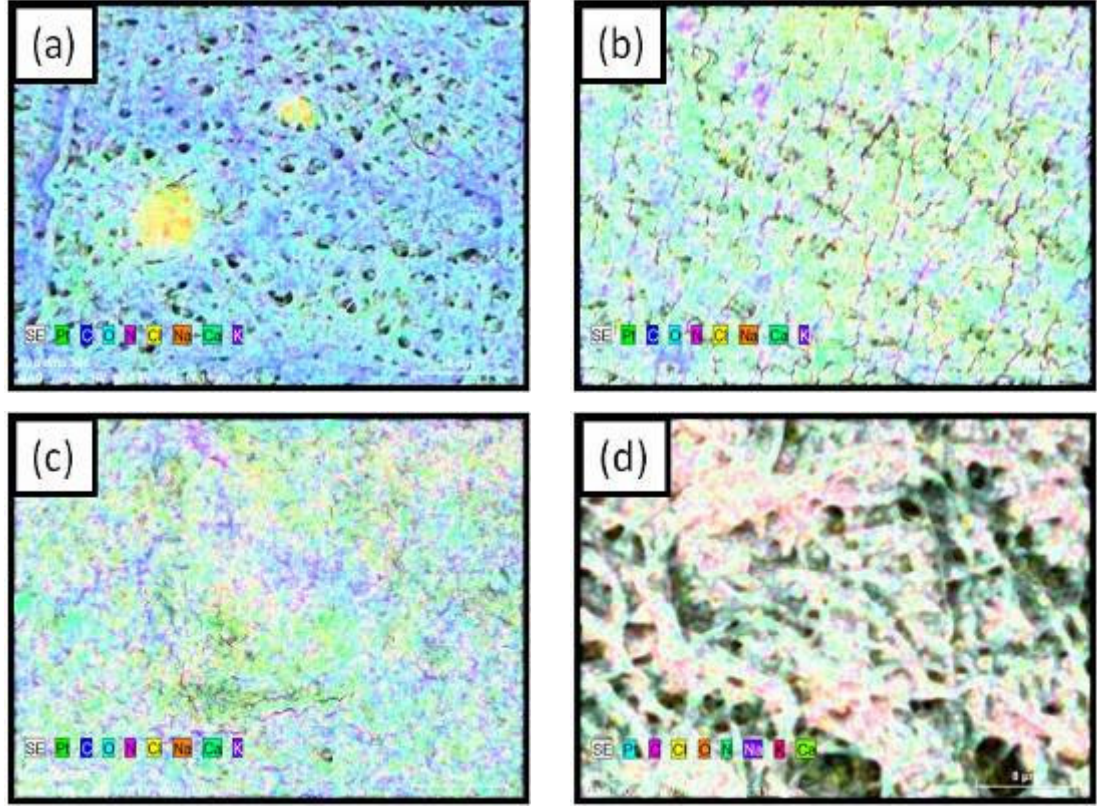
Şekil 4.23., 4.24., 4.25. ve 4.26.' da farklı konsantrasyonlardaki jelatin çözeltilerinden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 3, 6, 18 ve 30 saat süreyle kaplanması sırasında yüzeye tutulan iyon profillerini göstermektedir.



Şekil 4.23. %15 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat

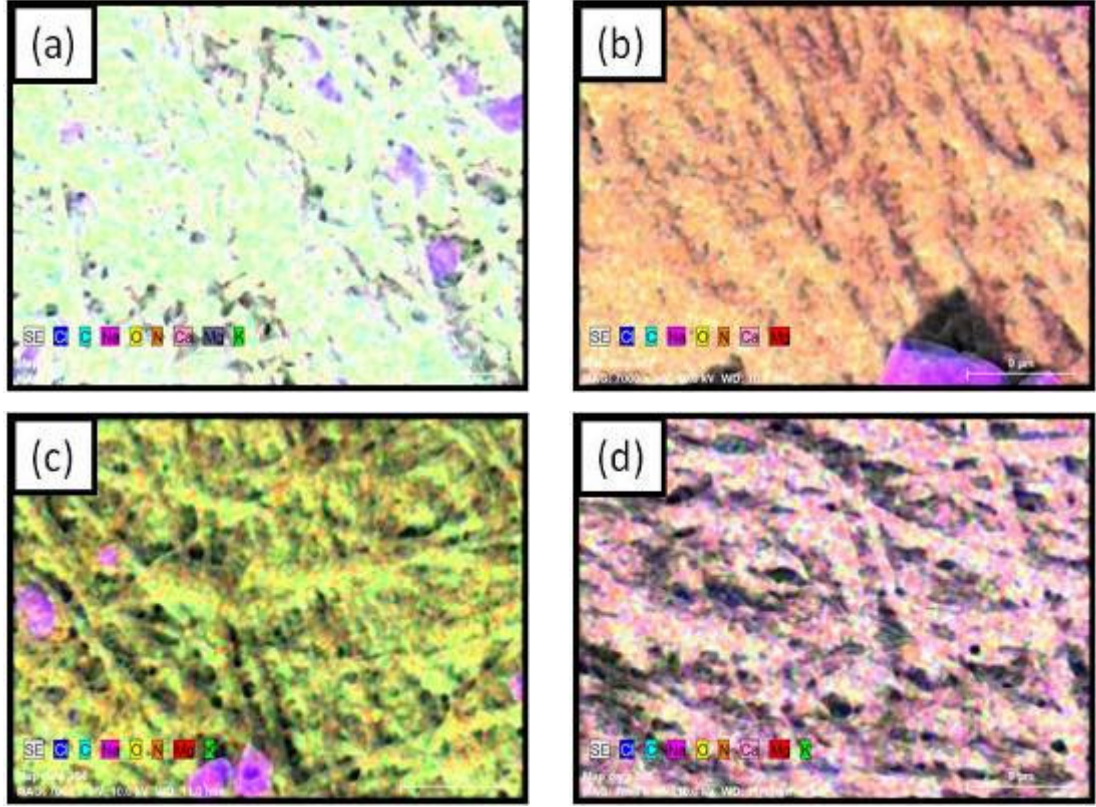


Şekil 4.24. %20 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat



Şekil 4.25. %25 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat



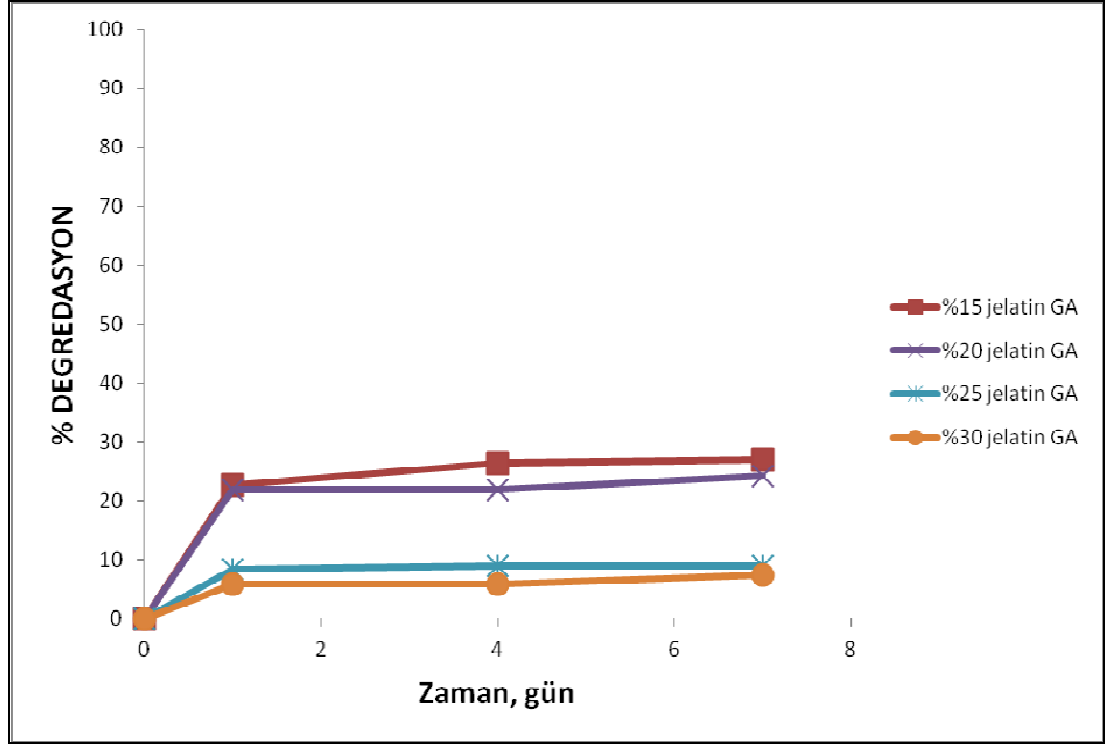


Şekil 4.26. %30 jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrası EDX analizi (a) 3 saat (b) 6 saat (c) 18 saat (d) 30 saat

EDX analizinde, nanofibröz doku iskelesindeki bir nokta yüzeyindeki iyon konsantrasyonunu belirlerken her bir iyonu farklı bir renk ile simgeleyerek yüzey morfolojisini göstermektedir. Elde edilen görüntüler incelendiğinde sonuçlar iyon konsantrasyonu grafiği ile örtüşmektedir. %15, %20 ve %30 jelatin konsantrasyonlarındaki çözeltilerden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinde Ca iyonu toz pembe renk ile simgelenmektedir. 30 saat süreyle HA kaplama sonrası görüntüleri incelendiğinde pembe rengin yoğun olduğu net bir şekilde görülmektedir. %25 jelatin konsantrasyonundaki numune de Ca iyonu yeşil renk ile simgelenmektedir. %25 jelatin konsantrasyonundaki 3 saat süreyle HA kaplama sonrası numunesinde belirgin sarı renk yani Cl iyonu görülmektedir. 30 saat süreyle HA kaplama sonrasında Cl iyonu diğer numunelere daha çok birikmiştir. % 30 jelatin konsantrasyonundaki numune de görünen büyük koyu pembe lekeler Na iyonunu simgelemektedir. Na ve Cl iyonlarının bu şekilde görünmesi hazırlanan SBF çözeltisindeki bir kısım NaCl tuzunun tam olarak çözünmediğini göstermektedir.

#### 4.1.2.11. *In vitro* degradasyonun incelenmesi

Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 37 °C’ de su banyosunda 7 gün boyunca yapılan degradasyon denemelerinin sonuçları Şekil 4.27. ‘ de sunulmuştur.



Şekil 4.27. Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş nanofibröz doku iskelelerinin degradasyonu

Farklı jelatin konsantrasyonuna sahip çözeltilerden üretilen 3 gün süre ile glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış numunelerin degradasyonu incelendiğinde; jelatin konsantrasyonu arttıkça (yani paralel olarak nanofiber çapı arttıkça) 7 gün sonunda meydana gelen degradasyon yüzdesi azalmıştır. % 15 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri 7 gün sonunda yaklaşık %27 degradasyona uğramıştır. % 30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri 7 gün sonunda yaklaşık %7,4 degradasyona uğramıştır. Nanofiber çapının azalması yüzey alanının genişlemesine sebep olarak degradasyon (bozunma) hızını arttırmıştır. Zhang ve arkadaşları çapraz bağlanmamış fiberlerin suya karşı dayanımı olmamasında karşın, çapraz bağlanmış

fiberlerin mekanik ve termal dayanıklılığının oldukça yüksek olduğunu, suya dayanıklılığın çapraz bağlama süresinin artmasına bağlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır [Zhang vd., 2006].

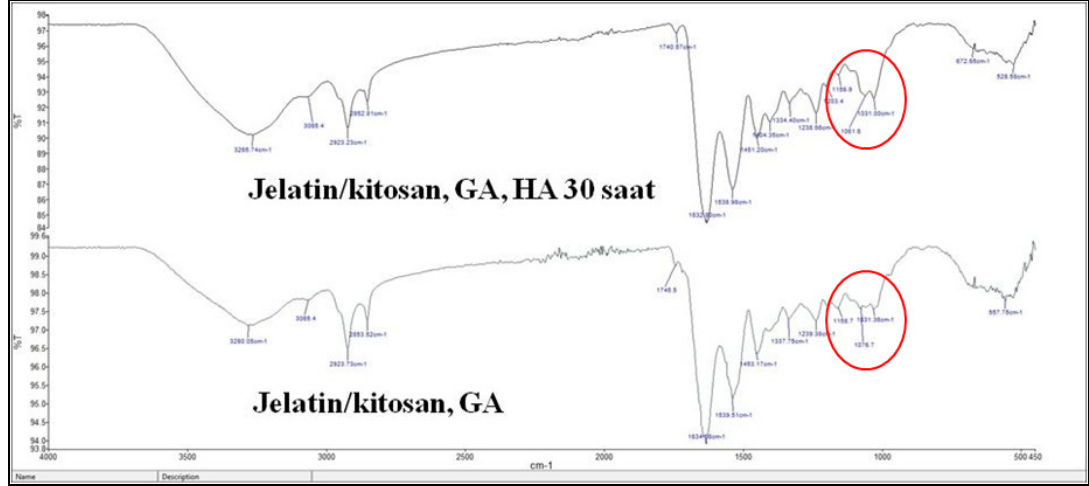
#### 4.1.3. Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması

##### 4.1.3.1. Jelatin/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Yapılan ön optimizasyon çalışmaları sonunda, çözücü olarak asetik asit, formik asit ve diklorometan (1/7/2, v/v/v) sisteminin kullanıldığı, çözeltiye uygulanan voltajın 13 kV ve polimer çözeltisini içeren şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklığın 10 cm olarak sabit tutulduğu ve besleme hızınının 0,3 ml/h olduğu sistemde jelatin/kitosan nanofibröz yapıları elektrospinning yöntemi ile üretilmiştir. Bu sistemde toplam polimer konsantrasyonu %30 ve toplam konsantrasyon içerisinde jelatin ve kitosan (düşük molekül ağırlıklı) yüzdeleri 25 ve 5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elektrospinning yöntemi kullanılarak üretilen nanofibröz doku iskeleleri mekanik olarak stabilitelerini sağlamak amacı ile 3 gün kapalı cam fanusda glutaraldehit buharına tabii tutularak çapraz bağlanmıştır. Bir önceki basamakta hazırlanan doku iskeleleri sentetik vücut sıvısı içerisinde, 37 °C’ de bekletilerek 30 saat süreyle hidroksiapatit ile kaplanmıştır.

##### 4.1.3.2. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin FTIR analizi

Çapraz bağlanmış ve hidroksiapatit ile kaplanmış jelatin/kitosan nanofibröz yapılarının FTIR spektrumu Şekil 4.28.’ de sunulmuştur.

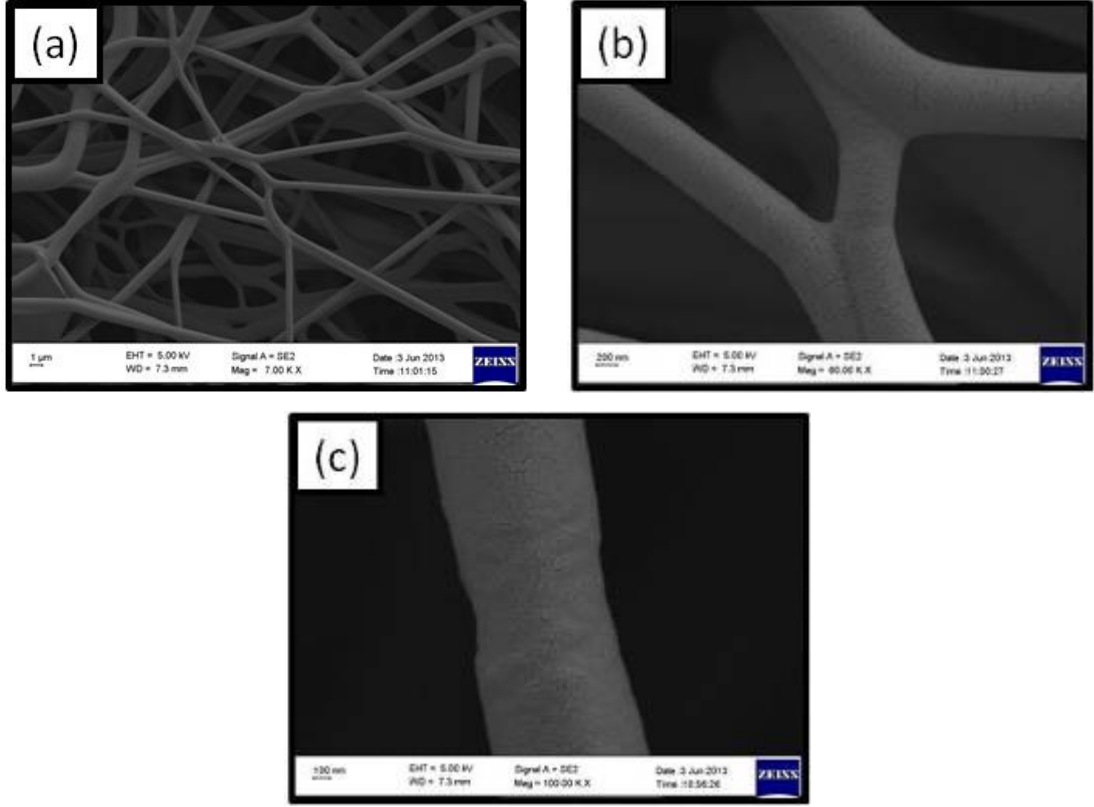


Şekil 4.28. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin FTIR spektrumları. GA: numunelerin glutaraldehit ile çapraz bağlandığını; HA 30 saat: numunelerin 30 saat boyunca HA ile kaplandığını ifade etmektedir.

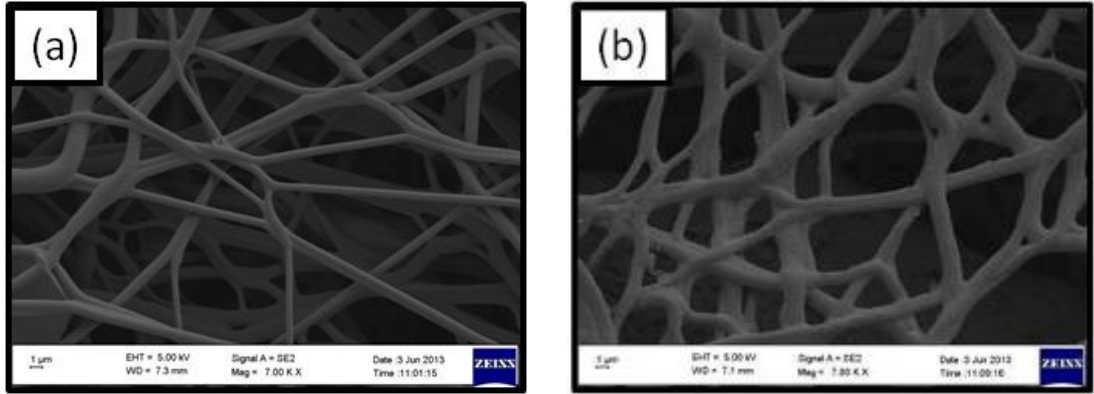
3419  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik, hidroksil ve molekül içi hidrojen bağlarına karşılık gelmektedir. 2850  $\text{cm}^{-1}$  ve 2923  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H, 1657  $\text{cm}^{-1}$  de  $\text{CONH}_2$ , 1155  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-köprüsü ve 960-1100  $\text{cm}^{-1}$  civarında ise C-O-C simetrik gerilimlerine ait pikler yer almaktadır. 1649  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=N bağının titreşimine ait pik, glutaraldehitin karbonil grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki tepkimenin bir sonucu olarak Schiff bazının oluşumunu gösterir. Çapraz bağlanmış kitosanın varlığı ise 892-1152  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülmektedir. Elde edilen sonuçlar Banerjee ve arkadaşlarının çalışmaları ile de uyum göstermektedir [Banerjee vd., 2002].

#### 4.1.3.3. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin SEM ile analizi

Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.29.' da jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin 7000X, 60000X ve 100000X büyütmedeki SEM görüntüleri sunulmuştur. Üretilen jelatin/kitosan nanofibröz çapraz bağlanmış doku iskelelerinin fiber çapları ortalama  $781 \pm 99$  nm olarak gözlenmiştir. Zhuang ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada jelatin/kitosan polimerlerinden elektrosponning metodu ile boncuk oluşumu olmadan, 220 – 400 nm arasındaki boyutlarda düzgün lifler elde etmişlerdir [Zhuang vd., 2010].



Şekil 4.29. Jelatin/kitosan nanofibröz çapraz bağlanmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) x7000 (b) x60000 (c) x100000

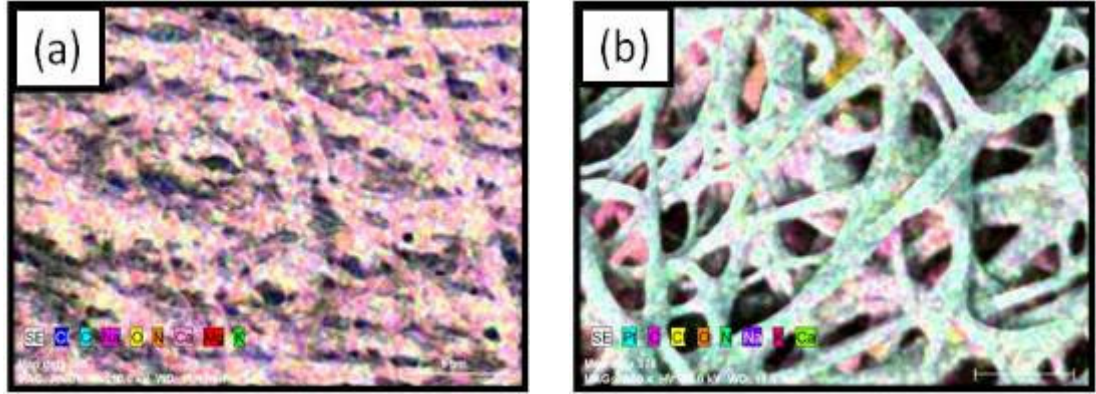


Şekil 4.30. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri, x7000 (a) çapraz bağlama sonrası (b) 30 saat HA kaplama sonrası

Kong ve arkadaşları 5X SBF çözeltisi kullanarak kitosan ve kitosan/nanohidroksit kompozit malzemeler üzerinde 36 saat sonunda hidroksiapatit yapıları elde etmişlerdir [Kong vd., 2006].

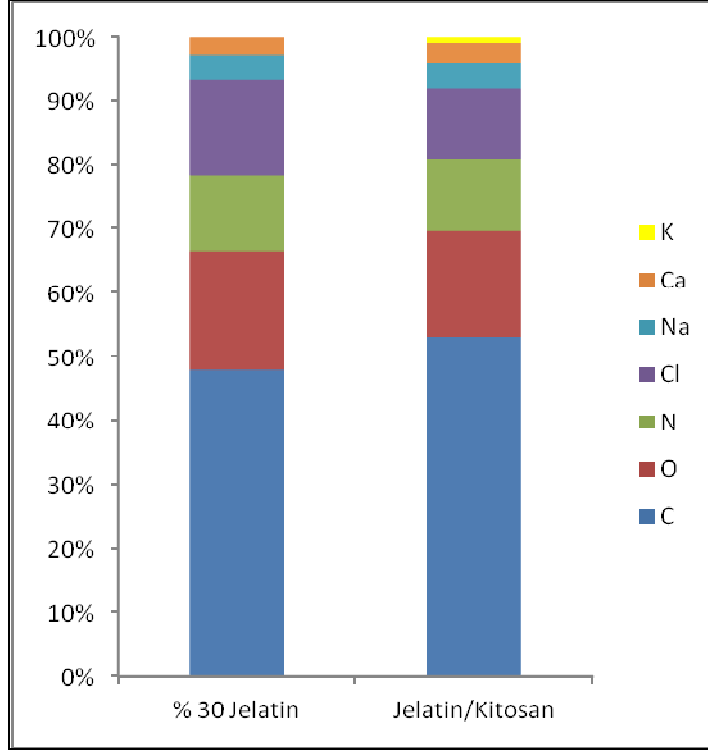
#### 4.1.3.4. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin EDX ile analizi

Taramalı elektron mikroskobu ile seçilmiş bir noktada X-ışın haritalanması (EDX) yapılarak bu gölgelerde kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır. EDX analizi ile bir nokta üzerinde kimyasal analiz yapılarak o noktadaki iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat HA kaplama sonrası EDX görüntüleri, (a) %30 jelatin (b) jelatin/kitosan

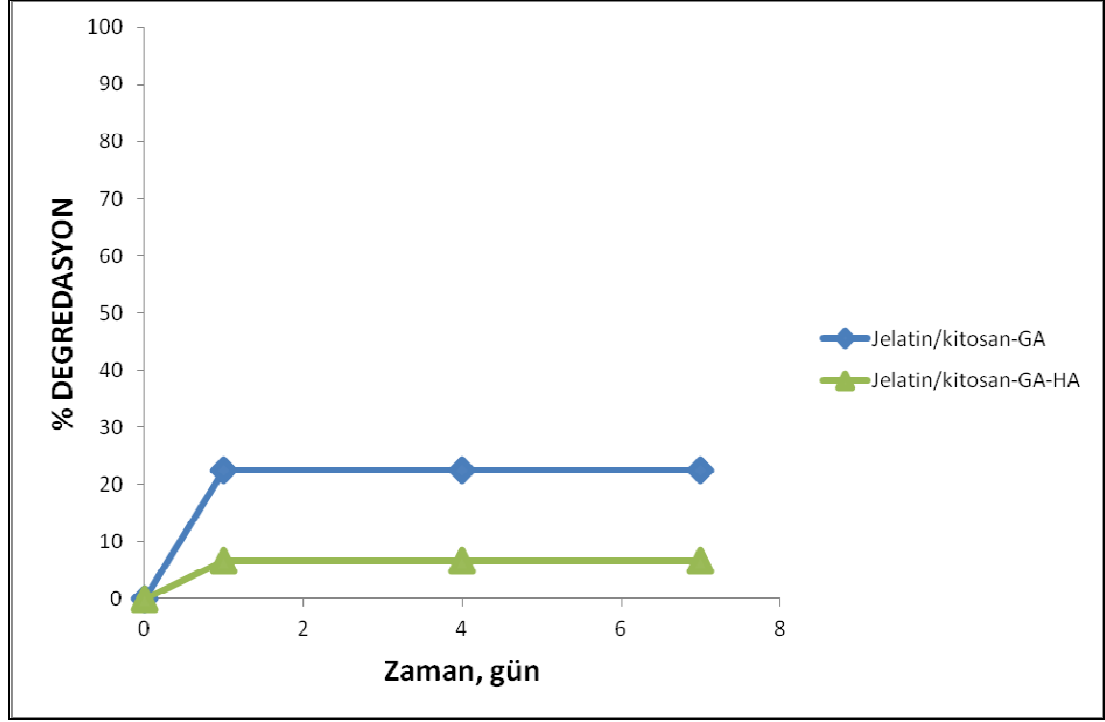
Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin 30 saat süreyle HA kaplama sonrası görüntüsünde ise N,Ca ve Cl iyonlarının yoğunluğu görülmektedir. Jelatin/kitosan ve %30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri karşılaştırıldığında,benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ancak jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelesi %30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden elde edilen nanofibröz doku iskelesine göre oldukça fazla K iyonu içermektedir. Bu iyonun fazlalığı ise yüzeyde daha fazla PO<sub>4</sub> iyonunun tutulduğunu göstermektedir. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin sentetik vücut sıvısı içerisinde 30 saat süreyle hidroksiapatit kaplanması sonucunda yüzeyde bir noktada biriken iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 4.32.)



Şekil 4.32. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin HA kaplanması sonrasındaki iyon yüzdeleri

#### 4.1.3.5. Jelatin/Kitosan Nanofibröz doku iskelelerinin degradasyonu

Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin 30 süreyle HA kaplama öncesi ve sonrası degradasyon profilleri Şekil 4.33.'de sunulmuştur. 3 gün süreyle glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış ve 30 saat süreyle HA kaplanmış numune 7 gün sonunda daha az degradasyona uğramıştır.



Şekil 4.33. Jelatin/kitosan çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 3 gün süre ile glutaraldehit buharında bekletilmiş ve HA kaplanması sonrası degradasyonu

Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama sonrası degradasyonunda 7.günün sonunda % 22,5 oranında degradasyona uğrarken, % 30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri %7,4 oranında degradasyona uğramıştır. Toplam polimer konsantrasyonu aynı olmasına rağmen degradasyon profilleri oldukça farklıdır.



## **5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Doku mühendisliği, hasarlı dokunun fonksiyonel olarak benzerinin geliştirilmesi için mühendislik ve tıp prensiplerini birleştiren ve uygulayan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Kemik yaşam süresi boyunca sürekli kendini yenileme özelliğine sahip, dinamik ve yüksek oranda damarlaşmış bir dokudur. Özellikle genç yaşlardaki insanlarda kemik dokusunun kendini yenileme kapasitesi çok yüksektir. Buna karşılık bir tümör operasyonu sonrası ya da kaza sonrası kaynamayacak kadar büyük kemik kayıplarında bu kendi kendine yenilenme süreci düzgün işlemez ve hasarlı dokunun onarımı için doku mühendisliği gibi alternatif yöntemlerin kullanılması gerekir.

Jelatin, kitosan ve bunların doğal veya sentetik polimerlerle olan kompozitlerinden üretilmiş gözenekli doku iskeleleri doku kayıplarının rejenerasyonunda kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Sentetik vücut sıvısı içinde biyomimetik hidroksiapatit ile kaplama yöntemi ise biyomedikal uygulamalar alanında yeni ve gelecek vaat eden bir prosestir.

Bu tez çalışmasında kemik doku onarımında doku iskelesi olarak kullanılacak, doğal bir polimer olan jelatin ve kitosandan elektrospinning tekniği ile jelatin ve jelatin/kitosan çözeltilerinden nanofibröz doku iskeleleri üretilerek; bu doku iskeleleri sentetik vücut sıvısı içerisinde hidroksiapatit ile kaplanmış ve üretilen nanofibröz doku iskelelerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin fiber yapısı, fiber çapları, hidroksiapatit kaplanma mekanizmaları ve degradasyon özellikleri incelenmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, jelatin ve jelatin/kitosan çözeltilerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin elektrospinning metodu ile üretilmesi, biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanması ve karakterizasyonudur. Kemik doku onarımı için henüz mükemmel bir doku iskelesi üretilmemiştir. Bu tez kapsamında, kemik dokusunda bulunan kolajenin denature edilmiş hali olan jelatin ve kitinin

kısmi deasetilasyonu ile elde edilen yapısal olarak kemik bağ dokusundaki glikozaminoglikanlara benzeyen kitosan polimerleri kullanılmıştır. Sentetik vücut sıvıları içinde biyomimetik hidroksiapatit (kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturan) ile kaplanmıştır. Böylece hem içerik olarak hem de mikro yapı olarak biyolojik sistemde (kemikte) yer alan inorganik fazı taklit edilerek daha hızlı ve kaliteli kemik dokusu oluşumu sağlanacaktır. Bu tez çalışmasında elektrospinning yöntemi ile kemik doku mühendisliği için yeni doku iskelelerinin hazırlanması hedeflenmiştir. Jelatin, kemiğin organik kısmına benzerlik göstermesi, kitosan, içeriğinin kemik bağ dokusundaki glikozaminoglikanlara benzerliği, yani kimyasal özellikleri sayesinde, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağladığından, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri göz önüne alınarak temel polimer sistemi olarak, hidroksiapatit ise kemiğin inorganik kısmının temelini oluşturduğu ve iyi biyoyumluluk gösterdiği için üretilen nanofibröz doku iskelesinin bir diğer bileşeni olarak seçilmiştir.

İdeal doku iskelesi kompozisyonunun belirlenebilmesi için yapılan ön optimizasyon çalışmalarda; farklı jelatin konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden ve sabit jelatin/kitosan kompozisyonunda elektrospinning yöntemi ile nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önüne alınarak, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaya elverişli olan nanofibröz doku iskelesi üretmek amacıyla jelatin ve jelatin/kitosan kompozisyonları sabit konsantrasyondaki glutaraldehit ile çapraz bağlanmışlardır.

Yapılan karakterizasyon çalışmaları ile nanofibröz doku iskelelerinin kimyasal yapıları, mekanik özellikleri, in vitro degradasyon profilleri ve morfolojik yapıları ortaya konulmuştur.

FTIR analizleri ile; jelatinin 1690 - 1530  $\text{cm}^{-1}$  bandı aralığında karakteristik amid grubu içeren bir protein olduğu, hidroksiapatitin 3572  $\text{cm}^{-1}$ , bandında -OH, 961  $\text{cm}^{-1}$   $\gamma_1$  fosfat ve 1017  $\text{cm}^{-1}$   $\gamma_3$  fosfat bandı yer aldığı, 1086  $\text{cm}^{-1}$  bandına gözlenen pik C=O bağlarından geldiği, jelatinin çapraz bağlanmasıyla moleküler yapısında oldukça büyük değişiklikler meydana geldiği ve 3280-3288  $\text{cm}^{-1}$  bandı aralığında

C=N bağının görülebildiği, çapraz bağlı formunda 962-1088  $\text{cm}^{-1}$  spektrum aralığında görülen fosfat bandı, jelatin makromolekülleri ve hidroksiapatit kristalleri arasında gerçekleşen stokiometrik olmayan apatit kompozisyonunun neden olduğu organik-inorganik etkileşimi ile ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Kitosanın FT-IR spektrumlarında ise 2850  $\text{cm}^{-1}$  ve 2923  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H, 1657  $\text{cm}^{-1}$  de CONH<sub>2</sub>, 1155  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-köprüsü ve 960-1100  $\text{cm}^{-1}$  civarında ise C-O-C simetrik gerilimlerine ait pikler yer almaktadır. 1649  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=N bağının titreşimine ait pik, glutaraldehitin karbonil grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki tepkimenin bir sonucu olarak Schiff bazının oluşumunu gösterir. Çapraz bağlanmış kitosanın varlığı ise 892-1152  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülmektedir.

SEM analizleri ile; jelatin ve jelatin/kitosan çözeltilerinden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin kimyasal yapıları ve yüzey morfolojileri belirlenmiştir. Farklı jelatin konsantrasyonlarında (%15, %20, %25, %30) elektrosinning metodu ile üretilen nanofibröz doku iskelelerinde çapraz bağlama işlemi için sabit oranda glutaraldehit kullanılmıştır. Jelatin konsantrasyonu arttıkça glutaraldehit oranında artırılması farklı jelatin konsantrasyonlarındaki nanofibröz doku iskelelerinin mekanik dayanımını arttıracaktır. Besleme hızı 0,3 ml/h olarak üretilen jelatin nanofibröz doku iskelelerinin ortalama fiber çapı 158 ± 23 – 371 ± 26 nm arasında değişkenlik gözlenmiştir. Besleme hızı 0,5 ml/h olarak değiştirildiğinde ortalama fiber çapı 107±14 – 395±45 nm arasında değişmiştir. Jelatin konsantrasyonu, uygulanan voltaj gibi parametreler sabit tutularak besleme hızı artırıldığında elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin ortalama fiber çaplarında azalış olduğu tespit edilmiştir. Besleme hızı artması ile elde edilen nanofibröz doku iskeleleri fiberleri arasında kısmen boncuklaşma da görülmüştür. Bu nedenle farklı bir çalışmada polimer ve çözücü kompozisyonları sabit tutularak uygulanan voltaj ve iğne ucu – toplayıcı arasındaki mesafe gibi proses değişkenlerinin de farklılaşmasıyla elde edilecek nanofibröz doku iskeleleri de incelenebilir. Jelatin/kitosan kompozisyonu ile elde edilen nanofibröz doku iskelelerinde ortalama fiber çapı 781±99 nm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre; jelatin/kitosan kompozisyonu ile elde edilen toplam polimer ağırlığına karşılık gelen yalnızca jelatin polimeri ile edilen nanofibröz doku iskeleleri kıyaslandığında, jelatin/kitosan kompozisyonu ile elde

edilen nanofibröz doku iskelelerinin ortalama fiber çapı jelatin polimeri ile elde edilen doku iskelelerine göre yaklaşık 2 katı büyüklüktedir. Bunun kitosanın fonksiyonel gruplarının jelatin gibi materyaller ile kompozit oluşturabilmesi özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sentetik vücut sıvısı içerisinde 3, 6, 18 ve 30 saat süre boyunca kaplanan nanofibröz doku iskeleleri incelendiğinde, kaplama süresi arttıkça nanofibröz doku iskelelerinde ağırlık artışı tespit edilmiştir. Kaplama süresi arttıkça nanofibröz doku iskelesi yüzeyine tutunan iyonların konsantrasyonu da artmaktadır. Ancak sentetik vücut sıvısı içerisinde kaplama işleminde insan plazmasının 5 katı kadar iyon içeren 5xSBF kullanıldığında kemik dokusuna daha yakın yüksek konsantrasyonda iyon içeriği olan nanofibröz doku iskeleleri elde edilebilir.

In vitro degradasyon çalışmaları sonunda, farklı jelatin konsantrasyonlarındaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskelelerinin 7 gün sonunda tamamıyla degrade olmadığı ve formunu koruduğu görülmüştür. % 15 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri 7 gün sonunda yaklaşık %27 degradasyona uğramıştır. % 30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri 7 gün sonunda yaklaşık %7,4 degradasyona uğramıştır. 3 gün süreyle glutaraldehit buharında çapraz bağlanmış farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerden elde edilen nanofibröz doku iskelelerinin degradasyonu polimer konsantrasyonu (buna paralel olarak nanofiber çapı) arttıkça azalmıştır. Nanofiber çapının azalması yüzey alanının genişlemesine sebep olarak degradasyon (bozunma) hızını arttırmıştır. Jelatin/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin çapraz bağlama sonrası degradasyonunda 7.günün sonunda % 22,5 oranında degradasyona uğrarken, %30 jelatin konsantrasyonundaki çözeltilerden üretilen nanofibröz doku iskeleleri %7,4 oranında degradasyona uğramıştır. Toplam polimer konsantrasyonu aynı olmasına rağmen degradasyon profilleri oldukça farklıdır.

Bu tez çalışmasında, klinik uygulamalara yönelik kemik doku onarımında kullanılabilme potansiyeline sahip, kimyasal, fiziksel ve *in vitro* koşullardaki

biyouyumluluk özellikleri karakterize edilmiş, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış jelatin ve jelatin/kitosan nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Gerçekleştirilen analizler ve elde edilen bulgular ışığında, tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak geliştirilmelerini devam ettirmek amacı ile mekanik dayanımı daha yüksek, nanofibröz doku iskelelerinin üretilmesi ve bu doku iskelelerinin kemik hücreleri ve kemik hücrelerine farklılaşan kök hücreler ile etkileşimlerinin incelenmesi ve kemik doku onarımına yönelik hayvan modellerinde *in vivo* çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Agrawal, C.M. and Ray, R.B., “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 55:141-150, (2001).
- Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A.K., Sharma, R.K. and Maitra, A., “Preparation,- characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles”, *International Journal of Pharmaceutics*, 243:93-105, (2002).
- Beachley, V., and Wen, X., “Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length”, *Materials Science and Engineering C*, 663-668, (2009).
- Bölgen, N., Menceloğlu, Y.Z., Açıatay, K., Vargel, İ., Pişkin, E., “In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning at different conditions,” *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 16: 1537–1555, (2005).
- Bölgen, N., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Pişkin, E., “Cryogelation for preparation of novel biodegradable tissue-engineering scaffolds”, *Biomater Sci: Polym Edn*, 18:1165-1179, (2007).
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., Recker, R., “Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization”, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 77-A(8), 1256-1272, (1995).
- Chang, M.C. and Tanaka, J., “FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde”, *Biomaterials*, 23(24): 4811–4818, (2002).

- Chen, G.P., Ushida, T. and Tateishi, T., “Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering”, *Materials Science and Engineering C*, 17:63–69, (2001).
- Chen, Z.G., Wang, P.W., Wei, B., Mo, X.M., Cui, F.Z., “Electrospun collagen-chitosan nanofiber:A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell”, *Acta Biomaterialia*, 372-382, (2010).
- Cheng, M.Y., Deng, J.U., Yang, F., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F., “Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions”, *Biomaterials* 24 (17), 2871-2880, (2003).
- Dan, L., and Xia, Y., “Electrospinning of nanofibers reinventing the Wheel”, *Advanced Materials*, (14):1151-1170, (2004).
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D. and Beck Tan, N.C., “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles”, *Polymer*, 42, 261–272, (2001).
- Duan, B., Wu, L. and Li, X., “Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro”, *J Biomater Sci.Polym Edit*, 95-115, (2007).
- Elder, S.H., Nettles, D.L., and Bumgardner, J.L., “Synthesis and characterization of chitosan scaffolds for cartilage-tissue engineering”, *Biopolymer Methods in Tissue Engineering (Methods in Molecular Biology)*, Hollander, A.P., Hatton, P. (eds.), Humana Press Inc., U.S. pp. 41-48, (2003).
- Geng, X., Kwon, O., Jang, J., “Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution”, *Biomaterials*, 5427-5432, (2005).

- Greiner, A. and Wendorff, J.H., "Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie*, 46:5670-5703, (2007).
- Gu, S., Wang, Z., Ren, J., Zhang, C., "Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(L-lactide) blend and its characteristics for wound dressing", *Materials Science and Engineering C*, 1822-1828, (2009).
- Gümüşderelioğlu, M., "Doku mühendisliğinde nanoteknoloji", *Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları*, Ekim, (2007).
- Han, J.K., Song, H.Y., Saito, F. and Lee, B.T., "Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method", *Materials Chemistry and Physics*, 99:235-239, (2006).
- Homayoni, H., Ravandi, S.A.H., Valizadeh, M., "Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization", *Carbohydrate Polymers*, 656-661, (2009).
- Huang, Z., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S., Lim, C.T., "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers", *Polymer*, 5361-5368, (2004).
- Ikada Y., "Challenges in tissue engineering", *Journal of the Royal Society Interface*, 22:589-601, (2006).
- Jalota, S., Bhaduri, B.S., Tas, A.C., "In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers", *Wiley Inter Science*, 481-490, (2006).
- Jalota, S., Bhaduri, B.S., Tas, A.C., "Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mM  $\text{HCO}_3^-$  to make bone substitutes more osteointegrative", *Materials Science and Engineering*, 129-140, (2008).



- Jalota, S., Bhaduri, S.B., Taş, A.C., “Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds”, *Materials Science and Engineering C*, 27:432-440, (2007).
- Jayaraman, K., Kotaki, M., Zhang, Y., Mo, X., Ramakrishna, S., “Recent advances in polymer nanofibers”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 52–65, (2004).
- Kabiri, M., Emami, S.H., Rafinia, M., Tahriri, M., “Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical application”, *Current Applied Physics*, 11: 457-461, (2011).
- Kataphinan, W., Zhang, G., Teye-Mensah, R., Katta, P., Khatri, L., Evans, E. A., Chase, G. G., Ramsier, R. D., Reneker, D. H., “Electrospun nanofibers for potential space-based applications”, *Materials Science and Engineering B*, 116, 353–358, (2005).
- Khor, E., Lim, L.Y., “Implantable applications of chitin and chitosan”, *Biomaterials*, 24:2339–2349, (2003).
- Kim, H., Kim, E., Salih, V., “Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds”, *Biomaterials*, 26:5221–5230, (2005).
- Kokubo, T. and Takadama, H., “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, 2907-2915, (2006).
- Kokubo, T., Hanakawa, M., Kawashita, M., Minoda, M., Beppu, T., Miyamoto, T., Nakamura, T., “Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF, *Biomaterials*, 25:4485-4488, (2004).

- Kong, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., Zhang X., “A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering”, *European Polymer Journal*, 42, 3171-3179, (2006).
- Kose, G.T., Korkusuz, F., Ozkul, A., Soysal, Y., Ozdemir, T., Yildiz, C. and Hasirci, V., “Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices”, *Biomaterials*, 26(25): 5187–5197, (2005).
- Kowalewski, T.A., Blonski, S., and Barral, S., “Experiments and modelling of electrospinning process”, *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Technical Sciences*, 53, (4), 385-394, (2005).
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75: 1-18, (2010).
- Kundu, S.C. and Bhardwaj, N., “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique”, *Biotechnology Advances*, 325-347, (2010).
- Langer, R., Vacanti, J.P., “Tissue engineering”, *Science*, 260, 920–6, (1993).
- Levy, I., Paldi, T. and Shoseyov, O., “Engineering a bifunctional starch-cellulose cross-bridge protein”, *Biomaterials*, 25(10): 1841, (2004).
- Li, P., Siddaramaiah, Kim, N.H., Yoo, G.H., Lee, J.H., “Poly(acrylamide/laponite) nanocomposite hydrogels: Swelling and cationic dye adsorption properties”, *Journal of Applied Polymer Science*, 111: 1786-1798, (2009).
- Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., “Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering”, *J Biomed Mater Res*, 613-621,(2002).

- Lööf, J., Svah, F., Jarmar, T., Engqvist, H, Pameijer, C.H., “A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications”, *Dental Materials*, 24, 653–659, (2008).
- Luu, Y.K., Kim, K., Hsiao, B.S., Chu, B. and Hadjiargyrou, M., “Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers”, *Journal of Controlled Release*, 89(2): 341–353, (2003).
- Lyons, J., and Ko, F., “Melt electrospinning of polymers: A review”, *Polymer News*, 30, 1-9, (2005).
- Marler, J.J., Upton, J., Langer, R., “Transplantation of cells in matrixes for tissue regeneration”, *Adv Drug Deliver Rev*, 33(1-2), 165-182, (1998).
- Materials Science Engineering, <http://www.engr.utk.edu/mse/pages/Textiles/Bicomponent%20fibers.html>, (2004).
- Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., Ikata, Y., “Bioadhesion gelatin films cross-linked with glutaraldehyde”, *J. Biomed Mater Res.*, 45:20–7, (1999).
- Myung, C., Ching-Chang K., Douglas W. H., “Conformational change of hydroxyapatite/gelatin nanocomposite by glutaraldehyde”, *Biomaterials* (24): 3087-3094, (2003),
- Nakahara, T., Nakamura, T., Kobayashi, E., Kuremoto, K., Matsuno, T., “In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells”, *Tissue Engineering*, 10, 537-44, (2004).
- Olde, Damink, L.H.H., Dijkstra, P.J., Van Luyn, M.J.A., Van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J., “Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials”, *J. Mater Sci. Mater Med.*, 6:460–72, (1995).

- Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W. E.; Lim, T. C.; Ma, Z.: “An Introduction to Electrospinning and Nanofibers”, World Scientific Publishing, Singapore, (2005).
- Resende, C.X., Dille, J., Platt, G.M., Bastos, I.N., Soares, G.A., “Characterization of coating produced on titanium surface by a designed solution containing calcium and phosphate ions”, *Materials Chemistry and Physics*, 109, 429–435, (2008).
- Riminucci, M., and Bianco, P., “Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology”, *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 36,1027-36, (2003).
- Sachlos, E., Czernuszka, J.T., “Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of solid freeform fabrication, technology to the production of tissue engineering scaffolds”, *European Cells and Materials*, 5: 29-40, (2003).
- Salgado, A.J., Coutinho, O., and Reis, R.L., “Bone tissue engineering: State of the art and future trends”, *Macromolecular Bioscience*, 4:743-65, (2004).
- Schueren, L.V., Steyaert, I., Schoenmaker, B.D., Clerck, K.D., “Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system”, *Carbohydrate Polymers*, 1221-1226, (2012).
- Shin, M., Yoshimoto, H., Vacanti, J.P., “In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold”, *Tissue Eng*, 33-41, (2004).

- Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., "Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems", *Journal of the American Ceramic Society*, 89 (2), 395- 407, (2006).
- Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G., "Biomaterials and bone mechanotransduction", *Biomaterials*, 22, 2581-2593, (2001).
- Sittinger, M., Huthmacher, D.W., and Risbud, M.V., "Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current Opinion Biotechnology*, 15,411-8, (2004).
- Stevens, M.M., "Biomaterials for bone tissue engineering", *Materials Today*, 11(5), 18-25, (2008).
- Subbiah, T., Tock, R.W., Parameswaran, S., and Ramkumar, J.S., "Electrospinning of Nanofibers", *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557-569, (2005).
- Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T., "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review", *Biomaterials*, 21, 2589-2598, (2000).
- Taş, A.C., Bhaduri, S.B., "Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10X simulated body fluid", *Journal of Materials Research*, 19(9), 2742-2749, (2004).
- Taylor, P.M., Cass, A.E.G. and Yacoub, M.H., "Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering herat valves", *Progress in Pediatric Cardiology*, 21: 219–225, (2006).

- Thein, H., W. W., Misra, R. D. K., “Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Acta Biomaterialia*, 5,1182-1197, (2009).
- Thomson, R.C. “Polymer scaffold processing”, *Principles of tissue engineering* Lanza, J. (eds) Elsevier, San Diego, pp-309-22, (2000).
- Weng, Y., Wang, M., Liu, W., Hu, X., Chai, G., Yan, Q., “Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone”, *Tissue Engineering*, 12,1503-13, (2006).
- Yih, T.C., Al-Fandi, M., “Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems”, *J Cell Biochem* ,97(6), 1184-1190, (2006).
- Yuan, X.Y., Zhang, Y.Y., Dong, C.H., Sheng, J., “Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning”, *Polym Int*, 53:1704–10, (2004).
- Zhang, Y., Lim, C. T., Ramakrishna, S., Huang, Z. M., “Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications”, *J.Mater. Sci. – Mater. Med.*, 16, 933-946, (2005).
- Zhang, Y.Z., Venugopal, J., Huang, Z.M., Lim, C.T., Ramakrishna, S., “Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers”, *Polymer*, 2911-2917, (2006).
- Zhao, F., Yin, Y.J., Lu, W.W., Leong, J.C., Zhang, W., Zhang, J.Y., Zhang, M.F. and Yao, K.D., “Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds”, *Biomaterials*, 23: 3227–3234, (2002).
- Zhuang, X., Cheng, B., Kang, W., Xu, X., “Electrospun chitosan/gelatin nanofibers containing silver nanoparticles”, *Carbohydrate Polymers*, 524-527, (2010).

Zimmermann, C.E., Borner, B.I., Hasse, A., Sieg, P., “Donor site morbidity after microvascular fibula transfer”, *Clin. Oral Invest.*, 5, 214–219, (2001).

Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B.S. and Chu, B., “Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes”, *Polymer*, 43, 4403–4412, (2002).

Zuo, W., Zhu, M.F., Yang, W., Yu, H., Chen, Y.M., Zhang, Y., “Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polym Eng Sci*, 45:704–9, (2005).

## ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

**Adı Soyadı:** Esra YIKAR

**Doğum Tarihi:** 03/01/1986

**Öğrenim Durumu:** Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen-Matematik	İstiklal Makzume Anadolu Lisesi	2000-2004
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2004-2009
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2010-2013

**(Varsa) Görevler:**

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Proses ve Planlama Mühendisi	Toros Tarım San. Ve Tic. A.Ş.	2012-Halen
Eğitim Takviye Mühendisi	Toros Tarım San. Ve Tic. A.Ş.	2010-2012

### ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Yıkar, E., Bölgen, N., “Elektrosponning Yöntemi İle Jelatin/Kitosan Nanofiberlerin Üretimi ve Biyomimetik Hidroksiapatit İle Kaplanması”, 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Koç Üniversitesi, 3-6 Eylül, İstanbul, (2012).
2. Yıkar, E., Bolgen, N., “Hydroxyapatite Coated Electrospun Gelatin/Chitosan Nanofibrous Structures for Bone Tissue Engineering Applications”, 18th International Biomedical Science&Technology Symposium, 10-13 September, Tokat, Turkey, (2012).
3. Vaseashta, A., Demir, D., Yıkar, E., Bolgen, N., “Electrospun Nanofibrous Membranes For Removal Of Antibiotics From Wastewater”, NATO Advanced Research Workshop, 29 Sept – 01 Oct, Yerevan, Armenia, (2012).