

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KERATİN ELYAF/TERMOPLASTİK POLİÜRETAN  
KOMPOZİTLERİNİN DOKU İSKELESİ OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**ÖZGE GÖKÇE**

**KOCAELİ 2013**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KERATİN ELYAF/TERMOPLASTİK POLİÜRETAN  
KOMPOZİTLERİNİN DOKU İSKELESİ OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**ÖZGE GÖKÇE**

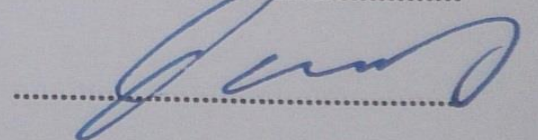
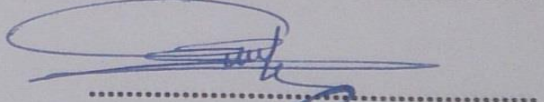
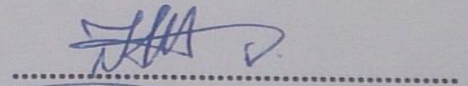
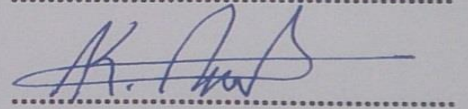
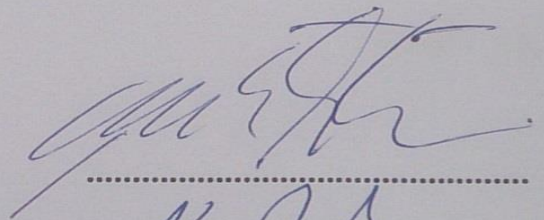
**Doç.Dr. Güralp ÖZKOÇ**  
Danışman, Kocaeli Üniv.

**Doç.Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**  
Jüri Üyesi, Yalova Üniv.

**Yrd.Doç.Dr. Halime KENAR**  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

**Doç.Dr. Murat KASAP**  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

**Yrd.Doç.Dr. Bağdagül KARAAĞAÇ**  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.



**Tezin Savunulduğu Tarih: 27.12.2013**

## **ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR**

Çalışmam sırasında bilgisini sabırla aktaran ve her konuda beni destekleyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Güralp Özkoç'a bana güvenerek sunduğu tüm fırsatlar için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı BAP 2013\027 numaralı proje ile destekleyen Kocaeli Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan başta tüm bölüm hocalarıma ve bölümümüz araştırma görevlilerine verdikleri destek ve gösterdikleri anlayış için teşekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. Murat Kasap ve DEKART ekibine verdikleri destek için teşekkürlerimi sunarım.

Kocaeli Üniversitesi Arslanbey Meslek Yüksek Okulunda basma testini yapmamamıza imkan veren ve destek olan sevgili Yard. Doç. Dr. Semin Özge Özkoç'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında tüm emeğiyle ve dostluğuyla yanımda olan sevgili Araş. Gör. Şebnem Kemaloğlu Doğan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme bana duydukları güven ve verdikleri destek için sonsuz teşekkür ederim.

Desteği ve yardımları ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Doğan Gökçe'ye çok teşekkür ederim.

Aralık - 2013

Özge Gökçe

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ .....	vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR .....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT .....	x
GİRİŞ .....	1
1. TEORİK BİLGİ .....	4
1.1. Doku Mühendisliği.....	4
1.2. Deri Doku Mühendisliği.....	5
1.2.1. Derinin yapısı ve doku hasarları.....	6
1.3. Doku İskeleleri .....	8
1.4. Tavuk Tüyü ve Keratin.....	13
1.4.1. Tavuk tüyü.....	13
1.4.2. Keratin .....	15
1.4.3. Keratin ve tavuk tüyü ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar.....	18
1.5. Poliüretanlar .....	21
1.5.1. Poliüretanların yapı ve özellikleri .....	21
1.5.2. Poliüretanların kullanım alanları .....	25
1.5.3. Poliüretanların yara örtüsü malzemesi olarak kullanımı.....	26
1.5.4. Literatür çalışmaları .....	29
1.6. Kullanılan Deneysel Teknikler ve Cihazların Çalışma Prensipleri.....	31
1.6.1. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC).....	31
1.6.2. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) .....	32
1.6.3. Çekme testi .....	33
1.6.4. Dinamik mekanik analiz (DMA).....	35
1.6.5. Yüzey temas açısı ölçümü.....	36
1.6.6. Dondurarak kurutma ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yöntemi.....	37
1.6.7. In vitro hücre kültürü ve sitotoksosite testi .....	39
1.6.7.1. In vitro hücre kültürü .....	39
1.6.7.2. Sitotoksosite testi .....	40
1.6.8. Lazer taramalı konfokal mikroskop .....	41
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	43
2.1. Malzemeler .....	43
2.2. Yöntem .....	45
2.2.1. Kompozit film ve doku iskeleleri üretimi .....	45
2.2.1.1. Çözeltiden film dökme .....	45
2.2.1.2. Gözenekli doku iskelelerinin eldesi için dondurarak kurutma ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yöntemleri .....	47

2.2.2. Kompozit filmlerin ve doku iskelelerinin karakterizasyonları.....	48
2.2.2.1. Termal analiz.....	48
2.2.2.2. Su temas açısı ölçümü .....	48
2.2.2.3. Mikroyapısal inceleme .....	49
2.2.2.4. Çekme testi.....	49
2.2.2.5. Dinamik mekanik analiz (DMA) .....	50
2.2.2.6. Gözeneklilik analizleri .....	50
2.2.2.7. Doku iskelelerinin mekanik özellikleri .....	51
2.2.3. In vitro hücre kültürü ve sitotoksosite.....	52
2.2.3.1. Hücre kültürü .....	52
2.2.3.2. Doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi.....	53
2.2.3.3. Doku iskelelerinin lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelenmesi .....	54
2.2.3.4. Sitotoksosite testi .....	54
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	56
3.1. Kompozit Film Üretimi ve Karakterizasyonu .....	56
3.1.1. Kompozit film üretimi.....	56
3.1.2. Kompozit film karakterizasyonu .....	59
3.1.2.1. Isıl özellikler .....	59
3.1.2.2. Mekanik özellikler .....	62
3.1.2.3. Dinamik mekanik analiz .....	65
3.1.2.4. Yüzey hidrofilitesi.....	67
3.1.2.5. Morfoloji .....	68
3.2. Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu .....	70
3.2.1. Doku iskelesi üretimi .....	70
3.2.2. Doku iskelelerinin karakterizasyonu .....	71
3.2.2.1. Gözeneklilik ve gözenek boyutu .....	71
3.2.2.2. Mekanik özellikler .....	73
3.3. In vitro Hücre Kültürü ve Sitotoksosite Testi .....	74
3.3.1. Hücre kültürü.....	74
3.3.2. Sitotoksosite testi .....	75
3.3.3. Morfolojik inceleme .....	76
3.3.4. Konfokal taramalı mikroskobu analizi.....	81
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	83
KAYNAKLAR .....	86
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER .....	93
ÖZGEÇMİŞ .....	94

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Doku mühendisliğinin temel yaklaşımı .....	5
Şekil 1.2. Deri doku mühendisliği yaklaşımı .....	6
Şekil 1.3. Derinin yapısı.....	7
Şekil 1.4. Yanık dereceleri ve doku hasarları .....	8
Şekil 1.5. Hücre dışı matrisin (HDM) makromoleküler organizasyonuna genel bir bakış .....	9
Şekil 1.6. Çeşitli şekillerde hazırlanmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri .....	12
Şekil 1.7. Taramalı elektron mikroskobu ile tavuk tüyü morfolojisi .....	13
Şekil 1.8. Amino asit dizilimi ve protein zinciri .....	15
Şekil 1.9. Disülfid bağı .....	17
Şekil 1.10. Keratinin alfa heliks yapısı .....	17
Şekil 1.11. Lineer poliüretan yapısı .....	21
Şekil 1.12. Temel TPU kimyası .....	22
Şekil 1.13. Polyester poliol kimyasal yapısı .....	25
Şekil 1.14. Modern yara örtüsü çeşitleri .....	28
Şekil 1.15. DSC' nin şematik gösterimi.....	31
Şekil 1.16. Örnek DSC termogramı .....	32
Şekil 1.17. SEM cihazının çalışma prensibi .....	33
Şekil 1.18. Çekme cihazının temel bileşenleri.....	34
Şekil 1.19. Polimerik malzemeler için tipik bir gerilim-gerinim eğrisi .....	34
Şekil 1.20. DMA analizinde kuvvetin sinüsoidal salınımı.....	35
Şekil 1.21. Temas açısı ölçümü.....	36
Şekil 1.22. Hidrofilik, hidrofobik ve süperhidrofobik yüzeylerde temas açısı .....	37
Şekil 1.23. Çözücü-dökümü/parçacık-uzaklaştırma yöntemiyle üretilmiş PLGA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri.....	38
Şekil 1.24. Dondurarak kurutma yöntemi ile polimer doku iskelesi oluşturma.....	39
Şekil 1.25. Hematositometre lamı ve hücre sayımı.....	41
Şekil 1.26. Lazer taramalı konfokal mikroskop çalışma prensibi.....	42
Şekil 2.1. TPU ve ATT numuneleri .....	46
Şekil 2.2. Çözücüden dökme ile üretilen 10ATT/90TPU film.....	47
Şekil 2.3. Gözenekli doku iskelesi .....	48
Şekil 2.4. Attension Teta Lite cihazı ve asılı damlacık yöntemi görüntüsü.....	49
Şekil 2.5. 37 °C sıcaklığındaki su banyosu içinde yapılan çekme testi .....	50
Şekil 2.6. Basma testi numuneleri.....	51
Şekil 2.7. Çoğaltılan hücrelerin flask yüzeyinden toplanması ve doku iskeleleri üzerine ekimi .....	53
Şekil 2.8. L929 hücrelerinin çöktürülmesi ve hücre ekimi .....	55
Şekil 3.1. ATT fiberlerin uzunlukları.....	59
Şekil 3.2. DSC termogramları.....	60
Şekil 3.3. 80ATT/20TPU çekme testi numunesi (dog-bone).....	62
Şekil 3.4. ATT/TPU kompozitlerinde elastik modül değerlerinin ATT oranı ile değişimi .....	63
Şekil 3.5. ATT/TPU kompozitlerinde çekme dayanımı değerlerinin	

ATT oranı ile değişimi .....	64
Şekil 3.6. ATT/TPU kompozitlerinde kopmadaki uzama değerlerinin ATT oranı ile değişimi .....	64
Şekil 3.7. TPU/ATT kompozitlerinin dinamik mekanik özellikleri (a) Saf TPU, (b) 10ATT/90TPU, (c) 20ATT/80TPU, (d) 40ATT/60TPU, (e) 80ATT/20TPU kompozitlerinin depo ve kayıp modülleri.....	65
Şekil 3.8. ATT/TPU kompozit filmlerin su temas açısının ATT oranıyla değişimi .....	68
Şekil 3.9. ATT/TPU kompozit filmlerine ait 750X büyütmede çekilmiş SEM fotoğrafları: (a) TPU, (b) 10ATT/90TPU, (c) 40ATT/60TPU, (d) 80ATT/20TPU .....	69
Şekil 3.10. ATT/TPU kompozit filmlerine ait 1500X büyütmede çekilmiş SEM fotoğrafları: (a) TPU, (b) 10ATT/90TPU, (c) 40ATT/60TPU, (d) 80ATT/20TPU .....	70
Şekil 3.11. 125-250 µm boyutlarındaki porojen NaCl.....	71
Şekil 3.12. Doku iskelelerinin gözenek morfolojisi ve gözenek boyutları a)TPU, b)20ATT/80TPU, c)80ATT/20TPU (100X ve 250X).....	72
Şekil 3.13. Basma testi sonucu elde edilen elastisite (basma) modül değerleri.....	74
Şekil 3.14. (a) L929 hücre hattı morfolojisi (40X), (b) 3. günde hücre yayılımı (4X), (c) 5. günde hücre yayılımı (4X), (d) 7. günde hücre yayılımı (4X).....	75
Şekil 3.15. L929 hücre hattı canlılık oranı.....	76
Şekil 3.16. Lamel üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000 X) .....	77
Şekil 3.17. Saf TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000 X).....	78
Şekil 3.18. 20ATT/80TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000 X).....	79
Şekil 3.19. 80ATT/20TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000 X).....	80
Şekil 3.20.(a) Lamel, (b) saf TPU, (c) 20ATT/80TPU ve (d) 80ATT/20TPU doku iskelelerinin konfokal mikroskop görüntüleri .....	81

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Bazı dokuların mekanik özellikleri.....	12
Tablo 1.2. Tavuk tüyü sapının malzeme özellikleri.....	14
Tablo 1.3. Keratin yapı içerisinde bulunan en yaygın amino asitler ve oranları .....	16
Tablo 1.4. Aromatik diizosiyanatlar .....	23
Tablo 1.5. Alifatik diizosiyanatlar .....	24
Tablo 1.6. İdeal yara örtüsünün özellikleri .....	27
Tablo 2.1. Tez kapsamında kullanılan malzemelerin genel özellikleri, kimyasal yapıları ve tedarik edildikleri firmalar .....	43
Tablo 2.2. Deneysel yöntemlerin aşamaları.....	45
Tablo 3.1. Hazırlanan karışımların kodları ve bileşimleri .....	56
Tablo 3.2. Çözücüler ve çözünürlük parametreleri.....	60
Tablo 3.3. Isıl özellikleri .....	61
Tablo 3.4. ATT/TPU kompozitlerinin frekansa bağlı kompleks modül (E*) değerleri.....	67
Tablo 3.5. Doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri.....	71



## SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

E'	: Depo modülü
E''	: Kayıp modülü
T <sub>g</sub>	: Camı geçiş sıcaklığı (°C)
T <sub>e</sub>	: Erime sıcaklığı (°C)

### Kısaltmalar

ASTM	: American Society for Testing and Materials (Amerikan Test ve Malzeme Derneği)
ATT	: Atık tavuk tüyü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media (Hücre Büyüme Besi Yeri)
HDM	: Hücre dışı matris
LTKM	: Lazer taramalı konfokal mikroskop
PCL	: Poli(ε-kaprolakton)
PMMA	: Poli(metil metakrilat)
TPU	: Termoplastik Poliüretan
THF	: Tetrahidrofur

# KERATİN ELYAF/TERMOPLASTİK POLİÜRETAN KOMPOZİTLERİNİN DOKU İSKELESİ OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

## ÖZET

Ülkemizde sağlıklı ve ekonomik olması bakımından beyaz ete olan ilginin artmasıyla kümes hayvancılığına yapılan yatırımlar gün geçtikçe artmaktadır. Hızla büyüyen bu işletmelerin en önemli sorunları atıklardır. Tavuk tüyleri, sadece Türkiye'de yıllık 30 bin ton atık olarak karşımıza çıkmaktadır. Atıklar yakma, gübreye dönüştürme, gömme yöntemleri ile yok edilmeye çalışılsa da çevreye büyük zararlar vermektedirler. Keratin bakımından son derece zengin olan bu atığın değerlendirilmesi, hem atık probleminin çözümü hem de bu değerli maddenin ekonomiye kazandırılması açısından oldukça önemlidir. Bu lifler kristal yapıda olduklarından dayanıklıdır ve biyobozunur özelliğe sahiptir. Ayrıca protein bazlı olduklarından potansiyel hücre uyumlulukları sayesinde, birçok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar için adaylardır. Bu çalışmada, keratin elyaf ile güçlendirilmiş poli( $\epsilon$ -kaprolakton diol) esaslı biyobozunur termoplastik poliüretan kompozitlerden doku iskelesi oluşturulması amaçlanmıştır. Atık tavuk tüyleri (ATT) yerel bir kesimhaneden alınarak temizlenmiş, kırılmış ve elenmiştir. ATT/TPU kompozitleri, çözültide karıştırma tekniğiyle karıştırılmış ve çözültiden dökme tekniği ile film haline getirilmiştir. Bileşimler ağırlıkça %0, %10, %20, %40 ve %80 ATT oranları ile seçilmiştir. Elde edilen kompozit filmlerde ATT yükleme oranı ve ATT boyutunun etkisi mekanik, termal ve morfolojik özellikleri sırasıyla çekme testleri, dinamik mekanik analiz (DMA), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve temas açısı ölçümü ile araştırılmıştır. Dondurarak kurutma ve çözücü-dökümü/parçacık-uzaklaştırma yöntemleri bir arada kullanılarak gözenekli doku iskeleleri elde edilmiştir. Yara örtüsü malzemesi olarak kullanılmak üzere doku iskeleleri üzerine ekilen hücrelerde, hücre çoğalması SEM analizi ve lazer taramalı konfokal mikroskop ile gözlenmiştir. Bu çalışmada amaçlanan hedefe ulaşılarak keratin elyaf katkılı TPU doku iskelelerinin biyomalzeme olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Doku iskelesi, Hücre kültürü, Keratin, Tavuk tüyü, Termoplastik Poliüretan (TPU).

# **INVESTIGATING THE POTENTIAL USE OF KERATIN FIBER/THERMOPLASTIC POLYURETHANE COMPOSITES AS SCAFFOLD**

## **ABSTRACT**

In Turkey, the investments in poultry and white-meat have increased with the growing interest to healthy and economical nutrition. One of the important issues in this rapidly growing area is the wastes. In Turkey, 30 thousands of waste chicken feathers (WCF) disposed annually. Reclaiming of these keratin rich WCF can partially solve the problem of poultry waste problem in an economical way compared to the traditional disposal methods which are burying, burning and producing fertilizer. These keratin based fibers are crystalline, therefore very stable, and biodegradable. The main purposes of this study is to prepare and characterize the reclaimed keratin fiber reinforced poly(caprolactone diol) based biodegradable thermoplastic polyurethane (TPU) composites potentially used for tissue engineering scaffolds. WCF obtained from a local slaughter-house were cleaned, cut and then sieved prior to production of composites. The WCF/TPU composites were prepared by solution casting method. The feather content was varied as 0%, 10%, 20%, 40% and 80% by weight. Mechanical, thermal and morphological properties were investigated by tensile tests, differential scanning calorimetry (DSC) analysis, scanning electron microscopy (SEM), dynamic mechanic analysis (DMA) and contact angle analysis, respectively. Salt leaching and freeze-drying methods are used combined for obtaining porous scaffold structures. Structure for use as a wound dressing material of the cells cultivated on scaffold, cell adhesion and proliferation was observed by SEM and confocal laser scanning microscopy. It is concluded that WCF/TPU composites can be used as wound dressing material thanks to the biocompatible keratin based structure of chicken feathers.

**Key Words:** Scaffold, Cell Culture, Keratin, Chicken Feathers, Thermoplastic Polyurethane (TPU).

## **GİRİŞ**

Organ veya doku kaybı tıp alanında karşılaşılan ciddi sorunlardan biridir. Doku mühendisliği, hasarlı dokuların fonksiyonlarını yeniden kazandırmak, geliştirmek veya korumak amacı ile mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini birleştiren çok disiplinli bir alandır. Doku mühendisliği alanında günümüzde önemli akademik gelişmeler olsa da araştırma ölçekli uygulamalardan ticari uygulamalara geçilmesi gerekmektedir [1,2].

Doku mühendisliği yaklaşımlardan biri doku iskelesi ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonudur. Bu yaklaşımda doku uygulamaları ile elde edilmiş doku iskelesi, gözenekli, üç boyutlu bir matris görevi görerek hücre tutunması, büyümesi ve çoğalmasına yardımcı olur. Hücre dışı matris tabakasını yapısal olarak taklit ederek hücre kültürüne elverişli bir ortam sağlar. Ayrıca doku iskelesi gözenekli yapısı sayesinde yeterli besin hareketi, atık temizleme ve gaz difüzyonu görevlerini de yerine getirir [3,4].

Çeşitli doğal polimerler, örneğin polisakkaritler (selüloz, kitin gibi) ve proteinler (kolajen, elastin, fibrin ve keratin gibi) doku mühendisliği alanında sıkça kullanılmaktadırlar. Doğal polimerlerin, biyouyumluluk ve toksik olmama gibi ortak avantajları bulunmaktadır. Ancak bu polimerlerin düşük mekanik mukavemet gibi dezavantajları kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu sebeple sentetik polimerler doku mühendisliği alanında oldukça sık kullanılan polimerlerdir. Bunların başında Poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA), poli (laktit-ko-glikolid) (PLGA) ve poliüretanlar (PU) gelmektedir [2]. En yeni yaklaşımlardan biri doğal ve sentetik polimerlerin kompozit uygulamalarıdır. Bu yaklaşım ilk olarak protein temelli biyomalzemeler olarak ortaya çıkmış ve birçok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulama için potansiyel aday olmuştur. Hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinin kolaylaştıran sentetik bir hücre dışı matris olarak işlev görürler. Bu tür yüzeyler 3 boyutlu hücre çoğalmasını ve hücre ile yönlendirilmiş doku oluşumu destekleyen özelliktedirler. Bu her iki özellik de doku iskeleleri için olması gereken özelliklerdir.

Çeşitli proteinler, doğal kaynaklı biyomateryellerin geliştirilmesi için araştırılmıştır. Bunların başında kolajen, albumin, jelatin, fibroin ve keratin gibi proteinler gelmektedir. Bunlardan, keratin bazlı malzemeler içsel biyoyoumluluk, biyobozunurluk, mekanik dayanıklılık ve doğal bolluk gösterdiğinden önem arz etmektedir [5].

Keratin esaslı doğal liflerden biri olan tavuk tüyünün, sentetik ve doğal liflerde (elyaf lifler demek, yani çoğul) bulunmayan yapı ve özellikleri bulunmaktadır. Düşük yoğunluk, mükemmel sıkıştırılabilirlik, esneklik ve tüylerin farklı morfolojik yapısı tavuk tüyünü benzersiz bir doğal lif kaynağı yapmaktadır [5]. Örneğin, tavuk tüyünün yoğunluğu  $0,8 \text{ g/cm}^3$ , selüloz elyaflar için yaklaşık  $1,5 \text{ g/cm}^3$  ve yün için  $1,3 \text{ g/cm}^3$  tür. Bugün ticari olarak mevcut olan doğal veya sentetik liflerden hiçbiri tavuk tüyü gibi düşük bir yoğunluğa sahip değildir.

Ülkemizde atık tavuk tüylerinin geri kazanımı ya da imha edilmesi ile ilgili bir mevzuat bulunmamaktadır. Kesimhanelerden çıkan bu atıklarının bertarafı gömme ya da yakma yöntemleri ile yapılmaktadır. Bu yöntemler önemli boyutlarda hava, su ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bol miktarda ortaya çıkan bu atık tavuk tüyleri önemli bir keratin kaynağıdır. Bu kaynağın biyomedikal ürünler üretilmesinde kullanılması ile ucuz ve bol bulunan bu değerli atık ekonomiye kazandırılabilir ve ayrıca atık tüylerin bertarafı sırasında çevreye verdiği zararlar önlenebilir [6].

Sentetik polimerlerden poliüretanlar, aromatik veya alifatik izosiyanatlardan oluşan sert segmentler ve poliester veya polieterler den oluşan yumuşak segmentler içeren blok kopolimerlerdir. Yumuşak ve sert segmentlerin moleküler ağırlıklarına ve yüzde oranlarına bağlı olarak, polimerin elastik modülü ve diğer birçok özellikleri değişebilir. Poliüretanlar, iyi bariyer özellikleri ve oksijen geçirgenlikleri nedeniyle biyomalzeme olarak da yaygın kullanım alanına sahiptir [7].

Bu çalışmada, literatürde ilk defa atık tavuk tüyünden geri kazanılmış keratin fiber ile güçlendirilmiş poli( $\epsilon$ -kaprolakton diol) esaslı biyobozunur termoplastik poliüretan (TPU) kompozitlerden doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere doku iskelesi oluşturulması amaçlanmıştır. Üretilen kompozit doku iskelelerinin fiziksel, mekanik ve termal özellikleri belirlenmiştir. Elektron mikroskobu çalışmaları ile doku iskelelerinin morfolojileri ve poroz yapıları hakkında gözlemler yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları ile bu doku iskelelerin biyouyumluluk özellikleri araştırılmıştır.

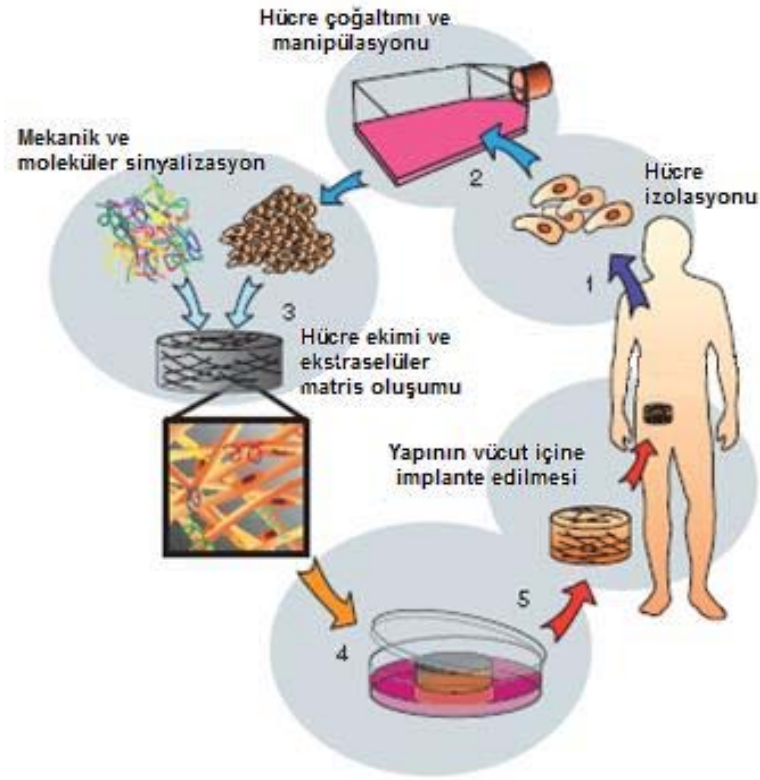
Bu tezde; ilk kısımda doku mühendisliği ve tavuk tüyü, keratin ile ilgili bilgiler ve literatürde yapılan çalışmalar verilmiştir. İkinci kısım olan malzemeler ve method kısmında önce kullanılan malzemeler tanıtılmış, ardından atık tavuk tüyü (ATT)/TPU kompozit film üretimi ve karakterizasyon yöntemleri anlatılmıştır. Devamında, ATT/TPU esaslı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonundan bahsedilmiştir. Sonrasında elde edilen doku iskeleleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları detaylı olarak verilmiştir. Tezin son iki kısmında ise bulgular verilmiş ve tartışılmış, ardından elde edilen sonuçlar özetlenmiş, önerilerde bulunulmuştur.

## 1. TEORİK BİLGİ

### 1.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, temel hedefi doku ve/veya organ hasarı veya kaybı durumunda kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında organ veya doku oluşturmak olan yeni bir disiplinler arası mühendislik dalıdır. Bilimsel çevrelerin “doku mühendisliği” konusuna odaklanmasında ise iki makale çok etkili olmuştur. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991’de “hücre mühendisliği” konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993’te Science dergisinde “doku mühendisliği” başlığı altında yayınlanmıştır [8,9]. Temel bilimciler, malzeme bilimcileri, mühendisler, hücre biyologları ve klinisyenlerin ortak çabalarıyla günümüzde doku mühendisliği bütünüyle disiplinler arası bir alan haline gelmiştir [8].

Doku mühendisliği için değişik tanımlamalar yapılmaktadır. Ancak, en kabul gören tanım, “biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır” şeklindedir. Bu tanıma göre doku mühendisliği için 4 yaklaşım mevcuttur. Birinci yaklaşım yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanırken, “hücre nakli” olarak adlandırılan ikinci yaklaşım yalnızca hücreleri kullanarak tedaviyi gerçekleştirmeyi amaçlar. Hücreler, canlı dokulardan yalıtılan hücreler olabileceği gibi, genetik olarak işlem görmüş hücreler de (bu durum gen tedavisi olarak adlandırılır) olabilir. Üçüncü yaklaşım, biyomalzeme ile biyosinyal moleküllerini (yapışma ve büyüme faktörleri) kullanıyor. Dördüncü yaklaşım biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin üçünü bir arada kullanarak doku oluşturmayı hedefler. Hücre üremesini yeni doku veya organları oluşturacak şekilde yönlendirmek ve gerekli mekanik desteği sağlamak için biyomalzemelerden 3-boyutlu doku iskeleleri (scaffold) üretilir [8]. Şekil 1.1’de doku mühendisliğine genel yaklaşım görülmektedir.



Şekil 1.1. Doku mühendisliğinin temel yaklaşımı [8]

## 1.2. Deri Doku Mühendisliği

Deri doku mühendisliğinin amacı, zarar görmüş deri dokusunun normal anatomi ve fizyolojisinin geri kazanılmasına yönelik uygulamalar gerçekleştirmektir. Günümüze gelinceye kadar kültüre suni deriler sadece kısmi olarak anatomik veya fonksiyonel yapıyı restore etmekte kullanılmıştır. Oysa deri doku mühendisliği uygulamaları derinin belirli bir katmanına yönelik değil, özellikle hasar sonrasında kendi kendini onaramayan katmanların onarılmasına yönelik uygulamalar olarak gelişmeye devam etmektedir [9]. Deri doku mühendisliği yaklaşımlarını analiz edebilmek ve geliştirebilmek için öncelikle, derinin işlevi, yapısı ve meydana gelebilecek hasarlar karşısında harekete geçirdiği iyileşme mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir. Şekil 1.2’de deri doku mühendisliği ile kaybedilen dokunun yerine yeni dokunun yerleştirilmesi gösterilmiştir.

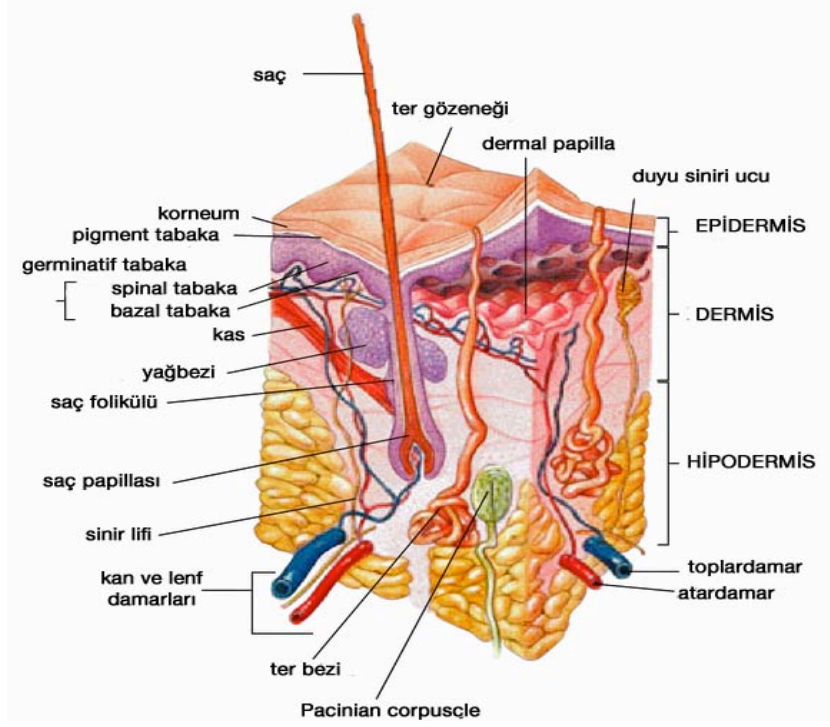




Şekil 1.2. Deri doku mühendisliği yaklaşımı [9]

### 1.2.1. Derinin yapısı ve doku hasarları

İki boyutlu geometriye sahip deri, vücudu kaplayan en geniş organ olup, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere, ultraviyole (UV) radyasyona ve serbest radikallerin tahrip edici etkilerine karşı koruyuculuk sağlamakta ve vücut ısısını muhafaza etmektedir. Deri başlıca üç tabakadan oluşmuştur, bu tabakalar en alttan üste doğru; hipodermis, dermis ve epidermis olarak sıralanmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Derinin yapısı [10]

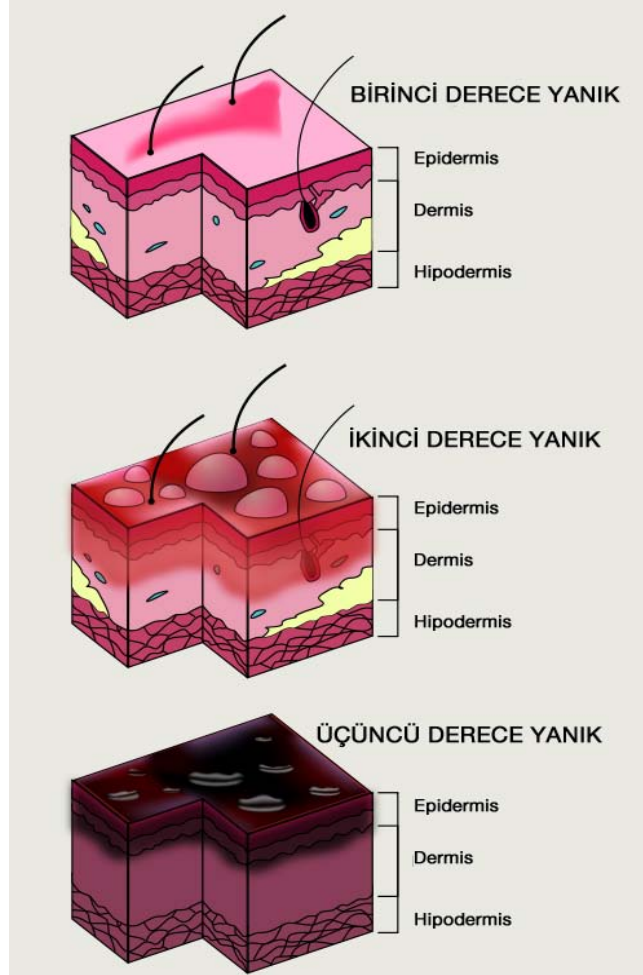
Hipodermis, dermis ile vücut bileşenleri arasında bir köprü görevi görmektedir. Yağların depolandığı kısımdır, termal yalıtım sağlar ve derinin dayanıklılığında katkısı bulunmaktadır. Dermis, insan derisinin ana bileşenidir ve genellikle 3-5 mm kalınlığındadır. Dermiste lif demetleri şeklinde bulunan kolajen ve elastin fiberler, kan ve lenf kılcal damarlarını fiziksel olarak destekler ve korurlar. Ayrıca dokuya, oksijen ve besin maddelerinin taşınması, toksinlerin ve atık ürünlerin uzaklaştırılması açısından yaşamsal öneme sahiptirler.

Derinin üst katmanı epidermis, keratinosit tabakalarından oluşur ve dehidrasyon, bakteriler, UV ışınlarına karşı koruma sağlar. Vücutta 0.06 - 0.8 mm arasında değişen kalınlıklarda, düzenli olarak kendini yenileyebilen ve kan damarları içermeyen bir tabakadır [10].

Deri doku mühendisliğini temel prensibi hasarlı ya da fonksiyonunu kaybetmiş olan dokunun yerine yeni dokunun geliştirilmesidir. Doku hasarlarından bahsederken yaranın tanımını yapmak önemlidir. Yara, herhangi bir dış etkenin veya hastalığın fiziksel bir hasar yaratması ile vücutta normal deri bütünlüğünün bozulmasıdır.

Doku mühendisliği yara örtüleri özellikle yanıklarda ve diyabetik ülser hastalıklarının tedavilerinde geleneksel tedavi yöntemlerine göre üstünlük

sağlamaktadır. Şekil 1.4'te yanıklarda oluşan doku hasarları gösterilmiştir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanan dokular sadece yarayı kapatmakla kalmamakta, aynı zamanda dermis yenilenmesini uyararak yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunmaktadır [11].



Şekil 1.4. Yanık dereceleri ve doku hasarları [11]

Yara iyileşmesi, sadece yara bölgesiyle sınırlı değildir, tüm sistemleri barındıran hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar bütünüdür. Bütün yaralar aynı temel prensiplerle iyileşirler. Fibroblast hücreleri iyileşme sürecinde önemli rol oynamaktadır [11].

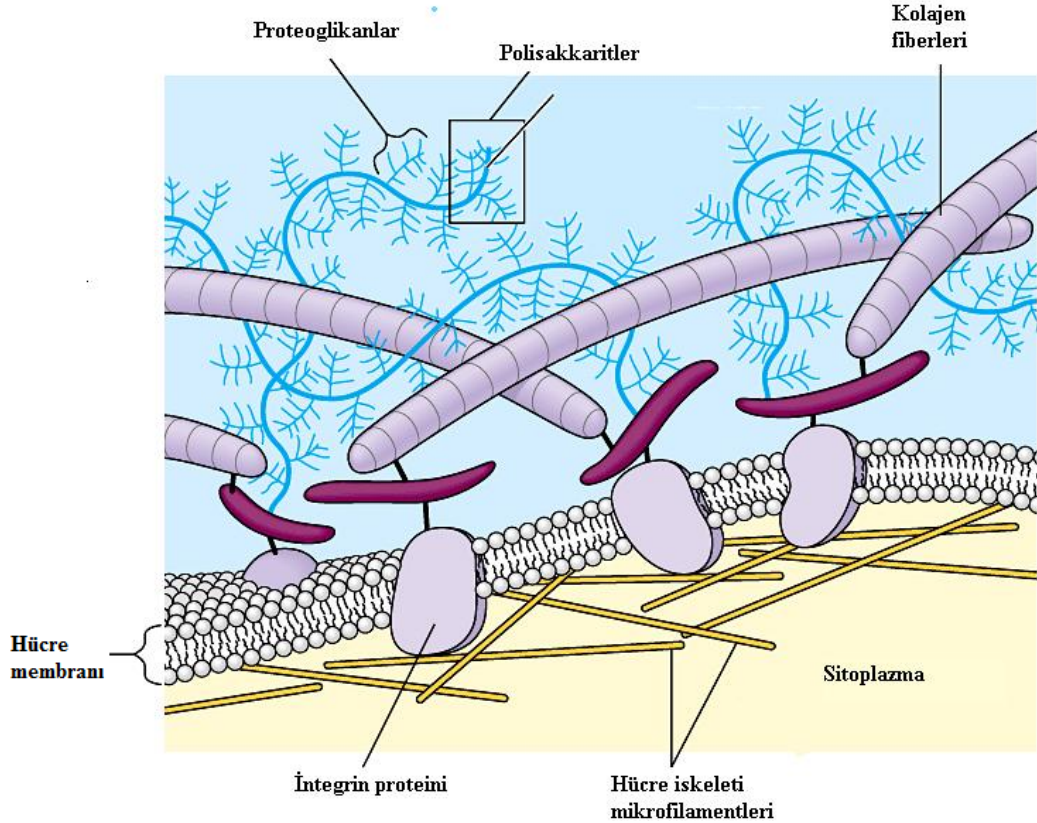
### 1.3. Doku İskeleleri (Scaffold)

Üç boyutlu, gözenekli doku iskelelerinin kullanımının temel amacı doku ve organların rejenerasyonu için uygun ortam sağlamaktır. Bu hücre kültürü yapılmış doku iskeleleri ya in vitro kültürlenerek yaralı dokuya implante edilebilir ya da in

vivo olarak vücudun doku sentezleme sistemini uyararak hasarlı bölgeye doğrudan implante edilerek, doku veya organların rejenerasyonu sağlanabilir [10].

İnsan vücudu hiyerarşik biçimde düzenlenmiş son derece karmaşık bir yapıdır. Vücudumuz sistemlerden, sistemler organlardan, organlar dokulardan, dokular ise hücreler ve hücre dışı matristen (HDM) oluşur. Hücrelerin bir araya toplanması ve doku yenilenmesinin gerçekleşmesinde HDM'nin önemi pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Hücre dışı matris, hücreler için üç-boyutlu bir mikro çevre oluşturur. Hücrelere fiziksel bir destek sağlamasının yanı sıra hücre-hücre etkileşimlerini organize eder ve hücrelerin yapışması, göçü, çoğalması, farklılaşması ve matris birikimi için çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarıları yapar.

Hayvan hücrelerinin birçok çeşidi, plazma membranının çevresinde mevcut bir organize ağ matrisi, bir hücre dışı matris (HDM) ile çevrilidir. Şekil 1.5'de görüldüğü gibi HDM, pek çok işlevsel proteinler ve polisakkaritlerden oluşur.



Şekil 1.5. Hücre dışı matrisin (HDM) makromoleküler organizasyonuna genel bir bakış

Hücrelerin ve dokuların bir arada tutulmasına yardım eder ve hücreler arası boşlukları doldurur. Besin ve madde alışverişi, hücre yaşamının devamlılığı için oldukça önemlidir. Ayrıca hücrelerin migrasyonunu ve birbirleri ile olan ilişkilerini de organize eder. Bu görevleri HDM içerisindeki proteinler sayesinde sağlamaktadır.

Kolajenler, sadece HDM içerisinde bulunan, fiber yapıda, yüksek mukavemete sahip, çekme kuvvetlerine karşı dayanıklı proteinlerdir. İnsan vücudunda bulunan en yaygın proteinler olarak tüm protein miktarının % 25'ini oluştururlar. Kolajenler, birçok hücre tarafından sentezlenirler ancak HDM' de fibroblastlar tarafından üretilirler. Bulunduğu dokuya ve bölgeye göre dizilişleri değişmektedir. Örneğin, tendon dokusunda çekme kuvvetlerine karşı direnci arttırmak için paralel olarak bulunmaktadırlar.

Proteoglikanlar, protein ve polisakkaritlerin bir araya gelmesi ile oluşan karmaşık yapılardır ve "dolgu" maddesi olarak hayvansal hücre dışı matrisinin büyük bir bileşenidir. HDM de bulunan proteoglikanlar, önemli bir molekül olan hyaluronik asiti ile etkileşerek matriste büyük agregatlar oluşturur. . Şekil 1.3'te bu yapı görülmektedir. Hiyaluronik asit sülfat içermediğinden HDM'de proteoglikan ile kovalent olmayan bir şekilde bağlı kompleksler oluşturur. Hiyaluronik asit polimerleri çok büyüktürler (100 - 10.000 kD) ve büyük hacimlerde su tutabilirler.

HDM'nin temel yapı taşlarından biri de integrinlerdir. Hem hücre-hücre, hem de hücre-matris bağlanmasını meydana getiren, plazma membranının her 2 tarafında da bulunan (transmembran) glikoproteinlerdir. Bağlanma kalsiyum, magnezyum ve mangan gibi katyonlardan etkilenir.

HDM, hücreler tarafından lokal olarak salgılanır. Örneğin konnektif dokuda (bağ doku) bu matris makromoleküllerini salgılayan büyük hücreler fibroblastlardır. Kemik ve kıkırdak dokularında ise bu hücreler kondroblast, osteoblastlardır. HDM'nin bir diğer özelliği ise farklı organlarda farklı miktarlarda bulunmasıdır. Her dokuda, dokunun fonksiyonel özelliklerine göre farklı özellik taşırlar. Örneğin, kemik ve dişte kalsifiye, korneada şeffaf ve tendonlarda ip gibi olup çok sağlamdır.

Doku iskeleleri yukarıda sözü edilen HDM'yi taklit edecek biçimde tasarlanan yapılar olmalıdır. Kısacası, yapay bir "hücre dışı matris" olarak düşünülebilirler [11].

Doku türü ne olursa olsun, doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelelerinin tasarımını ve uygunluğunu belirleyen unsurlar vardır. Bu unsurlar; biyouyumluluk, biyoparçalanma, iskelenin tasarımı, mekanik özellikler, üretim teknolojisi ve biyomalzeme'dir.

Doku mühendisliği için doku iskelesi öncelikle biyouyumlu değildir. Üzerine hücreler tutunabilmeli, sonrasında tutunan hücreler bu matrisin içine ilerleyerek çoğalabilmelidir. Vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalı ve aynı zamanda hücre yapışmasını ve işlevini artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalıdır. Şiddetli inflamatuvar (yangılı) yanıt vücut tarafından iskelenin reddedilmesine neden olabilir.

İkinci unsur biyoparçalanmadır. Doku mühendisliği ile elde edilmiş doku iskelesi vücuda implante edildikten sonra vücuttaki hücreler o bölgede doku iskelesinin yerini alarak çoğalmaya başlar. Hücreler yeni HDM oluşturacak kapasiteye ulaştıklarında iskeleye ihtiyaç kalmayacağından, doku iskelesinin vücut ortamında parçalanabilen bir malzemeden (biyobozunur malzeme) üretilmesi şarttır. Malzeme parçalanırken biyouyumluluğunu kaybetmemeli ve zehirli ürünler oluşturmamalıdır. Diğer organlara zarar vermeden vücuttan atılmalıdır.

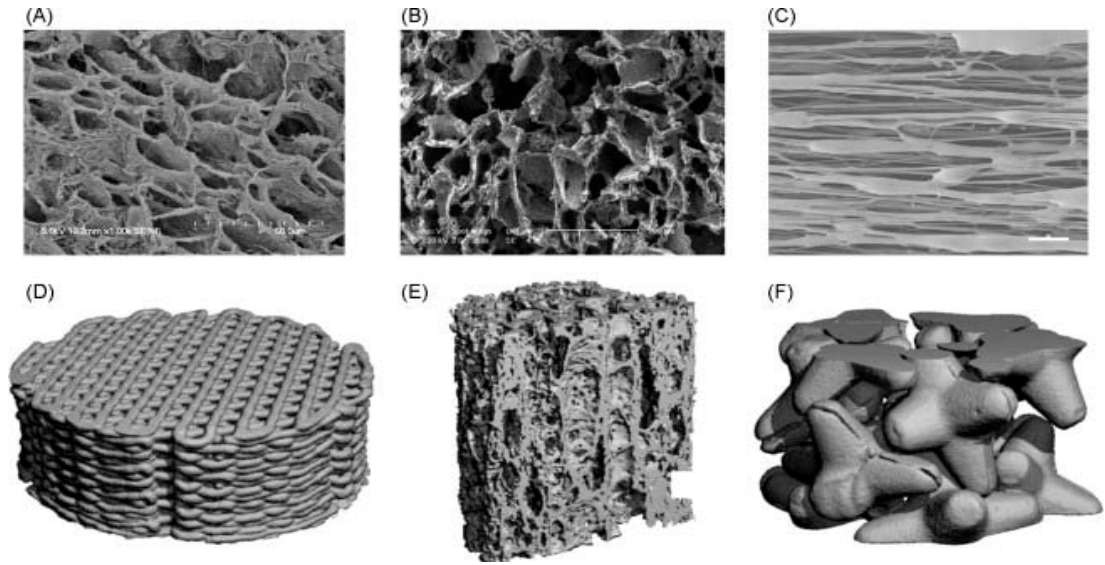
Diğer bir önemli unsur doku mühendisliği için kullanılacak iskelenin tasarımıdır. Doku iskeleleri, birbirine bağlı bir gözeneklere sahip olmalıdır. Bu yapıya sahip olması, hücrel penetrasyonu ve yapı içindeki hücrelere besinlerin yeterli difüzyon yapabilmesini sağlar.

Mekanik özelliklerde oldukça önemlidir. İdeal olarak, iskele ile implante edilecek olan anatomik bölgenin mekanik özellikleri tutarlı olmalıdır. Bazı insan dokularının mekanik özellikleri Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Bazı dokuların mekanik özellikleri [7]

Doku	Young Modülü	Çekme dayanımı
Kıkırdak, Kaburga	5.0 MPa	2.8 MPa
Arterler, Aort	0.3-0.94 MPa	1.1 MPa
Kemik	1-20 GPa	3.3 MPa
Deri	15-150 MPa	5-30 MPa

İskele fabrikasyonu için kullanılacak biyomalzemenin üretileceği polimerin seçimi en önemli aşamalardan biridir [9]. Şekil 1.6'da çeşitli şekil ve üretim teknikleri ile üretilmiş doku iskelelerinin resimleri verilmiştir.



Şekil 1.6. Çeşitli şekillerde hazırlanmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri (A) hücrelerden arındırılmış insan kalp dokusu, (B) sentetik poli (gliserol sebakat) doku iskelesi, (C) elektro eğirme yöntemi ile üretilmiş biyobozunur poliüretan doku iskelesi, (D) PCL/TCP kompoziti ile üretilen kemik doku mühendisliği için doku iskeleleri, (E) poli (L-laktik asit-ko-DL-laktid) 'den üretilen (F) kemik hasarlarını doldurmak için tasarlanmış yuvalar şekilli seramik tanecikleri [12]

Bu çalışmada polimer olarak biyoyumlu ve biyoparçalanabilir termoplastik poliüretan (TPU) seçilerek doku iskelesi oluşturabilme ölçütlerine uygunluk sağlanmıştır. Elyaf kaynağı olarak, doğal bir atık olan ve keratin bakımından zengin atık tavuk tüyleri (ATT) kullanılmıştır ve ATT/TPU kompozitleri biyomalzeme

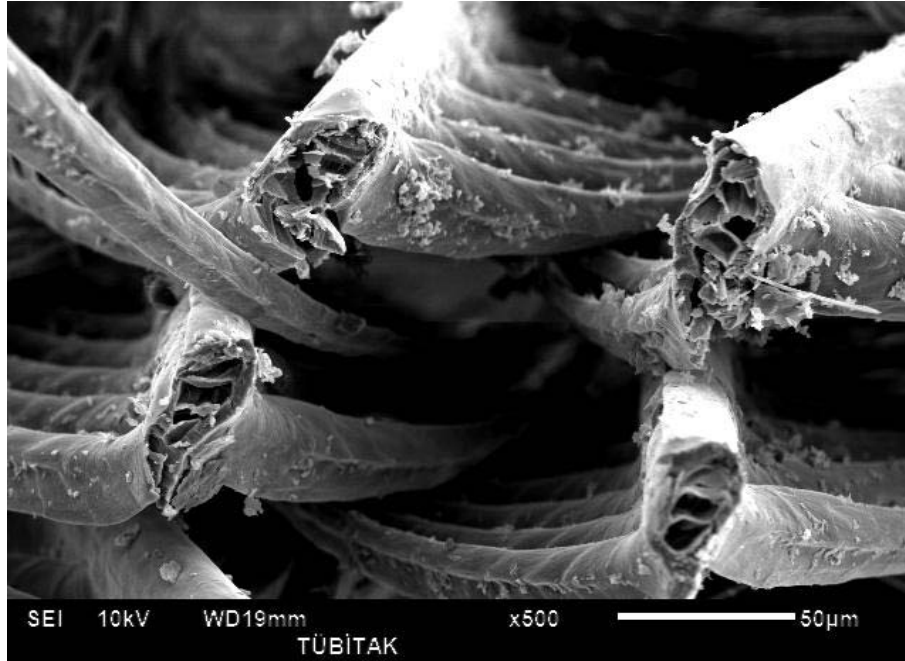
olarak kullanılma amacı ile üretilmiştir. Kompozitlerin bileşenleri detaylı olarak yapı ve özellikleri ile verilmiştir.

#### 1.4. Tavuk Tüyü ve Keratin

Bu bölümde; çalışılan kompozit malzemelerin fiber yapısını oluşturan tavuk tüyü ve içeriği keratin detaylı olarak anlatılmıştır.

##### 1.4.1. Tavuk tüyü

Tavuk tüyü, %91 keratin, %1 yağ ve %8 sudan oluşmaktadır [13]. Şekil 1.7’de gösterilen resimde de görüldüğü gibi tüylerin morfolojisi, bir gövde (içi boş tüy sapı) üzerinden belli bir açı ile uzanan tüylerden oluşur.



Şekil 1.7. Taramalı elektron mikroskobu ile tavuk tüyü morfolojisi

Tüyün sap kısmının materyal özellikleri, Tablo 1.2’de özetlenmiştir. Atık tavuk tüyleri (ATT) lifleri düşük yoğunluğu nedeniyle hafif kompozit uygulamaları için mükemmel bir takviye malzemesidir. Tek bir fiberin mekanik özellikleri sentetik liflere göre daha düşüktür, bu yüzden yüksek performans uygulamaları için uygun değildir. Ancak lif boyutları pamuk ve yün ile karşılaştırılabilir mertebededir [14]. Diğer bir yandan ATT lifleri tüm doğal ve sentetik elyaflar ile karşılaştırıldığında daha düşük yoğunluk değerine sahiptir [7].



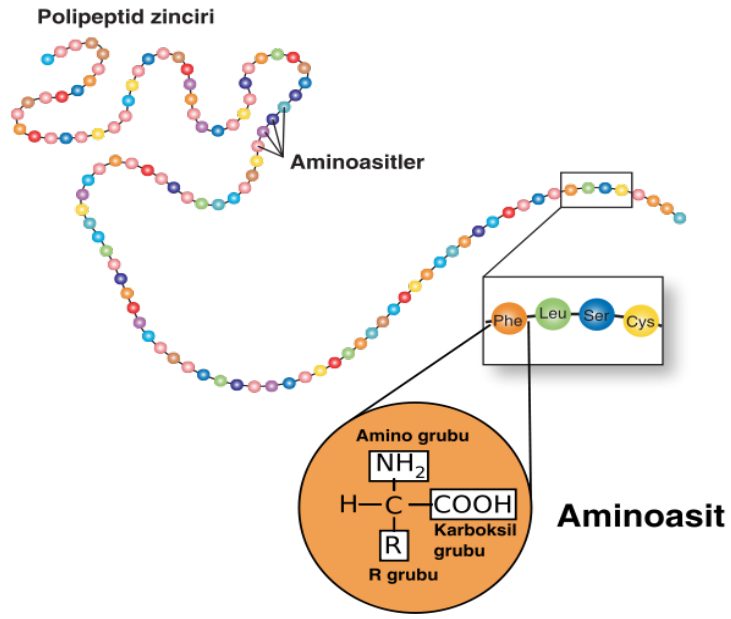
Tablo 1.2. Tavuk tüyü sapının malzeme özellikleri [15]

Boyut Özellikleri		Mekanik Özellikler	
Yoğunluk (g/cm)	0.89	Dayanımı (MPa)	113
Çap ( $\mu\text{m}$ )	15- 110	Modül (GPa)	2.8
Uzunluk (mm)	3-13	Uzama (%)	7.7

Tavuk tüyü, benzersiz ve avantajlı yapısının yanında atık olarak çevreye istenmeyen zararlar vermektedir. Ülkemizde tavuk tüyü, bertaraf sorunları nedeniyle çevre kirliliğine neden olan atık ürün olarak nitelendirilmektedir. Temel olarak iki şekilde yok edilmektedir. Bunlar; yakma ve gömme yöntemleridir. Bunların her ikisinin de çevre üzerinde olumsuz etkileri vardır. Atık tavuk tüyleri (ATT) ile yapılan son çalışmalar, kompozit üretimi için potansiyel bir katkı malzemesi olabileceğini göstermiştir. Ayrıca ucuz ve bol bulunabilen ATT, hafiflik, yüksek ısı yalıtımı, mükemmel akustik özellikler, aşındırıcı olmayan davranış ve mükemmel hidrofobik yapı gibi kompozit takviye kullanımı için arzu edilen özelliklere de sahiptir [16-18]. Böylece çevreye verilen zarar, yararlı kompozit malzemelerin üretimine dönüşecektir.

#### 1.4.2. Keratin

Keratin, saç, tırnak, yün, tüy, gaga, pençe ve boynuz gibi farklı yapıların temelini oluşturan lifli, yapısal bir proteindir. Keratin proteini, bir çok amino asit çeşidinin yan yana gelmesi ile oluşur. Bu amino asitler birbirleri ile çapraz bağ yapma, disülfid veya hidrojen bağları yapma eğilimindedirler [11]. Şekil 1.8'de amino asit yapısı ve protein zinciri oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Amino asit dizilimi ve protein zinciri [19]

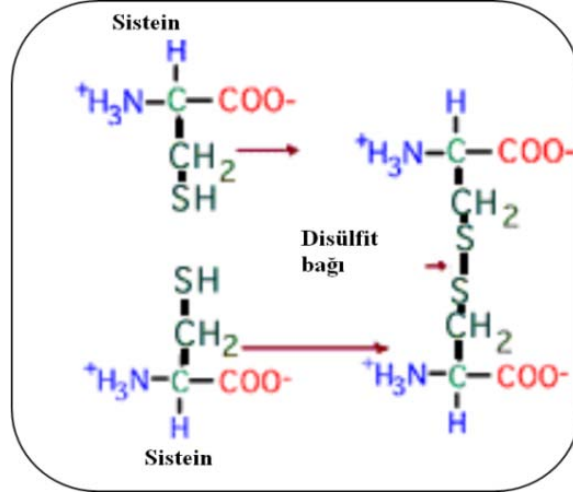
Tavuk tüyünde bulunan keratin, ağırlıkça %2 ile %18 arasında değişen sistein amino asit içeriği (ve aynı zamanda da sülfür içeriği) ile karakterize edilir (Tablo 1.3) [20].

Tablo 1.3. Keratin içerisinde bulunan en yaygın amino asitler ve oranları [20,21]

Amino Asit	Kısaltması	Yüzde oran (%)	Kimyasal Formülü
L-Serin	Ser	9-15	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{HC}-\text{COOH} \end{array}$
L-Sistein	Cys	2-18	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{HC}-\text{COOH} \end{array}$
L-Aspartik asit	Asp	4-6	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
L-Glisin	Gly	6-11	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
L-Glütamik asit	Glu	8-11	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
L-Arjinin	Arg	5-6	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{HN}-\text{C}=\text{NH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
L-Treonin	Thr	3-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
L-Alanin	Ala	3-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
L-Valin	Val	5-7	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

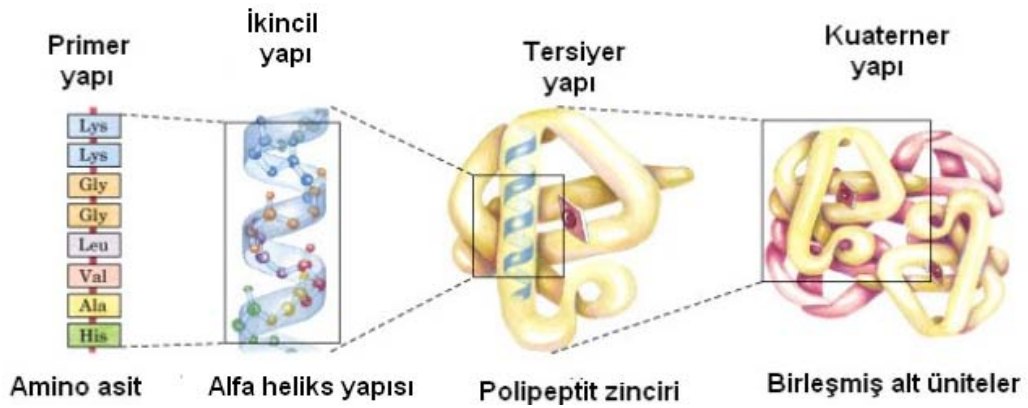
Sistein, yan zincirinde kükürt grubu içeren tek amino asittir. Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. 20 aminoasit arasında sadece sistein yan zincirinde fonksiyonel bir thiol grubu bulundurur. Thiol gruplarının okside olmasıyla iki sistein

arasında disülfid bağı oluşturulabilir (şekil 1.9). Bu bağın oluşumu geri çevrilebilir bir reaksiyondur.



Şekil 1.9. Disülfid bağı [22]

Disülfid bağlarının oluşturabilmesi sebebiyle sistein birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında belirleyici rol oynar. Bu bağlar sayesinde keratin, proteinlerin ikincil yapısında ve alfa heliks konformasyonunda bir protein olarak tanımlanır. Şekil 1.10'da proteinlerin bulunabileceği konformasyonlar ve alfa heliks yapı gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Keratinin alfa heliks yapısı [22]

Keratinin yüksek mukavemet özelliği bu iki sistein amino asiti arasında oluşan disülfid bağından ileri gelmektedir. Ayrıca proteolitik enzimlere karşı direnç oluşturmaktadır. Keratin, suda çözünmemesinin yanı sıra zayıf asit, baz ve organik çözücülerde de çözünmemektedir [23].

Literatürde birçok çalışma keratin katkılı doku iskelelerinin hücre kültürü çalışmalarında oldukça başarılı olduğunu kanıtlamıştır. Keratin fiberlerin hücre tutunmasını ve farklılaşmasını desteklediği kanıtlanmıştır. Bölüm 1.4.3’de bu yayınlardan bahsedilmiştir.

### **1.4.3. Keratin ve tavuk tüyü ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar**

Son yıllarda tavuk tüyünden elde edilen keratin ile ilgili yapılan akademik çalışmaların sayısında artış gözlenmektedir. Atık tavuk tüyünün önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu bölümde ATT ve keratin ile ilgili yapılan yapı özellik ilişkisi, kompozit malzeme ve biyomedikal uygulamalara yönelik çalışmalar özetlenmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

ATT ve elde edilen keratin ile ilgili yapılan akademik çalışmaları iki temel gruba ayırabiliriz. Birinci grupta yapı özellik ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalardır gösterilmiştir. İkinci grupta keratin ile sentetik polimerlerin kompozit malzeme olarak incelenmesi ve biyomalzeme olarak kullanımı araştırılmıştır.

Keratin ile ilgili ilk çalışmalar Yamauchi ve arkadaşları tarafından yün elyafının içerdiği keratinin özellikleri hakkında yapılmıştır. Yün elyafından elde edilen keratinin fizikokimyasal ve biyobozunma özellikleri çözeltiden dökme yöntemi ile keratin filmler üzerinde araştırılmıştır. Saf keratin filmler çok hassas ve kırılğan oldukları için filmlerin özelliklerini iyileştirmek amaçlanmıştır. Keratin filmlere gliserol ilave edilerek daha saydam ve saf keratine göre daha güçlü, esnek ve biyobozunur filmler elde etmişlerdir [24]. Diğer bir yayınlarında, Yamauchi ve arkadaşları ürettikleri bu filmlerin yüzeylerine fare fibroblast hücre kültürü çalışmaları yaparak keratin filmlerin hücre uyumluluklarını kanıtlamayı hedeflemişlerdir. Bu yüzey ile kolajen ve cam yüzeyler karşılaştırıldığında, keratin film yüzeylerin hücre tutunmasını artırıcı ve hücre çoğalmasını destekleyici özellikte olduğu ispatlanmıştır [25].

Fujii ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada saçtan keratin elde edilerek çözeltiden film dökme yöntemi ile keratin filmler hazırlanmıştır. Bu çalışmada filmlerin kontrollü ilaç salınımı uygulamalarında kullanılabilme

potansiyeli araştırılmış esnek ve ince filmler elde edilmiştir. Ancak biyobozunurluk testleri veya mekanik testler yapılmamıştır [26].

Bu ilk çalışmalar çözeltiden dökme yöntemi ile keratin filmler üretilebileceğini ve biyomalzeme olarak kullanılma potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir. Ancak, keratin filmlerin diğer doğal polimerler gibi güçlü biyouyumluluk özelliklerinin yanında zayıf mekanik özellikleri de elde edilen sonuçlar arasında olmuştur. Bu dezavantajın geliştirilmesi gerektiği düşünülerek çalışmalar bu yönde hız kazanmıştır.

Yamauchi' nin grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada kitosan ilavesiyle gliserol içeren keratin filmlerin mekanik özelliklerini iyileştirmek hedeflemiştir. Kitosan, yüksek biyolojik uyumluluk, yara iyileşmesinde biyolojik fonksiyona sahip olduğu bilinen ve antibakteriyel aktivitesi olan, biyomateryal uygulamaları için uygun bir moleküldür. Ayrıca antibakteriyel özelliği sayesinde kitosan içeren keratin filmlerde hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Kitosan takviyeli keratin filmler, takviyesiz keratin filmler gibi hücre tutunması ve çoğalması için uygun yüzeyler oluşturmuşlardır. Keratin filmlere kitosan takviyesi yapılmasıyla mekanik dayanımda da artış elde edilmiştir [27].

Barone ve Schmidt tarafından yapılan bir çalışmada, polietilen bazlı kompozitler, tavuk tüylerinden elde edilen keratin lifleri kullanılarak hazırlanmıştır. Benzer çaplardaki lifler çeşitli boy oranlarında düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) içine karıştırılmıştır. Tek eksenli çekme testi sonucunda kompozitin elastik modülü ve akma gerilimi, saf polimere göre artış göstermiştir. Bu sonuç fiber yükleme oranlarının birçoğu üzerinde gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile de polimer ve keratin lifler arasındaki uyum kanıtlanmıştır [28].

Benzer şekilde Lam ve arkadaşları atık tavuk tüy tüyleri (ATT) ile poli(laktik asit) (PLA)'yı yeni bir biyokompozit malzeme elde etmek için karıştırmışlardır. Tavuk tüylerini iki farklı bölgeden elde ederek polimer matrisine takviye olarak hazırlanmıştır. Çift vidalı ekstrüzyon makinesi ve enjeksiyon cihazı ile ağırlıkça %0, 2, 5, 8 ve 10 ATT içeren ATT/PLA kompozitleri üretilmiştir. Sonrasında elde edilen ATT/PLA biyokompozit numunelerinin mekanik özellikleri incelenmiştir. ATT/PLA biyokompozitlerinin çekme modüllerinde saf PLA'ya göre artış elde edilmiştir.

Ağırlıkça % 5 ATT içeren ATT/PLA biyokompozitinin SEM görüntüleri incelendiğinde ATT ve PLA matrisi arasında iyi bir yapışma olduğu gözlenmiştir [29].

Martínez-Hernández ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise tavuk tüylerinden elde edilen keratin lifler kısa elyaf takviyesi olarak poli(metil metakrilat) (PMMA) matrisine katılmıştır. Kompozitler, termal ve dinamik-mekanik analizler yapılarak değerlendirilmiştir. Keratin lifler içeren PMMA kompozitlerinin termal stabilite ve geçiş sıcaklığının saf PMMA'ya göre daha yüksek olduğu bulunmuştur [30].

Uzun ve arkadaşları çalışmalarında, atık tavuk tüyleri vinilester ve poliester polimerler ile kompozit haline getirilerek mekanik özellikler test edilmiştir. Çekme testi sonuçlarına göre saf polimere göre kompozitlerin üstün özellikleri elde edilememiştir. Fiber yüzdesi arttıkça saf polimere göre çekme dayanımı özelliklerinde azalma görülmüştür. Ancak çentik darbe testine göre, %10 ATT fiber içeren kompozit, saf polimere göre çok daha iyi darbe dayanımı göstermiştir [31].

Tonin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada poli (etilen oksit) (PEO) ve keratin arasındaki ilişki araştırılmıştır. Keratin ile harmanlanmış keratin/PEO filmlerinin morfolojik, yapısal ve termal analizleri yapılmıştır. Belirli düzeyde keratin ilave sonucu PEO'nun kristalleşmesi engellenmiştir. Ayrıca keratin/PEO doku iskeleleri üretilerek hücre büyümesi, yara pansumanı ve ilaç salınım membranları sağlayan keratin biyomalzeme geliştirilebileceği öngörülmüştür [32].

Zoccola ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise keratin ve poliamid 6 (PA6) arasındaki moleküller arası etkileşim incelenmiştir. Geniş uygulama alanlı ve pratik kullanımlı keratin bazlı malzemeler üretmek hedeflenmiştir [33].

Son yıllarda yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında keratin katkılı kompozit uygulamalarında olumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Tavuk tüyü fiberleri ile takviyeli birçok polimer kompozitlerinin mekanik özellikleri ve biyomalzeme olarak kullanılabilme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ancak literatürde daha önce ATT katkılı biyobozunur ve biyoyumlu TPU kompozitleri üretilerek deri doku mühendisliği uygulamaları için kullanılabilme potansiyeli incelenmemiştir. Bu tez

çalışmamız da üretilen ATT/TPU kompozitlerinin termal ve mekanik özellikleri incelenerek hücre kültürü testleri ile biyouyumluluklarının kanıtlanması hedeflenmiştir.

## 1.5. Poliüretanlar

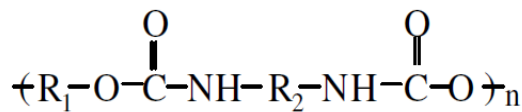
Bu bölümde; çalışılan malzemelerin temel matrisini oluşturan TPU detaylı olarak tanımlanmıştır.

### 1.5.1. Poliüretanların yapı ve özellikleri

Poliüretanlar, Dr. Otto Bayer ve arkadaşı I.G. Farbenindustrie tarafından 1937 yılında geliştirilmiştir. Bu polimerler, yüksek mukavemete sahip, gaz, ozon ve aromatik hidrokarbonlara karşı dirençli, yüksek aşınmaya karşı, oksijen ve ozona karşı dirençli olmanın yanında mikrobik saldırıya karşı duyarlılardır. Poliüretan kullanımı her ne kadar çoğunlukla sert ve esnek köpükler olsa da % 15 poliüretan üretimi elastomer uygulamalarında kullanılmaktadır [34].

İzosiyanat gruplarının ( $\text{-N=C=O}$ ), hidroksil gruplarıyla ( $\text{-OH}$ ) gerçekleştirdiği tüm karmaşık reaksiyon ürünleri üretan reaksiyonları olarak adlandırılır. Reaksiyon sırasında hidroksil gruplarının hidrojen atomları, izosiyanat gruplarının azot atomlarına aktarılır. Böylece poliüretan zinciri yalnızca karbon atomlarından değil, aynı zamanda oksijen ve azot atomlarından da oluşmuş olmaktadır. Kimyasal açıdan bakıldığında poliüretanlar, üretan grubunun ( $\text{-NH-CO-O-}$ ) yanında eter, ester, amid ve üre gibi farklı fonksiyonel grupları da içerirler [34-36].

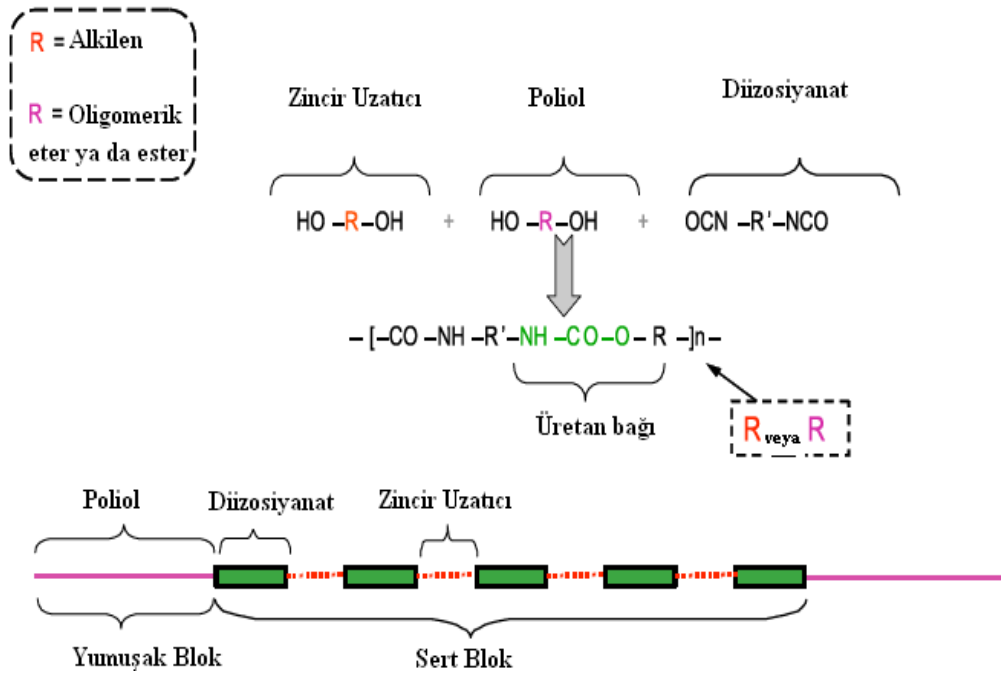
Poliüretanların en basit yapısı Şekil 1.11’de gösterildiği gibi lineer zincirlidir. Burada “n” tekrar eden grup sayısını gösterirken,  $R_1$  hidroksil grubunu içeren hidrokarbon grubunu,  $R_2$  ise izosiyanat grubundan yapıya katılan hidrokarbon grubunu temsil etmektedir [37].



Şekil 1.11. Lineer poliüretan yapısı [37]



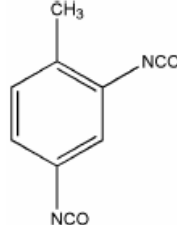
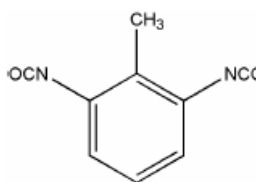
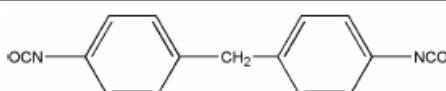
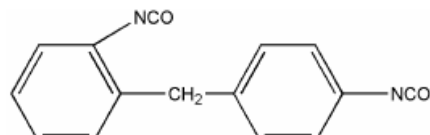
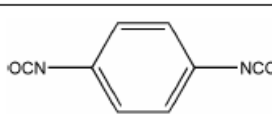
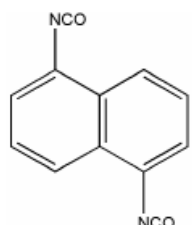
Termoplastik poliüretanlar, Şekil 1.12’de gösterildiği gibi, yumuşak ve sert blok adı verilen iki kısmın bir araya gelmesi ile elde edilir. Yumuşak blok poliester veya polieter gibi poliollerden oluşur ve esneklikten sorumludur. Ayrıca TPU’nun elastomerik özelliklerini belirler. Sert blok, izosiyanttan ve zincir uzatıcıdan oluşur. TPU’nun tokluk ve fiziksel performans özelliklerini belirler. Yumuşak kısmın camı geçiş sıcaklığı sert kısma göre daha düşüktür. Bu iki yapısal bileşenin oranına bağlı olarak son ürünün mekanik özellikleri geniş bir aralıkta değişmektedir [34-37].



Şekil 1.12. Temel TPU kimyası [35]

İzosiyantlar, son derece reaktif  $-N=C=O$  grubuna sahiptirler ve karbon-azot çift bağı boyunca ilave reaksiyonu geçerler. Bu gruplar, çok sayıda bileşikler ile tepkimeye girerler. Örneğin; aminler, alkoller, karboksilik asitler, ve hatta kendileri ile. Ayrıca izosiyantların bileşenleri aromatik ve alifatik gruplar olabilmektedir [37]. Aromatik izosiyantlar en yaygın olarak, hem esnek formlarda hem de sert poliüretan köpük kaplamaların üretiminde, yapıştırıcılarda, elastomer ve lif üretiminde kullanılmaktadırlar. Aromatik diizosiyantlardan elde edilen poliüretanlar oksijen varlığında yavaş oksidasyona geçer ve ışık, renk değişikliği daha yavaş olur [38]. Yaygın olarak kullanılan aromatik izosiyanat Tablo 1.4’de listelenmiştir.

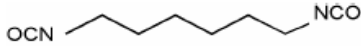
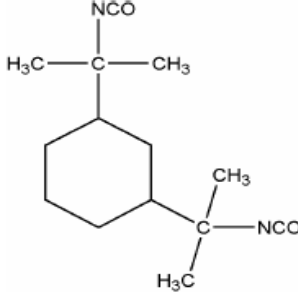
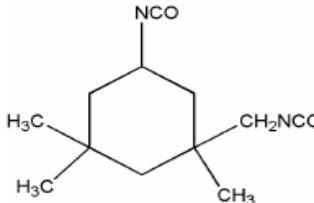
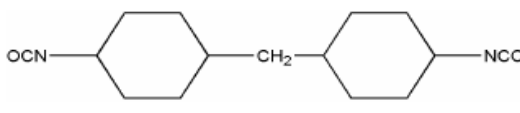

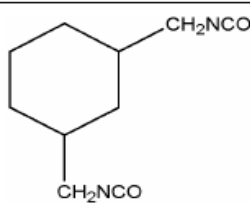
Tablo 1.4. Aromatik diizosiyanatlar [38]

Aromatik İzosiyanatlar	Formül
Toluen 2,4-diizosiyanat (TDI)	
Toluen 2,6-diizosiyanat (TDI)	
4,4'-metilen difenil diizosiyanat (MDI)	
2,4'- metilen difenil diizosiyanat (MDI)	
p-fenilen diizosiyanat (PDI)	
1,5- naftalin diizosiyanat (NDI)	

Toluen diizosiyanat (TDI) ve 4,4'-metilen difenil diizosiyanat (MDI) poliüretanların üretiminde en yaygın olarak kullanılan aromatik izosiyanatlardır.

Alifatik diizosiyanatlar içerisinde en az maliyetli olan 1,6 hegzametilen diizosiyanattır (HDI). HDI, TDI ve MDI'e göre daha az reaktiftir. HDI kullanımı ile renk değişikliğine, hidroliz ve ısı ile bozulmaya karşı dirençli üretan polimerler elde edilir [38]. Tablo 1.5'te alifatik diizosiyanatlar listelenmiştir.

Tablo 1.5. Alifatik diizosiyanatlar [38]

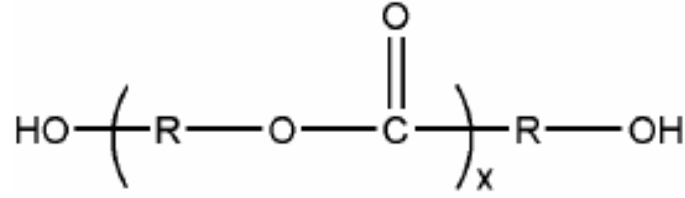
Alifatik diizosiyanatlar	Formül
1,6- hexametilen diizosiyanat (HDI)	
m-tetrametilksilen diizosiyanat (TMXDI)	
İzoforon diizosiyanat (IPDI)	
Disikloheksilmetan-4,4'-diizosiyanat (H12MDI)	
1,4-sikloheksan diizosiyanat (CHDI)	
Sikloheksan,1,4-bis (izosiyanatometil) (H6XDI, DDI)	

PU sentezinde kullanılan polioller molekül ağırlığı 400-5000 arasında değişen polieter ve poliester bazlı bileşiklerdir.

Polieter polioller ile hazırlanan poliüretan hidrofilik veya hidrofobik olabilir ve poliester poliollere göre daha stabildir. Bu nedenle biyolojik özelliği ve biyoparçalanma özelliğinin istenmediği cihazların tasarımı ve geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Polyester bazlı poliüretanlar, insan vücuduna implante edildiğinde hızlı hidrolize uğrar, bu nedenle en yaygın olarak biyolojik malzemelerin hazırlanmasında ve doku

mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [30,38]. Polyester poliöl yapısı şekil 1.13' de gösterilmiştir.



Şekil 1.13. Polyester poliöl kimyasal yapısı [38]

Bu çalışmada seçilen poliüretan, sert segment olarak biyoyumluluk nedeniyle diizosiyanat (HDI), ve yumuşak segment için poliöl olarak poli(ε-kaprolakton) (PCL) içermektedir. Yüksek olefin içeriği PCL' e eşsiz özellikler kazandırmaktadır. Hidrolitik olarak stabil alifatik ester bağı varlığı sebebiyle polimer, biyolojik olarak parçalanabilir. Bu polimer Avrupa'da doku uyumlu olarak kabul edilmektedir [34].

Zincir uzatıcı olarak da polioller ve daiminler kullanılır. Amaç, sert segmentin boyunu uzatmak, hidrojen bağı yoğunluğunu arttırmak ve molekül ağırlığını arttırmaktır. Ticari olarak kullanılan bazı zincir uzatıcıları; etilen glikol ve etilen diamindir [34].

Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler, doku mühendisliği ile üretilen doku iskeleleri geliştirmek için diğer malzemelere göre birçok avantaja sahiptirler. En önemli avantajları, bu polimerlerin mekanik özelliklerinin ve bozunma kinetiğinin çeşitli uygulamalar için uygunlaştırılabilmesidir. Aynı zamanda yeni doku oluşmasını sağlamak için istenen şekil ve gözenek morfolojik özellikleri ile üretilmeye elverişlidirler [40].

### 1.5.2. Poliüretanların kullanım alanları

Poliüretanlar termoset ve termoplastik özellikte olabilen polimerlerdir. Termoset poliüretanlar çeşitli biçimlerde olabilir; örneğin yumuşak köpük, sert köpük gibi. Yumuşak köpükler yatak, yorgan ve paketlenme malzemeleri üretiminde, sert köpükler ise genellikle yalıtım malzemesi olarak kullanılırlar.

Termoplastik poliüretanlar doğrusal ve kristalinite dereceleri yüksek moleküllerden oluşur; bunlardan aşınmaya dayanıklı malzemeler yapılır; örneğin, ayakkabı ta-

banları, araba çamurluğu, kapı panelleri, araç dış lastiği, conta, tamponu ve sentetik deri, gibi [41].

Poliüretanlar biyomalzeme olarak da birçok alanda kullanılmaktadır. Öncelikle biyomalzemenin tanımını tapmak gerekirse, metal, polimer, cam, seramik gibi canlı vücut ile bağlantılı olarak protez, teşhis veya tedavi amaçları ile vücutta herhangi bir yan etki oluşturmada kullanılabilen materyaller biyomalzeme olarak kabul edilmektedir [38,42].

Tıp alanında da, termoplastik poliüretanlar daha yüksek bir esneklik ve dayanıklılık, yıpranmaya, oksidasyona ve neme karşı direnç, elastomer benzeri karakter, yorulma dayanımı, uyum ve kabul veya iyileşme sırasında vücutta tolerans gibi özellikleri ile diğer elastomerlerin yerine kullanılmaktadır. Poliüretanlar, geniş yapısı / mal çeşitliliği olan, bugün bilinen en biyo-ve kan uyumlu malzemelerden biridir. Birçok yenilikçi işleme teknolojileri daha fonksiyonel cihazlar imal etmek için kullanılmaktadır. Bu özellikleri ile TPU'ların bu birçok tıbbi cihaz gelişiminde önemli bir rol oynadığı söylenebilir. Kan torbaları, birçok farklı vasküler kateterler ve tam yapay kalp gibi birçok biyomalzeme geliştirilmiştir ve başarılı bir şekilde klinik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yara iyileşme sürecinde de olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Diğerleri arasında en iyi performans gösteren vasküler kateter poliüretandan üretilmektedir. Ayrıca, en gelişmiş yara örtüsü ürünleri poliüretan tabanlı geliştirilmiştir [42].

### **1.5.3. Poliüretanların yara örtüsü malzemesi olarak kullanımı**

Yara örtü malzemeleri ilk olarak yarayı dış etkilere korumak amacıyla kullanılmış, ancak daha sonra yaranın iyileşmesine katkıda bulunmasına yönelik arayışlar başlamıştır. Yara iyileşmesi ile ilgili yapılan ilk çalışmalar M.Ö. 3000-2500 yılları arasında yapılmıştır. İlk olarak yara kaplamasında bitkiler kullanılmış, daha sonra yapışkan eklenmiş kumaşlarla yaralar sarılmaya başlanmıştır. 1800'lü yılların ortalarına kadar keten sargılar temel örtü malzemesi olarak kullanılmış, daha sonra gazlı beze yumuşak parafin veya yağ eklenerek yaraya yapışmayan sargılar üretilmiştir. 1962 yılında Winter, polietilen film sargı kullanıldığında yara iyileşmesinin iki kat hızlandığı gözlenmiştir. 1980'li yılların başında polimerlerin

yara örtüsü olarak kullanımı artmıştır. İyi bariyer özelliği ve oksijen geçirgenliği göstermesinden dolayı çalışmaların çoğunda PU'lar kullanılmıştır.

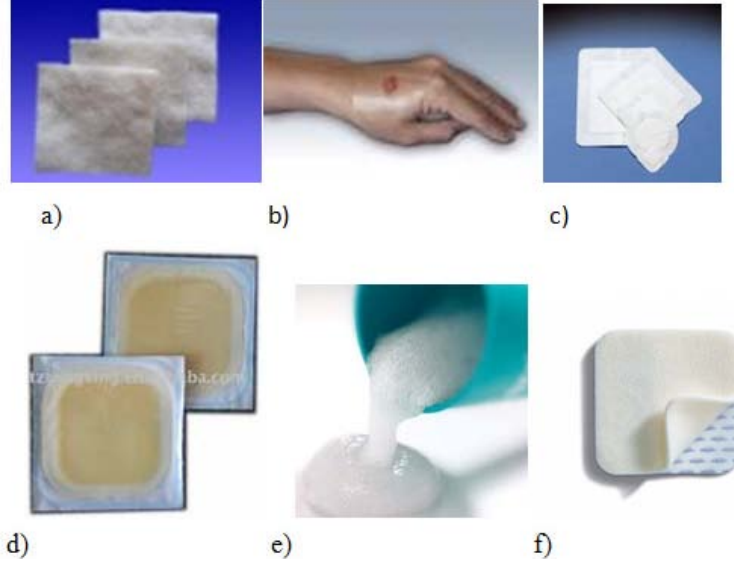
Bu bulgular göz önüne alınarak oklüzif sargılar ile polimer filmler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Yarada kullanılacak örtünün doğru seçimi, yaranın doğal şartlarda iyileşmesine katkıda bulunur. İyi bir yara örtüsü yarayı korumalı ve deriye uyumlu olmalıdır [36,43]. Yara iyileşmesi, karmaşık fizyolojik bir süreçtir. Yara örtüleri, çoğunlukla yara iyileşme sürecinin hızı üzerinde küçük bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte; bir takım etkenlerle kombine edildiğinde uygun yara örtüsü kullanımı yara iyileşme sürecini hızlandırabilmektedir.

Modern yara örtülerinin sahip olması gereken özellikler Tablo 1.6'da özetlenmektedir.

Tablo 1.6. İdeal yara örtüsünün özellikleri [44]

<b>Kesinlikle olması gereken özellikler</b>	<b>Ek olarak istenen özellikler</b>
Acıyı azaltmak	Biyobozunur olmak
Akıntıyı absorbe etmek	Transparan olmak
Toksik olmamak	Kolayca uygulanabilmek
Nemli bir ortam sağlamak	Yara alanına hücre göçüne yardımcı olmak
Enfeksiyonu önlemek	Yara yüzeyine yapışmadan kolayca uzaklaştırılabilmek
Optimum gaz geçirgenliği, sıcaklık ve pH sağlamak	Esnek ve konforlu olmak
Yaranın kontaminasyonunu engellemek	Su buharı geçişine imkân sağlamak ancak bakteri geçişine engel olmak

Modern yara örtüleri, genel olarak 5 ana grup altında sınıflandırılabilir. Bu ürünler, genellikle çeşitli fizyolojik yaralar üzerine farklı iyileşme süreçlerinde tek başlarına veya birkaçının kombinasyonu halinde uygulanmaktadır. Bu yara örtüleri Şekil 1.14’de listelenmiştir.



Şekil 1.14. Modern yara örtüsü çeşitleri a) Kalsiyum alginat yara örtüsü, b) Transparan poliüretan film, c) Hidrojel yara örtüsü, d) Hidrokoloid yara örtüsü, e) Silikon bazlı köpük yara örtüsü, f) Poliüretan köpük yara örtüsü [44]

PU film yara örtüleri yara örtüsünde bulunması gereken birçok özelliği sağlamaktadır. Şeffaf olan PU film yara ve etrafının gözlem altında tutulmasını kolaylaştırmaktadır. Yara yatağının nemli tutulması epidermal hücre göçünü hızlandırır. PU yara örtüleri nemli ortam sağlayarak iyileşme sürecini hızlandırır. Yarı geçirgen olması sebebiyle de gaz geçirgenliği sağlarken bakteriyel geçirgenliği engeller.

Bu çalışmada, ATT/TPU doku iskelesinin, keratin içeren yapısından dolayı hücre uyumu ve yara iyileşme sürecini artırıcı etkisi bulunacağı öngörülmektedir. Bu özellikleri sebebiyle, üretilecek ATT/TPU kompozitlerinin yara örtüsü olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bu yara örtüleri, birinci ve ikinci derece yanıklarda ve sadece üst deri dokusunun onarımının gerektiği doku kayıplarında doku iyileşmesini hızlandırıcı ve yara bölgesinde yara izi oluşumunu engelleyici bir rol oynayabilir.

#### 1.5.4. Literatür çalışmaları

Son yıllarda PU'ların biyouyumluluk özellikleri sayesinde biyomalzeme olarak medikal uygulamalarda kullanımı ile ilgili yapılan çalışmaların sayısında artış gözlenmektedir.

İlk olarak Boretos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 'Biomer™' olarak tanımladıkları medikal uygulamalarda kullanılabilecek elastomerik poliüretan malzemelerden bahsetmişlerdir. Üretilen poliüretanın kan uyumu, yüksek elastik modülü, dayanıklılık gibi özelliklerini kanıtlayarak birçok uygulama alanı olduğunu göstermişlerdir [45].

1970'lerde termoplastik poliüretanların (TPU) biyomalzeme olarak değerlendirilebileceği keşfedilmiştir. Bu dönemim sonlarına doğru Colovos ve arkadaşları tarafından PELLETHANE-2363™ adı ile farklı sertlik derecelerinde polieter bazlı TPU'lar üretilmiştir. PELLETHANE-2363™, vasküler kataterler, kan torbaları, kalıcı implantlar gibi birçok medikal üründe kullanılmıştır [46]. Daha sonralarda da TPU'ların üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili yüzlerce başarılı çalışmalar yapılmıştır.

Poliüretanların umut verici geçmişlerinin yanında oldukça gelecek vaat eden çalışmalar yapılmaya devam edilmiştir. Marchant ve arkadaşları, PU'ların medikal uygulamalarda hidrolize, kalsifikasyona ve makromoleküler oksidasyona karşı direçli olduklarını kanıtlamışlardır [47].

Plastiklerin bozunabilirlik sorunlarından yola çıkarak araştırmacılar üretimde değişikliklere yada biyobozunur polimerlere yönelmişlerdir. Huang ve arkadaşları, poliester PU'ların poliester zincirleri uzatıldıkça biyobozunurluklarının arttığını kanıtlamışlardır. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) diollerinden üretilen PU'lar farklı poliester zincir uzunluklarında üretilerek enzimatik bozunmaları incelenmiştir [47].

Phua ve arkadaşları ise Biomer™ ürünün biyobozunurluk özelliklerini araştırmışlardır. Çapraz bağlı PU yapısından dolayı ürünün enzimatik bozunmasının oldukça yavaş olduğu sonucu elde edilmiştir [48].



Bruin ve arkadaşları, yıldız şeklinde biyolojik olarak parçalanabilir, polyester bazlı poliüretan prepolimerler sentezini bildirmiştir. Yıldız-prepolimerler, penta şeker molekülü (myoinisitol) ile hazırlanmıştır. Bu molekül, L-laktid veya kaprolakton içeren glikolid ile halka açma kopolimerizasyonu tarafından üretilmiştir. Prepolimerler 2,6-diizosiyanat heksanoat kullanarak birbirlerine çapraz bağlanmıştır. Bu poliüretan ağların Bozunma ürünlerinin toksik olmadığı kabul edilmiştir. Ön deneyler ile domuzlara subkutan olarak implante edilen poliüretan malzemelerin biyolojik olarak bozunduğu gözlenmiştir [49].

Yine Bruin ve arkadaşları, önceki çalışmalarından 2 yıl sonra, 1990 yılında, LDI ve poli(glikolid-ko- $\gamma$ -kaprolakton) içeren poliüretan malzemedan iki tabaka suni deri geliştirmişlerdir. Kobaylarda subkutan olarak implante edilen gözenekli poliüretan ağlar hızlı hücre büyümesine izin vermiştir. Ayrıca implantasyon sonrası 4-8 hafta içerisinde neredeyse tamamen bozunmuştur ve hiçbir yan etki veya doku reaksiyonu görülmemiştir [50].

Akita ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, beş farklı şekilde dizayn edilmiş PU ve hidrojel yapılar da yara örtüleri karşılaştırılmıştır. Yapılan prospektif (ileriye dönük araştırmalar) çalışmada, poliüretan yara örtüsün hidrojel yara örtüsüne göre üstünlükleri gözlenmiştir. İyileşme süresi, yara örtüsünü değiştirme sıklığı, ağrının derecesi, yeni doku oluşumu ve yara izi oluşumu parametreleri kullanılmıştır. Yapılan karşılaştırmada, PU yara örtülerinin hidrojellere göre iyileşme süresi ve yara örtüsünün değişme sıklığında üstün özellikler gösterdiği görülmüştür. Hidrojeller ise daha az ağrı oluşmasında katkı sağlamıştır. Her iki üründe doku oluşumunu hızlandırmış ve yara izi oluşumunu büyük ölçüde azaltmıştır [51].

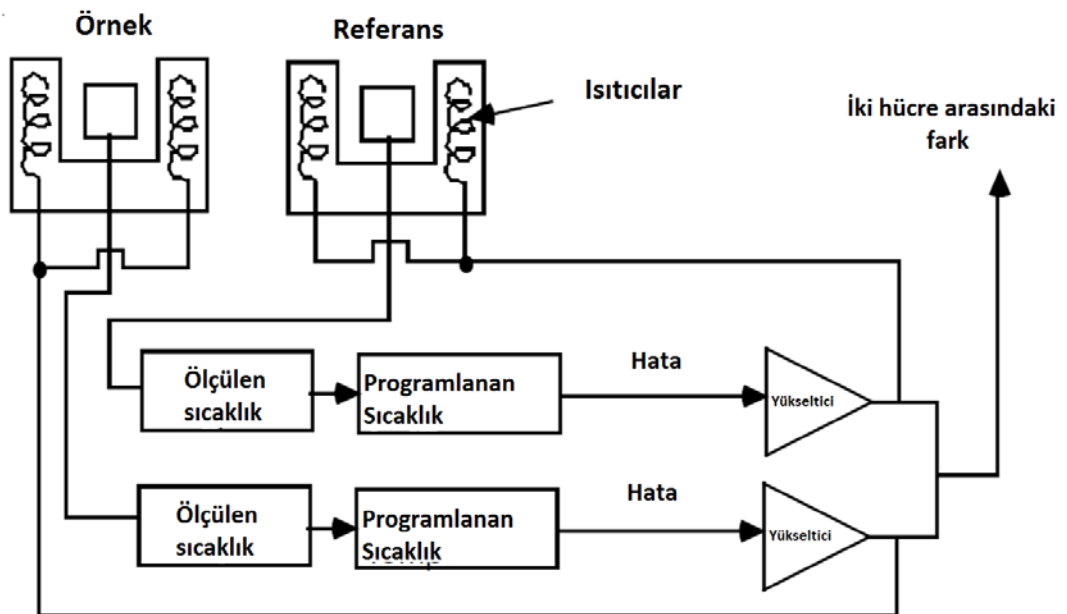
Bir çok literatür çalışması göstermiştir ki, hızla ilerleyen doku mühendisliği alanında poliüretanlar sayısız fırsatlar sunmaktadır ve çeşitli uygulamalarda doku iskeleleri geliştirmektedir amacına da uygundur.

## 1.6. Kullanılan Deneysel Teknikler ve Cihazların Çalışma Prensipleri

### 1.6.1. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

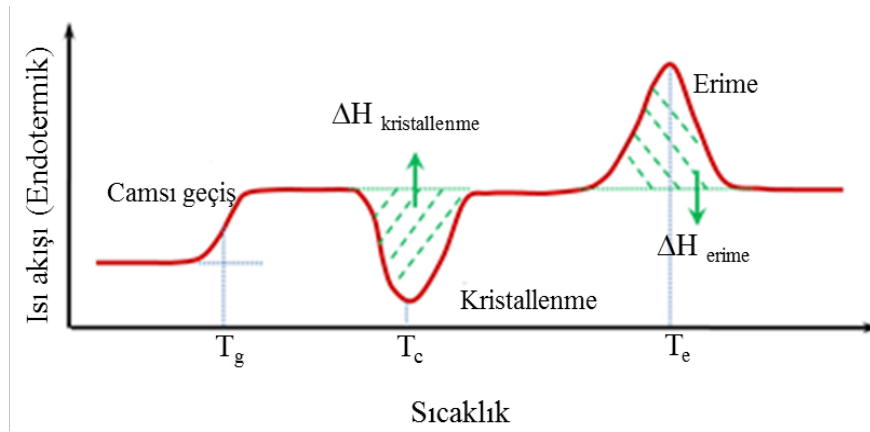
Polimerik malzeme ısıl analizlerinde en çok kullanılan teknik ise diferansiyel taramalı kalorimetridir (DSC). Bu cihazın çalışma prensibi, örnek ve referans malzemelerin sıcaklıklarının aynı tutulması esasına dayanır [52].

DSC’de biri örnek, diğeri referans için olmak üzere iki hazne bulunmaktadır. Boş örnek kabı referans haznesine yerleştirilirken, içinde polimer bulunan ikinci kap örnek haznesine yerleştirilmektedir. Polimerik malzemeler için genellikle alüminyum kaplar kullanılmaktadır. Analizin başlangıç sıcaklığının belirlenmesinin ardından iki hazne de belirlenen başlangıç sıcaklığına ulaşmaya kadar ısıtılmakta, ya da soğutulmaktadır. Başlangıç sıcaklığına ulaşan hazneler, belirlenen metot kapsamında belirtilmiş son sıcaklık değerine ulaşmaya kadar belirli hızda ( $^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ ) ısıtılmakta, ya da bir dizi ısıtma ve/veya soğutma işlemlerinden geçirilerek hedeflenen son sıcaklık değerine ulaşmaktadırlar. Örnek ile referans madde arasında bir sıcaklık farkı meydana gelmesi durumunda, sıcaklık farkının dengelenmesi amacıyla örneğe verilen ısı miktarı değiştirilmektedir. Bu sayede, faz değişimi sırasında örneğe aktarılan ısı miktarı saptanabilmektedir [52]. Şekil 1.15’de DSC’nin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.15. DSC'nin şematik gösterimi [53]

Bu teknikte, referans ile örnekten gelen, ya da uzaklaşan ısı farkı sıcaklığa ve zamana bağlı olarak gösterilir. Analiz sırasında ısı farkı pozitif ise (endotermik), malzeme ısıtıcısına enerji verilir ve pozitif bir sinyal elde edilir. Isı farkı negatif ise (ekzotermik), referans ısıtıcısına enerji verilir ve negatif bir sinyal elde edilir. Bu sayede malzemelerin entalpi, kristallenme sıcaklığı, erime sıcaklığı, camsı geçiş sıcaklığı, çagraz bağlanma sıcaklığı ve saflık gibi özellikleri incelenebilir. Şekil 1.16'da örnek bir DSC termogramı verilmiştir [54].



Şekil 1.16. Örnek DSC termogramı [55]

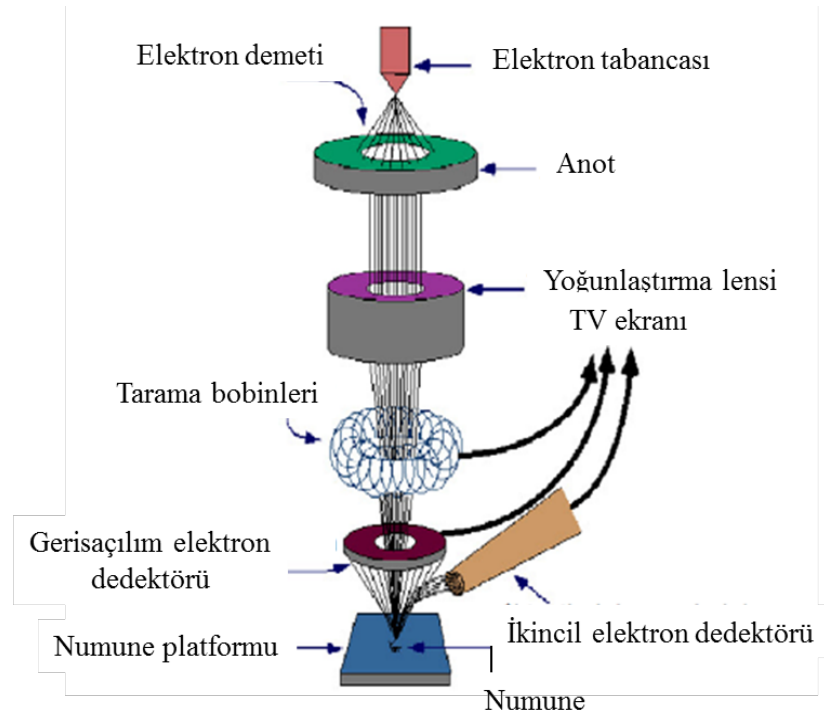
### 1.6.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), incelenecek örneğin yüzeyinin elektronlar ile taranması yoluyla yüksek çözünürlükte yüzey görüntülerinin elde edildiği bir tür elektron mikroskobudur [56]. Örneklerin yüzeyindeki çok küçük girinti ve çıkıntıların, ya da gözeneklerin ayrıntılı bir şekilde görüntülenmesini sağlamaktadır [53]. SEM; optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır [56].

Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apertürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune  $10^{-4}$  Pa gibi düşük bir basınçta tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda

oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır [53, 54].

SEM ile incelenen örnekler iletken ve yalıtkan olanlar şeklinde ikiye ayrılabilirler. Yalıtkan örneklerin görüntülerinin incelenebilmesi için önce iletken hale getirilmeleri, bunun için de altın, altın/paladyum veya alüminyum gibi ince iletken bir tabakayla kaplanmaları gerekmektedir. SEM’de büyütme oranı aralığı 10 ile 50.000 arasında olabilir. Ayrıca numunenin belli bölgelerindeki element bileşimlerinin nitel, ya da yarı nicel analizlerini de yapmak mümkündür [54]. SEM’in çalışma prensibi şematik olarak Şekil 1.17’de görülmektedir.

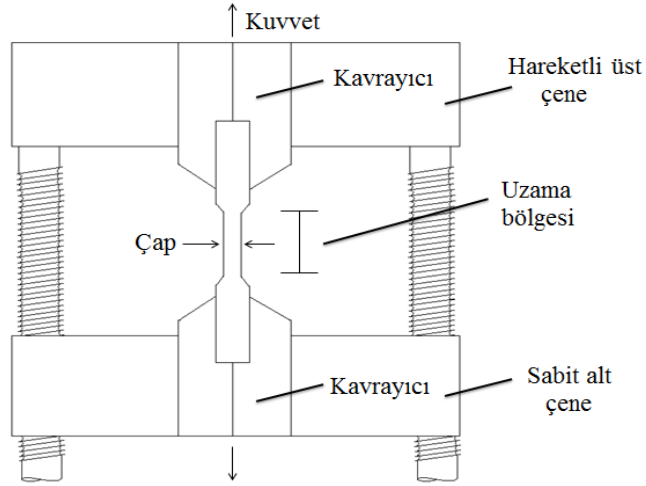


Şekil 1.17. SEM cihazının çalışma prensibi [57]

### 1.6.3. Çekme testi

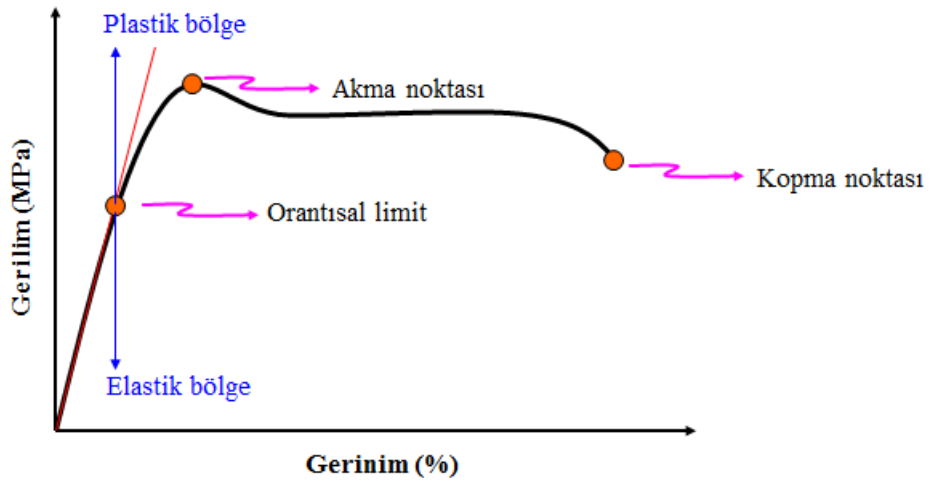
Malzemelerin çekme, basma, makaslama (shear) gibi dış etkenler sonucunda gösterdikleri tepkileri incelemek ve bu şekilde malzemenin mekanik özelliklerini anlamak için malzemelere bazı mekanik testler uygulanır. Bu şekilde malzemelerin, test yapılan koşullara benzer ortamlarda test edilen mekanik özellikler açısından kullanışlı olup olmadıkları anlaşılır. Bu amaçla uygulanan testlerden en yaygın olanı çekme testidir [58].

Çekme testinde standartlara göre hazırlanmış papyon (dog-bone) örnek, çekme aletinin iki çenesi arasında Şekil 1.18’de gösterildiği gibi yerleştirilir. Örnek sabit deformasyon hızında çekilirken deformasyona karşı gösterdiği direnç ölçülür. Direnç kuvvetine karşı uzama verisi kaydedilir. Deney, test örneği kopana kadar sürdürülebilir [58].



Şekil 1.18. Çekme cihazının temel bileşenleri [52]

Çekme testi sonucunda malzemelerin kopma dayanımı, akma dayanımı, kopma anındaki uzama, çekme dayanımı ve elastik modülü gibi önemli mekanik özellikleri elde edilir. Ayrıca çekme testi sırasında gerilimin uzama miktarına karşı grafiğe geçirilmesi ile de malzemenin mekanik karakterini yansıtan gerilim-gerinim eğrileri elde edilebilir [58]. Şekil 1.19’da tipik bir gerilim-gerinim eğrisi görülmektedir.



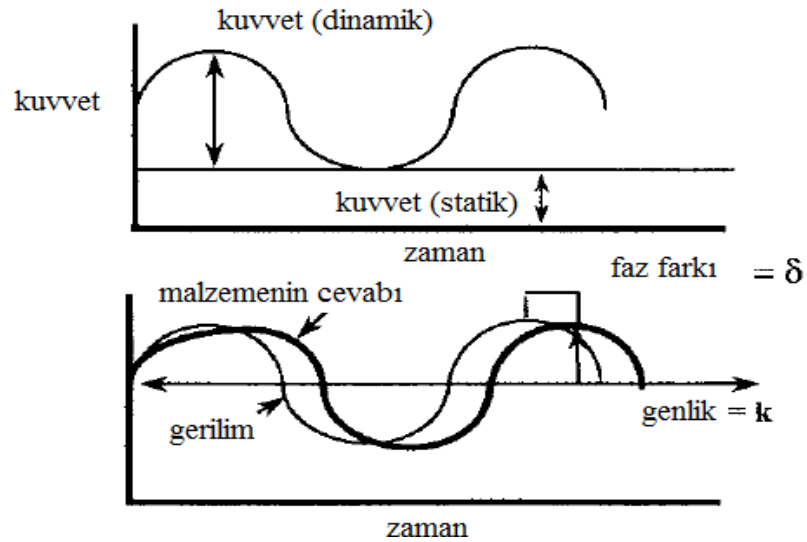
Şekil 1.19. Polimerik malzemeler için tipik bir gerilim-gerinim eğrisi [59]

Çekme hızı ve ortam sıcaklığı, çekme testinden elde edilecek sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir [53].

#### 1.6.4. Dinamik mekanik analiz (DMA)

Dinamik mekanik analiz (DMA) yöntemi, numune üzerinde döngüsel bir gerilimin uygulandığı dinamik bir tekniktir. Bu teknik ile numunenin gerilime, sıcaklığa ve frekansa karşı gösterdiği tepkiler ölçülür. DMA yöntemi ile belirlenmiş bir geometriye sahip numunenin, sinüsoidal deformasyon uygulanması prensibine göre faz geçişleri saptanabilmektedir. Ayrıca viskoelastik malzemelerin mekanik özellikleri sıcaklık, frekans ve zamana göre belirlenip, yapı-morfoloji ilişkisi hakkında bilgi alınabilmektedir [60].

Viskoelastik davranışı ölçmek için kullanılan yöntemlerden biri olan DMA'da numune gerilim kontrollü (stress-controlled) teste, ya da gerinim kontrollü (strain-controlled) teste tabi tutulur. Bilinen bir gerilim altında, belirlenmiş bir geometriye sahip numune belirli bir ölçüde gerinim gösterir. DMA yönteminde kuvvet sinüsoidal bir şekilde uygulanır ve numunenin ne kadar deformasyon göstereceği malzemenin sertliğine (direngenlik, rijitlik) bağlıdır [60]. Şekil 1.20'de DMA'da uygulanan kuvvetin zamana göre dağılımı şematik olarak verilmiştir.



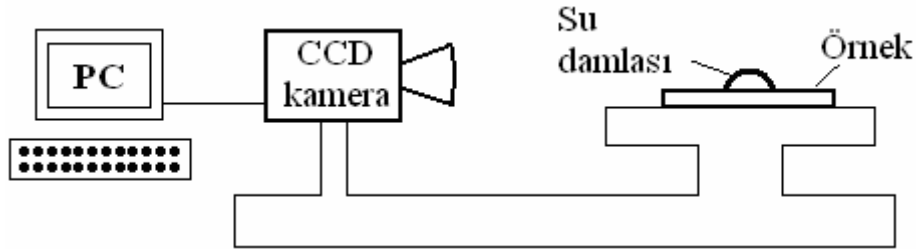
Şekil 1.18. DMA analizinde kuvvetin sinüsoidal salınımı [60]

Bir başka tanımla, DMA sertliği ve sönümü ölçer ve bu özellikleri modül ve sönüm (tan delta) değerleri ile takip eder. Ölçümler sinüsoidal kuvvet uygulanarak alındığı

için, modül iki bileşenden oluşur. Bunlar depo modül ve kayıp modül'dür. Depo modülü,  $E'$ , numunenin elastik davranışını gösterirken, kayıp modül ( $E''$ ) malzemenin viskoz davranışını belirtir. Kayıp modülün depo modülüne oranı ise sönümü, yani tan delmayı verir ( $\tan \delta = E''/E'$ ) [61].

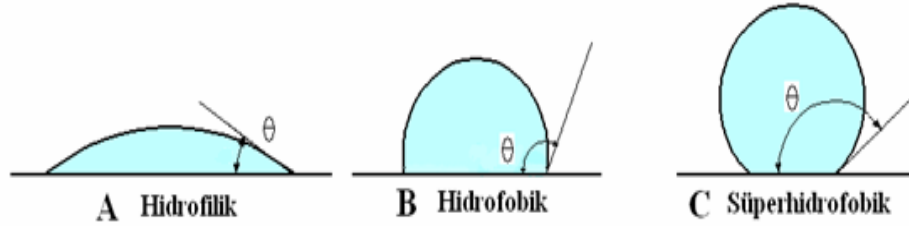
### 1.6.5. Yüzey temas açısı ölçümü

Temas açısı, katı yüzeylerin hidrofobikliğin ölçümü için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir ve bir katının bir sıvı tarafından ıslatılan miktarının nicel ölçüsü olarak tanımlanır. Bir katı yüzeyi ile temastaki bir sıvı yüzeyi bir açı oluşturur. Temas açısı adı verilen bu açının büyüklüğü, sıvının kendi molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri (kohezyon kuvvetleri) ile sıvı katı arası çekim kuvvetlerinin (adezyon kuvvetleri) göreceli büyüklüğüne bağlıdır. Kohezyon kuvvetlerinin büyüklüğü, adezyon kuvvetlerinin büyüklüğünden ne kadar fazla ise, sıvı katı arasındaki temas açısı da o denli büyük olur. Diğer bir ifade ile büyük bir temas açısı sıvı katı çekim kuvvetlerinin azlığının, küçük bir temas açısı ise bu kuvvetlerin büyük olmasının bir göstergesidir [62]. Şekil 1.21'de Temas açılarının ölçülmesi için kullanılan test düzeneği gösterilmiştir. Sıvı, katı yüzeyine damlatıldığında durgun hale geçmesi beklenir ve ondan sonra ölçülür. Doğru ve sağlıklı ölçümlerin yapılabilmesi için katı yüzeyinin düzgün olması gerekir [63].



Şekil 1.21. Temas açısı ölçümü [63]

Temas açısı değerinin  $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$  olduğu durumlarda sıvı katı yüzeyi ıslatmaktadır ve yüzey hidrofilik olarak adlandırılır. Yüzey hidrofobik özellik gösterdiğinde ise temas açısı değeri  $90^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$  arasında değişmektedir. Sıvının katı yüzey üzerinde neredeyse tam bir küre halinde durduğu durumda ise temas açısı değeri  $150^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$  arasındadır ve sıvı yüzeyi ıslatmamaktadır (Şekil 1.22) [64].



Şekil 1.22. Hidrofilik, hidrofobik ve süperhidrofobik yüzeylerde temas açısı

Temas açısını etkileyen en önemli faktörler katının yüzey enerjisi ve pürüzlülüğüdür. Yüzey enerjisi, yüzey gerilimi sonucu ortaya çıkmaktadır ve yüzey gerilimi düştükçe temas açısı değeri de düşüş göstermektedir. Yüzey pürüzlülüğünün artması ise hem hidrofobik hem de hidrofilik özelliklerin artmasına neden olmaktadır. Yüzey pürüzlülüğü olmadan ulaşılabilecek maksimum temas açısı hidrofobik bir yüzey için  $120^\circ$ 'yi geçmemektedir. Pürüzlülük yüzeyle su damlası arasında hava sıkışmasını sağladığı için yüzeyle damlacık arasındaki etkileşme miktarını düşürür ve böylelikle temas açısı hidrofobik yüzeylerde artış göstermektedir [64].

#### 1.6.6. Dondurarak kurutma ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yöntemi

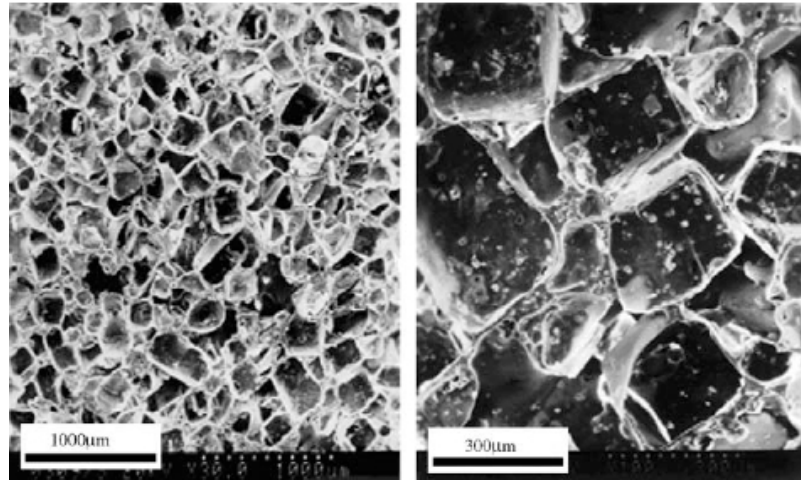
Doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelesi tasarımı ve üretimi çok önemli bir basamaktır. Çünkü doku iskelelerinin sahip olması gereken uygun gözeneklilik, yeterli mekanik dayanım gibi pek çok fiziksel özellik biyomalzemenin işleme yöntemine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca hasara özgü geometriye sahip doku iskelelerinin hazırlanması da hem seçilen biyomalzemenin uygunluğuna, hem de tercih edilen fabrikasyon yönteminin teknolojik altyapısına ve başarısına bağlıdır. Seramikler ve metaller işlenmesi ve şekil verilmesi zor malzemelerdir. Bu nedenle ancak yüksek sıcaklıklarda işlenerek, belirli geometrilerde doku iskelesi üretimi yapılmaktadır.

Polimerler ise kolay işlenebilir malzemelerdir. Bu nedenle polimerik doku iskelelerinin fabrikasyonuna yönelik olarak pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler; fiber bağlama, çözücü-dökümü/parçacık-uzaklaştırma, membran laminasyonu, eriyik kalıplama, ekstrüzyon, gaz köpüklendirme, faz ayrımı, elektro-eğirme, yerinde (in-situ) doku iskelesi üretimi, dondurarak kurutma, ısı kullanarak doku iskelesi üretimi, ışık kullanarak doku iskelesi üretimi, yapıştırıcı kullanarak



doku iskelesi üretimi, kalıp kullanarak doku iskelesi üretimidir. Bu metodlar uygulamaya göre ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kullanılırlar.

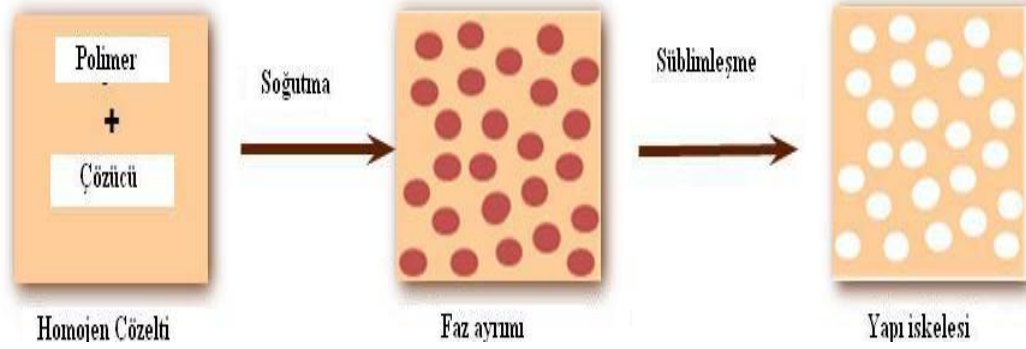
Çözücü-dökümü/parçacık-uzaklaştırma yöntemi ile gözenek boyutu ve gözeneklilik özellikleri kontrol edilebilen membran formundaki doku iskelelerinin üretimi mümkündür. Polimer uygun çözücü içinde çözüldükten sonra bu çözeltinin içine porojen adı verilen katı parçacıklar atılmaktadır. Tuz, şeker, jelatin ve parafin porojen olarak kullanılabilen malzemelerdir. 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 porojenin içinde çözüneceği herhangi bir çözücüyle etkileştirildiğinde porojen yapıdan uzaklaştırılır. Tuz, şeker ve jelatin için su; parafin için hekzan kullanılmaktadır. Bu işlem sonrasında porojenlerin terk ettiği bölgeler yapıda gözenek olarak kalmaktadır. Şekil 1.23'de görüldüğü gibi porojen geometrisi ve boyutu gözenek yapısına doğrudan yansımaktadır.



Şekil 1.23. Çözücü-dökümü/parçacık-uzaklaştırma yöntemiyle üretilmiş PLGA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri [65]

Dondurarak kurutma yöntem ile sünger formundaki gözenekli 3 boyutlu doku iskelelerinin üretimi için kullanılan bu yöntemde hazırlanan polimer çözeltileri uygun şartlar altında dondurulmakta, sonrasında liyofilizasyon cihazına yerleştirilmektedir. Düşük sıcaklıklarda, vakum altında çalıştırılan cihaz donmuş olan çözücünün süblimleşmesini ve daha sonrasında cihazın iç duvarlarında kristallenmesini veya yoğuşmasını sağlamaktadır. Hızlı bir şekilde kurutmanın

sağlandığı bu yöntem ile, doğal ve sentetik polimerlerden, mikro ve makro gözenekli yapıların elde edilmesi mümkündür [66]. Şekil 1.24'de polimer ve çözücüsü ile dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan gözenekli doku iskelesi görülmektedir.



Şekil 1.24 Dondurarak kurutma yöntemi ile polimer doku iskelesi oluşturma [67]

Bu iki yöntem beraber kullanıldığında daha kontrollü gözenek boyutu ve mekanik özellikler elde edilmektedir [67].

### 1.6.7. In vitro hücre kültürü ve sitotoksisite testi

#### 1.6.7.1. In vitro hücre kültürü

Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon edilerek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36°C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir.

Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültüre dilmesiyle elde edilir. Diş eti ve pulpa fibroblastları, primer kültür hücrelerine örnektir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlerle ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde

edilen ilk alt kùltùrlere sekonder hücre kùltürleri denir ve bir seri kùltür işlemlerinden sonra hücre hatları elde edilir. Fakat primer kùltürlerin insandan izole edilmesi ve kùltürünün yapılması oldukça zordur. Primer kùltürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıması farklıdır. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı in vivo özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları (L929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleridir (HeLa) [68].

### **1.6.7.2. Sitotoksisite testi**

Uygulanan materyalin hücrenin yaşamına olan etkisi biyoyumluluğu belirleyici etkindir. Sitotoksisite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır. Sitotoksisite testlerinde hücre kùltürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in vitro olarak değerlendirilmektedir. Sitotoksite testleri:

- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre membranı
- Hücre organelleri
- Protein veya DNA sentezi
- Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir.

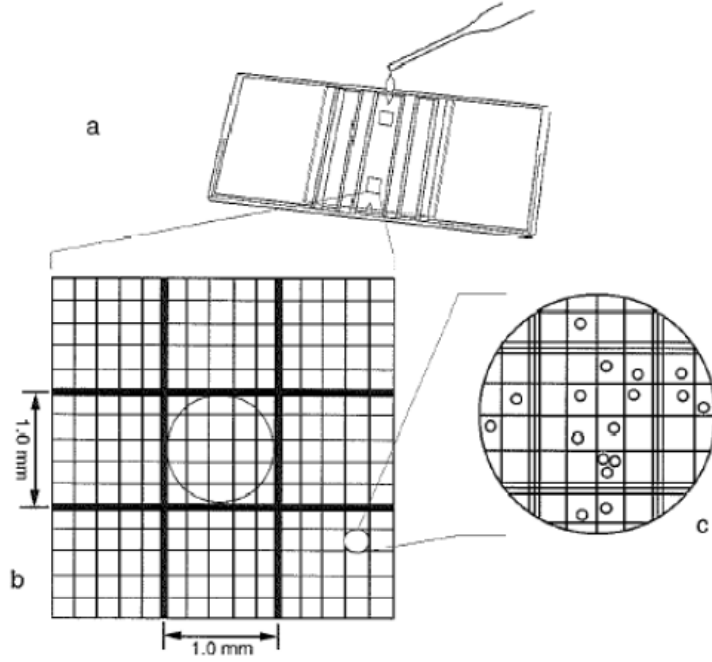
Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar:

- 1) Canlılık (viability) değerlendiren testler: Kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- 2) Yaşam (survival) değerlendiren testler: Uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- 3) Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler

4) Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleridir [68].

Bu çalışmada canlılık değerlendirme testi uygulanmış ve ‘‘Tripan mavisi testi’’ yapılmıştır. Tripan mavisi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde biriken bir boyadır. Hemositometre yardımı ile tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilir.

Öncelikle incelenecek hücreler tripan mavisi ile boyanır. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışarı atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyar. Hücreler, hematositometre olarak adlandırılan bir çeşit bölmeli lama damlatılır ve bunun üzerinde mikroskop altında tek tek sayılır. şekil 1.25’de hematositometre ve mikroskopta hücre sayımı gösterilmiştir.

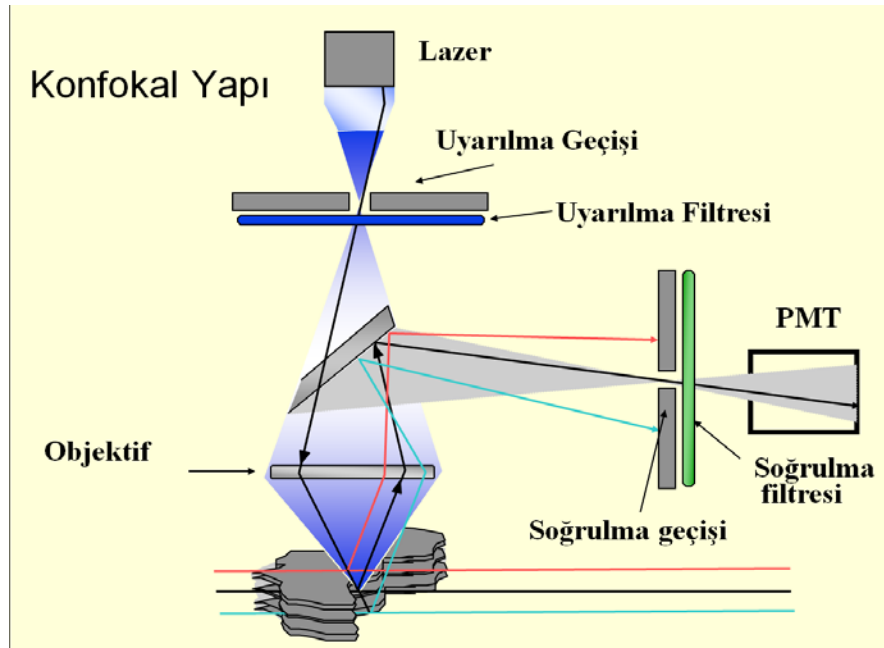


şekil 1.25. Hematositometre lamı ve hücre sayımı [69]

### 1.6.8. Lazer taramalı konfokal mikroskop

Lazer taramalı konfokal mikroskop (LTKM), günümüzde cisimleri üç boyutlu olarak izlemesinde kullanılan en önemli cihazdır. LTKM, fluoresan mikroskop esaslarına benzer şekilde çalışan bir mikroskop olup, burada aydınlatma kaynağı olarak lazer ışınları kullanılmaktadır.

LTKM'ta, objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. X-Y yansıtma mekanizması ile bu ışın, tarama ışınına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla floresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Optik kesit alma XY düzleminde veya XZ, YZ dikey düzlemlerinde gerçekleştirilebilir ve gerçek üç boyutlu veri setleri toplanabilir. Fokal düzlemlerden elde edilen optik kesit katmanları tekrar üst üste yapılandırılarak üç boyutlu görüntü üretilir. Şekil 1.26'da konfokal mikroskobun çalışma prensibi verilmiştir [70].



Şekil 1.26. Lazer taramalı konfokal mikroskop çalışma prensibi [70]

## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1. Malzemeler

Tablo 2.1’de deneysel çalışmada kullanılan malzemelerin genel özellikleri, kimyasal yapıları ve temin edildikleri firmalar belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Tez kapsamında kullanılan malzemelerin genel özellikleri, kimyasal yapıları ve tedarik edildikleri firmalar

	Malzeme	Temin Edilen Firma/Kaynağı	Kimyasal Yapısı	Genel Özellikleri
Polimer film elde etme	Termoplastik Poliüretan (TPU)	ESTANE 54351 NAT021		Yoğunluk: 1,16 g/cm <sup>3</sup> T <sub>g</sub> : -26,10 °C Çekme dayanımı: 42 MPa İşleme sıcaklığı: 200-210 °C Biyouyumlu, biyobozunur
	THF (tetrahidrofuran)	Merck KGaA (Almanya)		Safılık: 99% T <sub>e</sub> : -108,5 °C Yoğunluk: 0,89 g/cm <sup>3</sup> MA: 72.11 g/mol
	Atık Tavuk Tüyü (ATT)	Yerel kesimhane		T <sub>g</sub> : 232,8 °C
Doku iskelesi oluşturma	1,4-Dioxan	Merck KGaA (Almanya)		Safılık: 99% T <sub>e</sub> : 12 °C Yoğunluk: 1,03 g/cm <sup>3</sup> (20 °C) MA: 72.11 g/mol
	Tuz	Billur Tuz	NaCl	İri deniz tuzu

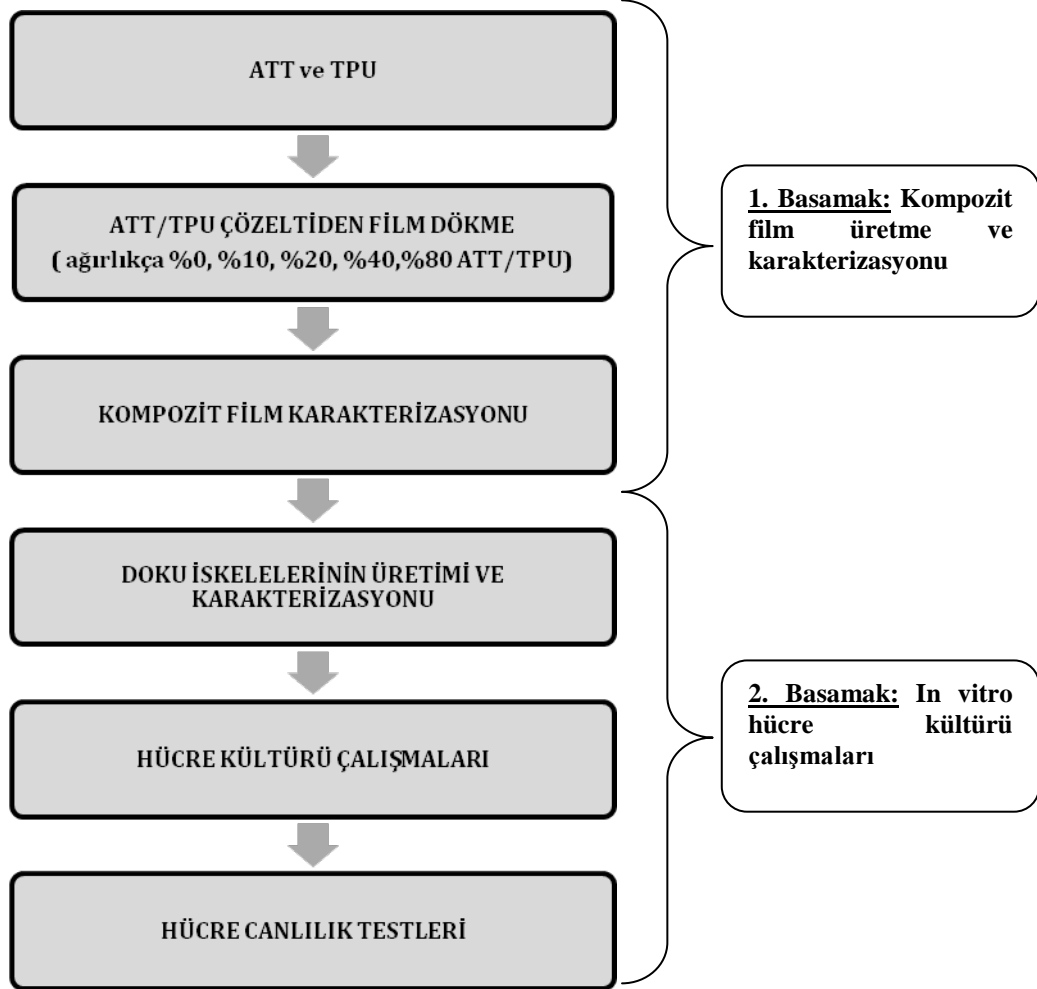
Tablo 2.1. Tez kapsamında kullanılan malzemelerin Hücre Kültürü çalışmaları kısmına ait olanların genel özellikleri, kimyasal yapıları ve tedarik edildikleri firmalar (devam)

	<b>Malzeme</b>	<b>Temin Edilen Firma</b>	<b>Genel Özellikleri</b>
<b>Hücre kültürü çalışmaları</b>	Yüksek Glikoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)	Sigma-Aldrich	Somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. Hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir.
	Fetal sığır serumu (FBS)	Sigma-Aldrich	Hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltisidir.
	L-glutamin (L-Glu)	Sigma-Aldrich	Hızla bölünen hücreler için alternatif bir enerji kaynağıdır. Stabil olmadığı için hücre kültür ortamı kullanılmadan hemen önce eklenmelidir.
	Penisilin-streptomisin içeren Alpha Minimal Essential Medium (P/S)	Sigma-Aldrich	İşlemler esnasında herhangi bir mikrobik kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılır.
	Tripsin	Sigma-Aldrich	Hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Hücrelerin tutunduğu ortam ile bağımlı kopararak hücreleri ayırmaya yarar.
	Tuzlu fosfat tamponu (PBS)	Sigma-Aldrich	Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. pH'ı olması gereken seviyede tutarak hücreler için uygun ortamı sağlar.

## 2.2. Yöntem

Tablo 2.2.'de çalışmada kullanılan yöntemlerin genel planı verilmiştir.

Tablo 2.2. Deneysel yöntemlerin aşamaları



### 2.2.1. Kompozit film ve doku iskeleleri üretimi

Bu bölümde; ATT/TPU kompozitlerinin önce film halinde üretilmesi sonra da ideal gözeneklilik oranına sahip doku iskelesi oluşturulması detaylı olarak verilmiştir.

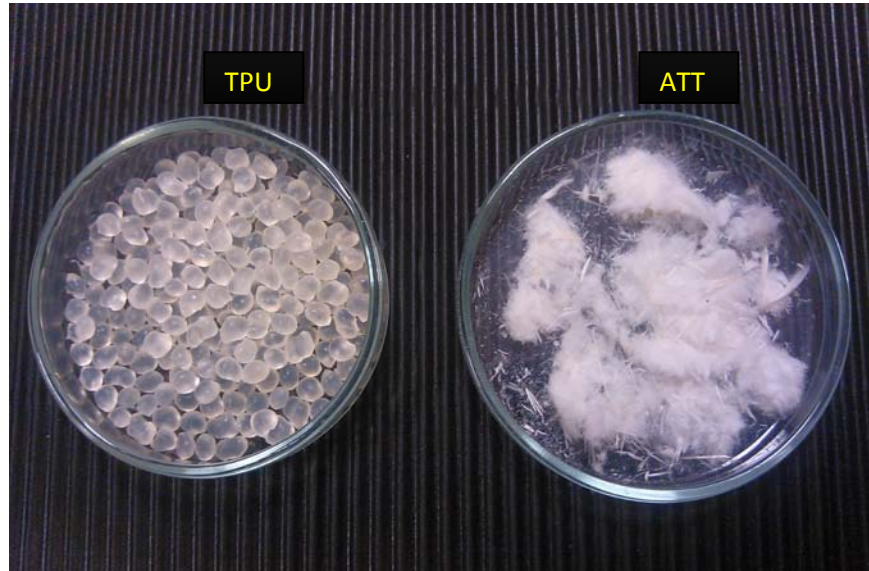
#### 2.2.1.1. Çözeltiden film dökme

Atık tavuk tüyleri (ATT), US005705030 patent [71] temel alınarak önce üzerindeki yağ dokusunun temizlenmesi için 1 saat %95'lik etanol ile yıkanmıştır. Sonra genel



sterilizasyon amacı ile 1 saat %75'lik etanol ile temizlenmiştir. 60°C sıcaklıkta etüvde kuruttuktan sonra ATT, BRAUN marka öğütücü ile 30 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen ATT boyutunu daha da küçültebilmek için, tavuk tüyü ve sap kısmından oluşan homojen karışıma kriyojenik parçalama uygulanmıştır. Kriyojenik parçalama, kriyojenik sıcaklıklarda yapılan dondurarak kırma prensibi ile uygulanan bir yöntemdir. Kriyojenik sıcaklıklar -273°C altındaki sıcaklıklardır ve en yaygın kriyojen sıvı azottur. Sıvı azot suya benzeyen berrak ve renksiz bir sıvıdır. Erime noktası -210°C, kaynama noktası -195,8°C'dir. Tümüyle buharlaşıp uçmasını önlemek için özel kaplarda saklanır. Bu kaplar özel olarak yapılmış büyük termoslardır ve bunları bulan kişinin adıyla 'Dewar' kapları olarak da anılır. Termostan alınan sıvı azot ile tavuk tüyü ve sap kısmından oluşan homojen karışım, kriyojenik olarak daha ufak parçalara ayrılmıştır. Karışım çok kısa sürede dondurularak, sıcaklığı saniyeden çok daha kısa bir sürede mutlak sıfır noktasına düşürülmüştür. Malzemeler donduktan sonra mekanik olarak parçalanmıştır.

Çözelti döküm tekniğiyle kompozit filmlerin üretimi için toplam ağırlık 5 gr olacak şekilde belirlenen oranlara göre TPU ve ATT tartılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. TPU ve ATT numuneleri

%20'lik TPU/THF çözeltisi hazırlanmış ve içerisine ATT eklenerek 6 saat karıştırılmıştır. Çözelti petri kabına dökülerek 48 saat oda sıcaklığında, 24 saat 40°C vakumda çözücünün uzaklaştırılması amacı ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda film petri kabından kaldırılarak polietilen poşetler içinde saklanmıştır. Şekil 2.1.'de

gösterildiği gibi çözelti petri kabına dökülerek kurutulmuş ve sonrasında kolayca kaldırılarak film halinde elde edilmiştir. Filmler isimlendirilirken % ağırlıkça oranları kullanılmıştır. Örneğin 20ATT/80TPU şeklinde gösterilen filmde %20 oranında ATT ve %80 oranında TPU olduğu anlaşılmaktadır. Şekil 2.2’de üretilen 10ATT/90TPU kompozit film örneği gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Çözeltiden dökme ile üretilen 10ATT/90TPU film

#### **2.2.1.2. Gözenekli doku iskelelerinin eldesi için dondurarak kurutma ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yöntemleri**

Toplam ağırlık 5 gr olacak şekilde % ağırlıkça saf TPU, 10ATT/90TPU, 20ATT/80TPU, 40ATT/60TPU ve 80ATT/20TPU filmler hazırlanmak üzere ATT ve TPU tartılmıştır. Dondurarak kurutma işlemi için literatürde belirtildiği gibi 5 gr PU, 53,5 gr dioksan ve 21,5 gr tuz ile çözülmüştür. Bu karışım miktarları göz önüne alınarak % oranlarına göre PU lar çözülmüş ve ATT eklenmiştir. Daha sonra çözelti karıştırılırken 1 ml distile su ilave edilmiştir. Bu işlemin amacı, çözücü olmaması özelliği ile soğuma esnasında sıvı fazların ayrışmasını hızlandırmaktır. En son tuz eklenerek çözelti mekanik olarak karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti petri kabına dökülerek dondurarak kurutma işlemi için 1-2 saat önceden -110°C sıcaklığa kadar soğutulan liyofilizatör cihazına koyulmuştur. Dondurarak kurutma işlemi 24 saat

sürdürülmüştür. Elde edilen doku iskelelerindeki tuz parçacıklarını uzaklaştırmak için iskeleler 24 saat saf su içerisinde mekanik olarak karıştırılmıştır. Üretilen saf TPU doku iskelesi Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Gözenekli doku iskelesi

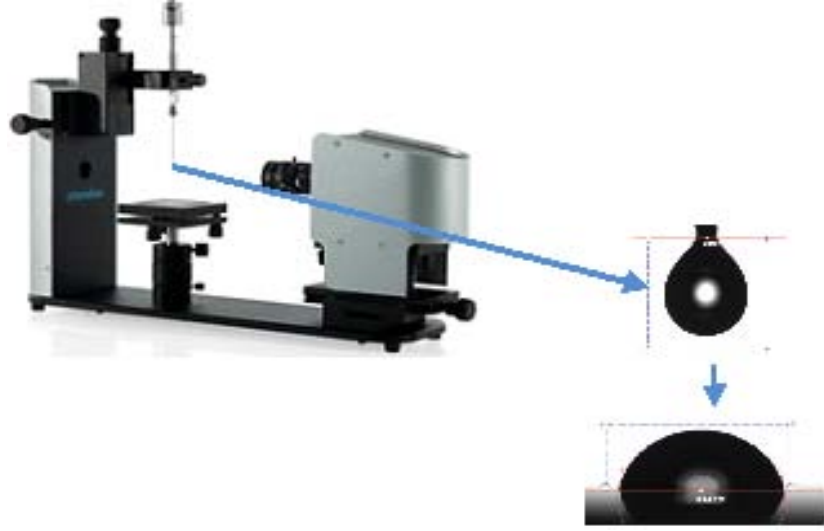
## **2.2.1. Kompozit filmlerin ve doku iskelelerinin karakterizasyonları**

### **2.2.2.1. Termal analiz**

Bu çalışmada, kompozit filmlerin ısı özelliklerini belirlemek amacıyla Mettler Toledo marka DSC1 model DSC cihazı kullanılmıştır. Taramalar -70 ile 350°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dk hızında yapılmıştır. Analizler esnasında sisteme süpürücü gaz olarak 20 ml/dk hacimsel akış hızında azot gazı beslemesi yapılmıştır. Yapılan analizlerin ardından paket program yardımıyla numunelerin  $T_g$  değerleri,  $T_m$  değerleri, erime entalpileri ve denatürasyon sıcaklıkları hesaplanmıştır.

### **2.2.2.2. Su temas açısı ölçümü**

ATT/TPU filmlerinin ıslatılabilirlik özellikleri su temas açısı ölçümleriyle belirlenmiştir. Su temas açısı değerleri, oda sıcaklığında, asılı damlacık yöntemiyle Attension Teta Lite cihazı ile ölçülmüştür (Şekil 2.4). Her ölçüm en az beş kez tekrar edilmiştir. Ortalama değerler rapor edilmiştir.



Şekil 2.4. Attension Teta Lite cihazı ve asılı damlacık yöntemi görüntüsü [72]

### 2.2.2.3. Mikroyapısal inceleme

ATT/TPU kompozit filmlerin mikro içyapıları, çekme testi ile kopan örneklerin yüzeylerinden JEOL JSM-6510 marka SEM cihazı ile yapılmıştır. İnceleme öncesi örnekler altın ile kaplanmıştır.

### 2.2.2.4. Çekme testi

Kompozit filmlerin çekme özellikleri Tinius Olsen marka ve H5KT model universal test cihazı ile 37°C sıcaklığındaki su banyosu içinde 5 mm/dk çekme hızı ile ASTM D882 standardına göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5). Paket program yardımıyla ATT/TPU filmlerin kopma dayanımı, kopma enerjisi ve kopmada uzama değerleri hesaplanmıştır. Her bir harmandan 10 numune test edilmiş ve ortalamaları test sonucu olarak kaydedilmiştir.



Şekil 2.5. 37 °C sıcaklığındaki su banyosu içinde yapılan film çekme testi

#### **2.2.2.5. Dinamik mekanik analiz (DMA)**

ATT/TPU kompozit filmlerin dinamik mekanik özellikleri, 01dB-Metravib marka DMA50 model DMA cihazı kullanılarak incelenmiştir. Ölçümler 37°C sıcaklıkta 1-200 Hz arasında frekans taraması ile yapılmıştır. Örneğin depo, kayıp ve kompleks modül değerlerinin frekans ile değişimi elde edilmiştir.

#### **2.2.2.6. Gözeneklilik analizi**

Doku iskelelerine ait % gözeneklilik değerlerinin belirlenmesi için, en az 15 yapı iskelesi örneği kullanılarak ölçüm ve hesaplamalar yapılmıştır. Öncelikle silindirik örneklerin yoğunluk ( $\rho_0$ ) ve görünür hacim ( $V_0$ ) değerleri ölçülmüştür.  $V_0$  değerleri, silindirik numunelerin hacimlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir. Farklı % ATT oranına sahip her bir doku iskelesinin yoğunluğu ( $\rho_0$ ), sıvıların kaldırma kuvveti prensibi ile çalışan Mettler Toledo PCE-ABZ 200C yoğunluk ölçümü cihazı ile tayin



edilmiştir. Buradan doku iskelesi örneklerinin görünür kütlesi ( $M_0$ ), polimer hacmi ( $V_0$ ) ile yoğunlukların çarpılması ile bulunmuştur;

$$M_0 = V_0 \times \rho_0 \quad (2.1)$$

Hassas terazi yardımı ile ölçülen  $M_{iskele}$  değerleri doku iskelesinin kütlesini vermiştir. İskelelerin görünür kütlelerinden ( $M_0$ ) doku iskelesinin gözenekli halinin kütlesi ( $M_{iskele}$ ) çıkarıldığında gözenekli kütle edilmiştir ( $M_{boşluk}$ );

$$M_{boşluk} = M_0 - M_{iskele} \quad (2.2)$$

Doku iskelesinde bulunan gözenek hacimi ( $V_{gözenek}$ ), eşitlik (2.2) ile hesaplanan gözenek kütlesinin, ölçülen yoğunluk değerlerine bölünmesi ile hesaplanmıştır;

$$V_{gözenek} = M_{boşluk} / \rho_0 \quad (2.3)$$

En son aşamada %-gözeneklilik değerleri, hesaplanan gözenek hacimlerinin görünür numune hacim değerleri ile orantılanması sonucu elde edilmiştir;

$$\% \text{ Gözeneklilik} = [V_{gözenek} / V_0] \times 100 \quad (2.4)$$

#### 2.2.2.7. Doku iskelelerinin mekanik özellikleri

Doku iskelelerinin mekanik özelliklerini belirlemek amacı ile Şekil 2.6'da gösterilen Lloyd Instruments TA plus Texture Analyser basma testi cihazı ile yapılmıştır. ATT katkı TPU doku iskeleleri, 15 mm çapta silindirler halinde kesilerek hazırlanmıştır. Analiz oda sıcaklığında 2mm/dk deformasyon hızında gerçekleştirilmiştir. Basma modülü %20 gerinim değeri esas alınarak hesaplanmıştır.



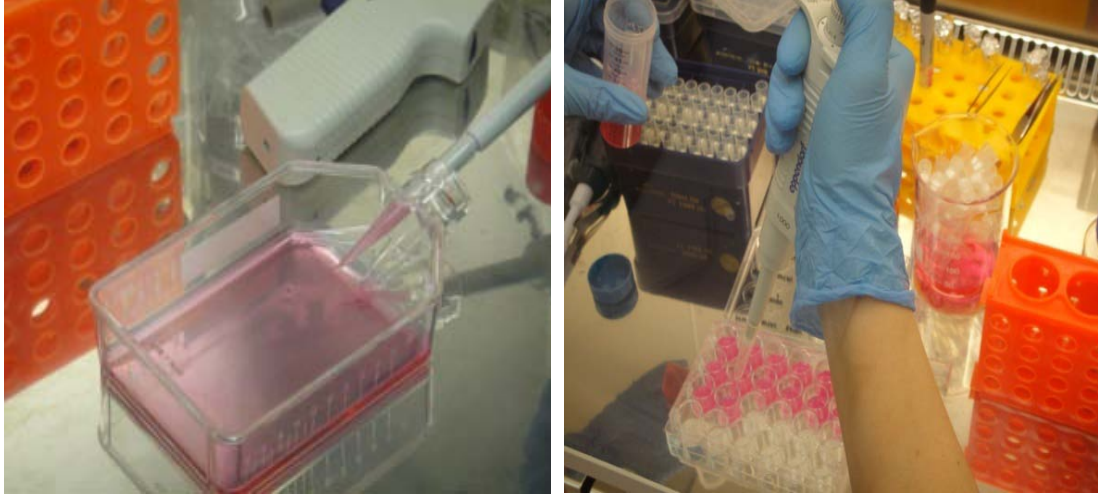
Şekil 2.6. Basma testi numuneleri

### 2.2.3. In vitro hücre kültürü ve sitotoksosite

Bu çalışmada L929 hücre hattı kullanılarak üretilen doku iskeleleri üzerinde hücre çoğalması araştırılmıştır. Ayrıca sitotoksosite testi ile de toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranı belirlenmiştir.

#### 2.2.3.1. Hücre kültürü

Çalışmada L929 fare fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır. Hücreler saklama ortamından çıkartıldıktan sonra 37°C deki su banyosunda çözdürmüş ve 10 dk 1500 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yüzeydeki süpernatant kısım atılmıştır. Çöktürülen hücreler, 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda içinde %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyeri içeren büyüme ortamında 37°C'de inkübe edilerek (inkübasyon koşulları: %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>) çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelere pasajlama yapılmış, her yeni pasajlamada hücreler 1:2 oranında seyreltilerek flasklara aktarılmıştır. Kültür ortamındaki hücreler %70 oranında çoğalmaya ulaşıncaya dek (yaklaşık 4 gün) bu işlem sürdürülmüştür. Hücreler kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra flask yüzeyinden (hücre ekimi yapılan yüzey) hücreleri ayırmak amacıyla tripsin/etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Bu aşamada çoğaltılan hücreleri ortamından ayırmak ve yapı iskeleleri üzerine ekime hazırlamak hedeflenmiştir. Tripsin-EDTA solüsyonu ile yıkanan hücreler 10 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması hızlandırılmıştır. Bu süre sonunda kültür kabından ayrılan hücreler 10 dk 1500 rpm devirde santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Doku iskelelerinin üzerine ekim yapabilmek için yeniden 9 mL yüksek glikozlu DMEM, 1 mL FBS, 140 µL L-Glu ve 100 µL P/S içeren besi ortamı hazırlanmıştır ve çöktürülerek elde edilen hücreler bu besi yeri ile beraber ekime hazır hale getirilmiştir. . Elde edilen hücre süspansiyonu herbiri 1.5 cm çapa sahip 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarında, hücre yoğunluğu 10<sup>5</sup> hücre/doku iskelesi olacak şekilde 1.5 cm çapındaki doku iskelelerine ekilmiştir. Şekil 2.7'de hücrelerin flask yüzeyinden toplanması ve doku iskeleleri üzerine hücre ekimi gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Çoğaltılan hücrelerin flask yüzeyinden toplanması ve doku iskeleleri üzerine hücre ekimi

Hücre ekimi yapılan doku iskeleleri %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 72. ve 120. saatlerde hücre çoğalmasını (proliferasyon) kanıtlamak için iskeleler inkübatörden alınarak analizlere hazır hale getirilmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminer akış kabininde yürütülmüştür.

#### **2.2.3.2. Doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi**

L929 hücrelerinin doku iskeleleri üzerindeki morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin incelenmesi için hücre kültürü ile hücre ekilen saf TPU, 20TPU/80ATT ve 80TPU/20ATT doku iskeleleri SEM ile analiz edilmiştir. Hücre kültürünün 72. ve 120. saatlerinde iskeleler kültür ortamından alınarak hafifçe PBS ile yıkandıktan sonra hücreleri sabitlemek için 0.1 M PBS (pH=7.4) içerisindeki %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 1 gece +4°C sıcaklıkta muamele edilmiştir. Sonrasında artan konsantrasyonlarda ( %15, 30, 50, 70 v\|v) etanol çözeltileri hazırlanarak iskelelerin dehidrasyon işlemi yapılmıştır. Sabitlenen hücrelerin bulunduğu dehidre edilen iskeleler en son işlem olarak distile su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutularak incelemeye hazır hale getirilmiştir. Analiz öncesi altın ile kaplanan hücre ekimi yapılmış saf TPU, 20TPU/80ATT ve 80TPU/20ATT doku iskeleleri JEOL JSM-6060 marka SEM cihazı ile analiz edilmiştir.



### **2.2.3.3. Doku iskelelerinin lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelenmesi**

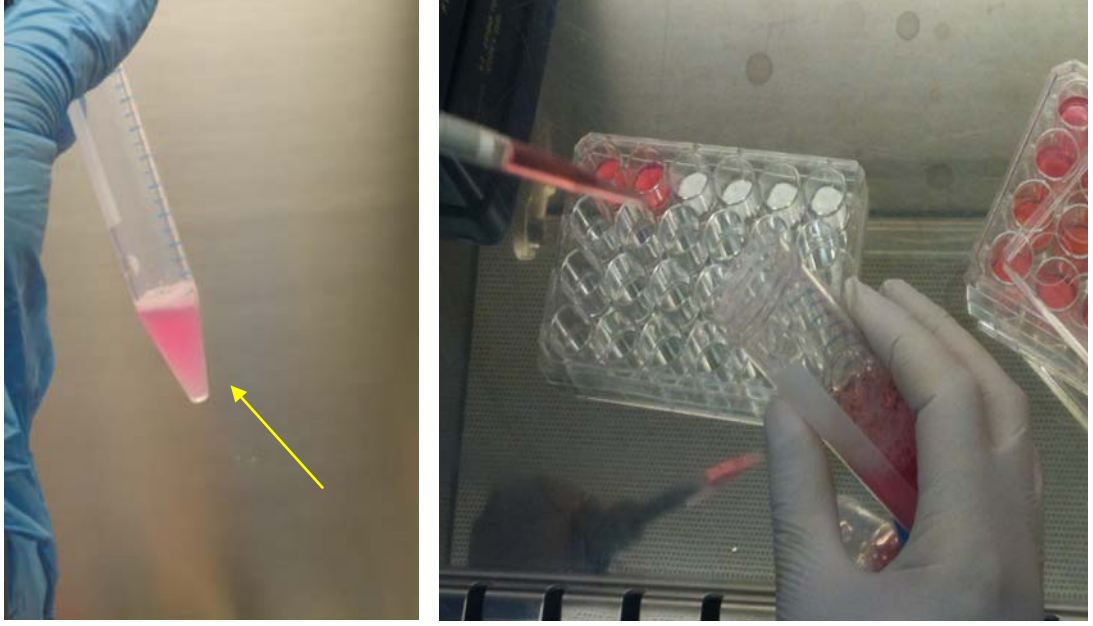
ATT/TPU doku iskelelerinin üzerinde tutunan ve çoğalan hücrelerin morfolojik özellikleri Zeiss LSM 510 marka lazer taramalı konfokal mikroskop ile analiz edilmiştir. Analiz öncesinde 24 gözlü kültür kabında saf TPU, 20ATT/80TPU, ve 80ATT/20TPU doku iskeleleri üzerinde 72. ve 120. saatlerde kültürasyonu gözlenen L929 hücre hatt, formaldehit çözeltisi (113 µL FA ve 1000 µL PBS) ile 20 dakika sabitleme (fiksasyon) protokolüne uygun olarak 45 dakika çözeltide bekletilerek sabitlenmiştir. Daha sonra doku iskeleleri sırası ile 5'er dakika PBS, NH<sub>4</sub>Cl, tekrar PBS ve Triton X100 çözeltilerinde bekletilmiştir. Triton X100, uzun süre hücrelere temas ettiğinde zarar verebileceğinden iskeleler hemen sonrasında üç kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Sonrasında iskele üzerine sabitlenmiş hücreler primer antikor olan vimentin antikoruna ile 1 saat muamele edilmiştir. İkinci antikor ile boyamaya geçmeden önce iskeleler 5'er dakika PBS ile yıkanarak fazla olan vimentin boyası alınmıştır. İkinci antikor olan teksas red ile doku iskeleleri karanlık ortamda 1 saat muamele edilerek hazırlanmıştır. En son aşamada tüm fazla kimyasalları arındırılmak için PBS ve distile su ile yıkanan ATT/TPU doku iskeleleri görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.

### **2.2.3.4. Sitotoksosite testi**

Hücre sitotoksosite testi, hücre kültürünün 72. ve 120. saatlerinde tripan mavisi boyası (Biochrom ®) canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

L929 fare fibroblast hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) içinde başlangıç hücre sayısı 120.000 hücre/ mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Örneklerin üzerine hücre ekimi yapıldıktan sonra 72. ve 120. saatlerde disklerin üzerinde kalan hücre ve besiyeri süspansiyonu alınarak 10 dk 1500 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Şekil 2.8'de L929 hücrelerinin çöktürülerek elde edilmesi ve doku iskeleleri üzerine sitotoksosite testi için hücre ekimi yapılması gösterilmiştir.



Şekil 2.8. L929 hücrelerinin çöktürülmesi ve hücre ekimi

Daha sonra yüzeydeki süpernatant kısım atıldıktan sonra çökeltideki hücreler tripan mavisi kullanılarak boyanmış, böylelikle disklerin üzerinde kalan, canlı olmayan veya tutunamayan hücrelerin sayımları yapılmıştır.

Sonraki aşamada hemositometre lamı yardımı ile mikroskop altında koyu mavi renge boyanmış hücreler sayılarak canlı olmayan hücrelerin oranı tespit edilmiştir.

Canlı ve doku iskelelerine tutunan hücre sayıları bu oranlar temel alınarak hesaplanmıştır ve grafiğe dökülmüştür.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanan ATT/TPU kompozit doku iskelelerinin üretimi, karakterizasyonu ve in vitro ortamda yürütülen hücre kültür çalışmaları ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Bu kısım, “kompozit film üretimi ve karakterizasyonu” ve “kompozit doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonu” olmak üzere iki ana başlık altında toplanmış, “hücre kültürü çalışmaları” ise ayrı bir başlık altında verilmiştir. Hazırlanan kompozit film bileşimleri ve kodları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hazırlanan karışımların kodları ve bileşimleri

Karışım kodu	ATT miktarı (%)	TPU miktarı (%)
TPU	0	100
10ATT/90TPU	10	90
20ATT/80TPU	20	80
40ATT/60TPU	40	60
80ATT/20TPU	80	20

#### 3.1. Kompozit film üretimi ve karakterizasyonu

##### 3.1.1. Kompozit film üretimi

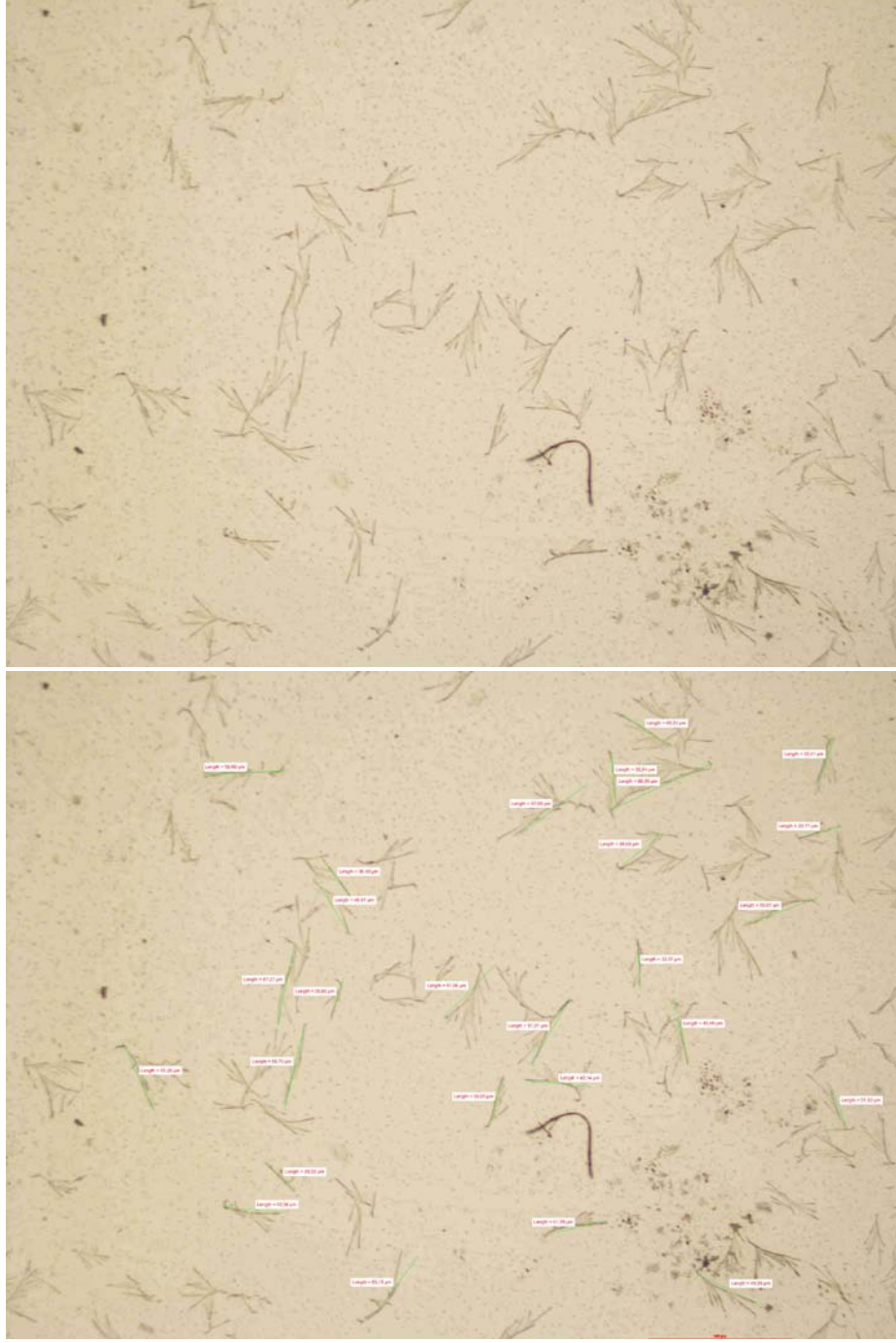
Sunulan çalışmada öncelikle çözültiden dökme tekniği ile farklı oranlarda atık tavuk tüyü (ATT) içeren ATT/TPU biyokompozit film örnekleri üretilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda, farklı ATT oranlarına sahip polimer filmlerin üretiminde PCL temelli TPU için THF, toluen ve kloroform olmak üzere üç farklı çözücü denenmiştir. Bu çözücüler çözünürlük parametrelerinin, PCL’nun çözünürlük parametresine olan yakınlıkları nedeniyle tercih edilmiştir. Tablo 3.2’de çözücüler ve PCL için çözünürlük parametreleri ile gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Çözücüler ve çözünürlük parametreleri [73]

Malzeme	Çözünürlük Parametresi $\delta$ , ((cal/cm <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> )
PCL	9,20
THF	9,48
Kloroform	9,29
Toluen	8,90

THF kullanılarak hazırlanan çözeltilerde TPU'nun daha kısa sürede çözüldüğünü söylemek mümkündür. Bu sebeple çözücü olarak THF seçilmiştir. Literatürde de PCL temelli doku iskelelerinin hazırlanmasında THF'in kullanıldığı çalışmalara rastlamak mümkündür Tang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farklı çözeltiler kullanarak, çözücü döküm yöntemiyle PCL filmler üretmiştir. PCL çözeltileri, kloroform ve THF kullanılarak hazırlandığında, tam çözünme gerçekleşmiştir [74]. Çözeltiden dökme tekniğiyle üretilen filmlerin kalınlığı, ATT oranı ile doğru orantılı artış göstererek 0,2-0,6 mm mertebesinde elde edilmiştir.

Ortalama ATT fiber boyunun eldesi için yaklaşık 150 fiber üzerinde yapılan analizlerde ortalama fiber boyunun 48,7 µm olduğu tespit edilmiştir. İncelemede en uzun liflerin uzunluğu 100 µm civarında ölçülmüştür. Şekil 3.1'de yapılan inceleme sırasında elde edilen fotoğraflardan biri örnek olarak gösterilmektedir.

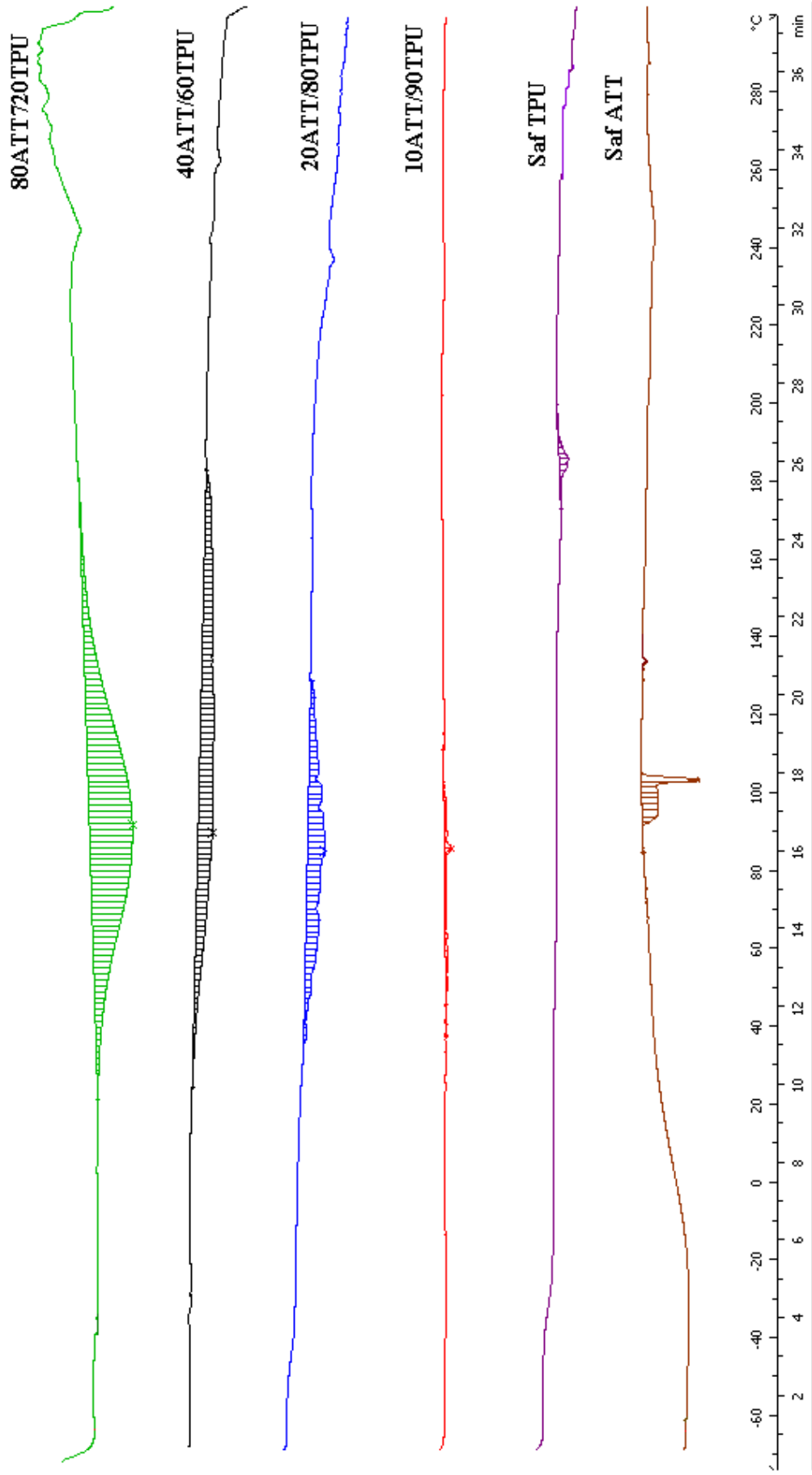


Şekil 3.1. ATT fiberlerin uzunlukları

### **3.1.2. Kompozit filmlerin karakterizasyonu**

#### **3.1.2.1. Isıl özellikler**

Çalışmanın bu kısmında ATT oranının, ATT/TPU kompozitlerinin ısıl geçişlerine etkisi tartışılmıştır. ATT/TPU kompozit filmlerin ısıl özellikleri DSC yöntemiyle belirlenmiştir.  $T_g$  ve  $T_m$  değerleri, erime entalpileri ve denatürasyon sıcaklıkları paket program yardımı ile belirlenmiştir. Şekil 3.2’de ATT/TPU kompozitlerinin, saf TPU ve saf ATT’nin DSC termogramları beraber verilmiştir.



Şekil 3.2. DSC termogramları

DSC analizleri sırasında ATT/TPU kompozitlerinde ATT miktarındaki artış ile 230 °C üzerinde keratinin denatürasyonu başlamıştır ve bu sebeple ağırlık değişimleri meydana gelerek temel çizgide (base-line) kaymalar gözlenmiştir [75].

Tablo 3.3. Isıl özellikler

	$T_g$ (°C)	$T_{su\ kaybi}$ (°C)	$\Delta H_{su\ kaybi}$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)
Saf TPU	-40,9	-	-	176,6	2,41
10ATT/90TPU	-41,1	14,7-116,9	23,1	-	-
20ATT/80TPU	-48,1	22,2-105,9	41,2	-	-
40ATT/60TPU	-41,8	115,8-126,7	34,1	-	-
80ATT/20TPU	-46,5	41,7-135,9	78,8	-	-
Saf ATT	232,8	98,5-101,1	99,9	-	-

Tablo 3.3’de görüldüğü gibi saf TPU’nun  $T_g$  değeri -40,9°C olarak belirlenmiştir. ATT miktarındaki artış ile  $T_g$  değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Saf ATT’nin  $T_g$  değeri ise 232,8 °C olarak bulunmuştur. Bu bulguyu destekler nitelikte literatürde de örnekler bulunmaktadır [76]. Yapılan çalışmalara göre tavuk tüyünün  $T_g$  değerinin 235 °C civarında olması keratinin alfa heliks yapısının birbirine sıkı bir şekilde bağlı olduğunu göstermektedir. Böylece tavuk tüyü daha fazla miktarda su tutabilmektedir. Şekil 3.2’de verilen DSC termogramlarına bakıldığında bu yargının desteklendiği görülmektedir. Saf ATT’nin ısıl özelliklerine incelendiğinde su tutma özelliği dikkat çekmiştir. ATT oranındaki artış ile su kaybının gerçekleştiği sıcaklık aralığında artış olmuştur (Tablo 3.3). Benzer şekilde entalpi değerlerinde de %10, 20, 40 ve 80 ATT içeren kompozitlerde saf TPU ya göre belirgin bir oranda artış gözlenmiştir. 80ATT/20TPU’da su kaybı saf TPU ya göre yaklaşık 40 kat fazla olmuştur. Bu sonuçlar ATT’nin büyük ölçüde su tutma özelliğine sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir.



Çalışmada, 230°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda keratin denatüre olmakta ve DSC termogramlarında denatürasyona ilişkin çeşitli endotermiler gözlenmektedir. Saf TPU'nun  $T_m$  değeri 176,6°C bulunmuştur. ATT ilavesi ile erime ve denatürasyon ardı ardına olmaktadır ve  $T_m$  endotermi ayırt edilmemiştir. 10ATT/90TPU'nun DSC termogramında denatürasyon sıcaklığı 233,3 civarında iken 80ATT/20TPU'da 240,6 civarındadır. Bu bulgular ışığında, 230°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda başlayan denatürasyon sırasında alfa heliks yapısının bozularak malzemenin daha amorf bir yapıya geçtiği düşünülmüştür. Benzer bulgular literatürde de bulunmaktadır [21,76-78].

### 3.1.2.2. Mekanik özellikler

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskelesinin yeterli mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Doku iskelelerinin in vitro kültür sırasında ve implantasyondan sonra vücut içinde maruz kalacağı yüklere dayanacak kadar güçlü olması gerekmektedir [8,9].

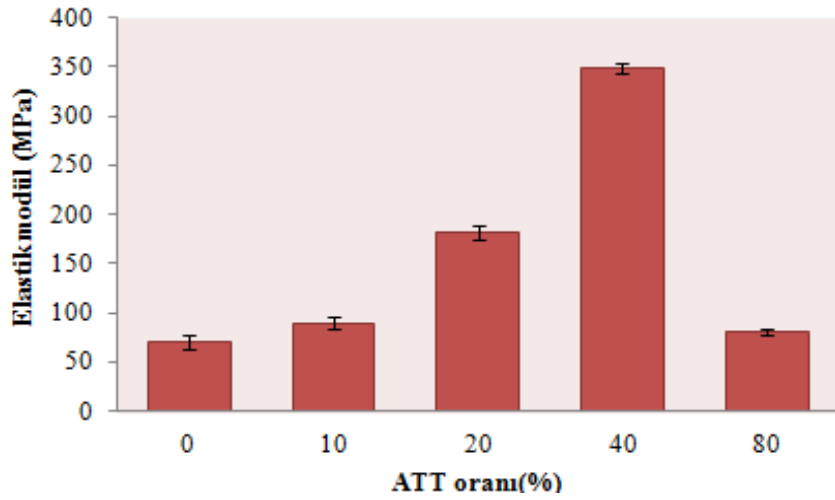
ATT/TPU kompozit filmlerinin mekanik özellikleri çekme testi sırasındaki davranışları ile belirlenmiştir. Standartlara uygun ölçüde papyon (dog-bone) şeklinde hazırlanan numuneler çekme testine tabi tutulmuştur. Elastik modül, çekme dayanımı ve gerinim değerleri hesaplanarak kıyaslanmıştır. Şekil 3.3'de 80ATT/20TPU çekme testi numunesi gösterilmiştir.



Şekil 3.3. 80ATT/20TPU çekme testi numunesi (dog-bone)

Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, saf TPU elastomerik karakteri sebebiyle düşük modüllü bir polimerdir. Bu matrise ATT ilavesi ile TPU'ya kıyasla elastik modül değerinde artış gözlenmektedir. ATT miktarındaki artış ile %40 ATT bileşimine kadar modül doğrusal olarak artmaktadır. Bu artış karışım kuralı ile açıklanabilir. Zayıf modüllü bir matris olan TPU'ya, ondan modülü daha yüksek olan ATT ilave edildiğinde elde edilen kompozitin modülü, ilave edilen elyafın hacim kesri oranında artmaktadır [79]. Ancak %80 elyaf oranı gibi yüksek bir yükleme oranına çıkıldığından TPU sürekliliğini yitirdiğinden modül değeri düşmektedir.

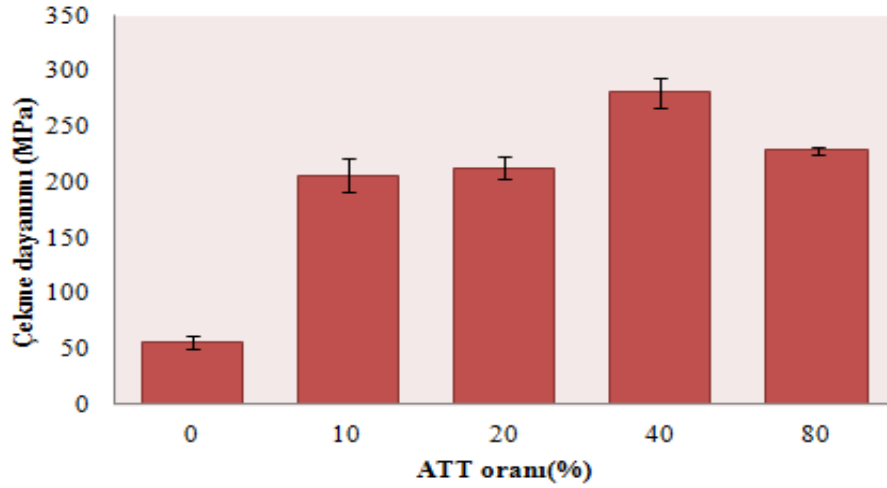
Yapılan çalışmalara bakıldığında tavuk tüyünün elastik modülü 0.045 GPa ile 10 GPa (45-10000 MPa) arasında elde edilmiştir [80]. Literatüre göre insan derisinin Young Modül değeri ise 15-150 MPa arasındadır [7]. Elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırılırsa üretilen ATT/TPU kompozitlerinin deri doku mühendisliğinde kullanılabilceği söylenebilir.



Şekil 3.4. ATT/TPU kompozitlerinde elastik modül değerlerinin ATT oranı ile değişimi

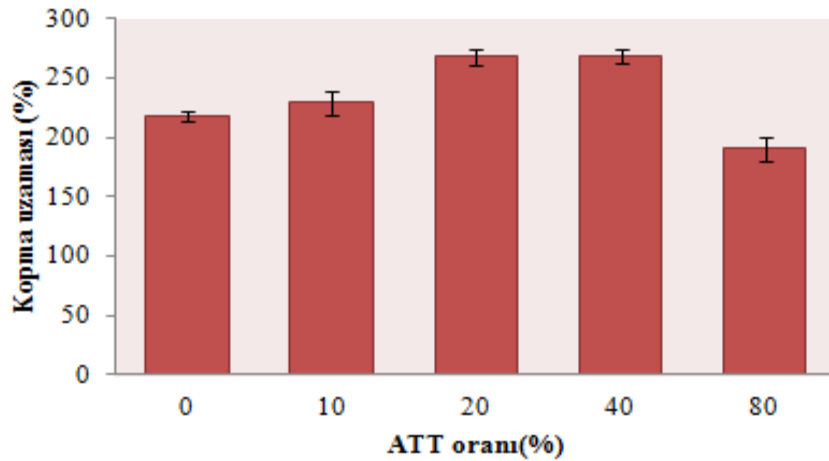
Saf TPU'nun çekme dayanımı değeri 50,9 MPa olarak ölçülmüştür (Şekil 3.5). Literatürde tavuk tüyünün çekme dayanımı 100-200 MPa olarak verilmiştir [81]. ATT ilavesi ve oranının artması ile çekme dayanımı değeri de artmıştır. Bu artış %40 ATT içeren kompozitlerde 4 kata varmaktadır. Elyaf takviyeli kompozitlerde çekme dayanımı elyaf ile matris ara yüzeyindeki yapışmanın derecesi ile alakalıdır. İyi bir ara yüzey etkileşimi, güçlü bir yapışmaya ve dolayısıyla yüksek bir çekme dayanımına sebep olmaktadır [82]. ATT ile TPU arasında bir etkileşim olduğuyla

ilgili ilk bulgular ısıl özellikler kısmında ifade edilmiştir (Bölüm 3.1.2.1). Bu etkileşim sebebiyle, ATT ilavesiyle kompozitlerde yüksek çekme dayanımı değerlerine ulaşılabilmiştir. Benzer şekilde, literatürde tavuk tüyü ile desteklenen PLA kompozitlerinin mekanik özelliklerinin de ATT oranı arttıkça iyileştiği gösterilmiştir [76].



Şekil 3.5. ATT/TPU kompozitlerinde çekme dayanımı değerlerinin ATT oranı ile değişimi

Şekil 3.6'da, ATT/TPU kompozitlerinin kopmadaki uzama değerleri görülmektedir. ATT ilavesiyle kopmadaki uzama değerleri hafifçe artmakta, ancak bu artış %40 ATT yüklemesinden sonra düşmektedir.

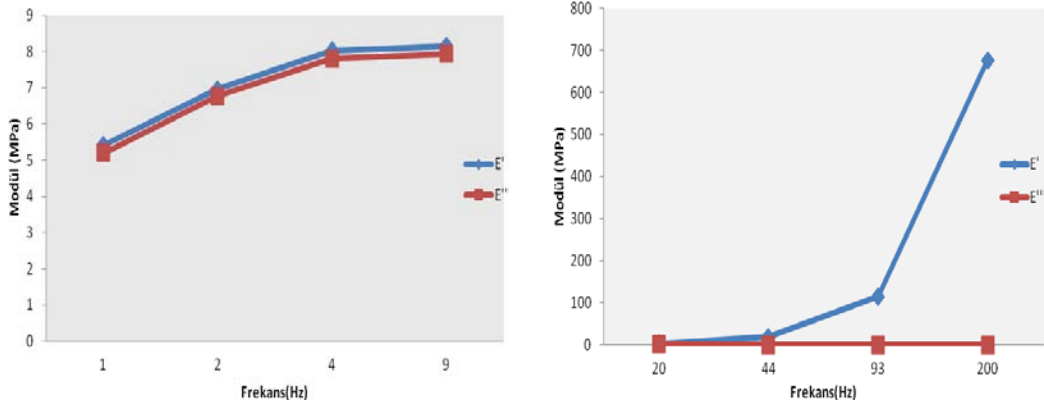


Şekil 3.6. ATT/TPU kompozitlerinde kopmadaki uzama değerlerinin ATT oranı ile değişimi

### 3.1.2.3. Dinamik mekanik analiz (DMA)

ATT/TPU kompozit filmlerin dinamik mekanik özellikleri 37°C sabit sıcaklıkta 1-200 Hz arasında frekans taraması yapılarak belirlenmiştir. Örneklerin depo ve kayıp modülleri kullanılarak kompleks modülleri hesaplanmıştır. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi ATT/TPU kompozit filmlerinin dinamik mekanik analiz sonuçları incelendiğinde elastik özellikleri gösteren depo modül  $E'$  ve viskoz özellikleri gösteren kayıp modül  $E''$  değerleri 0-10 Hz arasında beraber artış göstermiştir. Bu sonuçlar, filmlerin elastik özelliklerinin ve viskoz özelliklerinin birlikte arttığı ve enerjinin hem iç enerji olarak depolandığı hem de ısıya dönüştüğü şeklinde yorumlanmıştır. Ancak 20-200 Hz arasındaki sonuçlara bakıldığında farklı bulgular elde edilmiştir. Saf TPU, 10ATT/90TPU kompozit filmlerinin 20-200 Hz arasında kayıp modül değerlerinde değişme göstermezken, elastik modül değerlerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Benzer şekilde 20ATT/80TPU, 40ATT/60TPU ve 80ATT/20TPU kompozit filmlerinin analiz sonuçlarına bakıldığında kayıp modül değerlerinde bir miktar azalma gözlenirken elastik modül değerlerinde büyük ölçüde artış görülmüştür.

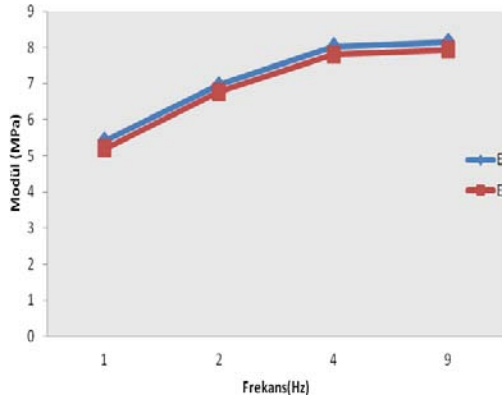
Bunun sebebi yüksek frekanslarda ortaya çıkan enerji iç enerji olarak depolanmıştır ve ATT/TPU filmlerinin elastik özelliklerinde artış şeklinde açıklanabilir.



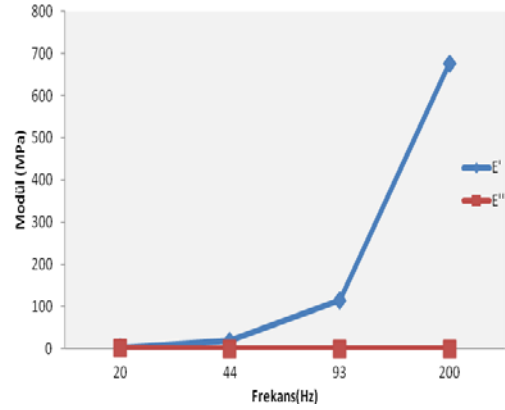
(a1)

(a2)

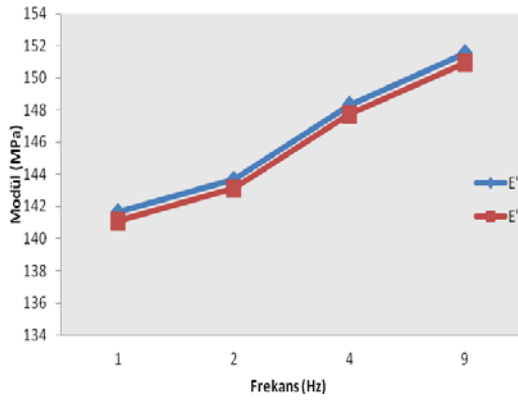
Şekil 3.7. TPU/ATT kompozitlerinin dinamik mekanik özellikleri: (a) Saf TPU ( $E'$ :depo modülü ve  $E''$ : kayıp modülü)



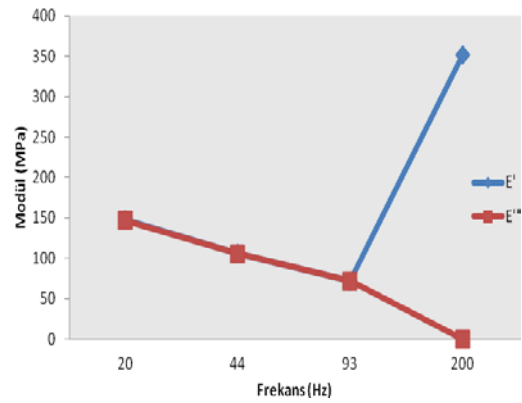
(b1)



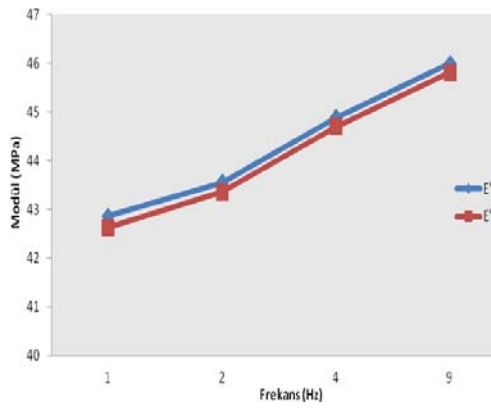
(b2)



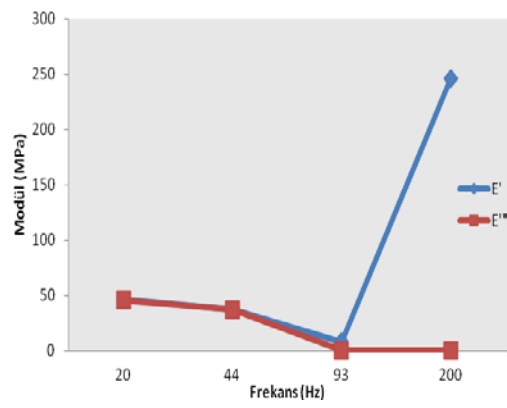
(c1)



(c2)

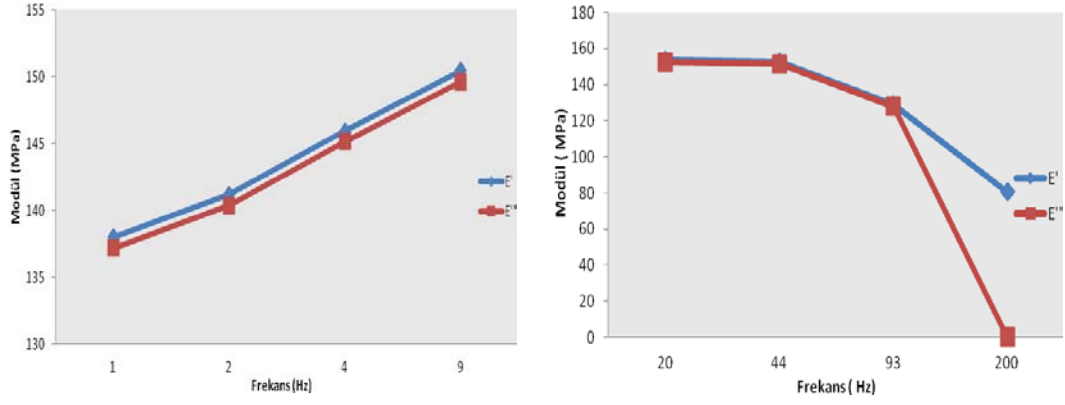


(d1)



(d2)

Şekil 3.7. (devam) TPU/ATT kompozitlerinin dinamik mekanik özellikleri (b) 10ATT/90TPU, (c) 20ATT/80TPU, (d) 40ATT/60TPU, (E':depo modülü ve E'': kayıp modülü)



(e1)

(e2)

Şekil 3.7. (devam) TPU/ATT kompozitlerinin dinamik mekanik özellikleri (e) 80ATT/20TPU (E':depo modülü ve E'': kayıp modülü)

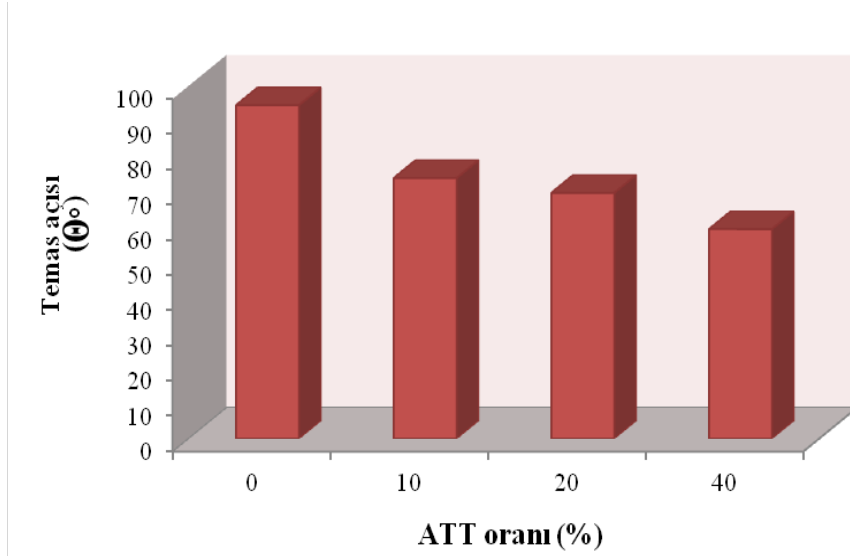
Deri doku mühendisliğinde kullanılacak ATT/TPU kompozit filmleri düşük frekanslardaki özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Buna sebep olarak, insan vücudunda meydana gelen hareketler veya maruz kalınan etkiler genellikle 0-10 Hz arasındadır. Benzer şekilde poliüretan doku iskeleleri ile yapılan doku mühendisliği çalışmaları da aynı yönde olmuştur [83]. Bu sonuçlar ışığında ATT/TPU kompozit filmlerinin kompleks modül değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.4. ATT/TPU kompozitlerinin frekansa bağlı kompleks modül (E\*) değerleri

E* (MPa)					
Frekans(Hz)	%0 ATT	% 10 ATT	% 20 ATT	% 40 ATT	% 80 ATT
1	7,5	11,1	199,9	194,6	60,4
2	9,7	13,6	202,8	199,1	61,4
4	11,2	15,6	209,3	205,8	63,3
9	11,4	16,3	213,9	212,2	64,9

#### 3.1.2.4. Yüzey hidrofilitesi

ATT/TPU kompozit filmlerinin yüzey su severlik özellikleri su temas açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Temas açısının bileşim ile değişimi Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



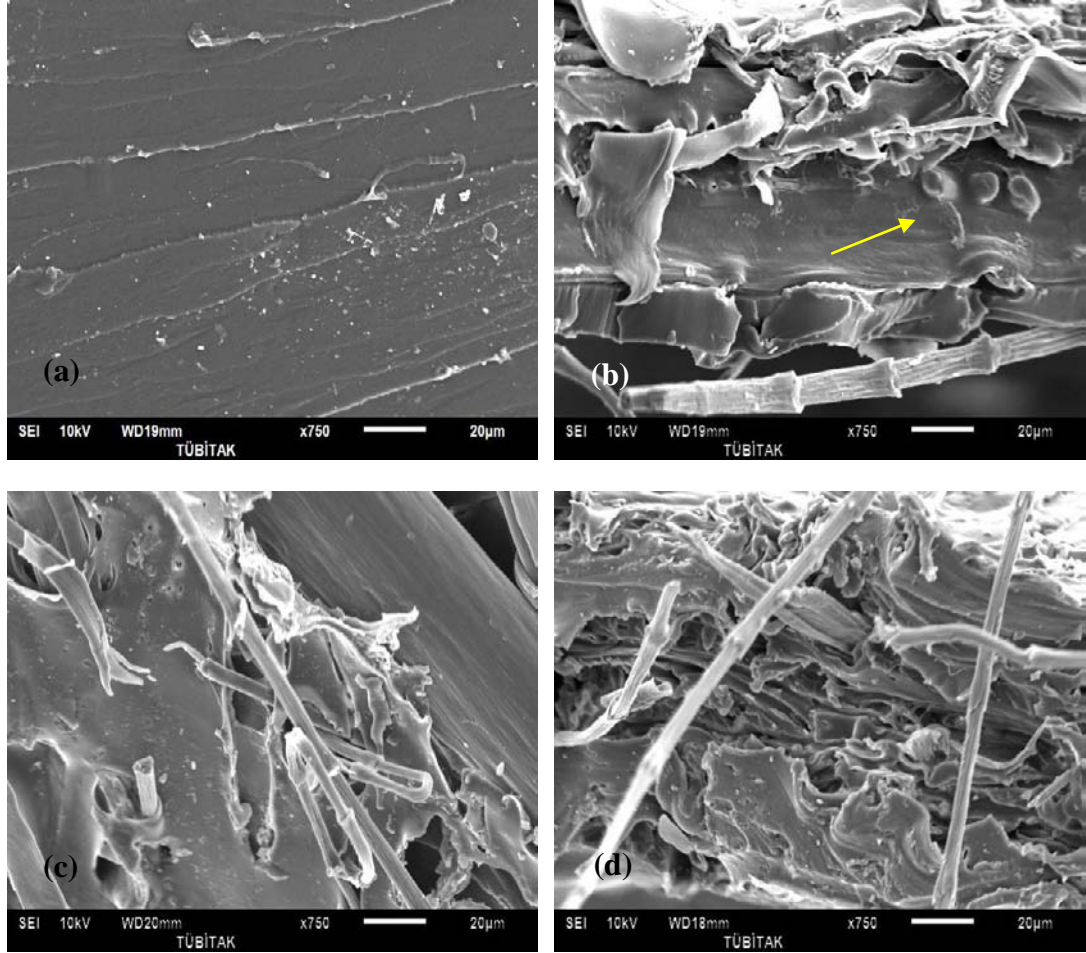
Şekil 3.8. ATT/TPU kompozit filmlerin su temas açısının ATT oranıyla değişimi

Saf TPU'nun yüzeyi hidrofobiktir. Bu hidrofilik karakterin yapısındaki kaprolakton poliester bloklardaki doymuş hidrokarbondan  $-(CH_2)_5-$  ileri geldiği düşünülmektedir. ATT ilavesi ve oranındaki artış ile su temas açısı azalma eğilimi göstermektedir. Hidrofiliklikteki bu artış keratinin yapısında bulunan polar gruplardan ileri gelmektedir. Keratin proteinin büyük bir bölümünü oluşturan serin amino asitlerinin (Bakınız: Tablo 1.3) yapısında bulunan  $-OH$  grupları sayesinde ATT büyük oranda su tutma kapasitesine sahiptir [84]. Çok yüksek ATT oranlarında ise (örneğin 80ATT/20TPU) yüksek su temas açısı değerleri elde edilmiştir, bir başka deyişle yüzeyi hidrofobiktir. Literatürde yapılan çalışmalarda, yüzey pürüzlüğü arttıkça su-malzeme ara yüzeyinin, pürüzlülüğe bağlı olarak ara yüzeyde kalan hava ile farklılaştığı, dolayısıyla daha hidrofobik hale geldiği görülmüştür [85, 86]. Bu bilgiler ışığında 80ATT/20TPU örneğinin daha yüksek su temas açısı değerlerine ve dolayısıyla daha yüksek hidrofobiteye sahip olmasının nedeninin yüzey pürüzlülüğü olduğu düşünülmektedir.

### 3.1.2.5. Morfoloji

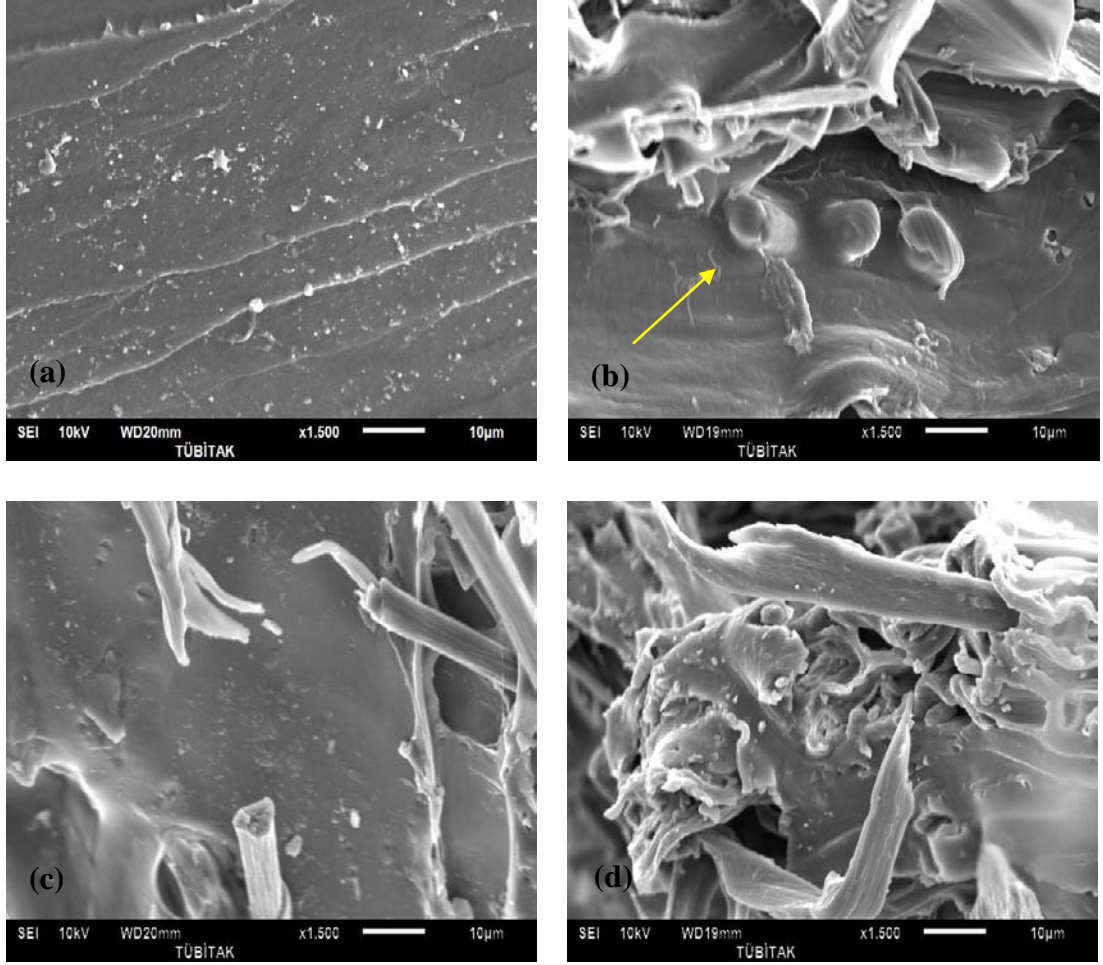
ATT/TPU kompozit filmlerinin çekme testi sırasında oluşan kırılma yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir (Şekil 3.9 ve 3.10). Saf TPU'nun kırılma yüzeyi, uzun, derin çatlaklarla ayrılmış platolar ile karakterize edilmektedir. ATT/TPU kompozitlerinde ise kırılma elyafların etrafından

gerçekleşmiştir. Kırılma sırasında sökülen (pull-out) elyaflar görülmektedir. Matris-fiber ara yüzeyinin iyi olduğu, matris ile kaplanmış elyaflardan anlaşılmaktadır (bkz: Şekil 3.8-b, 3.9-b).



Şekil 3.9. ATT/TPU kompozit filmlerine ait 750X büyütmede çekilmiş SEM fotoğrafları: (a) TPU, (b) 10ATT/90TPU, (c) 40ATT/60TPU, (d) 80ATT/20TPU





Şekil 3.10. ATT/TPU kompozit filmlerine ait 1500X büyütmede çekilmiş SEM fotoğrafları: (a) TPU, (b) 10ATT/90TPU, (c) 40ATT/60TPU, (d) 80ATT/20TPU

## 3.2. Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

### 3.2.1. Doku İskelesi Üretimi

Doku iskelesi üretimi amacıyla bu çalışmada dondurarak kurutma ve faz ayırma/parçacık-özütleme yöntemleri beraber uygulanmıştır. Faz ayırma/parçacık-özütleme yöntemi için kullanılacak tuz parçalanıp elekten geçirilerek 125-250  $\mu\text{m}$  boyutlarında elde edilmiştir. Bu işlemin amacı deri doku mühendisliği için hücre migrasyonu ve besin alışverişi için uygun gözenek boyutunu sağlamaktır.



Şekil 3.11. 125-250  $\mu\text{m}$  boyutlarındaki porojen NaCl

Doku iskelelerinin gözenek yapısı ve mekanik özellikleri analiz edilmiştir. Yara örtüsü uygulamaları için uygunluğu araştırılmıştır.

### 3.2.2. Doku iskelelerinin karakterizasyonu

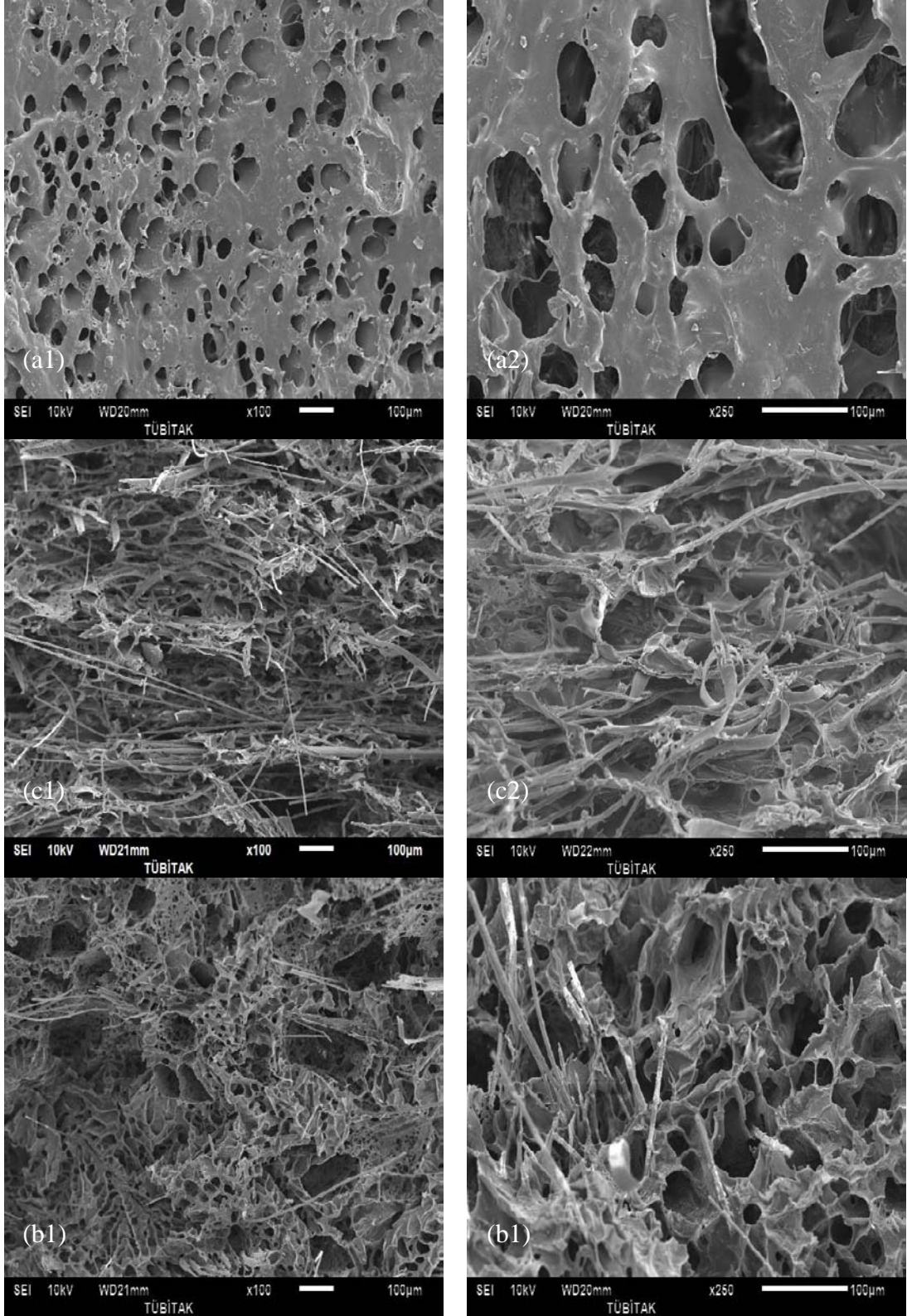
#### 3.2.2.1. Gözeneklilik ve gözenek boyutu

Doku iskelelerinin % gözeneklilik değerleri Tablo 3.5’de verilmiştir. Doku iskelelerinin gözenek morfolojisi ve gözenek boyutu SEM analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 3.9).

Tablo 3.5. Doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri

	% Gözeneklilik
TPU	90
10ATT/90TPU	86
20ATT/80TPU	93
40ATT/60TPU	88
80ATT/20TPU	80

Kompozit film karakterizasyon analizleri sonucunda özelliklerinin iyi olduğu düşünülen ve seçilen TPU, 20ATT/80TPU ve 80ATT/20TPU doku iskelelerinin gözenek morfolojisi ve gözenek boyutu SEM görüntüleri ile Şekil 3.12’de verilmiştir. Saf TPU için yüzeyden, diğer iskeleler için kesitten görüntüler çekilmiştir.



Şekil 3.12 Doku iskelelerinin gözenek morfolojisi ve gözenek boyutları (a) TPU, (b) 20ATT/80TPU, (c) 80ATT/20TPU (100X ve 250X)

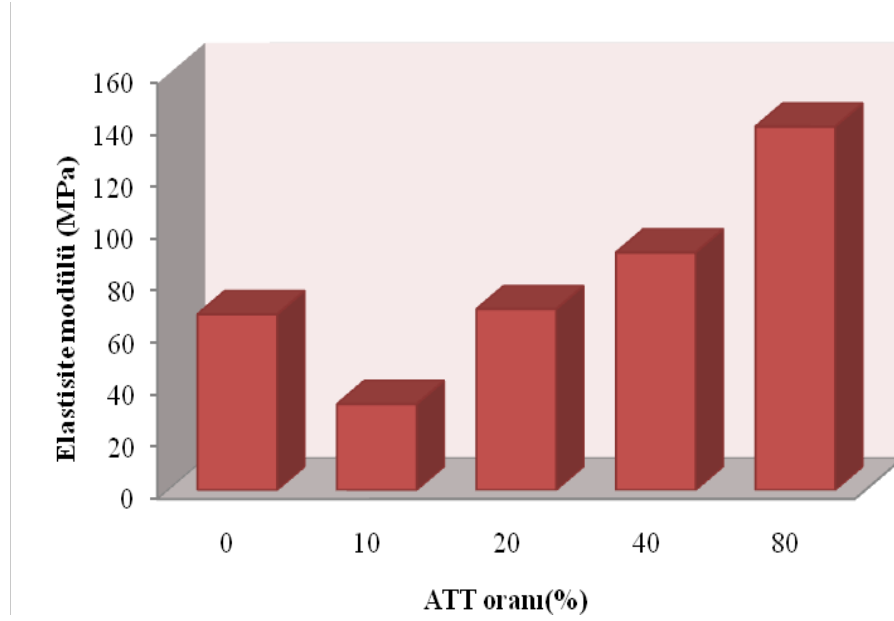
Büyük gözenekler, parçacık özütlemesi sırasında uzaklaşan tuz parçalarının, küçük gözenekler ise dondurarak kurutma sırasında uçurulan dioksan ve THF

çözücülerinden oluşmuştur. İki metodun beraber kullanılmasıyla % gözeneklilik arttırılmış ve birbirleriyle bağlı gözenekler elde edilmiştir. Heijkants ve ekibi tarafından yapılan çalışmada dondurarak kurutma ve parçacık-özütleme teknikleri beraber kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için doku iskeleleri üretilmiştir. İki metodun beraber kullanılması ile % gözeneklilik değerlerinde artmış ve birbirleri ile bağlantılı gözenekler sahip doku iskeleleri elde edilmiştir [84]. En iyi % gözeneklilik değeri 20ATT/80TPU iskelesinde %93 elde edilmiştir. Gözeneklilik değerleri ise genel bir eğilim göstermemekle birlikte %80 ile %93 arasında değişmektedir. Literatürde %65 ve üzeri gözenekliliğe sahip olan doku iskelelerinin kütle aktarımı ve gaz geçişine izin verdiği bilinmektedir. Ayrıca birbirine bağlı gözenek ağı olması önemli bir özelliktir. Bu nedenle, elde edilen gözeneklilik sonuçlarının, hücre infiltrasyonu, besin ve atık aktarımı için yeterli olduğu ve doku iskelelerinin yara örtüsü olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Sonuçlar hücre kültürü analizleri ile de örtüşmektedir (bkz bölüm 3.3.3).

Deri doku mühendisliği için kullanılacak gözenekli doku iskeleler için önemli olan bir diğer özellik gözenek büyüklüğüdür. Literatürde, hücrelerin doku iskelesinin içerisine ilerlemesi, damarlanma ve dokunun yenilenmesi için gözenek büyüklüğü 50-500 µm aralığında olması gerektiği belirtilmiştir [87]. SEM fotoğraflarından, gözenek büyüklükleri yaklaşık 50 ila 350 µm arasında olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre yara örtüsü uygulamaları için keratin fiber katkılı TPU iskelelerinin uygun olabileceği düşünülmektedir.

### **3.2.2.2. Mekanik Özellikler**

Keratin fiber katkılı TPU doku iskelelerinin basma testinden elde edilen elastik modülü %20 gerinimden hesaplanmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Basma testi sonucu elde edilen elastisite modül (basma modül) değerleri

Basma testi sonucunda elde edilen basma modül değerleri, çekme testi sonucu bulunan elastik modül değerlerinde de olduğu gibi ATT miktarındaki artış ile genel olarak artmaktadır. Bu artış, özellikle %20 ATT içeriğinden itibaren belirgin bir hal almaktadır. Bunun sebebi olarak ATT'nin bu değerden sonra perkolasyona uğradığı düşünülebilir.

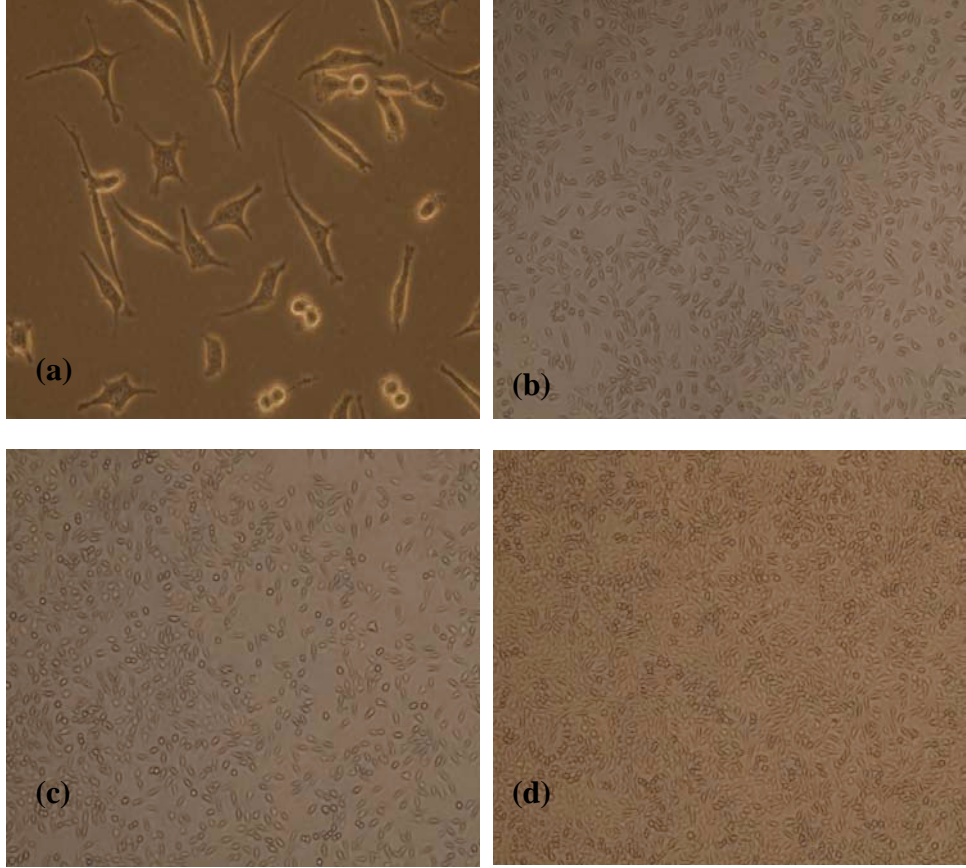
### 3.3. In vitro Hücre Kültürü ve Sitotoksikite Testi

#### 3.3.1. Hücre kültürü

Tez çalışmasının bu kısmında ATT/TPU kompozit filmlerinden üretilen doku iskelelerinin deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilme potansiyeli incelenmiştir. Özellikle ATT/TPU doku iskelelerinin yara örtüsü olarak üretilmesi ve hasarlı dokunun onarımında hücre çoğalmasını artırması hedeflenmiştir.

Bu doğrultuda yapılan hücre kültürü çalışmalarında fare bağ dokusuna ait fibroblast hücrelerinden elde edilmiş L929 hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin hücre kültürü ortamında invert mikroskop altında günlük gözlemleri yapılmış; 3, 5 ve 7. günlerde sahip oldukları morfoloji ve yayılımlara ait görüntüler Şekil 3.14'de verilmiştir.

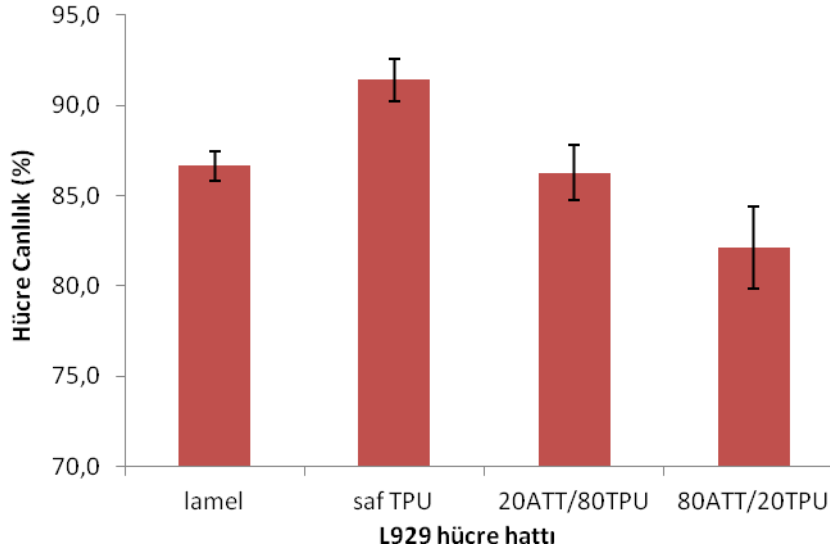




Şekil 3.14. (a) L929 hücre hattı morfolojisi (40X), (b) 3. günde hücre yayılımı (4X), (c) 5. günde hücre yayılımı (4X), (d) 7. günde hücre yayılımı (4X)

### 3.3.2. Sitotoksisite testi

Sitotoksisite çalışmalarında kontrol dahil 4 grup örnek ele alınmıştır. Bunlar, TPU, 20ATT/80ATT, 80ATT/20TPU ve kontrol grubu olarak kullanılan lameldir. L929 hücre hattı ile tripan mavisi canlılık testi yapılmıştır. Doku iskeleleri üzerine ekilen hücreler 5 gün hücre kültürü ortamında bırakılmıştır ve 5. gün sonunda iskeleler üzerinde kalan süspansiyon alınmıştır. Hemositometre yardımı ile tripan mavisi boyanan solüsyondaki hücreler invert mikroskop altında sayılarak canlı olmayan veya doku iskelelerine tutunamayan hücrelerin oranı tespit edilmiştir. Daha sonra sonuçlardan canlı hücre oranı elde edilerek değerlendirilmiştir.



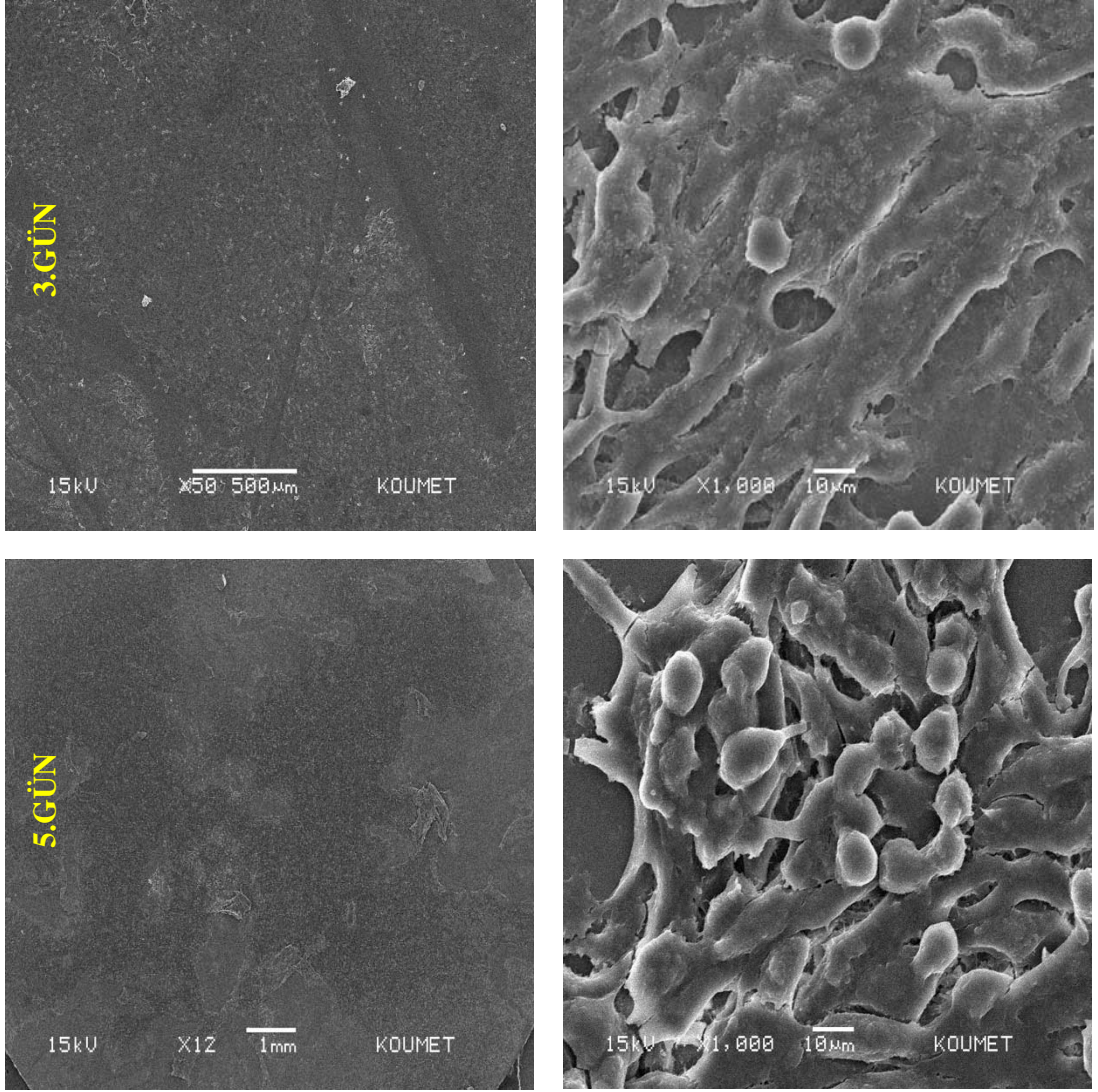
Şekil 3.15. L929 hücre hattı canlılık oranı

Şekil 3.15’de görüldüğü gibi incelenen doku iskelelerinde ve lamel yüzeyinde hücre canlılığı %80’den fazladır. Keratin fiber destekli TPU doku iskelelerinin deri doku mühendisliği ve yara örtüsü uygulamaları için kullanılabilirliği diğer analizlerle beraber bu sonuçlarla da desteklenmiştir.

### 3.3.3. Morfolojik inceleme

Saf TPU, 20ATT/80TPU, 80ATT/20TPU ve lamel üzerindeki, L929 hücrelerinin, kültürasyonun 3. ve 5. günlerine ait SEM görüntüleri Şekil 3.16, 3.17, 3.18 ve 3.19’ da verilmiştir. Kültürün 3. gününde doku iskelelerinin üzerindeki L929 hücreleri hızla yapışıp yayılırken 5. günün sonunda ise doku iskelelerinin yüzeyi tamamen hücreler ve hücrelerin ürettiği HDM proteinleriyle kaplanmıştır.

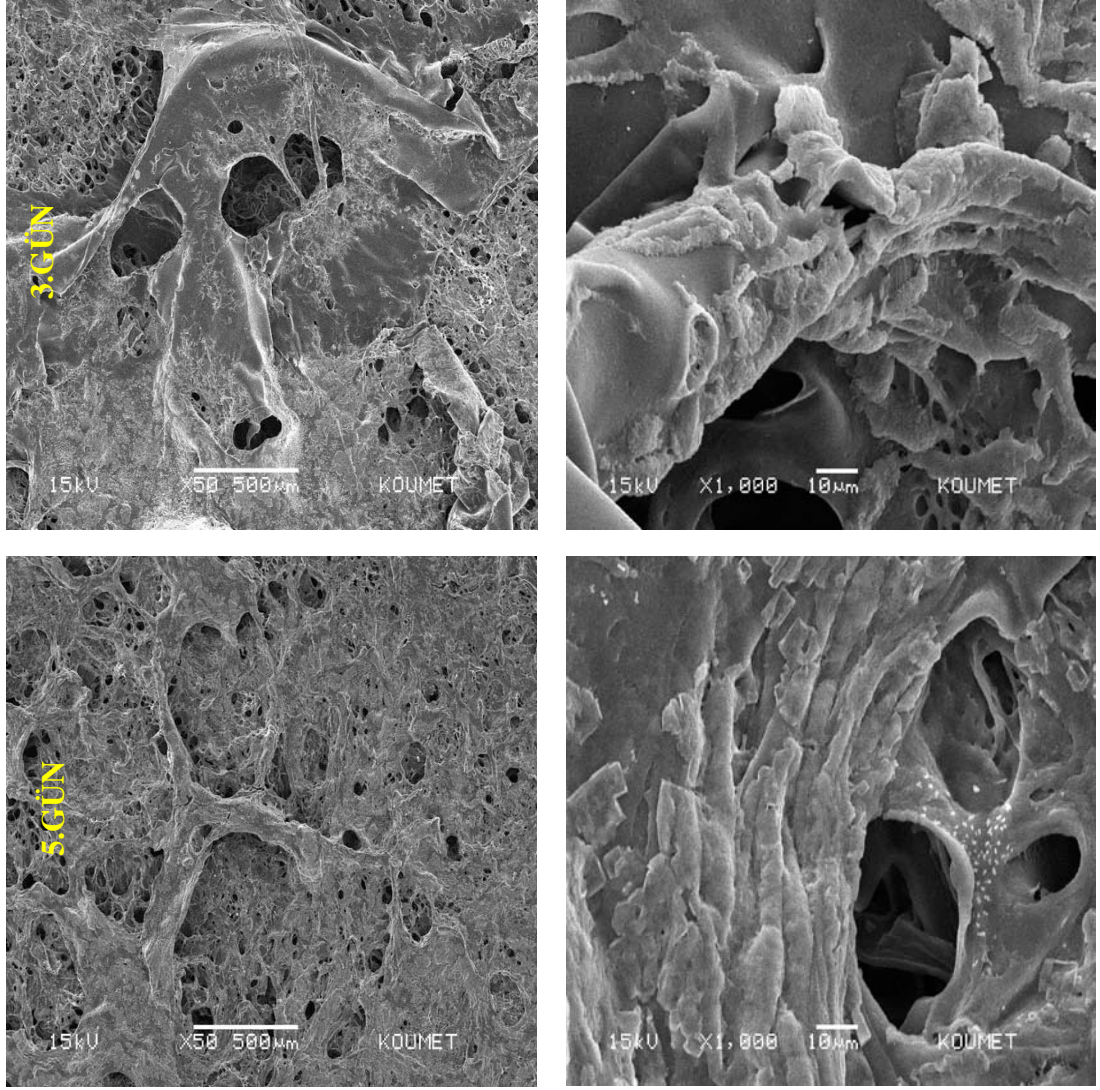
Yapılan SEM analizlerinden, hücrelerin keratin fiberlerin yüzeylerinde yapışıp ürettiği tespit edilmiştir. Sonuçlarda görüldüğü gibi, keratin fiber miktarı arttıkça 3. günde hücrelerin iskeleye tutunarak çoğaldığı, 5. günde hücrelerin çoğalmaya devam ederek fiberleri kapladığı gözlenmiştir. Tüm iskelelerde 5. günde hücre proliferasyonu artmış ve hücreler kendi HDM’lerini oluşturmuştur. Özellikle 20ATT/80TPU ve 80ATT/20TPU iskelelerinde yüksek büyütmelemlerde L929 hücrelerinin keratin fiberleri sardığı ve tabaka halinde büyüyerek ilerlediği görülmüştür.



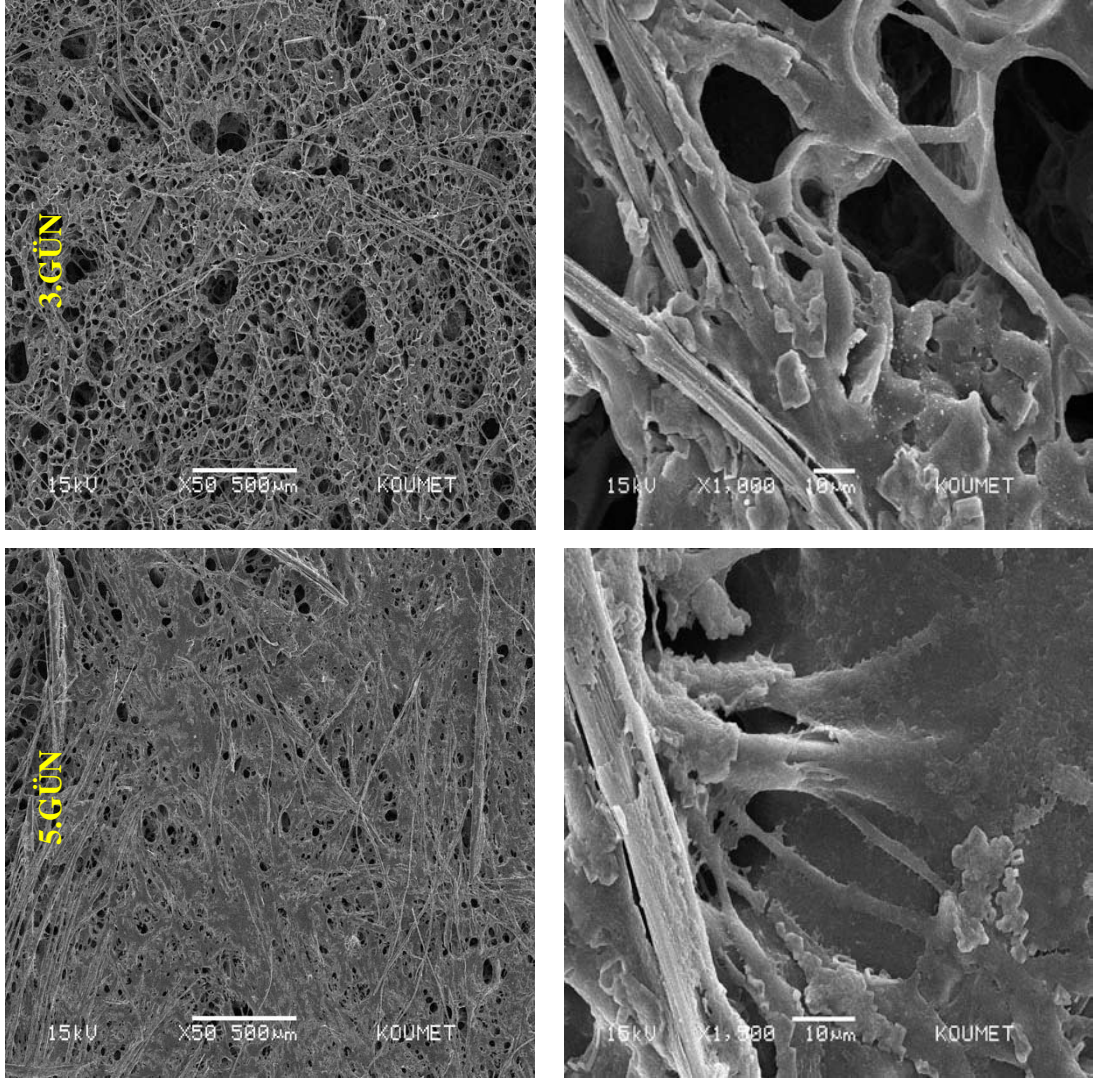
Şekil 3.16. Lamel üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000 X)

Fibroblast hücre morfolojileri incelendiğinde düz yüzeyler üzerinde hücrelerin daha yuvarlak şekiller aldıkları dikkat çekmiştir. Diğer bir yandan girintili çıkıntılı ve gözenekli yüzeylerde hücreler uzayan ve yayılmış şekillerde büyümüşlerdir. Literatürde de bu yargıyı destekleyen örnekler bulunmaktadır [88].



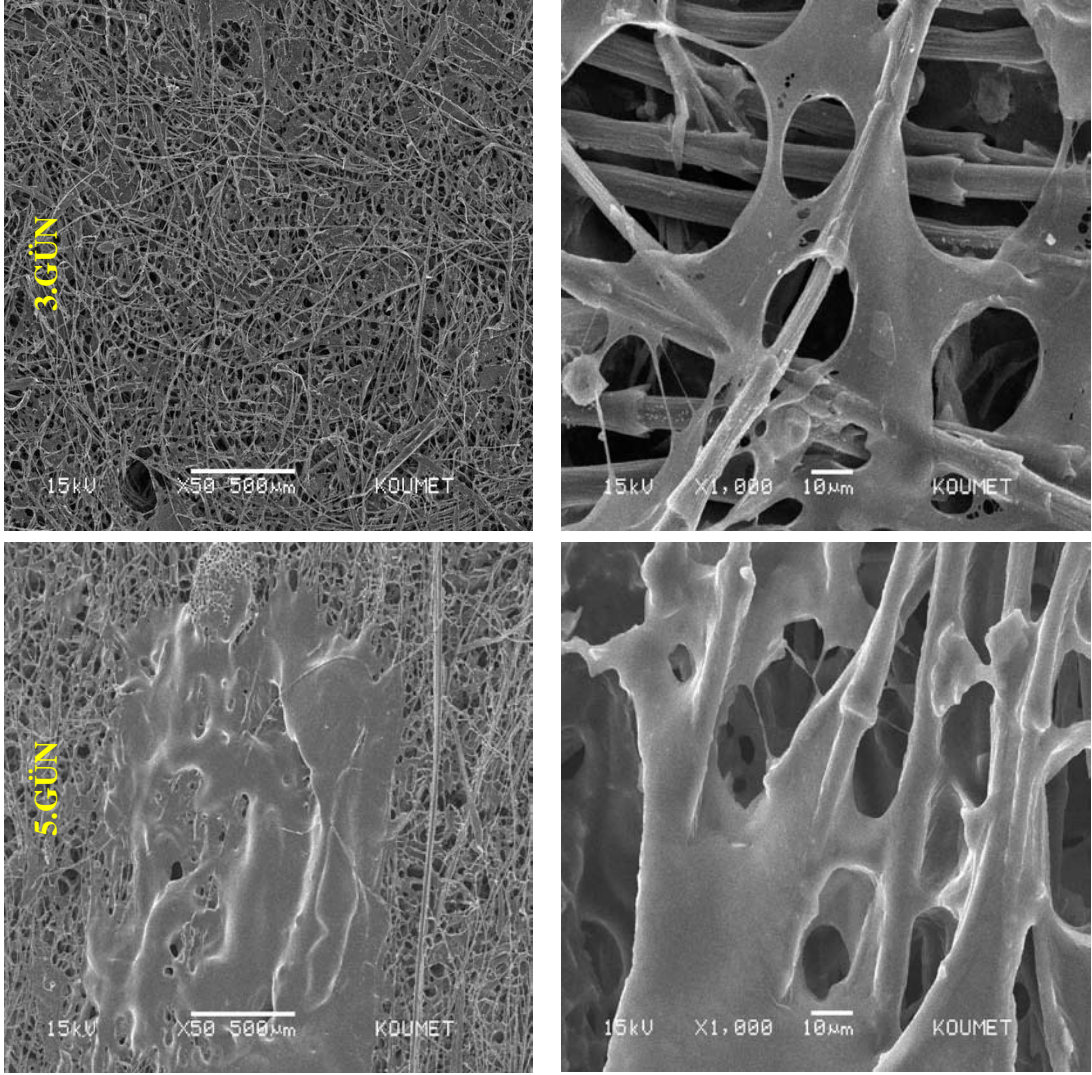


Şekil 3.17. Saf TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500X ve 1000X)



Şekil 3.18. 20ATT/80TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500 X ve 1000 X)

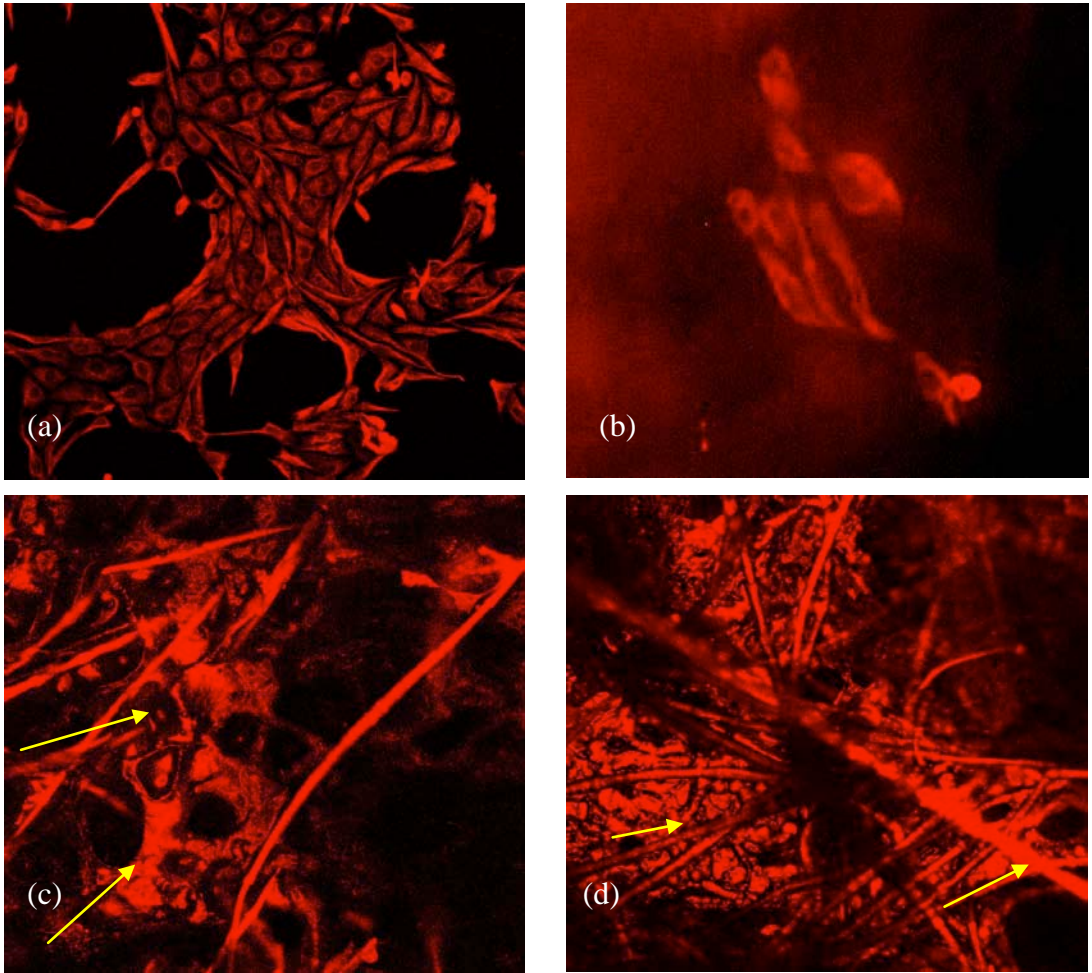




Şekil 3.19. 80ATT/20TPU doku iskelesi üzerinde 3. ve 5. günlerde hücre çoğalmasını gösteren SEM analizleri (500 X ve 1000 X)

### 3.3.4. Konfokal lazer mikroskobu analizi

TPU, 20ATT/80TPU, 80ATT/20TPU ve lamel üzerindeki, L929 hücrelerinin, kültürasyonun 5. günlerine ait konfokal lazer mikroskobu görüntüleri incelenmiştir. Bu analizin amacı ATT/TPU doku iskelelerinde çoğalan hücrelerin varlığını desteklemektir. Şekil 3.19’da görüldüğü gibi HDM’de bulunan vimentin proteinleri analiz öncesi hazırlıklar ile teksas red boyası ile boyanarak hücrelerin varlığı ve çoğalması kanıtlanmıştır. Keratin fiberleri de protein yapıda oldukları için vimentin ile boyama işleminde boyanarak görüntülerde ışımaya vermişlerdir.



Şekil 3.20. (a) Lamel, (b) saf TPU, (c) 20ATT/80TPU ve (d) 80ATT/20TPU doku iskelelerinin konfokal mikroskop görüntüleri

Keratin fiber miktarı arttıkça 5. günde hücre proliferasyonu ( çoğalması) fark edilir biçimde artmıştır (Şekil 3.20). Özellikle 20ATT/80TPU ve 80ATT/20TPU doku iskelelerinde L929 hücre hattının fiberleri ağ gibi sardığı görülmektedir. Hücrelerin proliferasyon sırasında uzantıları Şekil 3.19’da gösterilmiştir ve hücrelerin varlığı

kanıtlanmıştır. Konfokal lazer mikroskobu incelemeleri ile SEM analizleri sonuçları paraleldir.

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, literatürde ilk defa atık tavuk tüyünden geri kazanılmış keratin fiber ile güçlendirilmiş poli( $\epsilon$ -kaprolakton) diol esaslı biyobozunur termoplastik poliüretan (TPU) kompozitlerden doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere doku iskelesi oluşturulması amaçlanmıştır. Keratin bakımından oldukça zengin olan bu atığın değerlendirilmesi, hem atık probleminin çözümü hem de bu değerli maddenin ekonomiye kazandırılması açısından son derece önemlidir.

Çalışılan bileşimler ağırlıkça %0, %10, %20, %40 ve %80 atık tavuk tüyü (ATT) oranları ile seçilmiştir. Elde edilen kompozit filmlerde ATT yükleme oranı ve ATT boyutunun etkisinin mekanik, termal ve morfolojik özellikleri sırasıyla çekme testleri, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve temas açısı ölçümü ile araştırılmıştır. Dondurarak kurutma ve çözücü dökümü/parçacık-uzaklaştırma yöntemleri bir arada kullanılarak gözenekli doku iskeleleri elde edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları ile biyouyumluluk çalışmaları da yapılmıştır.

Çalışmanın sonucunda ortaya çıkan genel sonuçlar şunlardır:

- ATT ve TPU, THF' de tam çözünme göstermiştir.
- Çözelti döküm tekniğiyle ağırlıkça 0%, 10%, 20%, 40% ve 80% atık tavuk tüyü (ATT) içeren ATT/TPU kompozit filmler üretilmiştir. Sonra da ideal gözeneklilik oranına sahip aynı ATT oranlarında ATT/TPU doku iskeleleri elde edilmiştir.
- Kullanılan ATT fiber boyutları ortalama 48,7  $\mu\text{m}$ 'dir.
- ATT ilavesi ile saf TPU'nun mekanik özelliklerinde iyileşme gözlenmiştir. İnsan derisinin mekanik özellikleri ile karşılaştırıldığında, ATT/TPU kompozitleri deri doku mühendisliğinde özellikle yara örtüsü olarak kullanılabilir.

- Saf TPU'ya göre ATT/TPU kompozitlerinin su tutma kapasitesi artmıştır. Bu bulgu hem hidrofilitate testleri hem de DSC analizi ile desteklenmiştir. Yara iyileşmesi için gereken nemli ortam elde edilmiştir ve bu sonuç ışığında malzemenin yara örtüsü olarak kullanımının uygun olduğu yargısına varılmıştır.

- Yüzey morfolojisine bakıldığında matris-fiber ara yüzeyinin iyi olduğu ve keratin elyafların matrisi kapladığı sonuçlarına varılmıştır.

- İdeal gözenekliliğe ve gözenek boyutlarına sahip doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelelerinin hücre migrasyonu, gaz alışverişi ve besin- atık transferine uygun olduğu görülmüştür. Yara örtüsü malzemesi olarak kullanımı bu sonuçlar ile de desteklenmiştir.

- Hidrofiliteyi arttıran ve bu sayede hücre tutunmasını ve büyümesini destekleyen keratin fiberleri ile deri doku mühendisliği uygulamalarına kullanılmak üzere ATT/TPU doku iskeleleri üretilmiştir. Ayrıca üç boyutlu üretildiklerinde diyabetik deri ülseri veya derinin dermis tabakasını da kapsayan derin yanık ve yaralar için kullanılabilir.

- Fare bağ dokusuna ait fibroblast hücrelerinden elde edilmiş L929 hücre hattı kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. L929 hücreleri keratin fiberlere hızla tutunup çoğalmıştır. 5. günün sonunda ise doku iskelelerinin yüzeyi tamamen hücreler ve hücrelerin ürettiği HDM proteinleriyle kaplanmıştır. Hedeflendiği gibi, doku iskelesi görevini en iyi şekilde yerine getirerek hücre tutunmasını ve çoğalmasını tetiklemiş, hücrelerin kendi HDM'lerini oluşturmalarına uygun ortamı sağlamıştır.

- Konfokal lazer mikroskop ile incelenen doku iskelelerinde istenen hücrelerin doku iskelelerine tutunarak kısa zamanda çoğaldığı bir kez daha kanıtlanmıştır.

- Tüm değerlendirmeler sonucunda en iyi sonuçların 20ATT/80ATT ile elde edildiği düşünülmüştür.

Çalışma sonunda, piyasaya yara örtüsü olarak sunulabilecek hasarlı dokunun onarımına katkıda bulunacak, diğer ürünlere göre avantajları bulunan doku iskeleleri üretilmiştir.

Bu tezde tavuk tüyünü oluşturan keratin fiberlerin kullanılabilceği yeni bir alan olan doku mühendisliğine yönelik araştırmalar yapılmıştır. Böylece ucuz ve bol bulunan atık tavuk tüyleri kaynakları ile ürün geliştirilmesi planlanmış, ekonomiye ve çevreye katkıda bulunarak keratinin ülkemize kazandırılması hedeflenmiştir. Tezin genelinde de bahsedildiği gibi geliştirilen doku iskelelerinin yara örtüsü olarak kullanılabilme potansiyeli ele alınmıştır.

Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde ATT/TPU kompozitlerinin mekanik, fiziksel ve yüzey özelliklerinde saf TPU'ya göre iyileşmeler görölmüştür. ATT/TPU doku iskelelerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında da benzer olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebeple araştırmalara hayvan deneyleri ile devam edilmesi önerilmektedir. In vivo yapılacak bu çalışmalar, deney hayvanları üzerinde küçük yara benzeri kesikler açılarak takip edilebilir. ATT/TPU doku iskelelerinin yara yüzeyinde hücre proliferasyonunu arttırıcı ve ya azaltıcı etkileri gözlemsel çalışmalar ile rapor edilmelidir ve böylece in vitro çalışmalarımız desteklenmelidir.

Diğer bir açıdan bakıldığında keratin hidrojeller üretilerek, daha yüksek ölçüde dallanmış ve mikro gözenekli bir yapılar elde edilebilir. Ayrıca hidrojeller su tutma kapasitesinin artmasına da sebep olabilir.



## KAYNAKLAR

- [1] Ratcliffe A., Tissue engineering for vascular grafts, *Matrix biology*, 2000, **19**, 353-357.
- [2] Skarja G. A., Woodhouse K. A. J., Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino-acid based chain extender, *Applied Polymer Science*, 2000, **75**, 1522-1530.
- [3] Mikos A. G., Thorsen Amy J., Czerwonka L. A., Langer R., Preparation and characterization of poly(L-Lactic acid) foams , *Polymer*, 1994, **38**, 1068.
- [4] Heather P. M., Nanoscale modifications to polymeric tissue engineering scaffolds: Effect on cellular behavior, PhD. Thesis, The Ohio State University, USA, 2004.
- [5] Jillian G. R., Mark E. V. D., A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications, *Materials*, 2010, **3**, 999-1000.
- [6] Reddy N., Yang Y., Structure and properties of chicken feather barbs as natural protein fibers, *Journal of Polymer Environment*, 2007, **15**, 81-87.
- [7] Manisha S., Fabrication and Characterization of Porous Polyurethane Scaffold for Application in the Field of Tissue Engineering, PhD Thesis, University of Akron, USA, 2008.
- [8] Gümüşderelioğlu M., Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları, Ekim 2007.
- [9] Lanza R. P., Langer R., Vacanti J. P., *Principles of Tissue Engineering*, 3rd Ed., Academic Press, New York, 2007.
- [10] Rizzo D. C., *Delmar's Fundamentals of Anatomy and Physiology*, ThompsonLearning, USA, 137-142, 2001.
- [11] [http://www.burnsurgery.org/Modules/BurnWound%201/sect\\_VIII.htm](http://www.burnsurgery.org/Modules/BurnWound%201/sect_VIII.htm), (Ziyaret Tarihi 21 Nisan 2013)
- [12] Warren L. G., Timothy P. M., George M. E., Milica R., Gordana V. N., Biomimetic approach to tissue engineering, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, **20**, 665-673.
- [13] Cheung H. Y., Natural fibre-reinforced composites for bioengineering and environmental engineering applications, *Composites Part B: Engineering*, 2009, **40**, 655-663.

- [14] Tseng F., C. J., Verbeek C. J. R., Biofibre production from chicken feather, *SCENZ-I ChemE annual conference*, New Zealand, Wellington, 1-2 December 2011.
- [15] Shah H., Yang Y., Feather fiber reinforced light-weight composites with good acoustic properties, *Journal of Polymers and the Environment*, 2009, **17**, 131-142.
- [16] Barone J. R., Schmidt W. F., Liebner F. E., Compounding and molding of polyethylene composites reinforced with keratin feather fiber, *Composites Science and Technology*, 2005, **65**, 683-692.
- [17] Bullions T. A., Hoffman D., Gillespie R. A., O'Brien J. P., Loos A. C., Contributions of feather fibres and various cellulose fibres to the mechanical properties of polypropylene matrix composites, *Composite Science and Technology*, 2006, **66**, 102-114.
- [18] Huda S., Yang Y., Composites from ground chicken quill and polypropylene, *Composites Science and Technology*, 2008, **68**, 790-798.
- [19] [http://tr.wikipedia.org/wiki/Amino\\_asit](http://tr.wikipedia.org/wiki/Amino_asit), (Ziyaret Tarihi 25 Nisan 2013)
- [20] Moore G. R. P., Martelli S. M. , Gandolfo C., Sobral P. J. A., Laurindo J. B., Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films, *Food Hydrocolloids*, 2006, **20**, 975-982.
- [21] Vasconcelos A., Freddi G., Cavaco-Paulo A., Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1299-1305.
- [22] Karp G., Cell and Molecular Biology, 3rd Ed. John Wiley and Sons Inc., New York, 2002, 244-255.
- [23] Wrześniewska-Tosik K. and Adamiec J., Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 2007, **15**, 107-112.
- [24] Yamauchi K., Yamauchi A., Kusunoki T., Kohda A., Konishi Y, Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films, *Journal of Biomed.Mater. Res.*, 1996, **31**, 439-444.
- [25] Yamauchi K., Maniwa M., Mori T., Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata, *Journal of Biomaterial Science and Polymer Engineering*, 1998, **9**, 259-270.
- [26] Fujii T., Ogiwara D., Arimoto M., Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, **27**, 89-93.

- [27] Tanabe T., Okitsu N., Tachibana A., Yamauchi K., Preparation and characterization of keratin chitosan composite film, *Biomaterials*, 2002, **23**, 817-825.
- [28] Justin R. B., Walter F. S., Polyethylene reinforced with keratin fibers obtained from chicken feathers, *Composites Science and Technology*, 2005, **65**, 173-181.
- [29] Lama P. M., Laua K. T., Zhaob Y. Q., Chengc S., Liu T., Development of an eco-friendly cff/pla biocomposite, *International Conference on Crisis Mapping Conferences*, Edinburg, 2009.
- [30] Martí'nez-Herna'ndez A. L. , Velasco-Santos C., de-Icaza M., Victor M., Castaño, Dynamical-mechanical and thermal analysis of polymeric composites reinforced with keratin biofibers from chicken feathers, *Composites: Part B*, 2007, **38**, 405-410.
- [31] Uzun M., Sancak E., Patel I., Usta I., Mechanical behaviour of chicken quills and chicken feather fibres reinforced polymeric composites, *Archives of materials science and engineering*, 2011, **52**, 82-85.
- [32] Tonin C., Aluigi A., Vineis C., Varesano A., Montarsolo A., Ferrero F., Thermal and structural characterization of poly(ethylene-oxide)/keratin blend films, *Jornal of Thermal Anaysis and Calorimetry*, 2007, **89**, 601-608.
- [33] Zoccola M., Montarsolo A., Aluigi A., Varesano A., Vineis C., Tonin C., Electrospinning of polyamide 6/modified-keratin blends, *e-Polymers*, 2007, **105**, 1204-1222.
- [34] Polymer Science and Technology, 2nd Ed., Joel R. Fried, New York, 2003.
- [35] [http://www.huntsman.com/portal/page/portal/polyurethanes/Media%20Library/global/files/guide\\_tpu\\_screen.pdf](http://www.huntsman.com/portal/page/portal/polyurethanes/Media%20Library/global/files/guide_tpu_screen.pdf), (Ziyaret Tarihi: 11 Ağustos 2013)
- [36] Gültekin G., Yara örtü malzemesi uygulamaları için yağ asidi temelli poliüretan filmlerin üretimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 223150.
- [37] Howard G. T., Biodegradation of polyurethane: a review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, **49**, 245-252.
- [38] Aksoy E. A., Synthesis and surface modification studies of biomedical polyurethanes to improve long term biocompatibility, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008, 176715.
- [39] Hasirci N., Burke A., Polyurethanes in Biomedical Application in Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissues, Kluwer Academic/Plenum, New York, 2004, 83-101.
- [40] Pathiraja A. G., Raju A., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 2003, **5**, 1-16.

- [41] [http://www.bayar.edu.tr/besergil/endustri\\_polimerleri.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/endustri_polimerleri.pdf), (Ziyaret Tarihi: 12 Ağustos 2013)
- [42] Zdrahala R. J. , Zdrahala I. J., Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future, *Journal of Biomaterial Applications*, 1999, **14**, 67-68.
- [43] Yücedağ F., Antibakteriyel poliüretan film üretimi ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 222326.
- [44] Altay P., Basal G., Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Tekstil Mühendisliği Bölümü, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2010 , **4**, 109-121.
- [45] Boretos J. W., Pierce W. S., Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications, *Science*, 1967, **158**, 1481-1482.
- [46] Colovos G. C., Bonk H. W., Ulrich H., Thermoplastic polyurethane: an alternative to PVC for food and medical applications, *Safety and Health with Plastics; National Technical Conference*, Denver, USA, 08-10 November 1977, 55-58.
- [47] Gary T. H., Biodegradation of polyurethane: a review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, **49**, 245 – 252
- [48] Phua S. K., Castillo E., Anderson J. M., Hiltner A., Biodegradation of a polyurethane in vitro, *Journal of Biomedical Materilas Research*, 2004, **21**, 231-246.
- [49] Bruin P., Venstra G. J., Nijenhuis A. J., Pennings A. J., Design and synthesis of biodegradable poly(esterurethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks. *Makromolekular Chem Rapid Commun*, 1988, **9**, 589-594.
- [50] Bruin P., Smedinga J., Pennings A. J., Jonkman M. F., Biodegradable lysine diisocyanate-based poly(glycolide-co-ε-caprolactone)-urethane network in artificial skin, *Biomaterials*, 1990, **11**, 191-295.
- [51] Akita S., Akino K., Imaizumi T., Tanaka K., Anraku K., Yano H., Hirano A., A polyurethane dressing is beneficial for split-thickness skin-graft donor wound healing, *Burns*, 2006, **32**, 447-51.
- [52] Nairn J. A., Polymer Characterization, 1st ed., *Materials Science and Engineering 5473 course*, University of Utah, USA, 2005.
- [53] Karanlı Yılmaz N. G., Karbon lif takviyeli termoplastik karmaların üretimi ve özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2010, 238046.
- [54] Kemaloğlu Ş., Termal ara yüzey malzemesi olarak kullanılabilir polimer/bor nitrid mikro ve nano kompozitlerinin üretim teknolojilerinin araştırılması,

Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2009, 259402.

- [55] <http://www.polimernedir.com/polimerfizigi/polimerkarakterizasyonu/diferansiye-l-taramali-kalorimetri-dsc/>, (Ziyaret Tarihi: 14 Ağustos 2013)
- [56] Brundle C. R., Evans C. A., Wilson S., *Encyclopedia of Materials Characterization*, 1st ed., Reed Publishing, USA, 1992.
- [57] [http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROS-KOBU\[6\].pdf](http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROS-KOBU[6].pdf), (Ziyaret Tarihi: 14 Ağustos 2013)
- [58] Saçak M., *Polimer Teknolojisi*, 1. baskı, Gazi Kitapevi, Ankara, 2005.
- [59] Brostow W., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley and Sons Inc., Chichester, 2005.
- [60] Menrad K. P., *Dynamic Mechanical Analysis A Practical Introduction*, CRC Press, Boca Raton, 1999.
- [61] <http://www.polimernedir.com/polimer-fizigi/polimer-karakterizasyonu/dinamik-mekanik-analiz-dma/>, (Ziyaret Tarihi: 14 Ağustos 2013)
- [62] <http://w3.balikesir.edu.tr/~sedacan/yuzey.html>, (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2013)
- [63] Ersoy A., Kuntman A., Polimerik Yalıtkanlarda Yüzey Özelliklerinin Temas Açısı ile İncelenmesi, *Elektrik-Elektronik-Bilgisayar Mühendisliği Sempozyumu*, Bursa, Türkiye, 20-22 Kasım 2008.
- [64] Bağçeci B. İ., Nanopartikül yüzey kaplama, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 269938.
- [65] Wu L., Jing D., Ding J., A ‘‘room-temperature’’ injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds, *Biomaterials*, 2006, **27**, 185-191.
- [66] <http://www.belgeler.com/blg/2qdu/dondurarak-kurutma-1-odev-2003>, (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2013)
- [67] [http://madihally.okstate.edu/project\\_scaff.html](http://madihally.okstate.edu/project_scaff.html), (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2013)
- [68] Tuncer S., Demirci M., Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri, *Journal of Dental Faculty Atatürk Üniversitesi*, 2011, **21**, 141-149.
- [69] [http://www.acikders.org.tr/pluginfile.php/1104/mod\\_resource/content/0/konu9.pdf](http://www.acikders.org.tr/pluginfile.php/1104/mod_resource/content/0/konu9.pdf), (Ziyaret Tarihi: 15 Ağustos 2013)

- [70] Sağdıç O., Öztürk İ., Yapar N., Yetim H., Konfokal Mikroskop ve Gıda Mühendisliği Uygulamalarında Kullanımı, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, Türkiye, 21-23 Mayıs 2008.
- [71] Gassner G., Schmidt W., Line M. J., Thomas C., Water R. M., Fiber and fiber products from feathers. *United States*, Patent No. 5,705,030, 1998.
- [72] <http://www.attension.com/tensiometer/theta-lite>, (Ziyaret Tarihi: 11Eylül 2013)
- [73] Fried J. R., *Polymer Science and Technology*, 2nd Ed., Prentice Hall Professional Technical Reference, New Jersey, 2003, 582.
- [74] Tang Z. G., Black R. A., Curran J. M., Hunt J. A., Rhodes N. P., Williams D. F., Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[e-caprolactone] films, *Biomaterials*, 2004, **25**, 4741-4748.
- [75] Karsli N. G., Yilmaz T., Aytac A., Ozkoc G., Investigation of erosive wear behavior and physical properties of SGF and/or calcite reinforced ABS/PA6 composites, *Composites Part B: Engineering*, 2013, **44**, 385-393.
- [76] Martinez- Hernandez A. L., Velasco- Santos C., Victos de I. M., Castano M., Dynamical- mechanical and thermal analysis of polymeric composites reinforced with keratin biofibers from chicken feathers, *Composites:part B*, 2007, **38**, 405-410.
- [77] Wright D. D., Gilbert J. L., Lautenschlager E. P., The effect of processing temperature and time on the structure and fracture characteristics of self-reinforced composite poly(methyl methacrylate), *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , 1999, **10**, 503-512.
- [78] Schmidt W. F., Line M. J., Physical and chemical structures of poultry feather fiber fractions in fiber process development, *Nonwovens Conference TAPPI Proceedings*, North Carolina, USA, 11-13 March 1996, 135-141.
- [79] Ozkoc G., Bayram G., Bayramli E., Effects of polyamide 6 incorporation to the short glass fiber reinforced ABS composites: an interfacial approach, *Polymer*, 2004, **45**, 8957-8966.
- [80] Nielsen L. E., Landel R. F., *Mechanical properties of polymers and composites*, 2nd Ed., CRC Press, New York, 1994.
- [81] Cheng S., Lau K., Liu T., Zhao Y., Lam P., Yin Y., Mechanical and thermal properties of chicken feather fiber/PLA green composites, *Composites: Part B*, 2009, **40**, 650–654.
- [82] Hafeman A. E., Li B., Yoshii T., Zienkiewicz K., Davidson J. M., Guelcher S. A., Injectable Biodegradable Polyurethane Scaffold with Release of Platelet-derived Growth for Tissue Repair and Regeneration, 2008, **25**, 2387-2399.
- [83] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Ed., Garland Press, New York, 1994.

- [84] Chen F., Lee C. N., Teoh S. H., Nanofibrous modification on ultra-thin poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane via electrospinning, *Materials Science and Engineering*, 2007, **27**, 325-332.
- [85] Erbil H. Y., Demirel A. L., Avcı Y., Mert O., Transformation of a simple plastic into a superhydrophobic surface, *Science*, 2003, **299**, 1377-1380.
- [86] Heijkants R. G. J. C., Van Tienen T. G., De Groot J. H., Pennings A. J., Buma P., Veth R. P. H., Schouten A. J., Preparation of a polyurethane scaffold for tissue engineering made by a combination of salt leaching and freeze-drying of dioxane, *Journal of Material Science*, 2006, **41**, 2423-2428.
- [87] Katoha K., Tanabe T., Yamauchi K., Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity, *Biomaterials*, 2004, **25**, 4255-4262.
- [88] Ma J., Wang H., He B., Chen J., A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials*, 2001, **22**, 331-336

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] **Gökçe Ö.**, Özkoç G., Doğal keratin elyaf İle güçlendirilmiş biyobozunur termoplastik poliüretan kompozitlerinin özelliklerinin ve yapı iskelesi olarak kullanılabilme potansiyelinin incelenmesi, *İstanbul Kimyevi Maddeler ve Mamülleri Sektöründe 2. Ar-Ge Proje Pazarı*, İstanbul, Türkiye, 18-19 Eylül 2012.
- [2] **Gökçe Ö.**, Özkoç G., Atık Tavuk Tüyleri İle Güçlendirilmiş Biyobozunur Termoplastik Poliüretan Kompozitlerinin Özelliklerinin ve Yapı İskelesi Olarak Kullanılabilme Potansiyelinin İncelenmesi, *15. Ulusal Kimya Kongresi*, Muğla, Türkiye, 1-6 Ekim 2012.
- [3] Özkoç G., **Gökçe Ö.**, Kasap M., Akpınar G., Properties of Biodegradable TPU/Waste Chicken Feathers Composites and Their Investigation of Potential Use as Tissue Engineering Scaffold, *The 29<sup>th</sup> International Conference of The Polymer Processing Society (PPS-29)*, Nuremberg Germany, 15-19 July 2013.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Ankara'da doğdu. Ortaokul ve lise öğrenimini Ankara' da Ankara Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında girdiği Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2007 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2011-2013 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.