

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİYLE YUMUŞAK DOKU
MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMA UYGUN YÖNLENMİŞ
YARİSENTETİK POLİMER TAŞIYICI ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

CANSU DUMLU

KOCAELİ 2013

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİYLE YUMUŞAK DOKU
MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMA UYGUN YÖNLENMİŞ
YARİSENTETİK POLİMER TAŞIYICI ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

CANSU DURLU

Yrd.Doç.Dr. Halime KENAR
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Güralp ÖZKOÇ
Jüri yesi, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU
Jüri yesi, Yalova Üniv.



Tezin Savunulduđu Tarih: 27.12.2013

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Son yıllarda sağlık alanında yapılan çalışmalar tıbbi araştırma laboratuvarlarının dışına çıkıp, mühendislik bilimi ile ortak çalışarak biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarını doğurmuştur. Bu alanlar insan sağlığının iyiliği için çalışmalarını disiplinler arası olarak sürdürmekte ve hızla gelişmektedir. Özellikle polimer bilimi ve biyolojik bilimlerin ortak çalışmalarının bu alanlara yaptığı büyük katkılar sayesinde gelecekte, defalarca yenilenen cerrahi müdahaleler azalacak, yaralar çok daha hız iyileşecek, kayıp dokular yenilenecek ve hastalar eski sağlıklarına çok daha kısa sürede kavuşacaklar. Bu tez çalışmasının alanında yeni fikirler ve gelişmelere yol açacağını umuyorum.

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, tüm çalışmam süresince, çalışmamın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli tüm desteği hiçbir zaman esirgemeyen, yakın ilgi ve anlayışla çalışmamın tamamlanmasında çok büyük emeği bulunan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Halime KENAR'a,

Alanında sahip olduğu yüksek bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yardımcı ve destek olan bölüm başkanımız Sayın Doç. Dr. Güralp ÖZKOÇ'a,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde çok büyük emeği olan, bilgisi ve deneyimleriyle yardımlarını hiç esirgemeyen, laboratuvarlarında beni misafir eden hocam Sayın Prof. Dr. Vasıf HASIRCI'ya ve ekibine,

Tez çalışmamın yürütülmesinde ve biyolojik dokuların temini konusunda hastalarla iletişimimizi sağlayan değerli hocam Sayın Dr. Emek DOĞER'e,

Tez çalışmamdaki biyokimyasal analiz yöntemlerinde engin bilgi ve tecrübesiyle yardımını esirgemeyen hocam Sayın Murat KASAP'a,

Çalışmalarım esnasında bana laboratuvarlarını açan tüm öğretim üyesi ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 111T368 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir. Tez çalışmasına maddi destek sağlayan TÜBİTAK TBAG Başkanlığı'na ve muhasebe işlerini özveriyle gerçekleştiren Kocaeli Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü personeline,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi olarak beni destekleyen, aileme Teşekkürü bir borç bilirim.

Aralık – 2013

Cansu DUMLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Doku Mühendisliği	3
1.1.1. Yumuşak Doku Mühendisliği Yaklaşımı	4
1.2. Yumuşak Dokuların Yapısal Özellikleri	5
1.2.1. Hücreler Arası Maddenin Yapısı ve Temel Bileşenleri	5
1.2.1.1. Hiyaluronik asit	6
1.2.1.2. Kollajen fibriller	6
1.2.1.3. Fibroblastlar ve kök hücreler	8
1.3. Yumuşak Doku İyileşmesi	8
1.4. Biyouyumlu ve Biyobozunur Malzemeler	10
1.4.1. Doku mühendisliğinde kullanılan sentetik polimerler	11
1.4.2. Doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerler	13
1.5. Doku İskeleleri	15
1.6. Kullanılan Deneysel Yöntemler ve Cihazların Çalışma Prensipleri	16
1.6.1. Elektro-eğirme yönteminin tarihçesi ve çalışma prensibi	16
1.6.2. Liyofilizatör	19
1.6.3. İklimlendirmeli çekme testi cihazı	21
1.6.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	23
1.6.5. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	24
1.6.6. Dinamik mekanik analiz (DMA) yöntemi	25
1.6.7. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	27
1.6.8. Coomassie Mavisi Boyaması	29
1.6.9. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	29
1.6.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	30
1.7. Hücre - Biyomalzeme Etkileşimleri	31
2. MALZEME VE YÖNTEM	33
2.1. Sağlıklı İnsan Göbek Bağından Hyaluronik Asit ve Kollajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu	33
2.2. PLC/Kol/HA Karışımından ve PLC Kopolimerinden Doku İskelelerinin Elektro-eğirme Yöntemiyle Üretilmesi	35
2.3. PLDL/Kol/HA Karışımından ve PLDL Kopolimerinden Doku İskelelerinin Elektro-eğirme Yöntemiyle Üretilmesi	36
2.4. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA İskelelerin Çapraz Bağlanması	37

2.5. PLC ve PLC/Kol/HA Doku İskelelerinin Mekanik ve Isıl Analizi.....	37
2.6. PLC ve PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA İskelelerin Su Tutma Kapasitelerinin Ölçülmesi	39
2.7. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA İskelelerin Gözeneklilik Oranının Ölçülmesi	39
2.8. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA İskelelerin Biyoerozyon Oranlarının Belirlenmesi	40
2.9. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA İskelelerde Protein Varlığının Aranması ve Taramalı Elektron Mikroskopisi	40
2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	41
2.10.1. Endotel hücrelerin insan göbek bağı veninden izolasyonu ve çoğaltılması.....	41
2.10.2. Anjiogenez testi	42
2.10.3. Endotel hücrelerin nano/mikrofibröz polimerik taşıyıcıların üzerinde çoğaltılması ve kılcal damar ağı oluşumunun değerlendirilmesi.....	42
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
3.1. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin ve Kollajenin FT-IR Spektroskopisi	43
3.2. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Kollajenin SDS-PAGE Bulguları.....	45
3.3. PLC/Kol/HA ve PLDL/Kol/HA Elektro-eğirilmiş İskelelerde Protein Varlığının Kanıtlanması	46
3.4. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	48
3.5. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA iskelelerin Çapraz Bağlanması Deneyinin Bulgular	50
3.6. PLC/Kol/HA Karışımından ve PLC Kopolimerinden Üretilen Doku İskelelerinin Çekme Testi ve DMA ile Yapılan Mekanik Analiz Bulgular	51
3.7. PLC Kopolimerinden ve PLC/Kol/HA Karışımından Elektro-eğirilerek Üretilen İskelelerin Isıl Analiz Bulgular.....	54
3.8. Tutma Kapasiteleri Ölçüm Bulgular	55
3.9. PLC, PLC/Kol/HA, Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA Doku İskelelerinin Gözeneklilik Oranları Bulgular	56
3.10. PLC/Kol/HA, Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA ve PLC Doku İskelelerinin Yüzde Erozyon Oranları Bulgular	58
3.11. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	60
3.11.1. Anjiogenez Testi.....	60
3.11.2. Endotel hücrelerin nano/mikrofibröz polimerik taşıyıcıların üzerinde çoğaltılması ve kılcal damar ağı oluşumunun değerlendirilmesi.....	60
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	69
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Hücreler arası maddenin hücre ile ilişkisinin şematik gösterimi	6
Şekil 1.2.	Kollajen fiberlerini oluşturan zincirlerin ve fibrillerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.3.	İyileşme süreci.....	9
Şekil 1.4.	A. Film doku iskelesinin SEM görüntüsü, B. Köpük doku iskelesinin SEM görüntüsü, C. Fiber doku iskelesinin SEM görüntüsü	16
Şekil 1.5.	Bornat Deney Düzeneği	17
Şekil 1.6.	Basit bir elektro-eğirme düzeneği.....	18
Şekil 1.7.	Yönlenmiş fiber oluşturma prensibi	19
Şekil 1.8.	Laboratuvar tipi bir liyofilizatör	20
Şekil 1.9.	Çekme cihazının temel bileşenleri.....	21
Şekil 1.10.	Sıvı banyolu bir çekme testi cihazı.....	22
Şekil 1.11.	Taramalı elektron mikroskopunun şematik gösterimi	24
Şekil 1.12.	Örnek bir FTIR spektrumu	25
Şekil 1.13.	DMA sıcaklık taraması analizinden elde edilecek tipik bir termal eğri	26
Şekil 1.14.	DMA frekans taraması analizinden elde edilecek tipik bir termal eğri	27
Şekil 1.15.	DSC'nin şematik gösterimi	27
Şekil 1.16.	Örnek DSC termogramı	28
Şekil 1.17.	SDS-PAGE deney düzeneği.....	30
Şekil 1.18.	Hücre yüzey etkileşimi	31
Şekil 2.1.	A. SCANVAC® CoolSafe liyofilizatör, B. Kurutulmuş kollajenler	34
Şekil 2.2.	A. IKA® A10 öğütücü, B. Öğütülmüş stok kollajen.....	35
Şekil 2.3.	Perkin Elmer Spectrum 100 marka FTIR cihazı	35
Şekil 2.4.	Deneyde kullanılan elektro-eğirme düzeneği.....	36
Şekil 2.5.	Tinius Olsen® H5KT su banyolu çekme cihazı.....	38
Şekil 2.6.	01dB-Metravib marka DMA50 model DMA cihazı	38
Şekil 2.7.	Mettler Toledo DSC 1 cihazı	39
Şekil 2.8.	QUANTA 400F Field Emission SEM	41
Şekil 3.1.	Hyaluronik asitin FT-IR spektrumu ve moleküler yapısı	43
Şekil 3.2.	İnsan göbek bağından izole edilen kollajene ait FT-IR spektrumu	44
Şekil 3.3.	İzole edilen kollajenin SDS-PAGE görüntüsü	45
Şekil 3.4.	Elektro-eğirilmiş PLC, PLC/Kol/HA, PLDL ve PLDL/Kol/HA commassie mavisi boyaması görüntüleri	46
Şekil 3.5.	A. PLC/Kol/HA ve B. PLDL/Kol/HA iskelelerin commassie mavisi boyaması 800x ışık mikroskobu görüntüsü	47
Şekil 3.6.	Elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA'in, kollajenin ve hyaluronik asidinin FT-IR spektrumu	47
Şekil 3.7.	Elektroeğirme ile elde edilmiş PLC (A-5000x), PLC/Kol/HA (B-5000x), PLDL (C-10000x) ve PLDL/Kol/HA (D-10000x) nano/mikrofibröz taşıyıcıların SEM görüntüleri	48

Şekil 3.8.	Elektro-eğirme ile elde edilmiş PLC (A-1000x, B-3000x) ve PLC/Kol/HA (C-1000x, D-3000x) nano/mikrofibröz taşıyıcıların SEM görüntüleri	49
Şekil 3.9.	A. PLC, B. PLC/Kol/HA ve C. çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin 21 günlük biyorozyon sonrasındaki SEM fotoğrafları (x5000).....	50
Şekil 3.10.	Elektro-eğrilmiş (A) PLC, (B) PLC/Kol/HA ve (C) çapraz bağlı PLC/Kol/HA'nın gerilim-gerinim eğrileri	51
Şekil 3.11.	Elektro-eğrilmiş PLC'nin, PLC/Kol/HA'nın ve çapraz bağlı PLC/Kol/HA'nın 37 °C'de frekans taraması sonucu elde edilmiş depo modülü (E') ve kayıp modülü (E'') eğrileri	53
Şekil 3.12.	Elektro-eğrilmiş PLC/Kol/HA, çapraz bağlı PLC/Kol/HA ve PLC'(n)in tan δ -frekans eğrisi	54
Şekil 3.13.	PLC ve PLC/Kol/HA iskelelerin DSC termogramları.....	55
Şekil 3.14.	PLC/Kol/HA, çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA ve PLC iskelelerin yüzde su tutma kapasiteleri	56
Şekil 3.15.	PLC/Kol/HA, çapraz bağlanmış PLC/Kollajen/HA ve PLC iskelelerin yüzde gözeneklilik oranları	57
Şekil 3.16.	PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin 7,14 ve 21. günlerdeki yüzde erozyon grafiği.....	58
Şekil 3.17.	HUVEC hücrelerinin 1 hafta sonunda fibrin jel altında oluşturduğu damar ağının invert mikroskop görüntüsü	60
Şekil 3.18.	Endotel hücrelerin hücre kültürü kabında DMEM/F12 besiyeri ortamında 14 günlük inkübasyon sonundaki görüntüsü (x400).....	61
Şekil 3.19.	A. PLC/Kol/HA iskele üzerinde 5 günlük inkübasyon sonunda tutunan endotel hücrelerin görüntüsü (x400), B. PLC iskele üzerinde 5 günlük inkübasyon sonunda hücre tutunmasının olmadığı görüntü (x400).....	61
Şekil 3.20.	PLC/Kol/HA iskele üzerinde DMEM/F12 besiyeri ortamında endotel hücrelerin 7 günlük inkübasyonu sonundaki görüntüsü (x400), A1. CD31, A2. Çekirdek, PLC/Kol/HA iskele üzerinde DMEM/F12 besiyeri ortamında endotel hücrelerin 14 günlük inkübasyonu sonundaki görüntüsü (x400), B1. CD 31, B2. Çekirdek.....	62
Şekil 3.21.	Endotel hücrelerin PLC iskele üzerinde DMEM/F12+EGM-2 (1:1) besiyeri ortamında inkübasyonunun floresan mikroskobu görüntüsü A1. 7 gün (x100), A2. 7 gün (x400), B1. 14 gün (x100), B2. 14 gün (x400) (yeşil: CD31, kırmızı: hücre çekirdekleri)	63
Şekil 3.22.	Endotel hücrelerin DMEM/F12+EGM-2 besiyeri ortamında 14 günlük inkübasyon sonunda oluşturdukları damarsı oluşumlar (x100), A1,B1 CD31, A2,B2. Çekirdek.....	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Biyouyumlu malzemelerde olması gereken özellikler	11
Tablo 1.2. Biyo-bozunabilir sentetik polimerler ve onların uygulama alanları.....	12
Tablo 1.3. Tıpta kullanılan polimerlerin yaygın klinik uygulamaları ve tipleri	13
Tablo 3.1. Çekme testi bulguları	52
Tablo 3.2. Elektro-eğirilmiş PLC'nin, PLC/Kollajen/HA'in ve çapraz bağlı PLC/Kollajen/HA'in DMA analizi bulguları.....	55

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

T _g	: Camısı geçiş sıcaklığı, (°C)
T _m	: Erime sıcaklığı, (°C)

Kısaltmalar

DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Modifiye Edilmiş Zengin Besiyeri)
ECM	: Extra Cellular Matrix (Hücreler Arası Matriks)
EDC	: 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)kordiamid)
EGM	: Endothelial Cell Growth Media (Endotelial Hücre Besiyeri)
EtOH	: Etil Alkol
FITC	: Fluorescein İsothiocyanate (Floresan Hücre Boyası)
GAG	: Glikozaminoglikan
HA	: Hyaluronik Asit
HBSS	: Hank's Stock Solution (Tampon Çözelti)
HFIP	: Hexafluoroisopropanol
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (İnsan Göbek Bağı Veni Endotel Hücreleri)
Kol	: Kollajen Proteini
PFA	: Paraformaldehit
PLC	: Poli (L-laktid/caprolakton) (Poli L-laktik/kaprolakton) Kopolimeri
PLDL	: Poli L-laktid/DL-laktid Kopolimeri
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
UV	: Ultraviyole

ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİYLE YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMA UYGUN YÖNLENMİŞ YARİSENTETİK POLİMER TAŞIYICI ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada, yumuşak doku mühendisliğinde kullanmak amacıyla poli(L-laktid/caprolakton) (70:30) (PLC) kopolimeri, insan göbek bağı kollajeni ve hyaluronik asiti elektro-eğirilerek, nano/mikro fibril doku iskeleleri üretilmiştir. İzole edilen kollajen SDS-PAGE ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. Fiber yapıların mekanik, termal ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla çekme testi, dinamik mekanik analiz, diferansiyel taramalı kalorimetre analizi ve taramalı elektron mikroskopisi gerçekleştirilmiştir. Yarı-sentetik yapılardaki biyolojik içeriği göstermek amacıyla histo-kimyasal boyama yapılmıştır. Tampon çözelti içinde bu yapıların zamanla hidrolize bağlı erozyonu test edilmiştir. Bu düşük maliyetli hibrit doku iskelelerinin hem deri yara örtüsü olarak hem de diğer yumuşak doku hasarlarında iyileşmeye yardımcı olarak kullanılabilirliği in vitro ortamda biyoyumluluk testi ile gösterilmiştir. Bu doku iskeleleri yumuşak dokular ile mekanik ve termal olarak uyumlu olduğu kadar, insan dokusu kaynaklı hücre dışı matriksi bileşenleri dışında bir biyolojik materyal içermediğinden biyolojik açıdan da oldukça uyumludur, immün yanıtı neden olması beklenmemektedir. Nano/mikro fiber mimarisi, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri hücre tutunması ve çoğalması açısından büyük avantaja sahiptir. Sonuç olarak, bu hibrit doku iskelesi potansiyel bir yumuşak doku özdeşi ve yara örtüsü materyali olmaya adaydır.

Anahtar Kelimeler: Elektro-eğirme, Hibrit Doku İskeleleri, Kollajen, Nano/mikro Fiberler, Yumuşak Doku Mühendisliği.

ELECTROSPINNING AND CHARACTERIZATION OF ORIENTED SEMI-SYNTHETIC SCAFFOLDS FOR SOFT TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

ABSTRACT

In this study, nano/micro fibrous matrices composed of poly(L-lactide/caprolactone) (70:30) (PLC) copolymer, collagen and hyaluronic acid from human umbilical cord were fabricated by electrospinning for use in soft tissue engineering applications. The collagen isolated from umbilical cord was characterized via SDS-PAGE and FTIR. The mechanical, thermal, and morphological characteristics of the fibrous mats were studied with tensile tests, dynamic mechanical analysis, differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy, respectively. Histochemical staining of the hybrid mats revealed the even distribution of the biological component in the fibers. Time dependent bioerosion of the scaffolds through hydrolysis was tested in a buffer solution. These moderate cost hybrid scaffolds are suitable for use as skin wound dressing and also in treatment of other soft tissue injuries as shown by in vitro biocompatibility tests. These scaffolds are compatible with soft tissues in regard to their mechanical and thermal properties and also biologically since they do not contain any biological components but human tissue derived extracellular matrix components and are not expected to cause any immune response. Additionally, their nano/micro fibrous architecture, biocompatibility and biodegradability provide them a big advantage in terms of promoting cell adhesion and proliferation. These hybrid scaffolds can be considered as potential material to be used in preparation of soft tissue substitutes and wound dressings.

Keywords: Elektrospinning, Hybrid Scaffolds, Colllagen, Nono/micro Fibers, Soft Tissue Engineering.

GİRİŞ

Hastalık ya da kazalar nedeniyle işlev göremez hale gelen doku veya organın yerine sağlıklı bir yenisinin değişik yöntemlerle oluşturulması günümüzde hücre biyolojisi, polimer kimyası, malzeme bilimi, biyomedikal mühendisliği ve biyokimya alanlarının yer aldığı, çok disiplinli bir araştırma alanıdır [1]. Bu alanda yapılan çalışmalar doku mühendisliği adı altında toplanmaktadır.

Doku mühendisliği, hasar görmüş dokuları onarabilecek, işlevlerini yerine getirecek ve zayıflamış işlevleri geliştirecek doku ve doku özdeşleri oluşturmayı amaçlayan bir alan olarak tanımlanmaktadır.

Doku mühendisliğinin ilk zamanlarındaki gelişimi yapay biyomalzemelerin gelişimi ile paralel olarak gerçekleşmiştir. Rekonstrüktif tıbbın başı çeken uygulama alanlarının klinik uygulama örnekleri, modern dişçilik ve ortopedinin öncesinde mevcuttu. Ambroise Pare` (1510–1590) Dix livres de la chirurgie adlı çalışmasında diş, burun ve vücudun diğer parçalarını yeniden oluşturmanın yollarını anlatmaktadır [1].

Doku mühendisliği modern anlamda 1970’li yılların başlarında çalışılmaya başlanmıştır. Bu dönemde bir çocuk ortopedi cerrahı olan W. T. Green, M.D., nude (çıplak) farelerin kemik spikülleri üzerine kondrositleri implante ederek kırıkta doku geliştirmeyi amaçlamıştır. Green bu çalışmasında başarısız olmasına rağmen, biyouyumlu malzemelerin gelişmesine ve canlı hücre ekilebilen yapı iskeleleri oluşturulabileceğine örnek teşkil ederek doku mühendisliğinde bir öncü olmuştur [2].

Gelişme çabasında olan bu alanın doğumunda anahtar rolü 1980’li yılların ortalarında Boston Çocuk Hastanesinden Dr. Joseph Vacanti ve MIT’den Dr. Robert Langer oynamıştır. Dr. Vacanti ve Dr. Langer biyouyumlu/biyobozunur, canlı hücre ekimi için fonksiyonel yapı iskelesi üretmeyi başarmışlardır [2].

Biyoyumlu ve biyobozunur yapı iskelelerinin tasarlanmasında çok farklı malzemeler kullanılmışsa da polimerler bu iş için biçilmiş kaftandır. Günümüzde birçok çalışmada poli(laktik asit) (PLA), poli(kaprolakton) (PCL) ve poli(glikolik asit) (PGA) gibi biyoyumlu ve biyobozunur sentetik polimerler kullanılmaktadır.

Polimer kelimesinden pek çok zaman endüstriyel anlamlar çıkarılsa da bitkiler ve hayvanlar da birçok polimerik üründen oluşmaktadır. En başta DNA ve RNA olmak üzere karbohidratlar (hyaluronik asit vs.) ve proteinler (kollajen, elastin vs.) başlıca insan vücudunun ürettiği polimerlerdir.

Günümüze kadar sayısız sentetik ve biyolojik doku iskeleleri, yara örtüleri ve çeşitli implantlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında yumuşak doku mühendisliğinde birçok açıdan oldukça kullanışlı olmasından dolayı elektro-eğirilmiş ağsı iskeleler çalışılmaktadır. Bu yöntemle üretilen fiberlerin çapları mikro ya da nano boyutlarda olabilirken yapı iskelesi olarak hücre tutunmasına imkan sağlayan bir çok özellikleri de bünyelerinde barındırırlar.

Doğum sonrasında tıbbi atık olarak imha edilen insan göbek bağları, doğal birer polimer olan kollajeni ve hyaluronik asiti bol miktarda bulundurlar. Bu çalışmada yumuşak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere, insan göbek bağından izole edilen kollajen ve hyaluronik asit ile birlikte PLA/PCL (70:30) kopolimeri kullanılarak yarı-sentetik ve biyobozunur polimer karışımından elektro-eğirme yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen yönlenmiş nano/mikro fiberlerin mekanik, termal, histokimyasal ve morfolojik özellikleri çalışılmıştır. Bunlara ek olarak; biyoyumluluk ve biyorozyon testleri yapılarak, yumuşak doku hasarlarının iyileştirilmesinde kullanılabilecek bir doku iskelesi geliştirilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Doku Mühendisliği

Biyomedikal uygulamalarda doku ve organları onarmak veya vücut işlevini arttırmak ya da yerlerini doldurmak için kullanılan doğal, yapay ve yarı-yapay malzemelere biyomalzeme denir. Bu malzemeler fiber, film, jel, sünger ve benzeri birçok yapıda üretilirler. Bu sebepten dolayı birçok farklı kullanım alanına sahiptirler.

Doku mühendisliği, hasar görmüş dokuları onarabilecek, işlevlerini yerine getirecek ve zayıflamış işlevleri geliştirecek doku ve doku özdeşleri oluşturmayı amaçlayan bir alan olarak tanımlanmaktadır. Doku mühendisliğinin ilk zamanlarındaki gelişimi yapay biyomalzemelerin gelişimi ile paralel olarak gerçekleşmiştir.

Günümüzde disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliği hızla gelişmekte ve yapılan çalışmalar yaygın olarak klinik ve cerrahide uygulamaya konulmaktadır.

Doku mühendisliğinde kullanılacak olan malzeme biyouyumlu, biyobozunur, toksisiteye neden olmayan, uygun bir ömre ve mekanik özelliğe sahip bir malzeme olmalıdır. Bu nedenle uygulamalarda tüm bu özellikleri bir arada bulunduran polimerik malzemeler tercih edilmektedir.

Doku mühendisliği sürekli gelişmekte olan bir bilim dalı olmasını; temel aldığı biyoloji, tıp, malzeme bilimi gibi disiplinlerin gelişimine borçludur. Özellikle insan dokuları üzerinde çalışılan bu bilim dalı, kemik, kıkırdak, sinir, deri, kas gibi sert ve yumuşak hemen hemen tüm dokuları kapsayan geniş bir çalışma alanına sahiptir. Çalışılan her dokunun kendine has fizyolojisi, morfolojisi ve histolojisi olduğundan, doku mühendisliği çalışmalarında farklı yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması söz konusudur.

Doku mühendisliği çalışmalarında gerçek biyolojik doku taklit edilmeye çalışıldığından hücre, yapı iskelesi ve düzenleyiciler gibi dokunun tüm bileşenlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İşlevsel bir doku elde edebilmek için ihtiyaç duyulan hücre

miktarı çok fazla olduğundan, bu hücrelerin laboratuvar ortamında kolaylıkla çoğaltılabilmesi, birçok hücre tipine dönüşebilmesi ve genetik açıdan genç olmaları gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı doku mühendisliği çalışmalarında kök hücrelerin kullanılması tercih edilmektedir [1].

Bir hücrenin farklılaşması ya da çoğalmasında onun mikro çevresi büyük önem arz eder. Mikro çevre temelde fizyolojik ve mekanik özellikleri sayesinde hücrenin bulunduğu ortamdaki davranışını etkiler [2]. Doku mühendisliğinde kullanılan iskele hücre için mikro çevre olduğundan oluşturulmak istenen dokunun iskelesinin belirlenmesi önemlidir.

Dokularda hormonlar, çeşitli büyüme faktörleri, vitaminler, mineraller gibi birçok düzenleyici rol almaktadır. Oluşturulmak istenen dokunun tipine özgü olarak düzenleyiciler seçilmektedir. Bu sayede kök hücrelerin hedef dokunun hücrelerine farklılaşması sağlanır [3].

1.1.1. Yumuşak Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Yumuşak doku olarak tabir edilen dokular kaslar başta olmak üzere, tendonlar, sinirler, epiteller/deriler ve yağlardır. Günümüzde en çok üzerinde çalışılan yumuşak dokular kas ve deri dokularıdır. Bu dokuların hasar görmesi ya da kaybedilmesi hastanın o dokuyla ilişkili birçok fonksiyonu yerine getirememesine dolayısıyla hayat kalitesinin düşmesine hatta ölümüne sebep olmaktadır. Yumuşak doku hasarlarına günlük hayatta oldukça sık rastlanır; trafik kazaları sonucu kas ve deri yaralanmaları ve kayıpları, doğuştan oluşan yarık dudak sendromu, kalp krizleri sonucu oluşan kalp kası kaybı, ciddi yanıklar sonucu oluşan deri kayıpları buna örnek teşkil eder.

Yumuşak doku mühendisliğinde üç temel bileşen olan iskele, hücre ve uyarıcılar kullanılmaktadır [1].

Yumuşak dokularda iskele malzemesi olarak en yaygın olarak doğal bir polimer olan kollajen kullanılmaktadır. Kollajen; jel, sünger, film ve bunların kombinasyonları şeklinde çeşitli yumuşak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Yumuşak doku mühendisliğinde kollajen kullanılmasının temel sebepleri kollojen

elde etmenin günümüzde kolay olması, biyomalzeme olma standartlarını sağlaması, kollajenin metabolizmada önemli roller oynamasıdır [4].

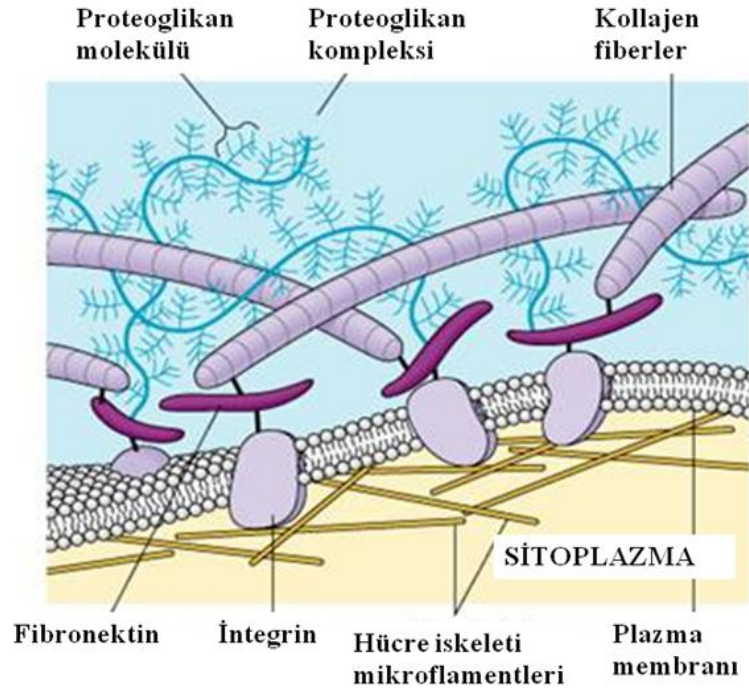
Kollajenin avantajlarının yanında bazı dezavantajlarının da olması, yumuşak doku mühendisliğinde araştırmacıları bazı sentetik biyouyumlu malzemeleri kollajenle birlikte kullanmaya yöneltmiştir [5].

Yumuşak dokularda mekanik özelliklerinin yanı sıra doku iskelesinin biyorozyon süresi de oldukça önemlidir. Bu aşamada kollajenin vücutta hızla bozunmasının önüne geçmek amacıyla sentetik ve biyolojik malzemeler birleştirilerek yarı-sentetik biyomalzemeler üretilmiş ve yumuşak doku mühendisliğinde kullanılmaya başlanmıştır [6].

1.2. Yumuşak Dokuların Yapısal Özellikleri

1.2.1. Hücrelerarası Maddenin Yapısı ve Temel Bileşenleri

Bağ dokusu gerçek dokularda hücrelerarası madde (Extra Cellular Matrix- ECM), ve hücrelerden oluşan bir destek dokusudur. ECM, bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenir ve esas olarak proteoglikanlardan (%95 polisakkarit, %5 protein) oluşur. Şekil 1.1’de ECM’in şematik gösterimi bulunmaktadır. Proteoglikan molekülü, bir merkezi protein ve buna kovalent bağla bağlanan GAG (glikoz aminoglikan) moleküllerinden meydana gelir. GAG’lar şekerlerin çoğunda bulunan sülfat ve karboksil grupları nedeniyle negatif elektrik yüklüdür. Bu negatif yük suya karşı yüksek ilgi oluşturarak jel şeklinde bir zemin maddesinin oluşmasına yol açar. Bu durum bakteri ve büyük moleküllerin hareketini kısıtlarken, suda çözünebilen moleküllerin hızlı difüzyonuna izin verir. Ayrıca proteoglikanların büyüme faktörlerini bağlayan bölgeleri de vardır [7].



Şekil 1.1. Hücreler arası maddenin hücre ile ilişkisinin şematik gösterimi [8]

Hücrelerarası madde doku mühendisliğinde yapı iskelesi olarak taklit edildiğinden dolayı, ECM'i tanımak yumuşak doku mühendisliği için malzeme geliştirmek açısından oldukça önemlidir.

ECM 7 farklı GAG içerebilmektedir. Bunlar; hiyaluronik asit, kondrotin 4-sülfat, kondrotin 6-sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve heparindir.

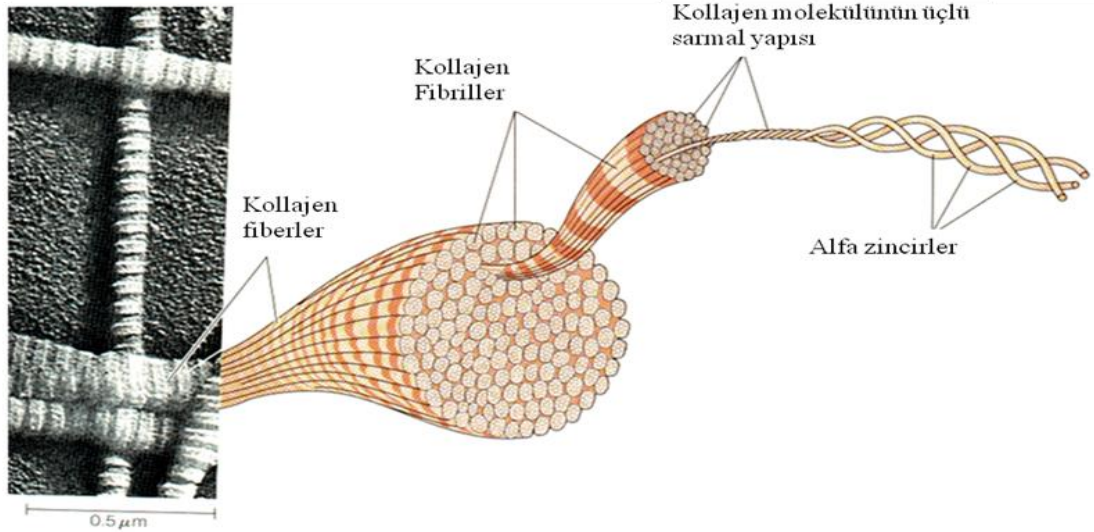
1.2.1.1. Hiyaluronik asit

ECM'de GAG'lardan en yüksek miktarda bulunanı hiyaluronik asittir. Hiyaluronik asit vitreous humor (göz merceğinin arkasındaki camsı cisim), sinoviyal sıvı, göbek bağı, tendon gibi çeşitli dokularda özellikle bol miktarda bulunmaktadır. Çok uzun ve ağır bir moleküldür. Uzatıldığında 2.5 mikron kadar uzayabilir. En önemli özelliklerinden biri sulu ortamda çözünebilmesidir. Hiyaluronik asit, fibroblastlar tarafından sentezlenir [7].

1.2.1.2. Kollajen fibriller

Bağ dokusunun tüm çeşitlerinde değişik miktarlarda bulunur. Kollajen fibriller en çok fibroblast tarafından sentezlenir. Kollajen fibrillerin en önemli özellikleri

gerilme ve çekilmelere karşı dayanıklı olmasıdır. Kollajen fibriller kollajen proteininden oluşmuştur. Bu protein bir biri üzerine sarılmış 3 alfa zincirinden meydana gelir. Şekil 1.2’de kollajen fibrillerinin dizilimi ve kollajen fiberlerini oluşturması gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Kollajen fiberlerini oluşturan zincirlerin ve fibrillerin şematik gösterimi [9]

Günümüze kadar tanımlanan 19 kollajen tipi mevcuttur. Dokularda en yaygın bulunan kollajen tipi tip1’dir ve tüm vücut kollajeninin %90’ını oluşturur. Tip 2 kollajen özellikle kıkırdakta ve tip 3 kollajen karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde bulunur.

Bağ dokusu en önemli fibril olan kollajen fibriller dışında elastik fibriller, retiküler fibriller, fibronektin, laminin, entaktin, tenaskin ve vitronektini de yapısında bulundurur [7].

Kollajen derinin esnekliğini ve gerginliğini sağlayan destek yapıyı meydana getirir. Kollajenin tıpta yer alması, ilk olarak hayvan kollajeninin ameliyat ipliklerinde kullanılmasıyla başlamıştır. Daha sonraları, kanamayı durduran bir ajan olarak devam edilmiştir. Kollajen aynı zamanda yüzde güneş etkisi, yaşlılık veya mimikler sonucunda belirginleşen çizgilerin giderilmesinde kullanılır. Kollajen, yeni iyileşen yaranın sağlamlaşmasında görev alır [10].

1.2.2.3. Fibroblastlar ve kök hücreler

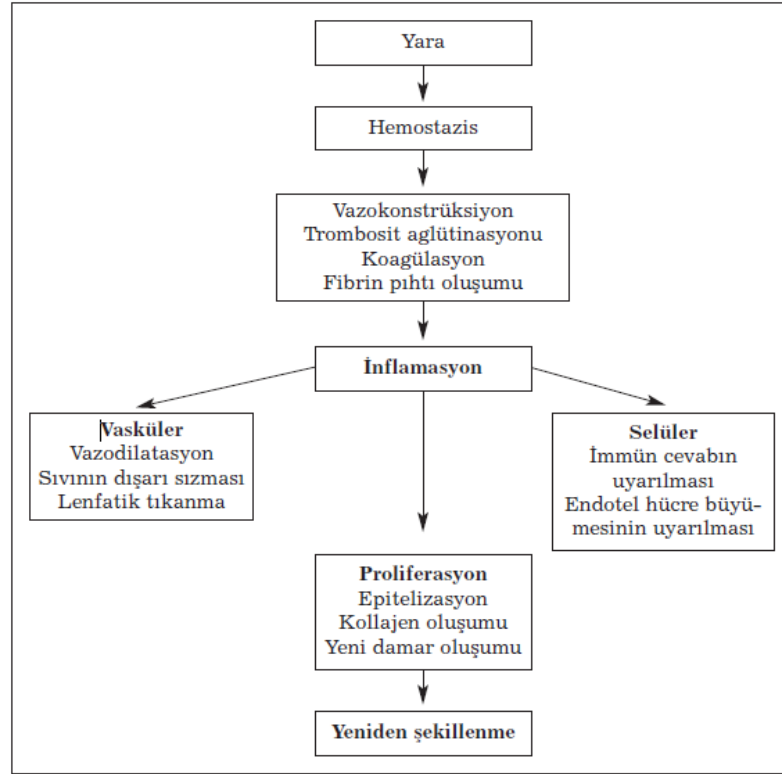
Bağ dokusunun sabit hücreleri fibroblastlardır. ECM’de bulunan GAG, kollajen ve elastinin çoğunu bu hücreler sentezler. Normal koşullarda aktif olmayan fibrositler, bağ dokusunun onarılmasında aktif hale geçerek ECM ve fibril (kollajen) sentezi yapacak fibroblastlara dönüşürler.

Bağ dokuda bulunan bir diğer önemli hücre tipi ise kök hücrelerdir. Kök hücreler doğum sonrası yaşamda, gerektiğinde doku onarımı, yeni doku ve kan damarı oluşumunda aktif hale geçerek bölünüp çoğalırlar ve bu dokuların değişik hücrelerine dönüşürler [7].

1.3. Yumuşak Doku İyileşmesi

Yumuşak doku iyileşmesi yaralanmadan hemen sonra başlar ve doğal iyileşme süreci olarak adlandırılan özel bir sırayı izler. Yara kenarlarından salgılanan maddeler, damar ve hücrelerarası değişimleri başlatarak, kanamayı kontrol altına alır, enfeksiyonu engeller ve iyileşme sürecini hızlandırır.

İyileşme işleminin etkili ve verimli olması, yaralanan bölgeye, yaranın büyüklüğüne ve ciddiyetine göre farklılıklar gösterirse de, iyileşme sürecindeki sıra değişmez. Şekil 1.3’de iyileşme aşamaları şematik olarak gösterilmiştir. İyileşmede hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları bir sıra halinde gerçekleşir [10].



Şekil 1.3. Yara iyileşme süreci [10]

Yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi uzun ve karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin anlaşılması doku mühendisliğinde doku iskelelerinin içeriğinin ve morfolojisinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir.

Hemostaz ve inflamasyon safhasında öncelikle yara bölgesine enfeksiyonları ve kan kaybını engellemek amacıyla çalışacak olan immünolojik elemanlar (nötrofiller, lenfositler, makrofajlar, eozinofiller) ve kan pıhtılaştırıcılar (trombositler, fibrinojen) gönderilir. Proliferasyon safhasında, fibroblastlar, 48.-72. saatlerde görülmeye başlarlar. Fibroblast çoğalması, düşük oksijen basıncı olan alanlarda artar, yaranın merkezinde ve ilerleyen yeni damar oluşumun önünde çoğalma en fazladır. Fibroblastların ana metabolik fonksiyonları, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Bağ dokusunun ana makromolekülü, kollajendir. Fibroblastlar, nedbe (skar/scar doku) oluşumunda ana elemanlardır ve yumuşak doku zedelenmesinin iyileşmesinde temel ürün olan kollajeni oluşturarak, yara direncini sağlarlar [10].

ECM'in ana elemanı olan proteoglikanlar, yeni oluşan nedbe dokusunun %50'sini oluştururlar. Diğer %50 miktarı kollajen oluşturur.

Yara iyileşmesi sürecinde yaralanan bölgeye öncelikle pıhtı oluşturmaktan ve bağışıklıktan sorumlu hücrelerin göç etmesi yaranın iyileştikten sonraki görünümünü kusurlu hale getirmekte ve hatta ciddi yaralanmalarda yetersiz kaldığından yara kronik hale gelmektedir.

Doku iskelesinin içeriği belirlenirken bu durum göz önüne alınarak yapılan bazı çalışmalarda, yaralanmayı takiben kollajen ile muamele edilen yaraların, doğal iyileşme sürecine bırakılanlara oranla %48 oranında daha hızlı ve orijinal dokuya en yakın şekilde iyileştiği gösterilmiştir [11].

1.4. Biyouyumlu ve Biyobozunur Malzemeler

Literatürde en yaygın olarak kullanılan biyomalzeme tanımı `Biyolojik sistemler ile etkileşim amacı ile hazırlanmış, tıbbi araçlarda kullanılan cansız malzemeler`dir [12].

Bir malzemenin biyomalzeme olabilmesi için en önemli koşul biyouyumluluktur, yani spesifik uygulama esnasında malzemenin konuk olduğu ortama karşı sergilediği olumlu tepkidir [13].

Biyoerozyon bir malzemenin yaşayan organizmalar tarafından kimyasal olarak kırılması ve fiziksel özelliklerinin değişmesi olarak tanımlanmaktadır [14]. Bir biyomalzemenin biyouyumlu olması aynı zamanda toksik özellik göstermemesi anlamına da gelir; polimerik biyomalzemeler sentezlenirken katkı maddeleri kullanılmaktadır ve bu maddelerin polimerik yapıdan dışarıya salınarak bulunduğu ortamdaki hücrelere toksik bir etkisinin olmaması gerekmektedir [15]. Biyomalzemenin hazırlanma işlemi biyolojik ve yapısal özellikler açısından karmaşık bir durumdur. Malzeme bilimi ve mühendislik dallarına düşen görev, hazırlanan malzemenin mekanik özellikleri ile erozyon hızı, şekillendirilme özelliği, yüzey morfolojisi ve gözenekliliği gibi özelliklerinin hedef dokunun özelliklerine göre uyarlayabilmektir. Biyolojik açıdan da biyomalzemenin arzu ediliyorsa büyüme faktörü ve hücre tutunmasını kolaylaştıracak uygun bağlayıcı ajanlar içermesi sağlanmalı ve bağışıklık sistemi tarafından yabancı madde olarak algılanmaması ve arzu edilen biyoaktifliği göstermesi için gerekli modifikasyonlar gerçekleştirilmelidir [16].

Biyomalzemeleri metaller, seramikler, kompozitler ve polimerik malzemeler olarak sınıflandırabiliriz [17]. Fakat günümüzde polimer biliminin gelişmesiyle birlikte artık doku mühendisliği için en uygun doku iskelesi malzemeleri polimerik ve kompozit malzemeler olmuştur.

1.4.1. Doku mühendisliğinde kullanılan sentetik polimerler

Polimerik malzemeler, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilmeleri için birçok önemli özelliğe sahip olmalıdırlar [18]. Bu özellikler Tablo 1.1’de sıralanmıştır.

Tablo 1.1. Biyouyumlu malzemelerde olması gereken özellikler [18]

Önemli Özellikler
Vücuda yerleştirildikten sonra her hangi bir alerjik etki ya da toksik salınım göstermemeli
Kontrollü bozunma süresine sahip ve biyobozunur olmalı
Uygun raf ömrüne sahip olmalı
Hücrelerin bağlanabilmesi, büyüebilmesi ve farklılaşabilmesi için uygun kimyasal ve fiziksel yüzey özelliğine sahip olmalı
Besinlerin ve yapıdan atılacak olan ürünlerinin geçişini sağlayacak gözeneklere sahip olmalı
Bozunma süresi iyileşme ya da rejenerasyon süresi ile birbirini tamamlıyor olmalı
Bozunma ürünleri toksik olmamalı, metabolize olabilmeli ve vücut tarafından atılabilmeli
Uygulandığı dokuya göre uygun mekanik özellikler göstermeli
Kolay ve çoklu şekil verilebilir özelliklerde olmalı

Kimyasal karakteri benzer olan polimerler belli koşullar altında çok farklı davranış sergileyebilirler. Örneğin, polietilen ve yüksek molekül ağırlıklı polietilen ortopedide diz ve kalça yer değiştirme biyomalzemesi olarak farklı davranış gösterirler.

Polietilene göre yüksek molekül ağırlıklı polietilen daha az yıpranma ve çökme teşkil eder [16].

Polimerik biyomalzemelerin biyoerozyonu, polimer zincirindeki bağların hidrolitik ya da enzimatik olarak kırılması ile gerçekleşir [18].

Bu nedenle de polimerik biyomalzemeleri bozunma kinetiğine göre hidrolitik olarak bozunan polimerler ve enzimatik olarak bozunan polimerler diye ikiye ayırabiliriz. Örneğin, insan metabolizmasında bozunan PLA yan ürün olarak laktik aside ve sitrik döngü ile su ve karbon dioksit dönüşür. Doğal esaslı polimerlerin çoğu enzimatik olarak bozunmaya uğrarlar [16].

Sentetik biyomalzemeler genellikle biyolojik olarak aktif değildirler ve özellikleri daha öngörülebilirdir. Spesifik uygulamalara göre özellikleri değiştirilebilir. İmplant olarak enzimatik bozunabilir polimerlere nazaran daha çok hidrolitik bozunabilir polimerler tercih edilmektedir. İlk sentetik esaslı biyomalzeme olarak poli(glikolik asit) ameliyat iplikleri 1960'lı yıllarda sentezlenip kullanılmış [19] ve ardından da ortopedik ve diğer tıbbi uygulamalar için yeni polimerik malzemeler üretilip geliştirilmiştir [20-22]. Sentetik biyobozunur ve biyouyumlu polimerler Tablo 1.2'de verilmiştir. Tıpta yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler ve kullanım alanları Tablo 1.3'de verilmiştir.

Tablo 1.2. Biyobozunur sentetik polimerler ve uygulama alanları [18]

Biyobozunur Sentetik Polimerler	Uygulama ve Araştırma Alanları
Poli(glikolik asit)	
Poli(laktik asit) ve kopolimerleri	Bariyer membranlar, ilaç taşıma
Poli(kaprolakton ve kopolimerleri)	sistemleri, ortopedik uygulamalar,
Polianhidritler	stentler, dikiş ipleri, yara örtüleri,
Polisiyanoakrilatlar	yapıştırıcılar, kan ile temas eden
Poli(amino asitler)	sistemler gibi.
Polifosfatazlar	

Tablo 1.3. Tıpta kullanılan polimerlerin yaygın klinik uygulamaları ve tipleri [18]

Kullanım Alanları	Tipleri
Kulak ve kulak parçaları	akrilik, polietilen, silikon, poli(vinil klorür) PVC
Yüz protezi	akrilik, PVC, poliüretan (PU)
Soluk borusu	akrilik silikon, naylon
Kalp ve kalp bileşenleri	poliester, silikon, PVC
Kalp hızlandırıcısı	polietilen, esetal
Akciğer, karaciğer parçaları	poliester, polialdehit ve PVC
Yemek borusu parçaları	polietilen, polipropilen (PP), PVC
Kan damarları	PVC, poliester
Biyo-bozunur dikiş iplikleri	PGA, PU
Sindirim sistemi parçaları	silikon, PVC, naylon
Parmak eklemleri	silikon, UHMWPE
Kemik ve eklem yerleri	akrilik, naylon, silikon, PU, PP, UHMWPE

1.4.2. Doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerler

Doğal polimerler, biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan polimerlerdir. Proteinler (örneğin kollajen, jelatin, elastin, aktin, vb.), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin vb.) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerlerdir [23].

Bağ dokuyu oluşturan hücreler, metabolizma ürünlerinin büyük çoğunluğunu sentezden sonra hücre dışına (ekstraselüler) salgırlar. Bu sentez ürünleri olarak kollajen, elastin ve proteoglikanlar örnek verilebilir [23].

Vücutta bağ dokunun ana bileşeni olan kollajen, toplam vücut proteinlerinin yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. Kollajen, kıkırdakta %50, korneada %68, deride %74 oranında bulunuyor. Kollajenin yapısında %35 oranında glisin, %11 oranındaysa alanin amino

asitleri bulunur. Kollajen, diğer proteinlerden farklı olarak %12 oranında prolin ve %9 oranındaysa hidroksiprolin amino asidi de içerir [17].

Kitin uzun ve doğrusal yapıya sahip bir polisakkarittir. Yapısı selüloza çok benzer. Kitin, genel olarak yengeç, karides, midye gibi bazı deniz kabuklularının, istiridye kabuğu, mürekkep balığı iskeleti gibi bazı deniz yumuşakçalarının ve sinek, çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alıyor.

Kitinin ticari olarak kullanımı, beraberinde bulunan proteinlerin uzaklaştırılmasındaki güçlükler nedeniyle sınırlı kalıyor. Kitinin, heparin ile olan ilişkisi nedeniyle kitin sülfatlar kan pıhtılaşmasını önleyici (antikoagülan) olarak kullanılmaktadır.

Kitosan, kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen amorf yapıda bir poliaminosakkarit ve doğal olarak meydana gelebilen birkaç katyonik polielektrolitten biridir. Kitosan üretiminde hammadde olarak kitin kullanılmaktadır [17].

Hyaluronik asit, uzun zincirli bir polisakkarittir. Bu asit, insan vücudunda bir yapıtaşı olarak, her türlü dokuda (epitelyumdan sinir dokusuna kadar) ve eklem sıvısında bulunan bir moleküldür. Gözün camsı sıvısı, kıkırdak, eklem sıvısı, alt deri (dermis), üst deri (epidermis) ve göbek bağı gibi vücutta farklı bölgelerde bulunur. Yüksek molekül ağırlıklı ve negatif yüklü oluşu ona viskoelastik bir özellik kazandırır. Doğal ve sentetik polimerlerden daha fazla (kendi hacminden bin kat fazla) su tutar. Horoz ibiği, göbek bağı ve diğer bazı hayvansal kaynaklardan saflaştırılır; ayrıca, bakteriden fermentasyon ve doğrudan ayırma (izolasyon) metotlarıyla elde edilebilir. Herhangi bir şekilde alerjik reaksiyonlara sebep olmaz.

Hyaluronik asit, dokuların hidrasyonu (kimyevî reaksiyon sonucu su ile birleşmesi) ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişinde, hücrelerin hareketinde, farklılaşmasında ve bölünmesinde, eklem kayganlığının sağlanmasında, kan akışıyla yaşayan cilt hücrelerine temel besinlerin taşınmasında vazife görür. Bu yüzden ortopedi, romatoloji, oftalmoloji, dermatoloji ve kozmetolojide kullanılmaktadır. Hyaluronik asit, enjekte edildiği yerde, yapısında ve şeklinde uzun süre deformasyon olmadığı için yara tedavisinde de kullanılır; en çok tercih edilen dolgu maddesidir.

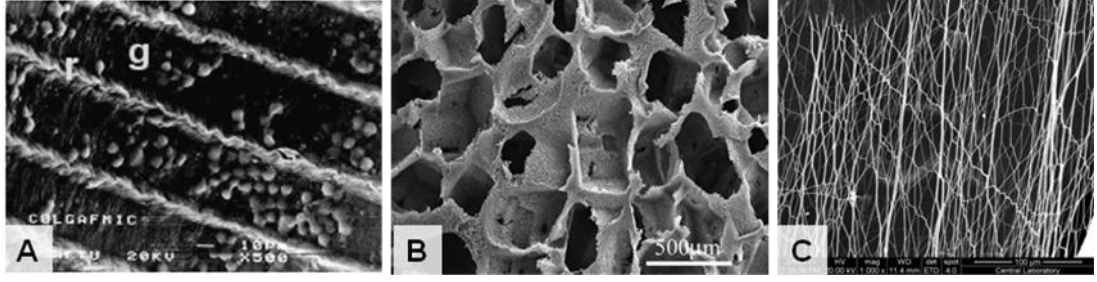
Mekanik ve kimyevi zararlara karşı cildi yumuşatıcı bir rol oynar. Vücudun ürettiği hyaluronik asidin % 50'si üst deride bulunur ve kandaki yarılanma ömrü çok kısa (2,5–5,5 dk.) olduğu için kısa sürede vücuttan atılır.

Cildin kollajen yapısının bozulmasının ana sebebi, kollajeni destekleyen hyaluronik asit stokunun azalmasıdır. Yaşlanmaya bağlı olarak çeşitli faktörlerle üst derideki hyaluronik asit seviyesi düşer ve neticede cilt yaşlanır, incelir; cildin nemi azalır, esneklik ve gerginliği kaybolur. Hyaluronik asitli kremler deriye uygulandığında derinin nem oranı artar; deri üzerinde ince bir film tabakası oluşur ve deri yumuşar; cildin esnekliği ve yeniden yapılanması sağlanır. Kullanımı Amerikan Milli İlaç Ajansı (FDA) tarafından 2003'te onaylanmıştır. Doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemlerinin temel bileşeni olabilecek, yeni, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimer taşıyıcı üretimine uygundur. Hyaluronik asidin molekül ağırlığı ve deri değişiminin azalması neticesi, eklem sıvısının viskoelastik özelliği kaybolmakta ve eklem kıkırdağında daha çok aşınma ve yıpranmalar oluşmaktadır. Bunların tedavisinde eklem içi hyaluronik asit enjeksiyonu kullanılmaktadır. Bunun, eklem sıvısıyla kıkırdak arasında metabolik değişimi düzenleyen, yarı geçirgen bir bariyer oluşturucu tesiri vardır. Bazı ön farmakolojik incelemelerde, hyaluronik asidin kıkırdak yapısını korumaya ve ağrının azalmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir [24].

1.5. Doku İskeleleri

Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri kullanılacak bölgeye ve kullanılan malzemeye göre çeşitlilik gösterirler. Her şeyden önce doku iskeleleri biyouyumlu olmak zorundadır. Daha sonra kullanım amacına göre uzun ya da kısa biyoerozyon sürelerine sahip olmaları beklenir. Uygun gözenekliliğe sahip olmaları hücre tutunması, çoğalması, besinlerin girişi ve atıkların çıkışı için oldukça önemlidir. Doku iskelelerinin vücutta kullanılacağı bölgeye göre istenen mekanik özellikleri vardır. Bunları sağlamak amacıyla uygun malzeme seçimi oldukça önemlidir [25].

Doku iskeleleri günümüzde farklı formlarda üretilebilmektedir. Bunlar filmler [26-27], köpükler [28], ve fiber [29-30] formlarında olabilmektedir. Şekil 1.4'de bu formlara örnekler verilmiştir.



Şekil 1.4. A. Film doku iskelesinin SEM görüntüsü [31], B. Köpük doku iskelesinin SEM görüntüsü [32] C. Fiber doku iskelesinin SEM görüntüsü

Günümüzde yumuşak doku mühendisliğinde en çok kullanılan form fiber formlardır [33,34]. Fiber formlar hücre tutunması için doğal ECM'e benzer bir zemin oluşturduklarından dolayı yumuşak doku mühendisliğinde çokça çalışılmaktadırlar. Birçok sentetik ve doğal polimerlerden fiberler oluşturulabilir. Mikro ve nanofiber formlar elektro eğirme yöntemiyle üretilebilmektedir [35].

1.6. Kullanılan Deneysel Yöntemler ve Cihazların Çalışma Prensipleri

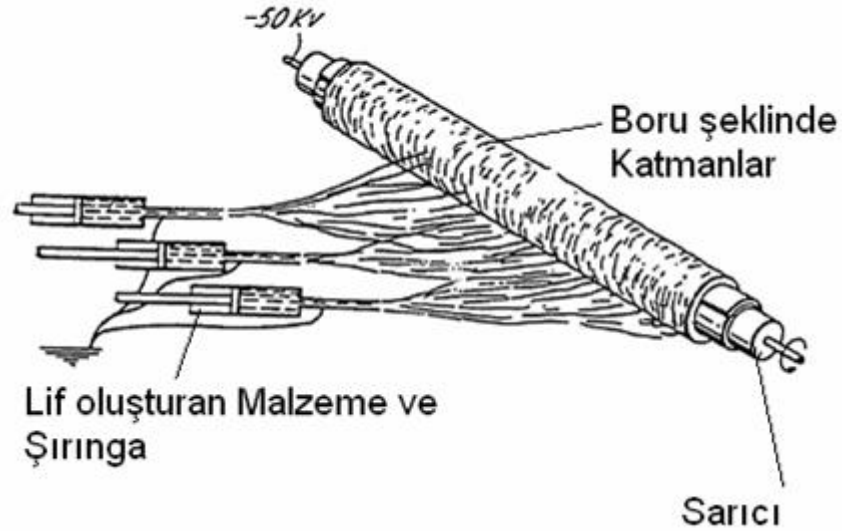
1.6.1. Elektro-eğirme Yönteminin Tarihçesi ve Çalışma Prensibi

Elektro-eğirme işlemi eski bir teknolojidir. Bu işlem 1600'lü yıllarda, William Gilbert'in manyetizma üzerine çalışmaları esnasında tesadüfi bir şekilde elektro-manyetizmanın sıvılar üzerindeki etkisini gözlemlemesi ile ortaya çıkmıştır [36]. Çalışmasında bir su damlasını elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir mesafede, bir koni biçiminde çekildiğine işaret etmiştir. İşte bu elektro eğirme işleminin ilk olarak ortaya konduğu çalışmadır [37]. 1882'de Lord Rayleigh, elektrik yüküne sahip damlaların elektro-eğirme sırasında gösterdiği düzensiz hareketler üzerinde çalışmıştır [38]. Rayleigh yalıtılmış bir yüklü damlacığın kararlılığı üzerine teorik bir çalışma yapmış ve yükün kararlılığını sağlayan yüzey geriliminin üstünde bir değer aldığında damlacığın kararsız bir hale geldiğini ve parçalanmanın gerçekleştiği teorisini ortaya koymuştur. Damla üzerine etkiyen iki kuvvetten birinin elektrik kuvveti, diğerinin ise elektrik kuvvetine tam zıt yönde damlayı etkileyen yüzey gerilimi kuvveti olduğunu bulmuştur [39].

Elektro üretim yöntemiyle lif üretimi hakkındaki ilk patent 1934 yılında Anton Formhals tarafından alınmıştır [40]. Formhals sıvılar üzerinde elektrik alan kullanımı ile suni ve sentetik filament üretimi üzerine bir tasarım yapmıştır [41].

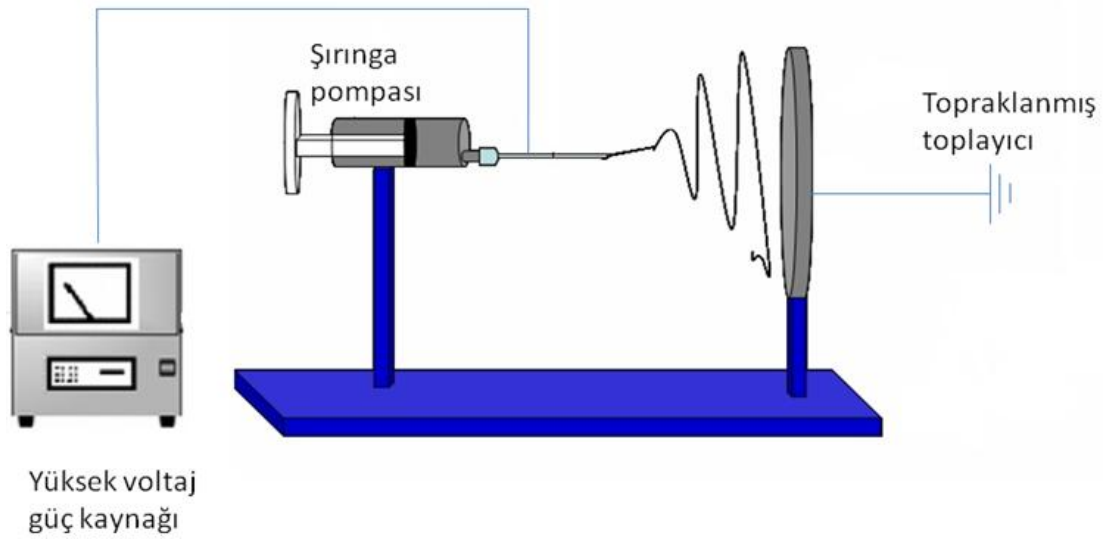
1977’de Martin ve ekibi elektro üretim yoluyla organik polimerlerin lif ağını elde ettiler. Böylece Martin ve ekibi fibrilli tülbenti icat etmiş oldular. İki veya üç boyutlu organik malzemelerin liflerinden tıbbi malzemelerde kullanılmak üzere elektro üretim yöntemiyle lif ağı oluşturmuşlardır [42].

1982’de Bornat, bir silindir üzerine takılıp sökülebilir bir tabaka sarmıştır ve bu mekanizmayı elektro üretimde kullanmıştır [43]. Şekil 1.5’de bu sistem gösterilmiştir. Bu sistemde de ana süreçler öncekilerle aynıdır. Bornat, bu işlemde poliüretanın kullanılmasıyla elde edilen tüp yapılarının suni kan damarı ve idrar kanalı olarak kullanılabileceğini iddia etmiştir. Elektro üretim yöntemi kullanılarak suni vasküler yapıların elde edildiği başka patentler de vardır.



Şekil 1.5. Bornat Deney Düzeneği [44,45]

Polimer esaslı nano/mikro fiberlerin üretimi için en etkin yöntem elektro-eğirme yöntemidir. Elektro-eğirme akışkanlar dinamiği, polimer kimyası, temel fizik, elektrik fiziği, makine ve tekstil mühendisliği disiplinlerini barındıran disiplinler arası bir yöntemdir. Elektro-eğirme yöntemi için gerekli deney düzeneği Şekil 1.6’da verilmiştir. Bu düzenek temel olarak önemli üç ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar yüksek voltaj güç kaynağı, beşleme ünitesi (şırınga pompası) ve toplayıcıdır.

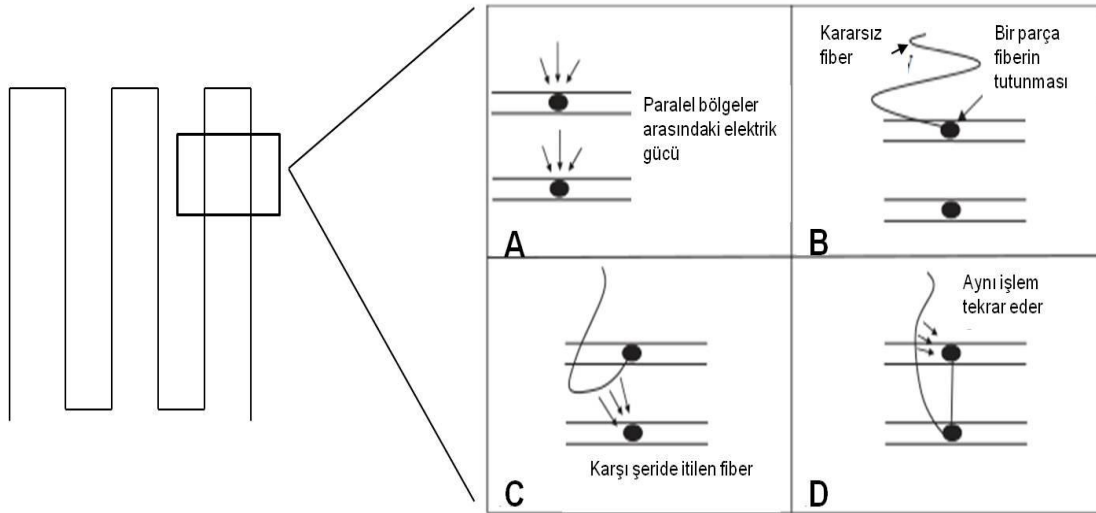


Şekil 1.6. Basit bir elektro-eğirme düzeneği

Bu teknikte, polimer uygun bir çözücünde çözünür ve küt uçlu bir iğnesi bulunan bir şırıngaya doldurulur. Şırınganın iletken iğnesine yüksek voltaj güç kaynağı bağlanır. Şırınga bir pompaya yerleştirilir ve karşısına uygun bir mesafede topraklanmış iletken bir toplayıcı yerleştirilir. Düzenek kurulduktan sonra yüksek voltaj güç kaynağı uygun bir voltajda çalışmaya başlatılır. Elektrik yükleri polimer çözeltisinin viskozitesi ve yüzey gerilimini yendiğinde bu zamana kadar iğnenin ucunda damlacık şeklinde bulunan polimer çözeltisi koni (Taylor konisi) şeklini alır ve koninin ucundan ilerleyen nano/mikro boyutlarda fiberler yolda kuruyarak karşıdaki toplayıcıya tutunurlar.

Elde edilmek istenen mimariye göre farklı toplayıcı düzenekleri kurulmaktadır. Örneğin damar doku iskelesi oluşturmak için toplayıcı olarak, dönen silindir bir boru kullanılabilir ya da kas dokularının ECM'ini taklit etmek amacıyla yönlendirilmiş fiberler oluşturmak istendiğinde birbirine paralel toplayıcılar kullanılabilir.

Yumuşak doku mühendisliğinin birçok uygulaması için yönlendirilmiş fiberler tercih edilmektedir. Bu tür fiberler Şekil 1.7'deki prensiple üretilebilir.



Şekil 1.7. Yönlenmiş fiber oluşturma prensibi

Polimer çözeltilerinden nano/mikro fiberler oluştururken göz önünde bulundurulması gereken bazı değişkenler vardır. Çözelti değişkenleri moleküler ağırlık, moleküler ağırlık dağılımı, polimerin yapısı (lineer, dallanmış), çözelti özellikleri, viskozite, iletkenlik, yüzey gerilimi ve pH'dır. Sistem değişkenleri uygulanan voltaj, akış hızı, toplayıcı ile iğne arasındaki mesafe, toplama plakasının çeşididir. Çevresel değişkenler ise çözelti sıcaklığı, ortam sıcaklığı, nem ve hava akımı olarak sıralanabilir.

Şırınganın kılcal ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin azaltılmasıyla morfolojik değişimler yapılabilir. Mesafeyi arttırarak veya elektrik alan gücü azaltılarak damla yoğunluğu azaltılır. Yüklü alanlar periyodik yollarla morfolojiyi etkileyebilir, yüzey şekillerinde değişikliğe sebep olabilir [46].

Voltajın artmasıyla lif çapı belli bir noktaya kadar azalırken, o noktadan sonra voltajın artması daha fazla polimer beslenmesine neden olur. Taylor konisi iğnenin ucunda olma eğilimi gösterirken, artan voltaj değeri ile koni iğne içinde oluşmaya baslar ve daha fazla polimer çekilir [47].

1.6.2. Liyofilizasyon

1900'lü yılların ilk çeyreğinde geliştirilmiştir. İlk liyofilizasyon aygıtı 1905 yılında Benedict & Manning tarafından geliştirilmiş olan bir kimyasal pompadan türemiştir. 1930'lu yıllardan bu yana liyofilizasyon ecza ve biyoteknoloji firmaları tarafından yenilenmiştir [48].

Liyofilizasyon, maddenin kurutulması için çözücüsünün süblimleşme adı verilen bir süreçten geçtiği tekniktir. Ürünlerin içinde bulunan su en başta dondurulur ve bu haldeyken süblimleşme ile su uzaklaştırılır. Süblimleşme maddenin katı (buz) halden gaz (su buharı) haline, maddenin sıvı hali atlanarak yani buzun erimesine imkan olmaksızın geçişidir. Buz haline gelmiş su, düşük basınç ortamında, belli belirsiz bir sıcaklık artışı durumunda doğrudan buharlaşır. Böylelikle kurumanın elde edilmesi için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç kalmaz. Bu yöntem ürünlerin moleküler ve hücre yapısında yarıma gibi değişikliklere yol açmaz. İç ve dış yapıları bozulmaz neredeyse en baştaki hallerini korurlar [48]. Şekil 1.8’da laboratuvar tipi bir liyofilizatör gösterilmektedir.



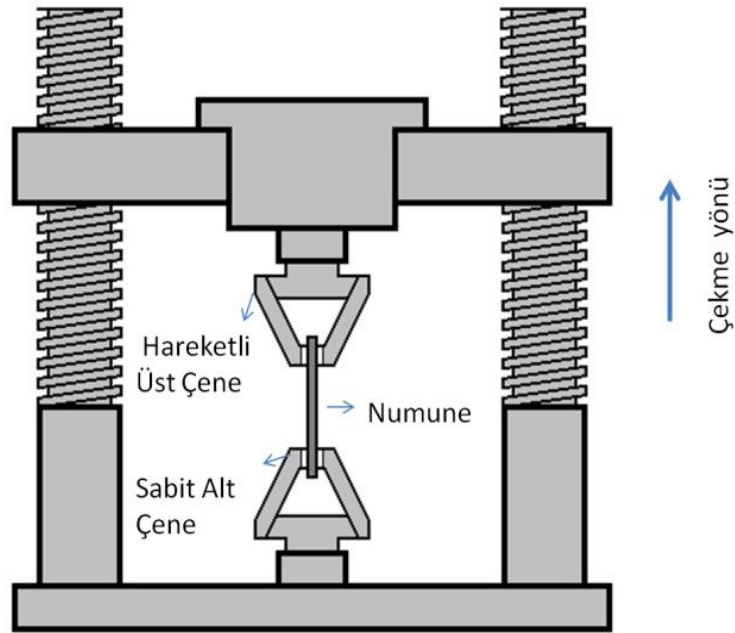
Şekil 1.8. Laboratuvar tipi bir liyofilizatör [49]

Genel hatlarıyla liyofilizasyon işlemi üç temel aşamadan oluşur: Dondurma, birincil kurutma (süblimleşme), ikincil kurutma (dezorpsiyon). Aşamalar şu şekilde seyreder: Ürün dondurma işleminden geçirilir. Ürün tipine göre dondurma işleminin süresi iyice uzun veya biraz daha kısa tutulur. Birincil kurutma aşamasında ürünün içinde bulunduğu liyofilizasyon kabininde hafif bir vakum uygulanır ve sıcaklık giderek düştükçe yüksek enerjideki moleküller kendiliklerinden dışarı uçarlar. İkincil kurutma aşamasında ise, öte yandan, vakum maksimum seviyeye çıkarılır ve kristalleşmiş ve maddeye tutunup kalmış son su molekülleri maddeden dışarı çekilir [48].

1.6.3. İklimlendirmeli çekme testi

Malzemelerin çekme, sıkıştırma 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 önemlisi çekme testidir [50].

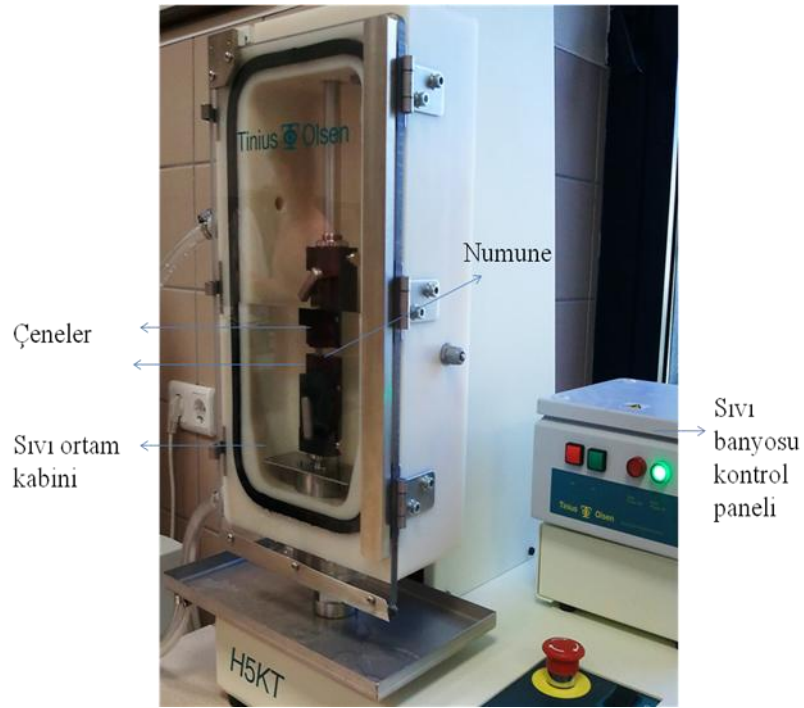
Çekme testinde standartlara göre hazırlanmış örnek, çekme cihazının iki çenesi arasına Şekil 1.19’da gösterildiği gibi yerleştirilir. Örnek sabit deformasyon hızında çekilirken deformasyona karşı gösterdiği direnç ölçülür. Gerilmeye karşı uzama verisi kaydedilir. Deney, test örneği kopana kadar sürdürülebilir. Bu deney sonucunda, malzemenin hangi yüklemde ne kadar uzadığı ve hangi yüklemde koptuğu gibi verilere ulaşılır [50].



Şekil 1.9. Çekme cihazının temel bileşenleri

Çekme testi sonucunda malzemelerin kopma dayanımı, kopma anındaki uzama değeri ve elastik modülü gibi önemli mekanik özellikleri belirlenir. Ayrıca çekme testi sırasında gerilimin uzama miktarına karşı grafiğe geçirilmesi ile de malzemenin karakterini yansıtan gerilim-gerinim eğrileri elde edilebilir [51].

Şartlandırılmalı çekme cihazları standart çekme cihazlarının fonksiyonuna ek olarak çekilen numuneyi kullanılacağı ortam şartlarındaki sıcaklık ve pH değerlerindeki mekanik özelliklerinin anlaşılmasını sağlar. Kapalı bir kabin içerisinde sıvı bir ortamın içinde çekme işlemi gerçekleşir. Bu sıvı ortam distile su olabileceği gibi numunenin kullanılmak istendiği ortamla eşdeğer bir sıvı da olabilir. Örneğin; doku mühendisliği için tasarlanan bir numune çekilirken sıvı ortam olarak distile su ya da pH 7.2-7.4 arasında olan fosfat tamponu kullanılabilir ve sıcaklık 37 °C olarak ayarlanabilir. Şekil 1.10'de sıvı ortam içinde çekme imkanı sağlayan bir çekme cihazı gösterilmektedir.



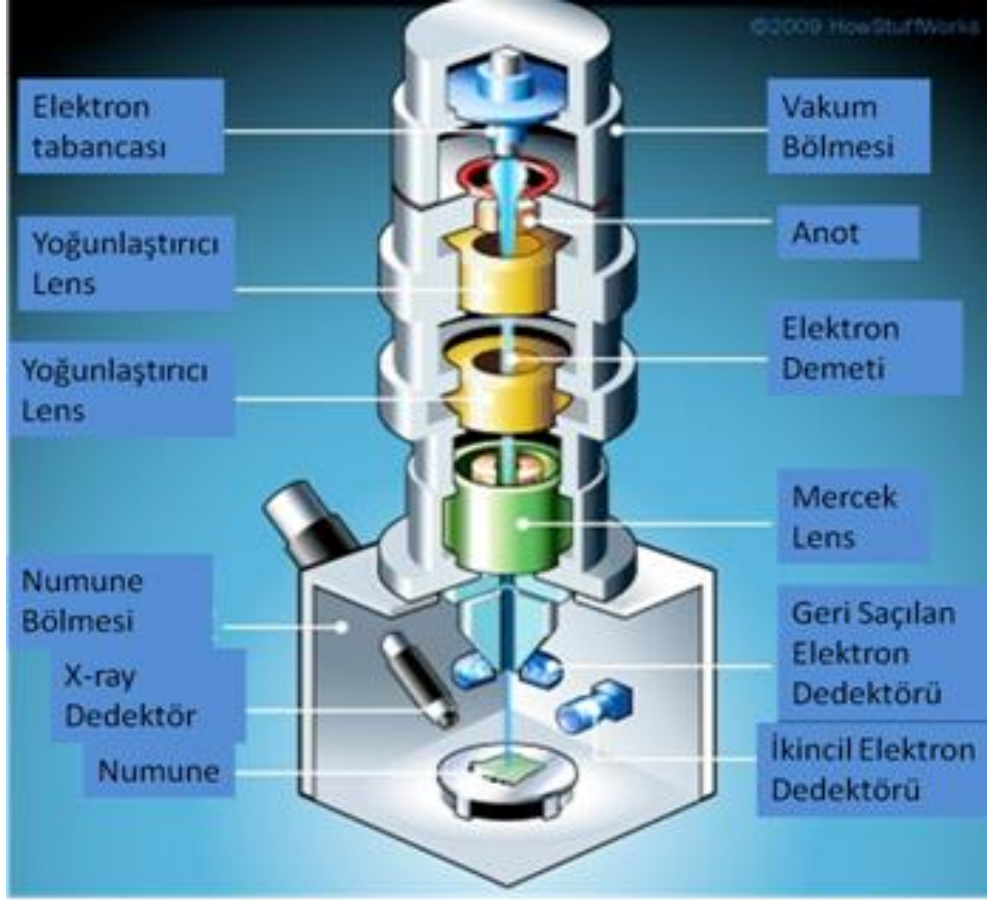
Şekil 1.10. Sıvı banyolu bir mekanik test cihazı

1.6.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, incelenecek örneğin yüzeyinin elektronlar ile taranması yoluyla yüksek çözünürlükte yüzey görüntülerinin elde edildiği bir tür elektron mikroskobudur [52]. Örneklerin yüzeyindeki çok küçük girinti ve çıkıntıların, ya da gözeneklerin ayrıntılı bir şekilde görüntülenmesini sağlar [53]. SEM; optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır [52].

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

SEM ile incelenen örnekler iletken ya da yalıtkan olabilirler. 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 [53]. SEM’in çalışma prensibi şematik olarak Şekil 1.11’de görülmektedir.



Şekil 1.11. Taramalı elektron mikroskopunun şematik gösterimi [55]

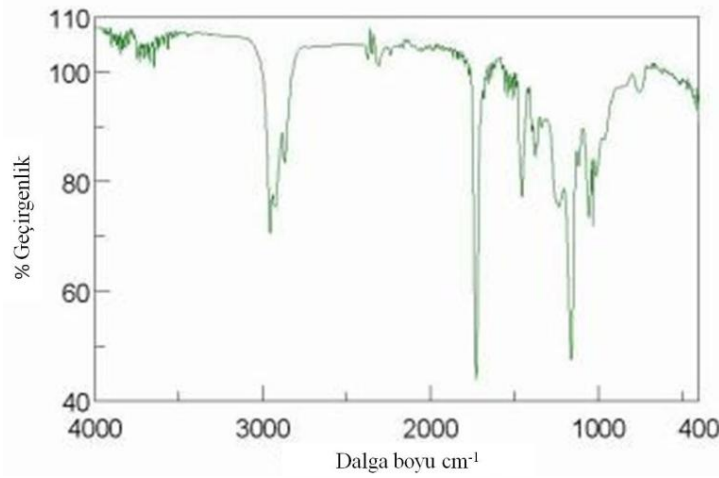
1.6.5. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, malzeme içindeki fonksiyonel grupların türlerini belirlemede kullanılan en etkin spektroskopik analiz yöntemidir. Molekülleri oluşturan atomlar sürekli hareket halinde bulunmaktadır. Bu hareketler sonucunda moleküllerde titreşim hareketleri oluşmaktadır. Bu titreşim hareketleri de bağlarda gerilme ve eğilme hareketlerinin oluşmasını sağlamaktadır [56].

Bu teknikte molekül içindeki rotasyonel enerjinin yanı sıra belli atom veya atom gruplarının titreşim enerjilerine karşılık gelen örnek spektrumu referans spektrumu ile karşılaştırılarak örneğin bileşenleri tanımlanır [57].

Çok yönlü ve geniş çapta kullanılan FTIR tekniği, ışık demetinde karışıklık yaratmaya dayanır. Kaynak ışık demeti iki kısma ayrılır ve devam eden değişen faz farkı iki bileşke demetinden birinin içine yerleşir. İki demet tekrar bir araya getirilir

ve karışık sinyaller ölçülerek girişim eğrisi (interferogram) olarak kaydedilir [58]. Şekil 1.12’de örnek bir FTIR spektrumu verilmiştir.



Şekil 1.12. Örnek bir FTIR spektrumu [59]

1.6.6. Dinamik mekanik analiz (DMA) yöntemi

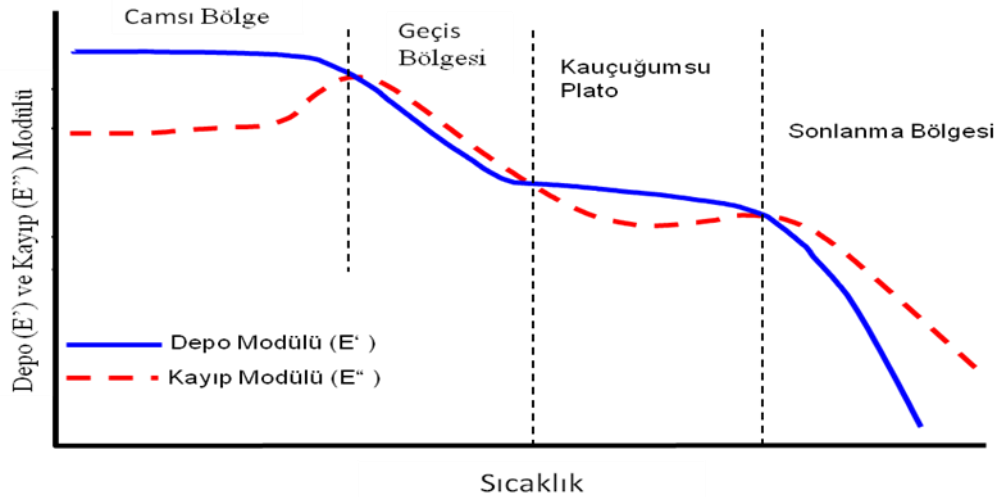
Dinamik Mekanik Analiz yöntemi, bir diğer adıyla DMA, numune üzerinde küçük bir gerilim döngüsünün uygulandığı bir tekniktir. Bu teknik ile numunenin gerilime, sıcaklığa ve frekansa karşı gösterdiği tepki ölçülür. DMA yöntemi moleküllerin hareketlerinden kaynaklanan hal değişimlerini saptar. Viskoelastik malzemelerin mekanik özellikleri sıcaklık, frekans ve zamana göre belirlenebilir. Yapı-morfoloji ilişkisi hakkında da bilgi almak mümkündür [60].

Bir malzeme üzerine yük uygulandığında, deformasyon gerçekleşir. Eğer yük uygulanan malzeme ideal elastik bir malzeme ise, uygulanan yük kaldırıldığında deformasyon kaybolur. Buna elastik deformasyon denir. Elastik deformasyon, malzemeye uygulanan yük ile doğru orantılıdır ve yük uygulandığında gecikmeksizin deformasyon görülür ve yük kaldırıldığında da tamamen kaybolur. Bazı malzemelerde ise, örneğin polimerlerde, deformasyon doğrusal değildir ve uygulanan yüke göre gecikmeli gerçekleşir. Elastik davranışın karşıtı viskoz davranıştır. Viskozluk katılara özgü değil, sıvıların bir davranış biçimidir. İdeal viskoz bir malzemede deformasyon hızı yük ile doğru orantılıdır. İdeal viskoz bir malzemede bu orantı sabit, ancak gerinim zamana bağımlıdır. Viskoz malzemede görülen deformasyon geri dönmez ve malzeme üzerinde kalır [60].

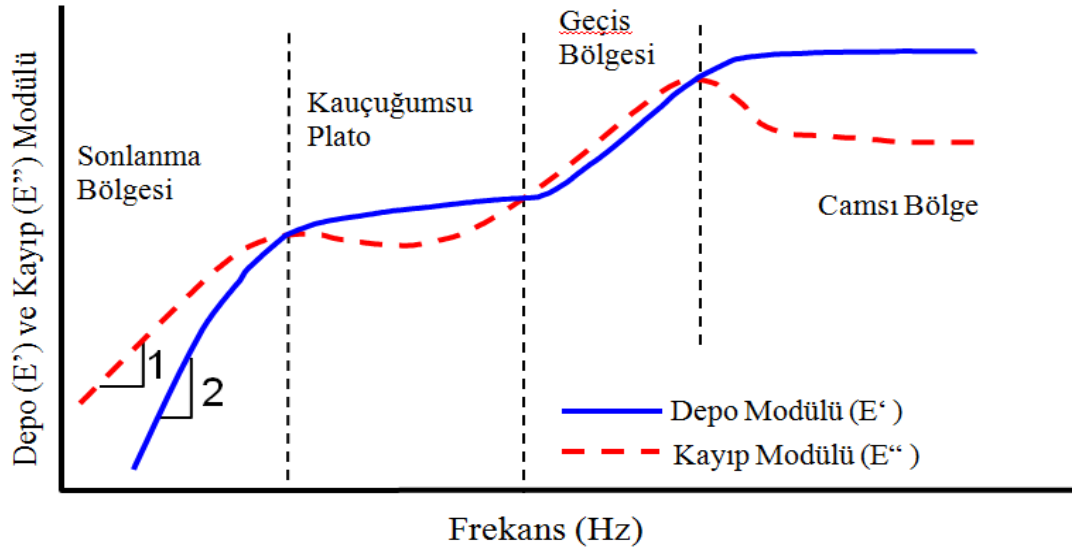
Viskoelastik davranışı ölçmek için kullanılan yöntemlerden biri olan DMA, belirlenmiş bir geometriye sahip numuneye sinüsoidal deformasyon uygulanarak çalışır. Numune gerilim kontrolü ya da gerinim kontrolüne tabi tutulur. Bilinen bir gerilim altında, numune belirli bir ölçüde gerinim gösterir. DMA yönteminde bu sinüsoidal bir şekilde uygulanır ve numunenin ne kadar deformasyon göstereceği malzemenin sertliğine bağlıdır [60].

Daha genel bir tanımla, DMA sönümü ölçer ve bu özellikleri modül ve kayıp faktörü (tan delta) değerleri ile takip eder. Ölçümler sinüsoidal kuvvet uygulanarak alındığı için, modül iki bileşenden oluşur, sinüsoidal kuvvetin eş fazlı bileşeni depo modülünü, dışarı fazlı bileşeni ise kayıp modülünü verir. Depo modülü, E' , numunenin elastik davranışını gösterirken, kayıp modül (E'') malzemenin viskoz davranışını belirtir. Kayıp modülün depo modülüne oranı ise kayıp faktörü, yani tan deltayı verir ($\tan \delta = E''/E'$) [60].

DMA ile sıcaklık ya da frekans taraması yapılabilir. Şekil 1.13'de sıcaklık taraması yapılmış bir numunenin tipik eğrisi ve Şekil 1.14'de frekans taraması yapılmış bir numunenin tipik bir eğrisi verilmiştir.



Şekil 1.13. DMA sıcaklık taraması analizinden elde edilen tipik bir termal eğri [61]

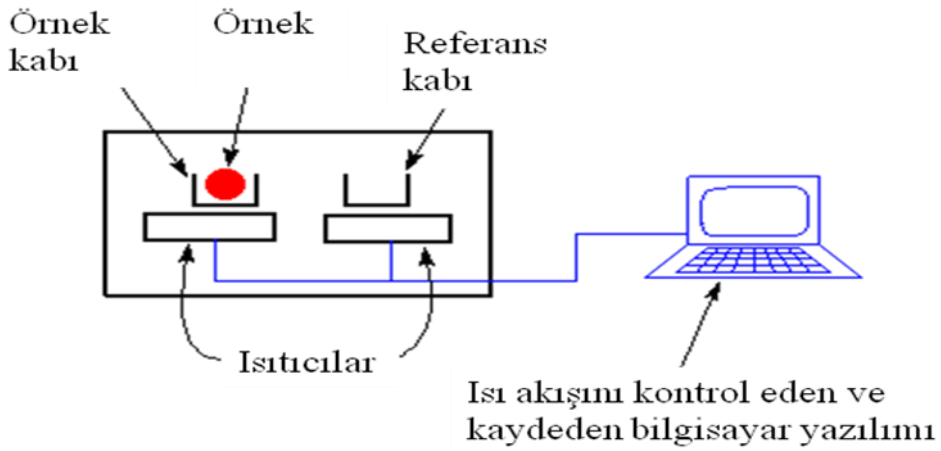


Şekil 1.14. DMA frekans taraması analizinden elde edilen tipik bir termal eğri [61]

1.6.7. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri, ısı geçişler, ısı kapasitesi, reaksiyon ve kristalizasyon kinetiği gibi önemli özelliklerin karakterize edilmesinde kullanılan bir tür kalorimetrik ısı analiz tekniğidir [54].

Bu cihazın çalışma prensibi, sabit hızla ısıtma veya soğutma koşullarında örnek ve referans madde sıcaklıklarının aynı tutulması için gerekli olan ısı akışının zaman ve sıcaklığa göre kaydedilmesi esasına dayanmaktadır [62]. Şekil 1.16'da DSC'nin şematik gösterimi verilmiştir.

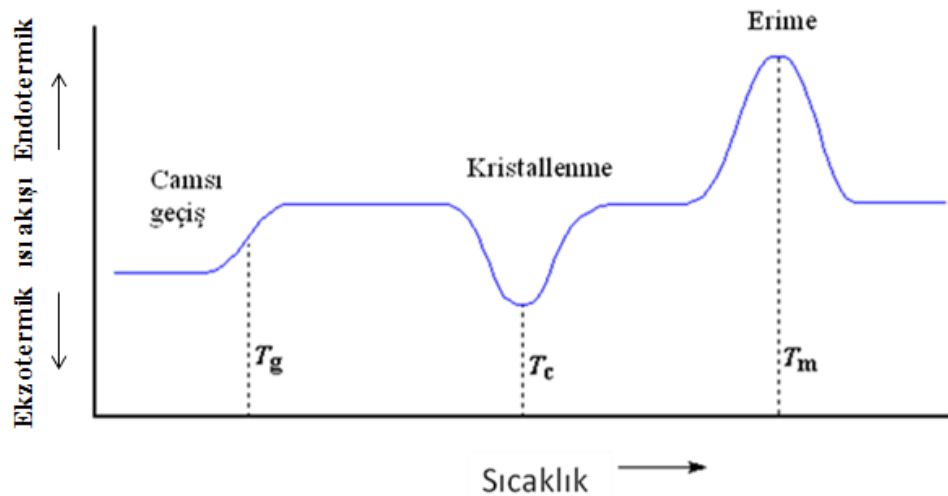


Şekil 1.15. DSC'nin şematik gösterimi [63]

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 ulaşınca kadar ısıtılmakta, ya da soğutulmaktadır. Başlangıç sıcaklığına ulaşan hazneler, belirlenen metot kapsamında belirtilmiş son sıcaklık değerine ulaşınca 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 [62].

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 [54].

DSC yalnız entalpi değişiminin olduğu olaylara karşı değil, aynı zamanda numune ile referansın ısı kapasiteleri arasındaki farka karşı da çok duyarlıdır. Bu sayede malzemelerin entalpi, kristallenme sıcaklığı, erime sıcaklığı, camsı geçiş sıcaklığı, çapraz bağlanma sıcaklığı ve saflık gibi özellikleri incelenebilir. Şekil 1.17’de örnek bir DSC termogramı verilmiştir [54].



Şekil 1.16. Örnek DSC termogramı [64]

Şekil 1.20’de gösterilen termogram, yarı kristalin yapıdaki polimerlerin analizi sonucu elde edilmektedir. Tamamen amorf yapıdaki polimerlerin DSC termogramlarında, morfolojilerinde herhangi bir kristal yapı bulunmadığı için kristalizasyon veya erime eğrileri gözlenmemektedir. Amorf yapıdaki örneklerin DSC termogramlarında sadece camsı geçiş gözlenmektedir. T_g ikinci dereceden bir geçiş olup, örneği ısıtma hızı ile değişen bir değerdir. Isıtma hızı arttıkça, T_g de artmaktadır [62].

1.6.8. Coomassie Mavisi Boyaması

Coomassie mavisi boyası proteinlerin kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Bradford yöntemi olarak da bilinen metot oldukça duyarlı bir yöntemdir. Organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmalarını esas alır.

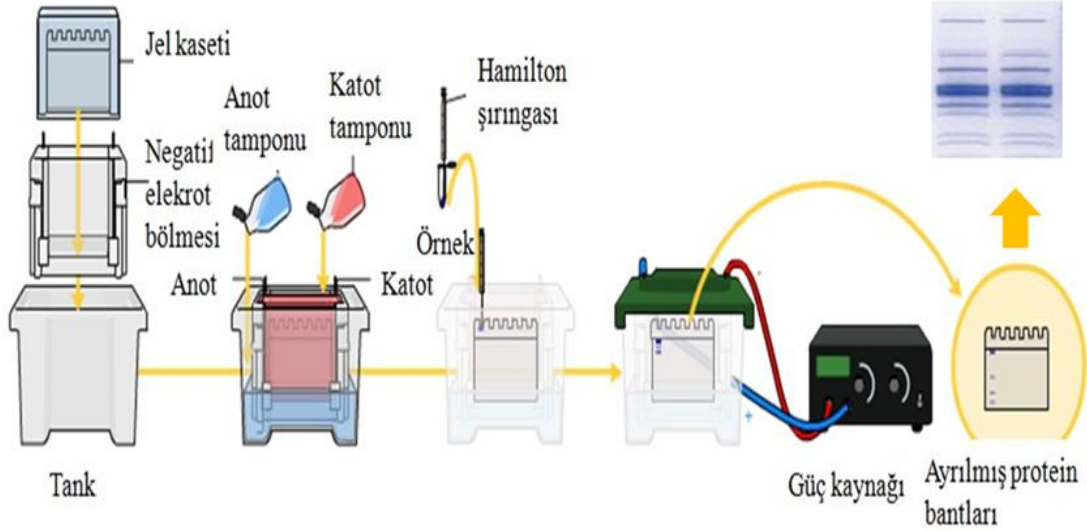
Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik aminoasitler ve aromatik aminoasitler) önemlidir. Yöntemde, protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands verir [65].

Genellikle elektroforez yöntemlerinde kullanılan coomassie mavisi mikroskobik ya da makroskopik protein tayininde de kullanılmaktadır.

1.6.9. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Yüklü moleküllerin bir elektrik alan içinde yürütülerek ayrıştırılması tekniğine elektroforez denir. Elektroforezin çalışma ilkesi; molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır. Elektroforezde katedilen mesafe, net yük ile doğru; molekül büyüklüğü ve elektroforetik ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır. Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında jel bir ortamda yüklü çözelti veya partiküllerin göçüdür. SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır.

Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar çünkü ayrışım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır. Şekil 1.18’de örnek bir SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.17. SDS-PAGE deney düzeneği [66]

1.6.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarlarda rutin olarak uygulanmaya başlanmış ancak asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur [68].

Hücreler dokulardan ex-vivo olarak birkaç günde saflaştırılabilir, ayrıştırılabilir. Hücreler kandan kolayca elde edilebilir; ancak sadece beyaz kan hücreleri kültürde üreme yeteneğine sahiptirler. Tek çekirdekli hücreler, hücre dışı maddeyi parçalayan kollajenaz, tripsin ya da pronaz gibi enzimler sayesinde yumuşak dokulardan izole edilebilirler [68].

Farklı olarak, doku parçaları büyüme ortamına (besiyeri ya da medyum) konulabilir ve hücreler bu şekilde kültüre edilmiş olur. Hücreler, birincil kültür olarak adlandırılan yöntemle doğrudan kültüre edilebilmektedir. Tümörlerden kaynaklanan bazı istisnalar hariç, çoğu birincil hücre kültürünün sınırlı yaşam süresi vardır [68].

Çoğalan hücrelerin önemli bir miktarı (özellikle kanser kökenli olmayanlar), kültürün ilerleyen zamanlarında yaşlanma ve bölünmenin durması gibi süreçlere

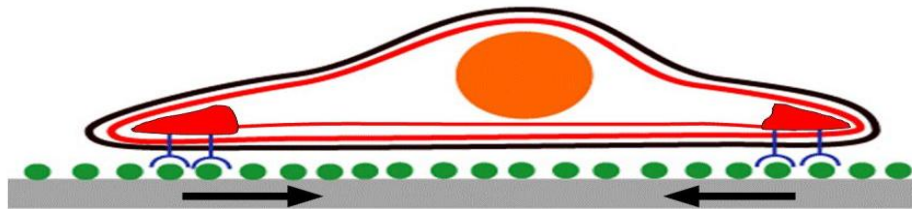
girer; bu hücreyi canlılıktan alıkoyar. Belirlenmiş ya da ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı, rastgele bir mutasyonla ya da telomeraz geninin yapay ifadesi gibi bilinçli değişimlerle süresiz çoğalma yeteneğine kavuşabilir [68].

Özel hücre tiplerinin iyi belirlenmiş hücre hattı örnekleri oldukça çeşitlidir. Hücreler uygun bir sıcaklık ve gaz karışımıyla (hayvan hücreleri için 37°C ve kültürde bikarbonat tampon çözeltisinin kullanılması halinde genelde %5 CO₂ içeren) inkübatörde çoğaltılabilir ve sürdürülebilir [68].

Hücre kültürleri deney hayvanı kullanımını azaltarak, insanlar için üretilen ilaç, kozmetik ya da biyomalzeme gibi biyomedikal ürünlerin etki ve yan etkilerini, insan hücre kültürleriyle, daha gerçekçi test edilmesini sağlar.

1.7. Hücre-Biyomalzeme Etkileşimleri

Hücre, organizmanın özel yapı ve fonksiyona sahip, dış ortamdan aldığı maddelerle beslenen ve bölünüp çoğalabilen en küçük canlı birimdir. Yapısında çekirdek, mitokondri, Golgi cisimciği, endoplazmik retikulum, ve lizozom gibi organellerin dışında hücre hareketini sağlayan ve hücre iskeletini içeren sitoplazma bulunmaktadır. Tüm organeller ve sitoplazma hücre membranı ile çevrilmiştir. Hücre membranının farklı kısımları, absorpsiyon, salgılama, sıvı transferi, mekanik tutunma ve diğer hücreler ve ECM bileşenleri ile iletişim kurma gibi değişik fonksiyonları yerine getirmektedir. Hücrenin dış ortamı ile olan haberleşmesi membran yüzeyinde bulunan ve heterodimerik proteinlerden oluşan integrinler aracılığı ile gerçekleşmektedir. İntegrinlerin, fibronektinin RGD sekansı gibi bazı moleküllere bağlanabilme özelliğine sahip olması nedeniyle hücre iskeletinin hücre tutunmasını sağlayan moleküller aracılığı ile yüzeylerle etkileşimi mümkün olmaktadır [69].



1.18. Hücre yüzey etkileşimi, kırmızı renkli çizimler aktin hücre iskeletini, mavi renkle gösterilen çubuklar integrin moleküllerini ve yeşil renkli küreler ise ECM proteinlerini temsil etmektedir [70]

Hücrelerin biyomalzeme yüzeyine tutunması ve yüzeye yapışması sırasında hücre ile biyomalzeme yüzeyi arasındaki ilk temas hücre iskeletinin yüzeye olan etkileşimidir [69].

Fizyolojik bir ortamda, protein adsorpsiyonu her zaman için hücrenin fokal yapışmasını ve yayılmasını hızlandırmakla birlikte, hücre tarafından salgılanan proteinler ve biyomalzeme yüzeyinin özellikleri de hücre yapışmasının kuvvetini etkileyecektir. Kuvvetli yapışmanın ardından hücrenin yüzeye yayılması gerçekleşir ve hücreler hacimce daha geniş yüzey alanına sahip olurlar. Hücre yayılmasının temel nedeninin, hücrenin serum içerisindeki mitojenik faktörleri yapısına alabilmek için geniş bir yüzey alanı sağlamak amacıyla olduğu düşünülmektedir [69].

Elde edilen bu sonuçlar, hücrelerin biyomalzeme yüzeyi ile direk temas kurabilmek için adsorplanmış proteinleri tükettiği, biyomalzeme yüzey özelliklerinin adsorplanan proteinlerin konformasyonu üzerinde etkin olabileceği ve hücre yapışması ve yayılması için farklı molekül gruplarının hücrelerle temas edeceği şeklinde açıklanabilmektedir. Bununla birlikte, hücre yapışması ve yayılmasının yüzey serbest enerjisinin çok yüksek olduğu hidrojeller gibi yüksek hidrofilisiteye sahip yüzeylerde azaldığı gözlemlenmiştir [71].

Fizikokimyasal yaklaşımlara zıt olarak karşımıza çıkan görüş, integrinler aracılığı ile gerçekleşen hücre-biyomalzeme yüzeyi arasındaki etkileşim sonucu, yüzeyde bulunan ve hücre yapışmasını destekleyen fibronektin gibi proteinlerin veya bunların peptid sekanslarının hücre yapışmasını her zaman destekleyeceği yönündedir [69].

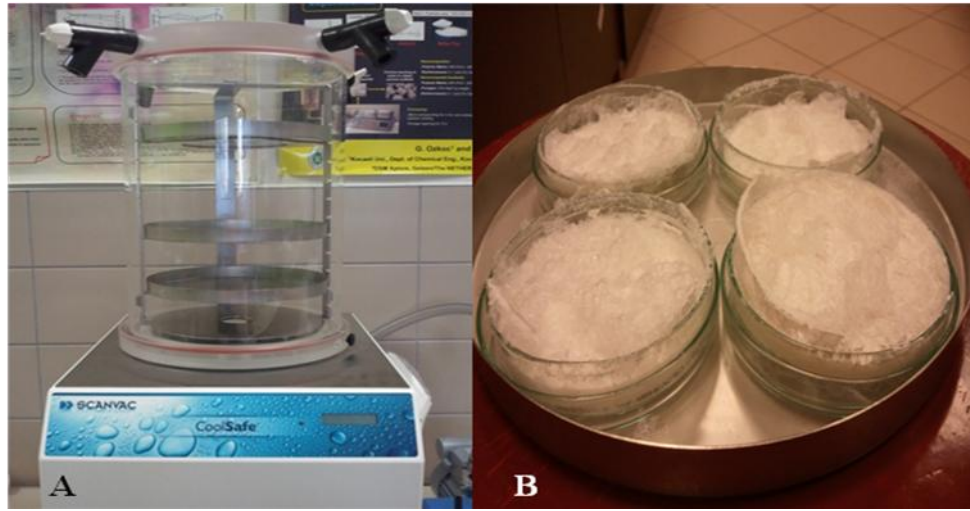
2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. İnsan Göbek Bağından Hyaluronik Asit ve Kollajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu

TÜBİTAK 111T368 No'lu proje çerçevesinde Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan onay ile önceden bilgilendirilen ve onam formu imzalatılan donörlerden doğumu takiben, alanında uzman doktorlar aracılığıyla normalde tıbbi atık olarak değerlendirilen insan göbek bağları temin edildi. Göbek bağlarının, izole edilecek kollajen ve hyaluronik asit (HA)'ın mümkün olduğunca yapısal açıdan homojen olması ve kontaminant içermemesi için bulaşıcı hastalık taşımayan donörlerden alınması tercih edildi.

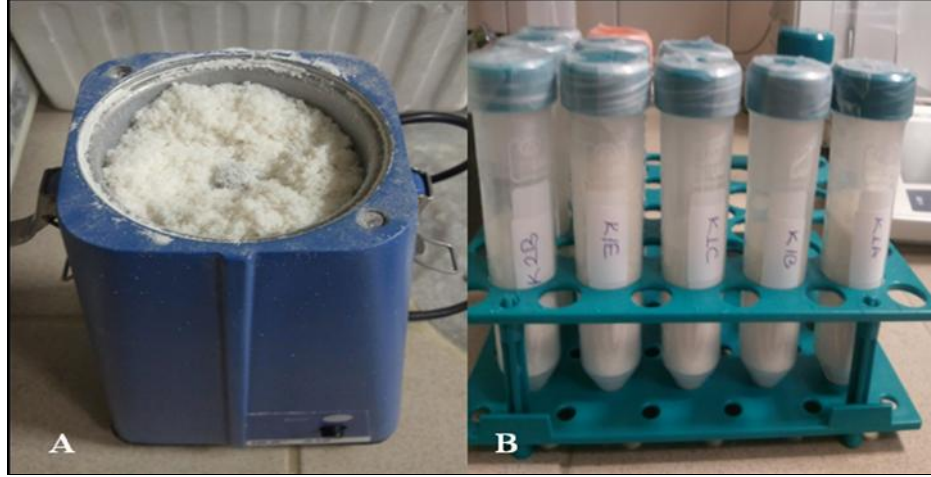
İlk olarak, kandan mümkün olduğunca kurtulmak amacıyla, göbek bağlarının damarları temizlendi ve yaklaşık 5 mm boyutunda parçalara ayrıldı. Yaklaşık 1 kg göbek bağı 4 litre % 0,2'lik NaCl solüsyonu içerisinde +4 °C' ye kaldırıldı. 3 gün sonrasında oda sıcaklığında yaklaşık 16 saat karıştırıcıda çalkalandı. Göbek bağından çıkan hyaluronik asiti alabilmek için süpernatanta 300–600 ml %1 cetyltrimethylamonium bromide (CTAB, AppliChem) solüsyonu eklendi. Eklendikçe agregasyon olduğundan HA falkonda toplandı. Sonrasında HA'ın çözünmesi için 0,9 M kalsiyum klorür çözeltisi eklenerek 37 °C de çözünene kadar çalkalayıcıya koyuldu. HA çözeltisindeki nükleik asitleri elimine etmek için 30 ml %25 (v/v) etil alkol 10 ml' lik HA çözeltisine eklenerek santrifüj edildi (1000 g, 10 dakika). Süpernatantın %10 u kadar kloroform (Merck) eklenerek iyice çalkalanıp bırakıldı. Çözeltide iki faz oluşumu gözlemlendi. Alt kısım proteinli kısım olduğu için üst kısım toplandı ve tekrar çözeltinin %10'u kadar kloroform eklendi ve iyice çalkalanarak bırakıldı. Bu işlem 4 gün boyunca 4 defa tekrarlandı. Sonrasında %75 v/v etil alkol (Rieder de Haen) solüsyona eklenerek HA'lerin çökmesi beklendi, çökme olmuyorsa aseton (Sigma- Aldrich) eklenerek 3000 g'de 5 dk 25 °C'de santrifüze edildi ve çökelti 7 gün boyunca çeker ocak içerisinde kurumaya bırakıldı.

HA izolasyonundan çıkan göbek bağı parçaları kollajen izolasyonu için kullanıldı. Kollajeni çözerek kordon dokusundan izole etmek için 0,2 M asetik asit çözeltisi hazırlandı ve her 100 ml asetik asit çözeltisine 100 mg pepsin enzimi ilave edildi. pH'sı 2,5 olan enzim çözeltisi göbek bağı parçaları ile 1:2 (doku:çözelti, v/v) oranında karıştırıldı ve 10 gün boyunca 2 günde bir solüsyon değiştirilerek işlem tekrar edildi. Elde edilen kollajen çözeltisi 10000 g'de 10 dk santrifüj edilerek solüsyon içerisinden doku kalıntıları uzaklaştırıldı. Sonrasında kollajen çözeltisi pH 8'e getirilerek pepsin inhibe edildi ve ardından pH 7,5'e çekilerek kollajenlerin fibril halinde çökmesi sağlandı. Çöken kollajenler 5000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve beyaz çökelti halindeki kollajenler 10 cm çapında cam petrilere alındı ve -110 °C'de 3 saat muhafaza edilen kollajen cam petrilerin kapakları açık olarak SCANVAC CoolSafe marka liyofilizatörde -110 °C sıcaklık ve vakum altında 24 saat kurutuldu. Şekil 2.1'de deneyde kullanılan liyofilizasyon cihazı ve kurutulmuş kollajen örnekleri verilmiştir.



Şekil 2.1. A. SCANVAC® CoolSafe liyofilizatör, B. Kurutulmuş kollajenler

Kurutulan kollajen, Şekil 2.2'deki IKA® A10 öğütücü yardımıyla 1 dakika boyunca öğütülerek, steril 50 ml'lik polipropilen tüpler içerisinde, karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.



Şekil 2.2. A. IKA® A10 öğütücü, B. Öğütülmüş stok kollajen

İzole edilen hyaluronik asit ve kollajen görseli Şekil 2.3’de verilen Perkin Elmer Spectrum 100 marka FTIR cihazı kullanılarak karakterize edildi.



Şekil 2.3. Perkin Elmer Spectrum 100 marka FTIR cihazı

Ayrıca izole edilen göbek bağı kollajeninde kollajen tiplerinin tek tek gösterilmesi amacıyla Kocaeli Üniversitesi, Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı. Kollajen karışımı Dry Buffer Component II (GE Healthcare) içinde çözünerek % 8 poliakrilamid jelde 2-merkaptetanol yokluğunda ve varlığında yürütüldü.

2.2. PLC/Kol/HA Karışımından ve PLC Kopolimerinden Doku İskelelerinin Elektro-eğirme Yöntemiyle Üretilmesi

%5 oranında kollajen:HA (95:5) karışımı, %10 oranında poli (L-laktid/kaprolakton) kopolimeri (70:30) (PURASORB® PLC 7015) HFIP:H₂O:EtOH 15:1:4

oranlarının çözücü karışımında çözülerek, kapaklı cam tüp içerisinde önce sonikatörde ardından da 24 saat çalkalayıcı bir cihaz içerisinde çözünmeye bırakıldı.

Çözünen karışım Şekil 2.4'deki gibi 10 ml'lik şırınga içerisine çekilerek kesik (küt) uçlu bir şırınga iğnesi şırıngaya takıldı. 18 kV voltaj, 8 μ l/dk akış hızı ve 20 cm toplayıcı-iğne ucu mesafesi koşullarında, topraklanmış bakır tel toplayıcıya yönlendirilmiş polimer fiberler toplandı. Bir toplayıcının yeterli kalınlıkta fiberleri toplaması 75-90 dakika zaman gerektirdi. Bu deney ODTÜ (Ortadoğu Teknik Üniversitesi), BİOMATEN (Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi) laboratuvarlarında gerçekleştirildi.



Şekil 2.4. Deneyde kullanılan elektro-eğirme düzeneği

%12 oranında poli (L-lactid/kaprolakton) kopolimeri kloroform:DMF 75:25 içerisinde 24 saat süreyle çalkalayıcı üzerinde kapaklı cam tüp içerisinde çözünmeye bırakıldı. 24 saat sonunda 10 ml şırıngaya çekilen polimer çözeltisi küt uçlu iğne ile elektro-eğirme işlemine tabi tutuldu. İşlem 15kV voltaj, 4 μ l/dk akış hızı ve 12 cm toplayıcı-iğne ucu mesafesi ile bakır toplayıcıya yönlendirilerek yapıldı. Yeterli kalınlıkta fiberlerin toplanması 60 dakika zaman gerektirdi.

2.3. PLDL/Kol/HA Karışımından ve PLDL Kopolimerinden Doku İskelelerinin Elektro-eğirme Yöntemiyle Üretilmesi

%5 oranında kollajen:HA (95:5) karışımı, %7 oranında poli (L-laktid/DL- laktid) kopolimeri 70:30 (PURASORB ® PLDL 7028) HFIP:H₂O:EtOH 15:1:4 oranlarının çözücü karışımında çözülerek, kapaklı cam tüp içerisinde 24 saat çalkalayıcı bir cihaz üzerinde homojenize olmaya bırakıldı.

Çözünen karışım 10 ml'lik şırınga içerisine çekilerek kesik (küt) uçlu bir şırınga iğnesi şırıngaya takıldı. 12 kV voltaj, 8 µl/dk akış hızı ve 10 cm toplayıcı-iğne ucu mesafesi koşullarında, topraklanmış bakır tel toplayıcıya yönelmiş polimer fiberler toplandı. Bir toplayıcının yeterli kalınlıkta fiberleri toplaması 45-60 dakika zaman gerektirdi.

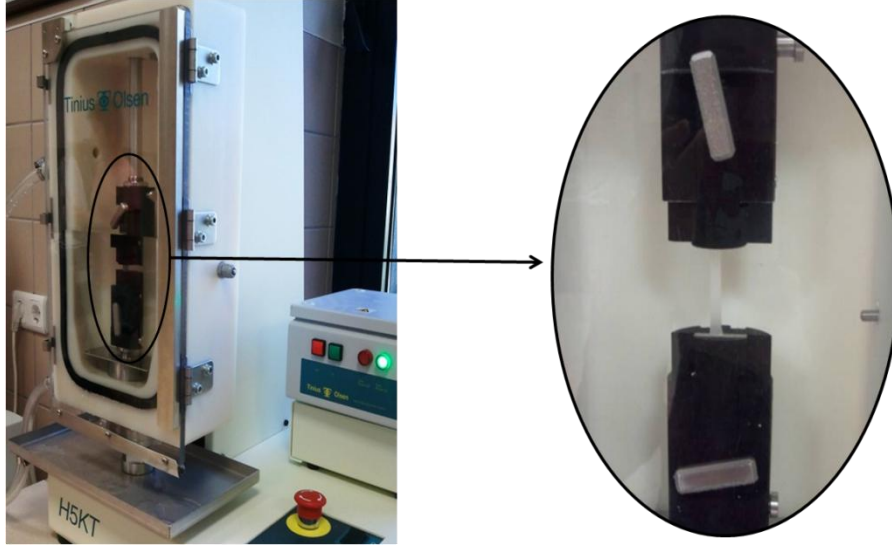
%10 L-laktid/DL-laktid kopolimeri 70:30 kloroform:DMF 95:5 içerisinde 24 saat süreyle çalkalayıcı yardımıyla çözüldü. 15 kV voltaj, 6 µl/dk akış hızı ve 18 cm iğne ucu-toplayıcı mesafesi ile polimer çözeltisi çalışıldı. 60 dakika sürede yeterli kalınlıkta fiber toplayıcıya toplandı.

2.4. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA İskelelerin Çapraz Bağlanması

Elektro-eğirme yöntemi ile yarı yapay polimerlerden üretilmiş paralel mikro/nano fiber yapıdaki iskeleler kollajen, HA ve sentetik polimerler ile daha dayanıklı bir yapı oluşturmak için çapraz bağlama prosedürüne tabi tutuldu. Öncelikle iskeleler 1 cm² alanına sahip olacak şekilde kesildi ve 0,2 M 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) karbodiamide (EDC) (Thermo Scientific) olacak şekilde %95 lik EtOH içerisinde hazırlanan çapraz bağlayıcı çözelti ile 24 saat oda şartlarında muamele edildi. Ardından bağlanmayı sonlandırmak amacıyla iskeleler sırasıyla %75, 50, 20 EtOH içerisinde yıkandı. Yıkanan iskeleler oda şartlarında kurutuldu ve nemsiz oda sıcaklığında daha sonraki testler için saklandı.

2.5. PLC ve PLC/Kol/HA Doku İskelelerinin Mekanik ve Isıl Analizi

PLC ve PLC/Kol/HA ve PLC/Kol/HA çapraz bağlanmış iskelelerin mekanik karakterizasyonu için Tinius Olsen H5KT su banyolu mekanik analiz cihazı kullanıldı. Numuneler test etmek için standart çekme testi numunesi şekli olan köpek kemiği (dog-bone) şeklinde kesildi. Çekme testi 37 °C'deki su banyosu içerisinde 25,4 mm/dk hızda yapıldı. Şekil 2.5'de deneyde kullanılan mekanik test cihazı gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Tinius Olsen® H5KT su banyolu çekme cihazı

Çekme testine ek olarak üretilen iskelelerin hedef vücut içi bölgenin frekansında nasıl özellik göstereceklerinin anlaşılması amacıyla Şekil 2.6'daki 01dB-Metravib marka DMA50 model dinamik mekanik analiz (DMA) cihazı ile 37°C'de frekans taraması yapılmıştır.



Şekil 2.6. 01dB – Metravib marka DMA50 model DMA cihazı

PLC ve PLC/Kol/HA doku iskelelerinin insan vücut sıcaklığı olan 37°C'deki ısı özelliklerini belirlemek amacıyla görseli Şekil 2.7'de verilen Mettler Toledo marka DSC1 model DSC cihazı kullanılmıştır. Taramalar -80-200 °C sıcaklık aralığında ve

10 °C/dk hızda yapılmıştır. Analizler esnasında sistemde süpürücü gaz olarak 20 ml/dk hacimsel akış hızında azot gazı kullanılmıştır.



Şekil 2.7. Mettler Toledo DSC 1 cihazı

2.6. PLC ve PLC/Kol/HA ve Çapraz bağlı PLC/Kol/HA İskelelerin Su Tutma Kapasitelerinin Ölçülmesi

Çapraz bağlanmış PLC ve PLC/Kol/HA iskeleleri su tutma kapasitelerinin ölçülmesi için öncelikle tamamen kurutuldu. Her gruptan 4'er örnek ile su tutma kapasitesi deneyi gerçekleştirildi. Su tutma kapasitesinin belirlenmesinde Denklem 2.1'den yararlanıldı;

$$W(\%) = \left[\frac{W - W_0}{W_0} \right] \times 100 \quad (2.1)$$

Öncelikle iskelelerin tek tek kuru ağırlıkları tartıldı. Ardından iskeleler 24 saat boyunca 37°C° sıcaklık koşullarında PBS içerisinde muamele edildi. 24 saat sonunda PBS içerisinden çıkarılan iskeleler kurutma kağıdı üzerine alınarak fazla sıvı uzaklaştırıldı ve yaş ağırlıklarının belirlenmesi için tartıldı.

2.7. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA İskelelerin Gözeneklilik Oranının Ölçülmesi

PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin Denklem 2.2 ve 2.3 yardımıyla gözeneklilik oranının belirlenmesi için öncelikle alanları hesaplandı;

$$G_{my}(g/cm^3) = \left[\frac{M_a(g)}{M_k(cm) \times M_a(cm^2)} \right] \quad (2.2)$$

$$Mg(\%) = \left[1 - \frac{Gmy(g/cm^3)}{Yy(g/cm^3)} \right] \times 100 \quad (2.3)$$

Daha sonra kuru ağırlıkları tartıldı ve formüle göre gözeneksiz varsayılarak yoğunlukları hesaplandı. (Mg: Matriks yoğunluğu, Gmy: Görünen matriks yoğunluğu, Yy: Yığın yoğunluğu, Mk: Matriks kalınlığı, Ma: Matriks alanı)

Gözenekli yoğunluğun bulunması amacıyla Mettler Toledo XS204 analitik denge cihazı kullanıldı ve iskelelerin formüle göre yüzde gözeneklilik oranları hesaplandı.

2.8. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA İskelelerin Biyoerozyon Oranlarının Belirlenmesi

Çapraz bağlanmış ve bağlanmamış PLC ve PLC/Kol/HA iskeleler biyoerozyon oranlarının belirlenmesi için 1 cm² alanında kesildi. Bu deney için 3 grup oluşturuldu; PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA. Her grup için 4 numune kullanıldı. Her grup ayrı tüpler içerisinde ve %1 sodyum azid içeren PBS içerisinde 37 °C su banyosunda protokole tabi tutuldu. Numuneler işleme tabi tutulmadan önce tartılarak kuru ağırlıkları not edildi.

Numuneler 7, 14 ve 21. günlerde sıvı ortamdan alınarak kurutuldu, kuru ağırlıkları tartıldı ve tekrar çözelti içerisine konuldu. Elde edilen ağırlık değişimleri denklem 2.4 yardımıyla hesaplanarak erozyon oranları belirlendi;

$$W(\%) = \left[\frac{W_0 - W}{W_0} \right] \times 100 \quad (2.4)$$

2.9. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA İskelelerde Protein Varlığının Aranması ve Taramalı Elektron Mikroskopisi

PLC/Kol/HA iskelelerde kollajen varlığını ispatlamak amacıyla PLC/Kol/HA ve PLC iskeleler 1 cm² boyutlarında kesilerek, Coomassie mavisi (Coomassie Brilliant Blue R250, Merck) ile boyama yapıldı.

Boyama işlemi için % 0.1 Coomassie Blue çözeltisi %40 metanol, %10 asetik asit, % 50 dH₂O çözücü karışımı içerisinde hazırlandı ve filtre kağıdı ile süzüldü. Ardından numuneler bir miktar boya çözeltisi içerisinde 6 saat muamele edildi. Boyama işlemini sonlandırmak amacıyla numuneler %40 metanol, %10 asetik asit, % 50 dH₂O çözeltisi ile yıkandı.

İskeleler fiberlerinin paralelliklerinin kanıtlanması ve çaplarının belirlenmesi amacıyla, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntüldü. SEM görüntüleri ODTÜ Merkez Laboratuvarında, QUANTA 400F Field Emission SEM, taramalı elektron mikroskobu ile alınmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. QUANTA 400F Field Emission SEM

2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.10.1. Endotel hücrelerin insan göbek bağı veninden izolasyonu ve çoğaltılması

İnsan göbek bağı veni endotel hücreleri (HUVEC) enzimatik yöntemle elde edilmiştir. Doğum sonrasında insan göbek bağı antibiyotikli HBSS içine alınmış ve dokunun dış yüzeyi PBS tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra ven içinden HBSS besiyeri geçirilmiş ve pıhtılaşmış kan damar içinden uzaklaştırılmıştır. Göbek bağının bir ucu sutur ile bağlanmış ve ven (toplardamar) içindeki hava çıkarıldıktan sonra içine % 0,1'lik kollajenaz I (Gibco) içeren HBSS çözeltisi doldurulmuş ve diğer ucu da sutur ile bağlanmıştır. Bu aşamadan sonra göbek bağı PBS içeren falkon tüpe yerleştirilmiş ve çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 25 dk bekletildikten sonra göbek bağının bir ucu kesilerek ven içindeki enzim ve endotel hücreleri bir falkon tüpe alınmış ve ven içi besiyeri ile yıkanarak kopan hücreler de aynı falkona

alınmıştır. 1300 rpm'de 5 dk'lık santrifüj sonrası pellet EGM-2 + 2U/ml heparin + %10 insan plazması besiyeri içinde pipetaj ile homojen dağıtılarak bir adet jelatin kaplı T25 flaska aktarılmış ve 37°C'de % 5 karbondioksit etüvünde inkübasyona alınmıştır. Birinci pasaj sonrasında hücreler %10 insan plazması içeren EGM-2 besiyerinde büyütülmüştür.

2.10.2. Anjiogenez testi

Pasaj 2 HUVEC'leri jelatin kaplı T25 flaska alındı ve üzerlerine yeterince heparin içermeyen EGM-2 + % 10 insan kan plazması eklendi ve flask % 5 CO₂'li karbondioksit etüvünde inkübasyona bırakıldı. Üzerlerinde fibrin jel oluşan endotel hücreler bir hafta sonunda invert mikroskop altında incelendi ve damar ağı oluşturdukları saptandı. Bu test ile HUVEC'lerin damar ağı oluşturma potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

2.10.3. Endotel hücrelerin nano/mikrofibröz polimerik taşıyıcıların üzerinde çoğaltılması ve kılcal damar ağı oluşumunun değerlendirilmesi

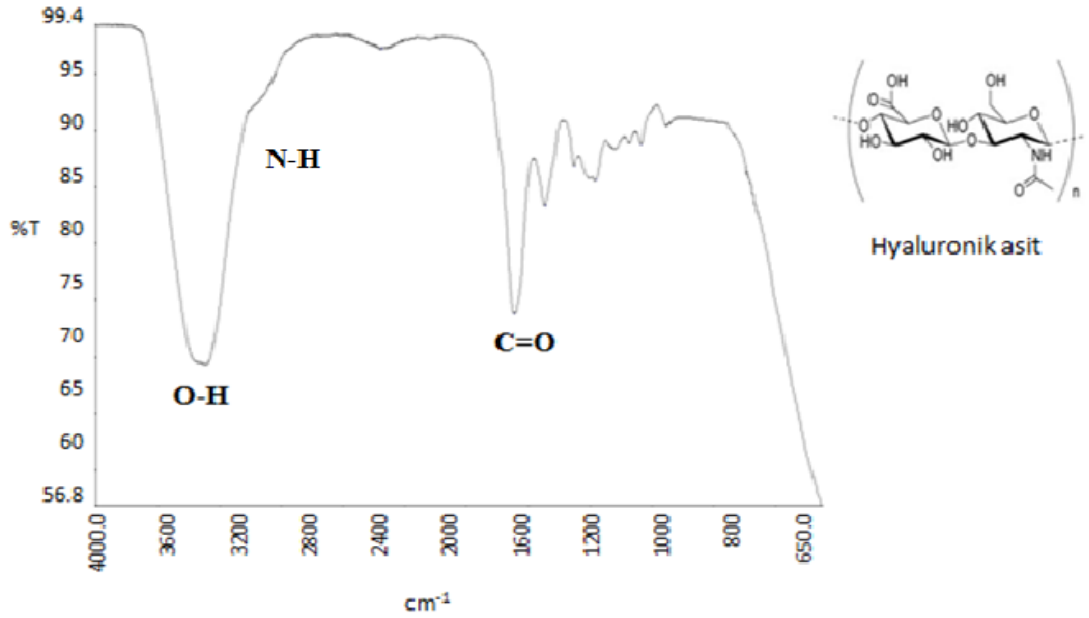
Polimerik taşıyıcıların her bir yüzü sterilizasyon amacıyla 15'er dakika UV ışını ile muamele edildi. HUVEC pasaj 2 kaldırıldı ve PLC ve PLC/Kol/HA (1x1 cm²) üzerine 24 kuyucuklu plakalarda ekildi. Bu deneyde besiyeri olarak DMEM/F12 + % 10 insan kan plazması + 4 U/mL heparin + % 0,2 primocin veya bu besiyerinin EGM-2 ile bire bir karışımı kullanıldı.

Kuyucuğun içindeki polimerik taşıyıcılara 1 mL besiyeri içinde kuyucuk başına 50000 hücre ekildi ve %5 CO₂'li karbondioksit etüvünde inkübasyona bırakıldı. 14 günlük inkübasyondan sonra kültür sona erdirildi ve HUVEC'ler anti-CD31 antikoruna ile boyanıp floresan mikroskopta incelendi. % 4 PFA ile sabitlenen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra % 0,1 Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Almanya) ile permeabilize edildi. Yüzey serum ile bloke edildikten sonra (30 dk, 37°C) hücreler bir gece boyunca 4°C'de 1:100 seyreltilmiş anti-CD 31 (Santa Cruz Biotechnology) birincil antikor çözeltisi içinde bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra hücreler FITC işaretli ikincil antikor (Santa Cruz Biotechnology) ile muamele edildi (45 dk, oda sıcaklığı). Çekirdeklerin boyanması için preparatlar etidium homodimer (Life Technologies) ile 30 dk muamele edildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin ve Kollajenin FTIR Spektroskopisi

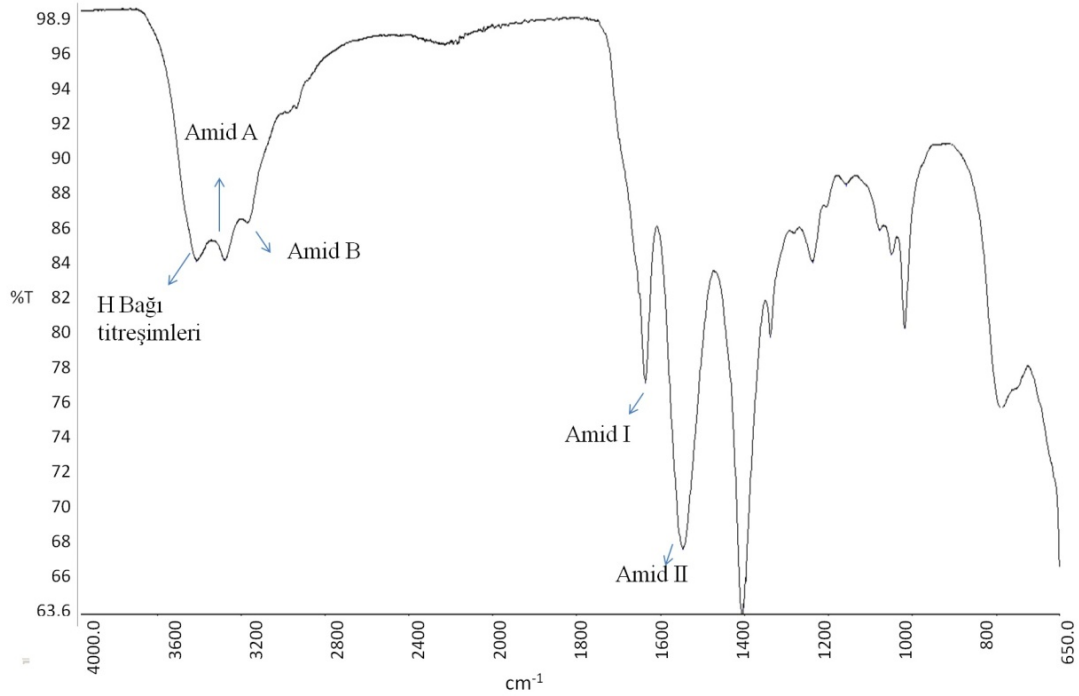
İzole edilen hyaluronik asit ve kollajen Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR cihazı kullanılarak analiz edildi. HA'in spektrumunda görülmesi beklenen O-H ve C=O pikleri ve HA'in moleküler yapısı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Hyaluronik asitin FT-IR spektrumu ve moleküler yapısı

Hyaluronik asitin karakteristik olarak, asimetrik karbonil (C=O) grubunun gerilim titreşimlerinden meydana gelen spektrumu $\sim 1639 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenir. O-H bağı pikinin 3400 cm^{-1} 'de olduğu bulunmuştur [72]. İnsan göbek bağından izole edilen hyaluronik asit için yapılan FT-IR sonucunda karbonil grubunun spektrumu $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Amid (N-H) grubunun karakteristik spektrumu olan 3300 cm^{-1} [73] izole edilen hyaluronik asitte de $\sim 3314 \text{ cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Hem karboksil hem de amid gruplarının analizi desteklediği, verilerden açıkça anlaşılmaktadır.

Kollajen'in spektrumunda görölmesi beklenen amid A, amid B, amid I ve amid II pikleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



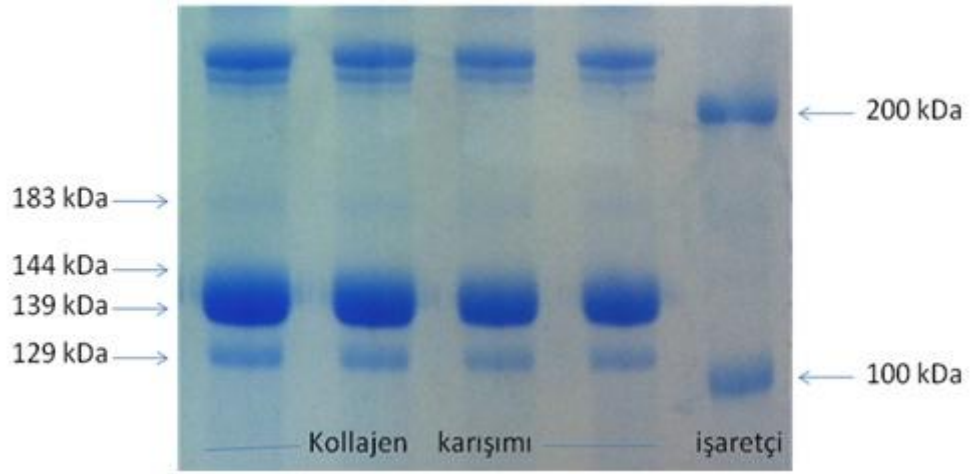
Şekil 3.2. İnsan göbek bağından izole edilen kollajene ait FT-IR spektrumu

Kollajenin FT-IR analizinde amid A ($3330\text{--}3325\text{ cm}^{-1}$), amid B (3080 cm^{-1}), amid I (1650 cm^{-1}) ve amid II (1550 cm^{-1}) bantları kollajenin peptit bağlarıyla ilişkilidir [74]. Kollajenin amid A bandı amid (N-H) direnciyle ilişkilidir [75]. Amid A bandının bazı komponentleri doğrudan kollajenin üçlü sarmal yapısındaki ve hidrojen bağı omurgasındaki değişikliklerle ilişkilidir. Bu bantlarda 3500 cm^{-1} ve 3400 cm^{-1} 'de toplananlar hidrojen bağlarıyla ilgilidir [76]. Kollajenin amid B bandı genellikle 3080 cm^{-1} de bulunur [75]. Amid I bandı 1600 ve 1700 cm^{-1} arasında bulunur [77]. Bu pikin karmaşıklığı karbonil çiftinin gerilmesinden ve heterojenik karbonil grubu omurgasından dolayıdır [75].

Amid II absorpsiyonunun %60'ı N-H titreşiminden % 40'ı ise C-N gerilmesi titreşiminden kaynaklıdır [78]. Amid gruplarının üçlü sarmal konumu 1549 cm^{-1} 'deki pik ile ilişkilidir. FTIR analizi sonuçları insan kollajenleri ile çalışılan benzer çalışmalardaki verilerle uyushmaktadır [74].

3.2. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Kollajenin SDS-PAGE Bulguları

İnsan göbek bağından izole edilen kollajenlerin, literatürdeki bilgilerle tutarlılığını kanıtlamak ve ilk defa yapılan pH'ya göre çöktürme yöntemi ile elde edilen kollajen tiplerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Kollajenin her tipini oluşturan zincirler farklı ağırlıklarda olduklarından dolayı, moleküler ağırlığa göre protein ayrımı sağlayan SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Kollajene ait yapılan SDS-PAGE sonuçları Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. İzole edilen kollajenin SDS-PAGE görüntüsü

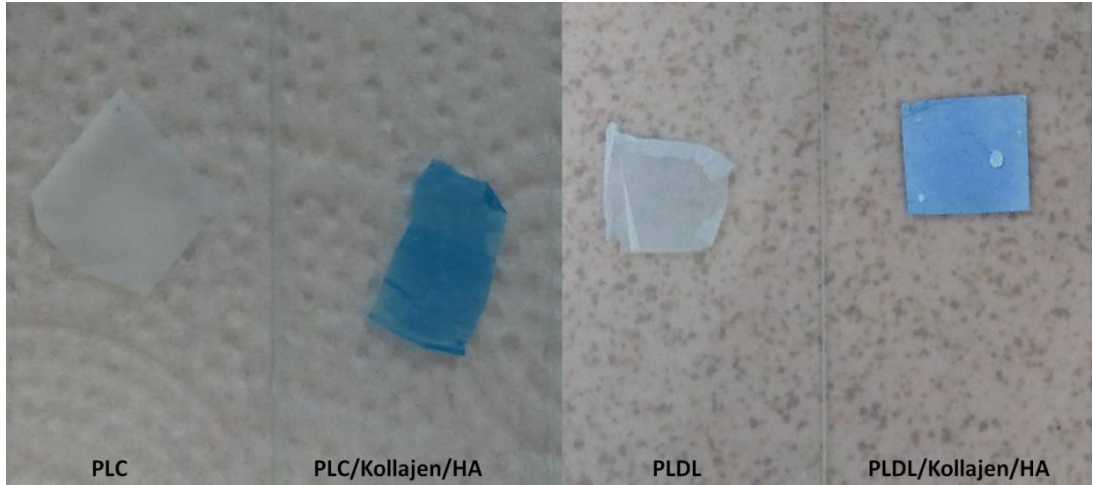
İnsan göbek bağından izole edilen kollajende bulunan kollajen tip I, III ve V'i oluşturan α (alfa) zincirler poliakrilamid jelde moleküler ağırlıklarına göre sıralanarak kollajen tiplerinin ayırt edilmesini sağlarlar. Moleküler ağırlığına göre; kollajen tip I $\alpha 1$ ve kollajen tip III $\alpha 1$ zincirleri 139 kDa, kollajen tip I $\alpha 2$ zinciri 129 kDa, kollajen tip V $\alpha 1$ zinciri 183 kDa ve V $\alpha 2$ zinciri 144 kDa olarak jelde dizilirler. Kollajen tip III $\alpha 1$ zinciri 139 kDa olmakla birlikte ancak zincirler arasındaki disülfid bağları merkaptotanol ile indirgendiikten sonra jelde bu boyutta görülebilmektedir. Kollajen karışımında kollajen tip III'ün varlığı merkaptotanol varlığında ve yokluğunda yapılan SDS-PAGE jellerinin karşılaştırılması ile kanıtlanmıştır; merkaptotanol yokluğunda var olan kollajen üçlü heliksi merkaptotanol varlığında 139 kDa boyutuna indirgenmiş ve jelde var olan 139 kDa boyutundaki bantta kalınlaşma gözlemlenmiştir.

Kollajen tip V'in $\alpha 3$ zinciri 172 kDa ağırlığında olmakla birlikte insan göbek bağında bulunmadığından dolayı jelde görünmemektedir.

Yapılan SDS-PAGE deneyi sonuçları açıkça göstermektedir ki izole edilen kollajen, literatürdeki insan kollajeni için yapılan moleküler ağırlık ölçümleri ile tutarlıdır [74]. Bu deney sonucunda, göbek bağından pepsin ile elde edilen kollajen karışımının içinde yüksek miktarda kollajen tip I ve III ve eser miktarda da kollajen tip V olduğu belirlenmiştir.

3.3. PLC/Kol/HA ve PLDL/Kol/HA Elektro-eğirilmiş İskelelerde Protein Varlığının Kanıtlanması

Commassie mavisi ile boyanan elektro-eğirilmiş PLC ve PLC/Kol/HA, PLDL ve PLDL/Kol/HA iskelelerin makroskopik olarak renk farklılıkları gözlemlenmiştir. Şekil 3.4’de commassie mavisi ile boyanmayan PLC ve PLDL iskeleler ve proteinleri yani kollajenleri boyanan PLC/Kol/HA ve PLDL/Kol/HA iskelelerinin makroskopik görüntüleri verilmiştir.

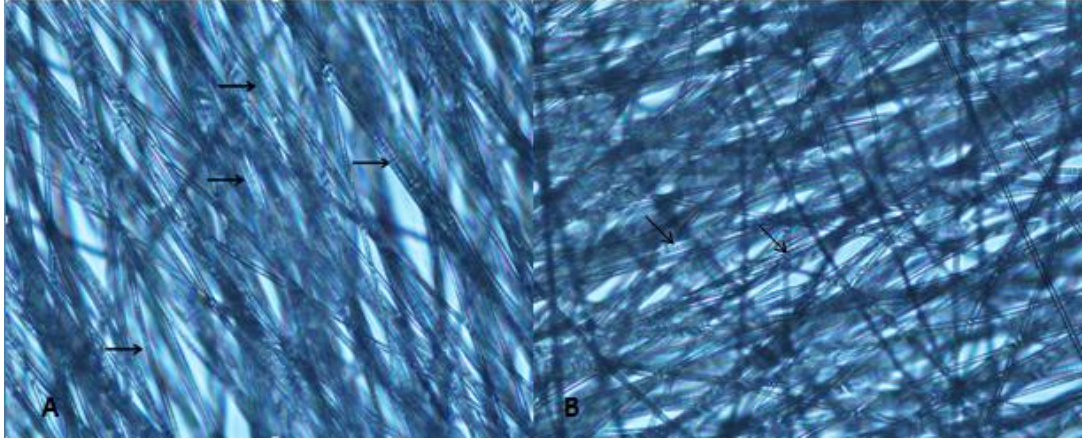


Şekil 3.4. Elektro-eğirilmiş PLC, PLC/Kol/HA, PLDL ve PLDL/Kol/HA commassie mavisi boyaması görüntüleri

Commassie mavisi proteinleri kantitatif tayininde kullanılan güvenilir bir maddedir. Commassie mavisi muamelesi sonucu kollajen proteinini içeren iskelelerin yoğun mavi renk almaları elektro-eğirme işlemi esnasında kollajenin homojen bir şekilde çözündüğünü ve nano/mikro fiberlerde sentetik ve biyolojik polimerlerin homojen dağılım gösterdiğinin bir kanıtıdır.

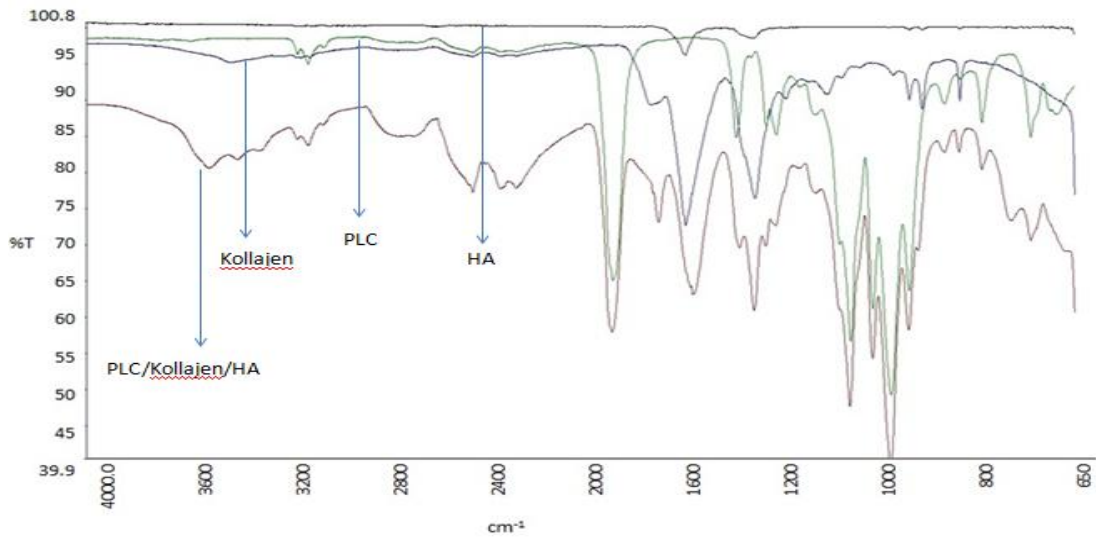
Commassie mavisi ile boyanan PLC/Kol/HA iskele ışık mikroskobu ile görüntülendi ve boyanan liflerdeki kollajenin eşit bir dağılım gösterdiği gözlemlendi. Şekil 3.5’de

commassie mavisi ile boyanmış PLC/Kol/HA iskelenin ışık mikroskobu görüntüsünde protein (kollajen) yapıdan kaynaklanan enine çizgiler görülmektedir.



Şekil 3.5. A. PLC/Kol/HA ve B. PLDL/Kol/HA iskelelerin commassie mavisi boyaması ışık mikroskobu görüntüsü (x800)

Protein varlığını elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA iskele içerisinde göstermek amacıyla yapılan karşılaştırmalı FTIR analizinin spektrumu Şekil 3.6’da verilmiştir.



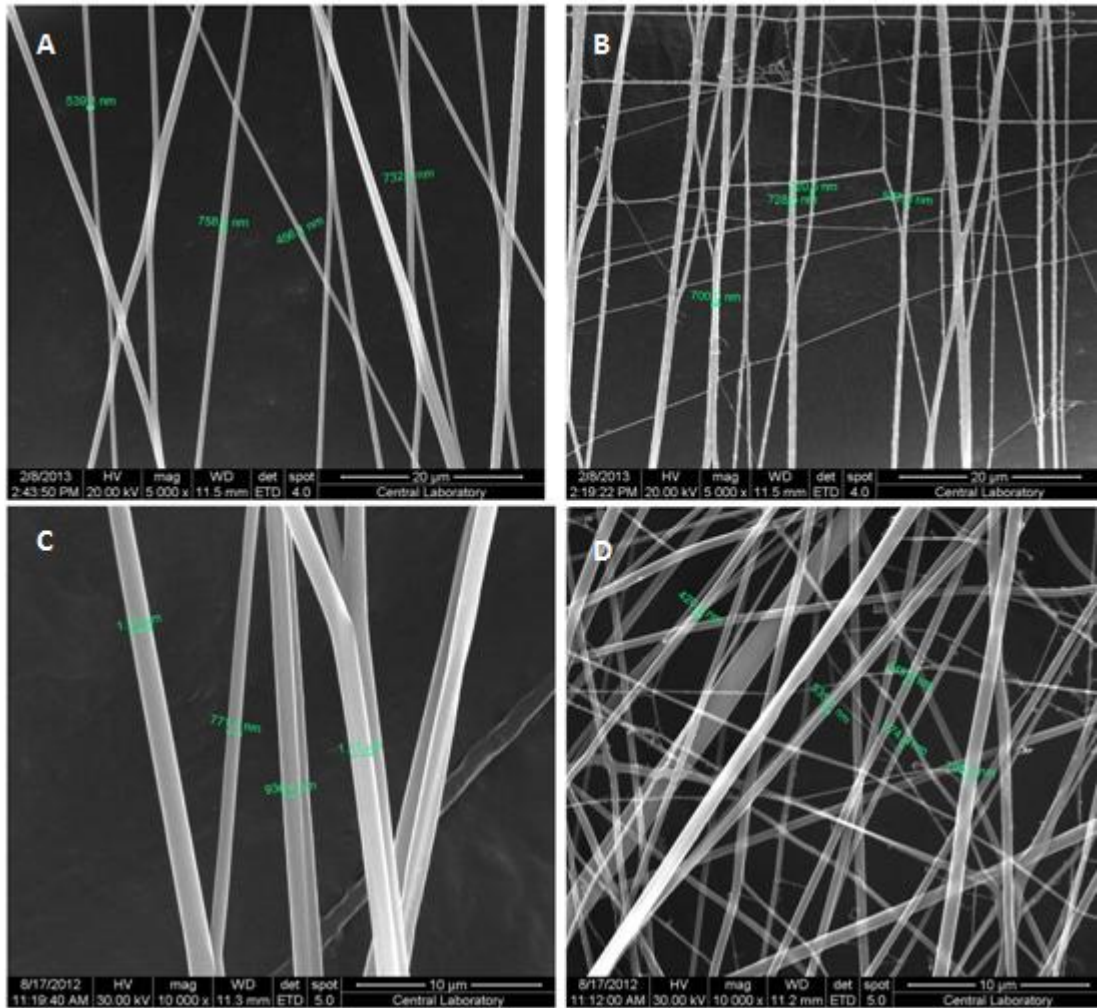
Şekil 3.6. Elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA’in, kollajenin ve hyaluronik asidinin FTIR spektrumu

FTIR analizinde PLC, PLC/Kol/HA, kollajen ve HA’in spektrumları, birbirleri ile tutarlı değerler vermektedir. HA’in karışım içerisinde % 0,25 oranında olmasından dolayı, karışım içerisinde ayırt edilmesi mümkün olmamıştır.

3.4. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskopisi

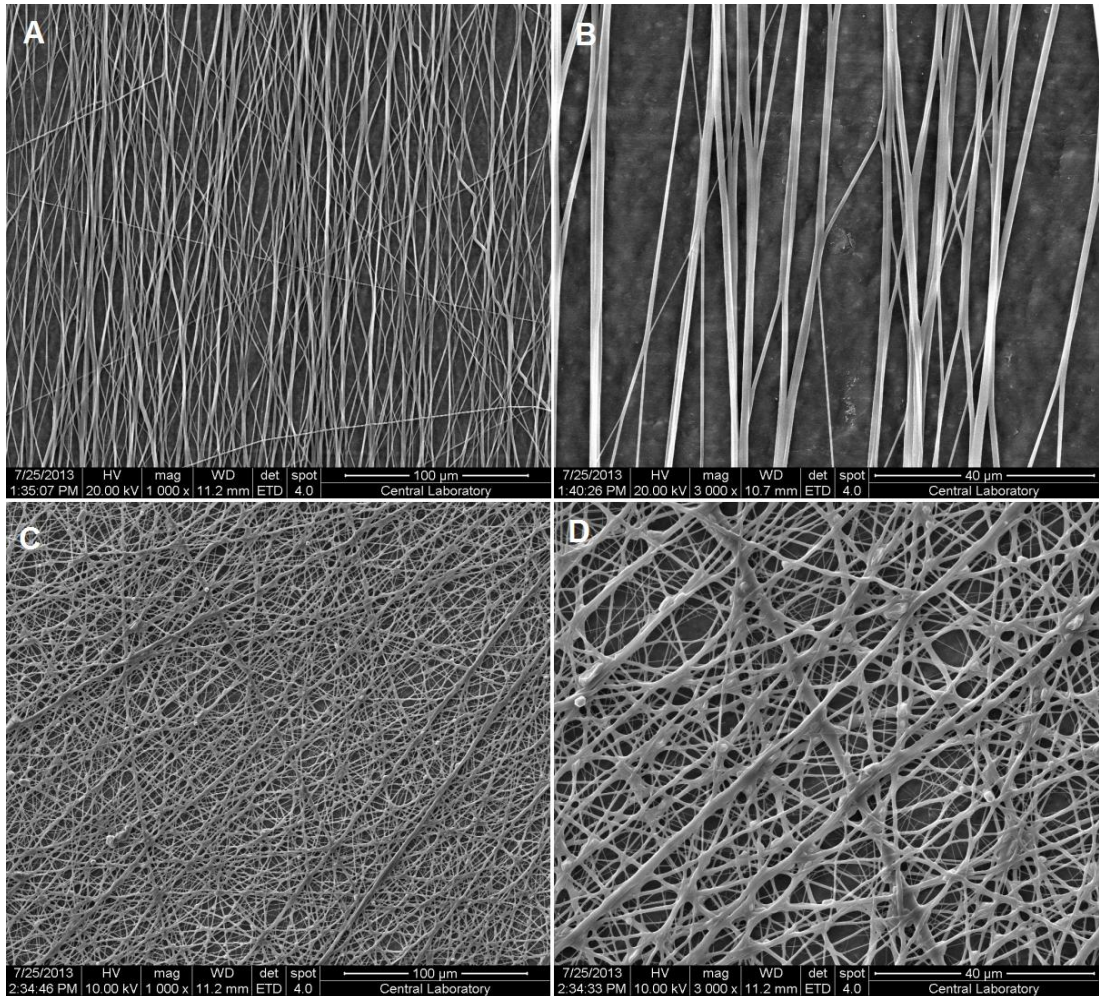
Optimizasyon çalışmaları sonunda fiberlerin düzgünlüğü, birbirine paralellığı ve birbirine yapışma durumları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlendi (ODTÜ Merkez Laboratuvarı, QUANTA 400F Field Emission SEM).

Üretilen PLC taşıyıcılardaki fiberlerin ortalama çapı $641,9 \pm 104,3$ nm, PLC/Kol/HA karışımı kullanılarak elde edilen fiberlerin ortalama çapı $569,2 \pm 188,0$ nm, PLDL ile üretilen fiberlerin ortalama çapı $1610,0 \pm 376,8$ nm ve PLDL/Kol/HA karışımı kullanılarak elde edilen fiberlerin ortalama çapı $797,4 \pm 188,8$ nm ve olarak ölçülmüştür (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Elektroegirme ile elde edilmiş PLC (A-5000x), PLC/Kol/HA (B-5000x), PLDL (C-10000x) ve PLDL/Kol/HA (D-10000x) nano/mikro fibröz taşıyıcıların SEM görüntüleri

SEM görüntülerinde PLC/Kol/HA karışımı ile elde edilen taşıyıcılarda saf PLC taşıyıcılarına oranla fiberler daha az yönlenmiş olarak göze çarpmaktadır; PLC/Kol/HA taşıyıcılarda toplayıcı üzerinde ilk biriken fiberler yönlenmiş iken, bunların üzerine biriken fiberlerin yönlenmesi azalmaktadır. Bunun sebebi; iskele üzerindeki fiber katmanları arttıkça bakır toplayıcı ile bağlantısının kesilmesidir. Ayrıca, PLC/Kol/HA karışımından üretilen fiberler üzerinde oluşan topaklanmalar, çözünememiş polimerlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [79] (Şekil 3.8).



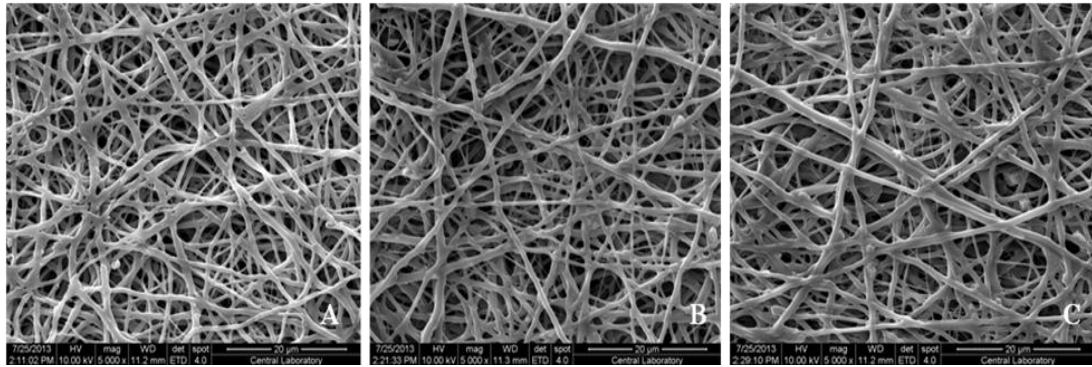
Şekil 3.8. Elektroğirme ile elde edilmiş PLC (A-1000x, B-3000x) ve PLC/Kol/HA (C-1000x, D-3000x) nano/mikrofibröz taşıyıcıların SEM görüntüleri

Karışım içerisindeki kollojen tiplerinin farklı moleküler ağırlıklarda olmaları hücre tutunması açısından ve biyouyumluluk açısından olumlu olacağı düşünülse de yönlenmeyi olumsuz etkilediği görülmüştür [80]. Bu olumsuzluk SEM görüntülerinde birbirinden farklı fiber çapına sahip nano fiber çapında liflerin genel

yönlenmeyi oluşturan sentetik polimerden bağımsız hareket etme eğilimi gösterdiği görülmektedir.

Bunun yanında, fiberlerin tamamen yönlenmiş olmaması doku iskelesinde gözenekliliğin de artmasını sağlamıştır. Gözeneklilik oranının yüksek olması hücre tutunması için daha fazla yüzey alanı ve hücrelerin iskelenin iç bölgelerine göç edebilmesi için yol anlamına gelmektedir.

Biyoerozyon deneyi sonrasında PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelerin SEM fotoğrafları Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.9. A. PLC, B. PLC/Kol/HA ve C. çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin 21 günlük biyoerozyon sonrasındaki SEM fotoğrafları (x5000).

Erozyon sonrası alınan SEM görüntülerinde en belirgin fark olarak PLC/Kol/HA fiberlerin yüzeylerinde az da olsa madde kaybı işaretleri (fiber boyunca birbirini takip eden daha kalın ve daha ince bölgeler) görülmektedir. 21 günün sonunda fiber bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir.

3.5. PLC, PLC/Kol/HA ve PLDL, PLDL/Kol/HA iskelelerin Çapraz Bağlanması Deneyinin Bulguları

PLDL, PLDL/Kol/HA iskeleler çapraz bağlandıktan sonra büzülüp sertleştiklerinden ve kolay kırılır hale gelmelerinden dolayı üzerlerinde diğer karakterizasyon testlerinin yapılamayacağına karar verilmiştir ve testler PLC ve PLC/Kol/HA üzerinde yapılmıştır.

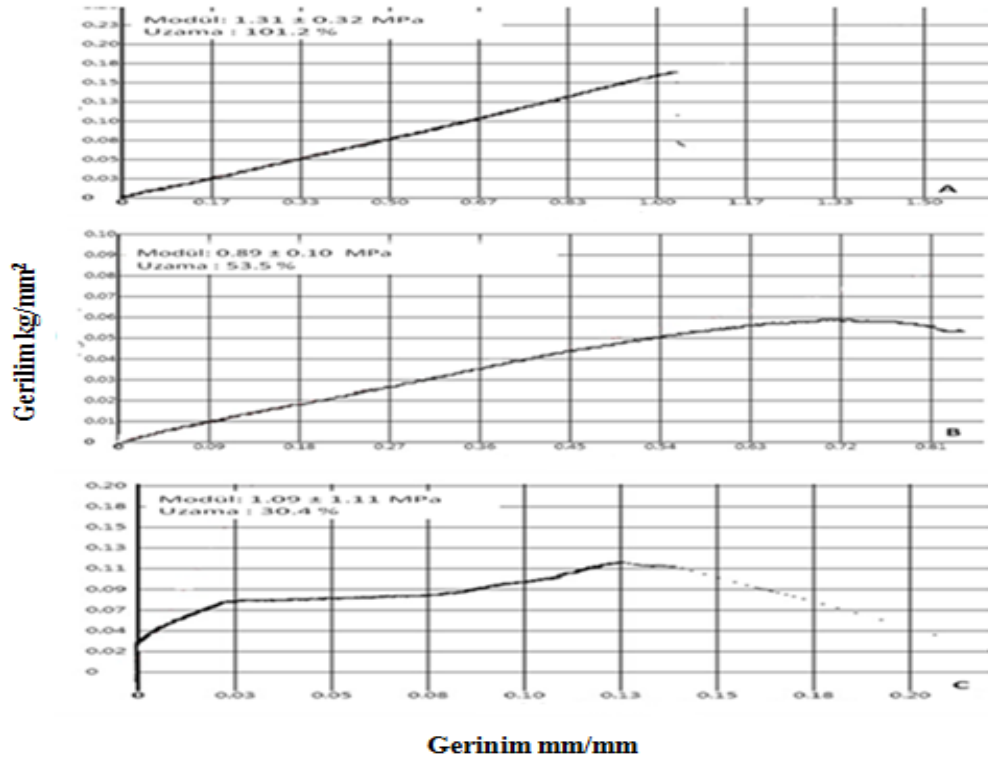
3.6. PLC/Kol/HA Karışımından ve PLC Kopolimerinden Üretilen Doku İskelelerinin Çekme Testi ve DMA ile Yapılan Mekanik Analiz Bulguları

PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin çekme testi bulguları modül ve çekme uzaması verileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo3.1. Çekme testi bulguları.

İskele Türü	Elastisite Modülü (MPa)	Kopmadaki uzama (%)	Kopma dayanımı (MPa)
PLC	$1,31 \pm 0,32$	101,2	11,6
PLC/Kol/HA	$0,89 \pm 0,10$	53,5	0,6
Çapraz Bağlı PLC/Kol/HA	$1,09 \pm 1,11$	30,4	295,2

Şekil 3.10’da numunelerin çekme testi sonucu oluşan gerilim-gerinim eğrileri gösterilmiştir.

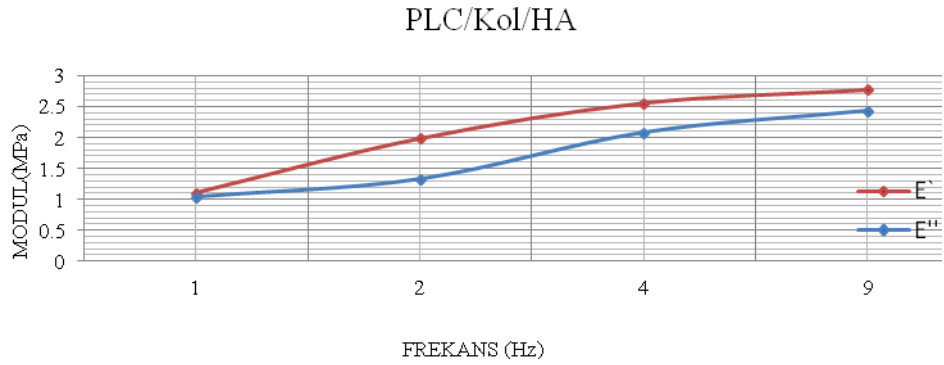
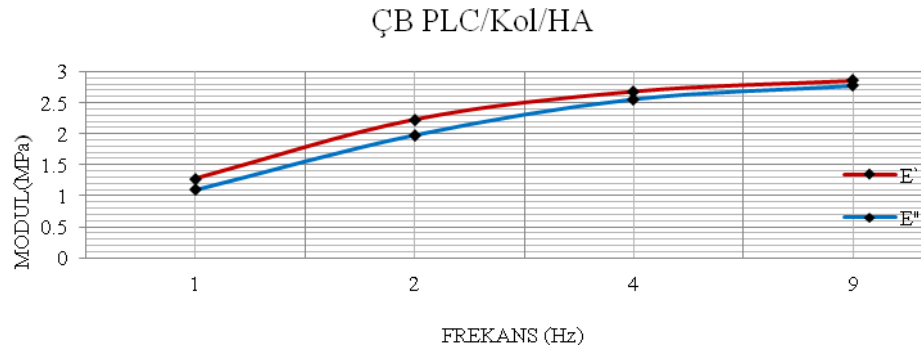
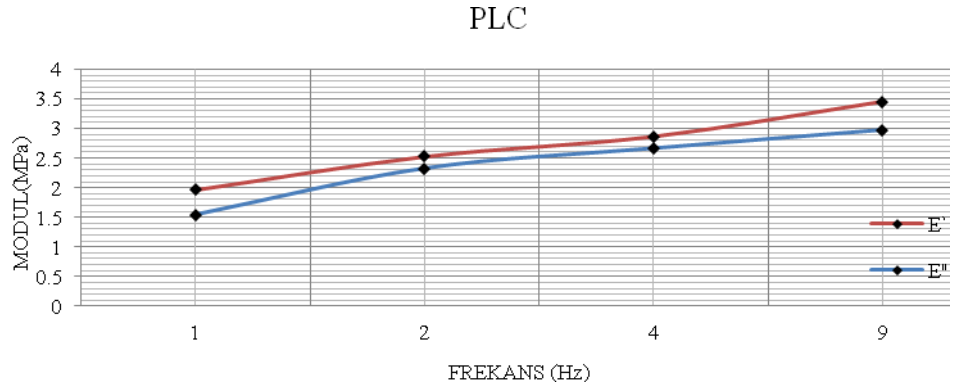


Şekil 3.10. Elektro-eğrilmiş (A) PLC, (B) PLC/Kol/HA ve (C) çapraz bağlı PLC/Kol/HA’nin gerilim-gerinim eğrileri

Çekme testi verileri incelendiğinde beklendiği gibi elektro eğirilmiş PLC'nin kopma uzaması ve çekme dayanımı, kollajen ve HA içeren iskeleye göre daha yüksek bulunmuştur. Çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmamış olan karşılaştırıldığında çapraz bağlanan iskelenin modülünde artış görülmekle birlikte kopma uzamasının düştüğü görülmüştür.

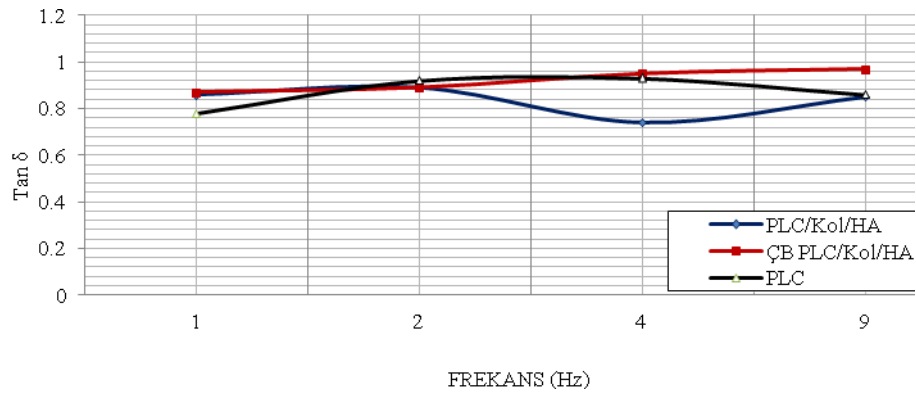
Yumuşak dokulardan olan kasların çalışırken uzama ve kısalma işlevleri olduğu göz önüne alındığında, kopma uzaması daha yüksek olan [81], çapraz bağlanmamış PLC/Kol/HA iskelenin yumuşak dokulara daha uyumlu olabileceği düşünülmektedir.

Elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA, çapraz bağlı PLC/Kol/HA ve PLC'nin 37 °C'de farklı frekanslarla taranarak izlenen viskoelastik davranışları sonucu frekans arttıkça tüm elektro-eğirilmiş iskelelerde modülün arttığı görülmüştür. DMA sonucu elde edilen elastik modül-frekans eğrileri Şekil 3.11'da gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Elektro-eğirilmiş PLC'nin, PLC/Kol/HA'nın ve çapraz bağlı PLC/Kol/HA'nın 37 °C'de frekans taraması sonucu elde edilmiş depo modülü (E') ve kayıp modülü (E'') eğrileri

DMA analizi sonucu elektro-eğirilmiş PLC'nin, PLC/Kol/HA'nın ve çapraz bağlı PLC/Kol/HA'nın darbe dayanımı $\tan \delta$ ile ifade edildi. Analiz sonucu elde edilen $\tan \delta$ -frekans eğrisi Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA, çapraz bağlı PLC/Kol/HA ve PLC'nin tan δ -frekans eğrisi

İskelelerin gösterdikleri visko-elastik davranışların ayrıntılı değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

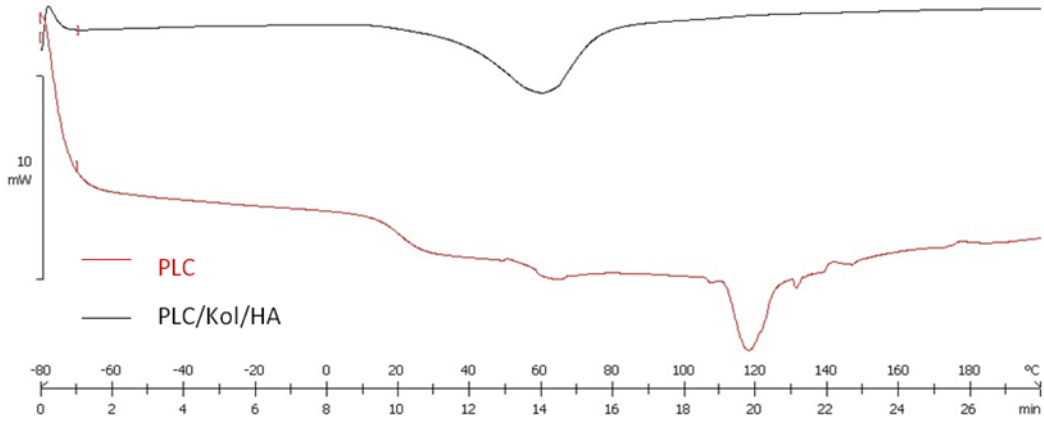
Tablo 3.2. Elektro-eğirilmiş PLC'nin, PLC/Kol/HA'nın ve çapraz bağlı PLC/Kol/HA'nın DMA analizi bulguları

İskele Türü	Depo Modülü (E') MPa				Kayıp Modülü (E'') MPa				Tan Delta			
	1Hz	2 Hz	4 Hz	9 Hz	1 Hz	2 Hz	4 Hz	9 Hz	1 Hz	2 Hz	4Hz	9 Hz
PLC/Kol/HA	1,04	1,33	2,08	2,44	0,90	1,18	1,54	2,06	0,86	0,89	0,74	0,85
Çapraz bağlı PLC/Kol/HA	1,27	2,23	2,69	2,86	1,10	1,98	2,56	2,77	0,87	0,89	0,95	0,97
PLC	1,96	2,53	2,87	3,46	1,54	2,32	2,66	2,97	0,78	0,92	0,93	0,86

DMA deneyi ile bulunan modül değerleri çekme testi ile tutarlılık göstermektedir. Yumuşak dokuların canlı vücudundaki frekans aralığında yapılan DMA deneyi sonuçları, literatürdeki çalışmalarla tutarlı modül değerlerini vermektedir [82]. Bulunan değerlerin yumuşak doku mühendisliği çalışmalarında kullanıma uygun değerler olduğu anlaşılmaktadır.

3.7. PLC Kopolimerinden ve PLC/Kol/HA Karışımından Elektro-eğirilerek Üretilen İskelelerin Isıl Analiz Bulguları

PLC kopolimerinin ve PLC/Kol/HA karışımının ısı davranışlarını görmek amacıyla yapılan DSC analizinin termogramı Şekil 3.13'de verilmiştir.



Şekil 3.13. PLC ve PLC/Kol/HA iskelelerin DSC termogramları

PLC kopolimerinin DSC termogramında yaklaşık olarak 22 °C’de ilk Tg ve yaklaşık olarak 50 °C’de ikinci Tg gözlenmiştir. 200 °C’ye kadar gerçekleştirilen analizde 120 °C’de Tm gözlenmiştir.

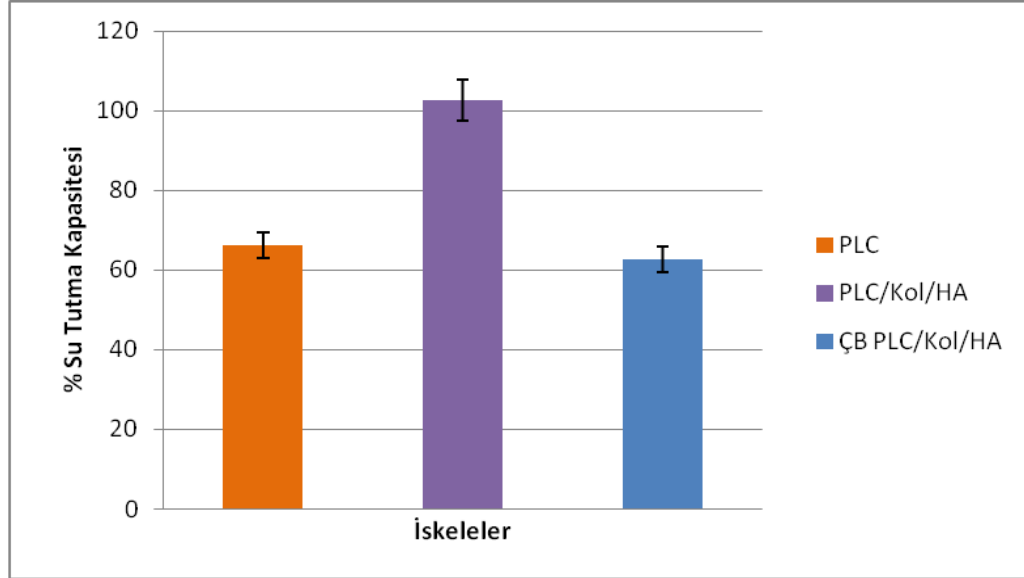
PLC/Kol/HA karışımında Tg belirgin olmasa da 60 °C’deki erime öncesinde 20 ile 40 °C arasında olduğu varsayılmaktadır. Bu varsayımı iskelenin oda şartlarında gözlemsel olarak fonksiyonel olduğunun gözlemlenmesi de desteklemektedir.

Yapılan DSC analizinden anlaşılmaktadır ki PLC/Kol/HA karışımından elektro-eğirilerek üretilen iskeleler insan vücut sıcaklığı olan 37 °C’de fonksiyoneldirler.

Çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA karışımından üretilen iskelelerin, DSC termogramında net bir Tg ve Tm görülememesinden dolayı şekilde yer verilmemiştir. Çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA karışımından üretilen iskelelerin ısı analizi için DSC’nin yeterince hassas bir yöntem olmadığı anlaşılmıştır.

3.8. PLC Kopolimerinden ve PLC/Kol/HA Karışımından ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA Karışımından Üretilen Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasiteleri Ölçüm Bulguları

PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA doku iskelelerinin su tutma kapasitelerinin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları sırasıyla; % $102,6 \pm 12,5$, % $66,2 \pm 4,1$ ve % $62,6 \pm 3,8$ olarak bulunmuştur. Bu veriler şematik olarak Şekil 3.14’de gösterilmiştir.

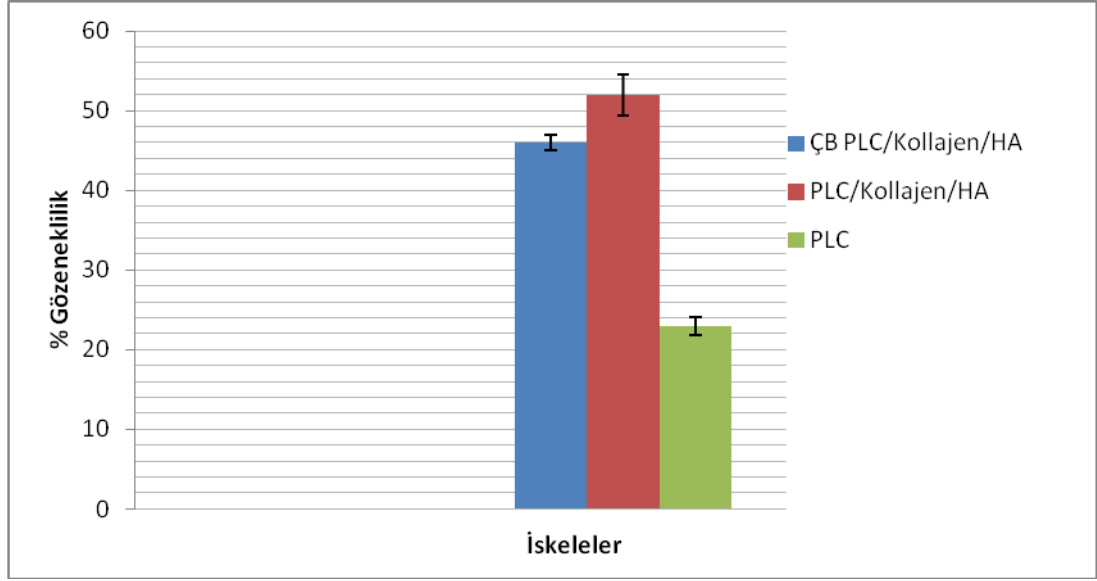


Şekil 3.14. PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin yüzde su tutma kapasiteleri

Su tutma kapasitesi doku iskelesine gerçek dokuya benzemesi yönünden ve çeşitli molekülleri (enzim, hormon, mineral vs.) bağlamasına yardımcı olması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca su tutma kapasitesinin yüksek olması hücre tutunmasını destekleyerek hücrenin doğal ortamına benzeyen bir çevrede olmasını sağlar, hücre bölünmesi ve de hücrenin bulunduğu ortamda daha az stresle mücadele etmesini sağlar [2]. Ayrıca su tutma kapasitesinin fazla olması iskelenin biyorozyon hızını arttırarak, hücrelerin enzimatik biyorozyon sürecine katkıda bulunur [83].

3.9. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA Doku İskelelerinin Gözeneklilik Oranları Bulguları

Mevcut denklemler yardımıyla bulunan, iskelelerin yüzde gözeneklilik oranları PLC/ PLC/Kol/HA ve çapraz bağlı PLC/Kol/HA iskeleler için sırasıyla; $\% 23,00 \pm 0,03$, $\%52,00 \pm 0,03$ ve $\%46,00 \pm 0,01$ olarak Şekil 3.15’de şematik olarak gösterilmiştir.



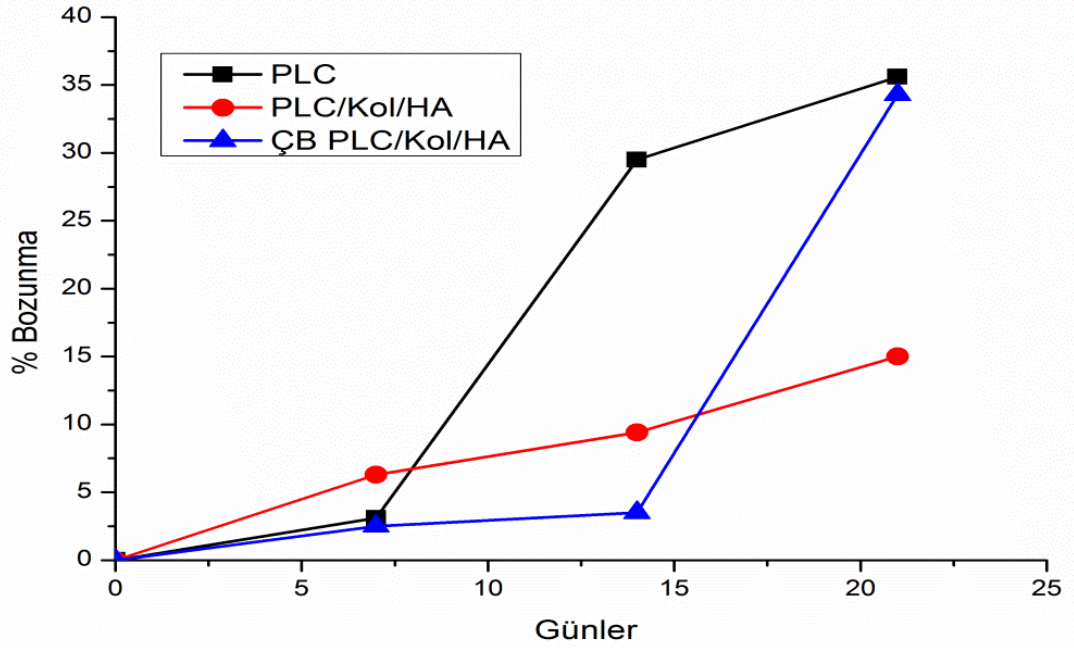
Şekil 3.15. PLC/Kollajen/HA, çapraz bağlanmış PLC/Kollajen/HA ve PLC iskelelerin yüzde gözeneklilik oranları

İdeal gözeneklilik oranları literatürde sıklıkla %60-90 olarak belirtilmektedir [84]. Gözeneklilik yumuşak doku iskelesi için en önemli özelliklerden biridir. İskelenin hücreler ile kaplanması çoğu zaman yeterli olmamakta ve hücrelerin iskelenin içlerindeki liflere de tutunarak tam bir doku özdesi oluşturmaları gerekmektedir [85]. Hücrelerin bu liflerden oluşan yapının içlerine girebilmeleri için lifler arasında yeterli büyüklükteki gözeneklerin bulunması şarttır [86].

PLC/Kol/HA iskelede gözeneklilik oranı %52, çapraz bağlı PLC/Kol/HA iskelede ise %46 olduğu tespit edilmiş. Bu oranların %60'ın altında değerlerde olmasının sebeplerinden biri liflerin nano/mikro yapıda olmasıdır. Bu durum gözeneklerin daha küçük boyutlarda olmasına sebep olmuştur fakat aynı zamanda daha fazla miktarda gözenek oluşmasını da sağlamıştır. Daha fazla gözenek bulunması, yüzey alanını arttırdığından dolayı, doku iskelesinin hücre kültüründe biyorozyon ile birlikte kısa sürede gözenekliliğin artmasını sağlayacaktır. PLC/Kol/HA iskelelerin standart gözeneklilik oranının altında bir değerde olmasının dezavantajı, elektro-eğirilmiş olmasının getirdiği avantajla birlikte düşünüldüğünde ortadan kalkacaktır. Bunun kanıtı hücre kültürü çalışmaları ile verilmiştir.

3.10. PLC, PLC/Kol/HA ve Çapraz Bağlanmış PLC/Kol/HA Doku İskelelerinin Yüzde Erozyon Oranları Bulguları

PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin uygun şartlarda 7,14 ve 21. günlerdeki yüzde erozyon oranları belirlenmiştir. 21. günde erozyon yüzdeleri sırasıyla; $35,6 \pm 0,3$, $15,0 \pm 0,2$ ve $34,3 \pm 0,3$ olarak bulunmuştur. Şekil 3.16'da 7, 14, ve 21. günlerdeki erozyon hızları gösterilmiştir.



Şekil 3.16. PLC, PLC/Kol/HA ve çapraz bağlanmış PLC/Kol/HA iskelelerin 7,14 ve 21. günlerdeki yüzde erozyon grafiği

Doku mühendisliğinin amacı biyobozunur materyaller üreterek, hastaya nakledilen doku özdeşinin zaman içerisinde gerçek dokuya dönüşmesini sağlamaktır [87]. Bunu da üretilen doku iskelesinin biyobozunur yapıda üretilmesini sağlayarak yapmaktadır. Biyoerozyon prensibi en başta üretilen doku özdeşindeki polimerik malzemenin zaman içerisinde hücrelerin enzimatik faaliyetlerinden ve vücuttaki fizyolojik sıvılardan (enzim, su vs.) dolayı parçalanmasıdır ve bunun üzerine doku iskelesinin yerini, hücrelerin kendi ürettikleri ECM materyalleri ile doldurmaları beklenir [87].

Doku iskelesi parçalanırken ve yerine hücreler kendi ECM materyallerini yerleştirirken zamanlama önemlidir. Doku iskelesinin çok hızlı erozyonu veya çok yavaş erozyonu, doku mühendisliğinin amacını gerçekleştirmesindeki büyük

engellerden biridir. Bu sebepten dolayı, üretilen doku iskelesi ideal erozyon süresine sahip olmalıdır.

Çapraz bağlanmanın amacı erozyon süresini uzatmaktır. Erozyon süresini uzatmak yani çapraz bağlamak tamamen biyolojik polimerlerden üretilen iskeleler için bir zorunluluktur. PLC/Kol/HA iskelenin hem sentetik hem de biyolojik polimerlerden üretilmesinin sebeplerinden biri erozyon süresini yavaşlatmaktır. Çapraz bağlamak için kullanılan EDC, çalışma prensibinde aminoasitlerdeki azot içeren gruplardan ve aminoasitlerde ve hyaluronik asitte bulunan hidroksil (OH) grubundan yararlandığından dolayı PLC/Kol/HA karışımındaki kollajenleri birbirine ve hyaluronik asite bağlamıştır.

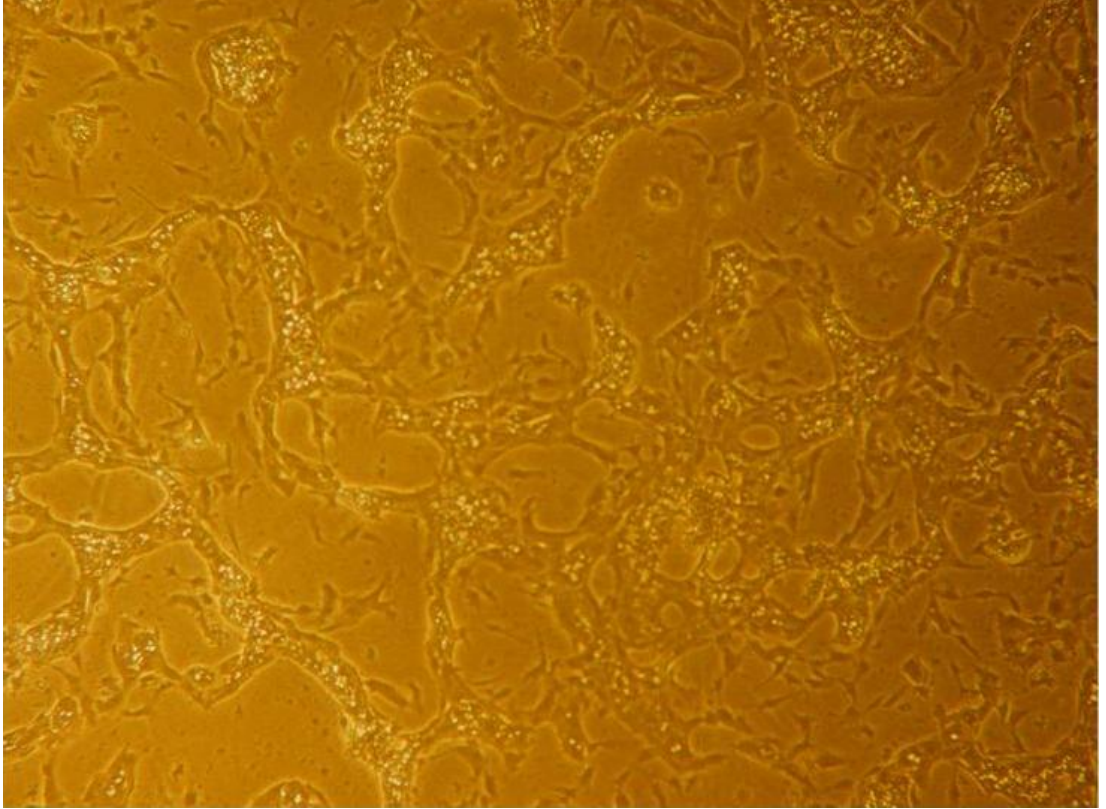
HA suda çözünebilen bir GAG olduğundan dolayı erozyon sürecinde en hızlı olarak iskeleden ayrılması beklenen üründür. Erozyon deneyinde 7. güne kadar bozulan ürünün içerisinde, suda çözünen bir molekül olduğundan dolayı HA moleküllerinin de olduğu düşünülmektedir. Elektro-eğirilmiş PLC kopolimerinin 7. günün ardından hızlı erozyonu homojen bir çözünme ile olmamıştır. PLC iskeleden PBS içerisinde bölgesel kırılmalarından dolayı küçük parçacıklar ayrılmıştır. Ani ağırlık kaybı olmasının sebebi bu yüzdendir. Çapraz bağlı PLC/Kol/HA iskelede de PLC iskeledekiyle benzer bir parçalanma söz konusu olduğundan 14. ve 21. günler arasında ani bir ağırlık kaybı gözlenmiştir. Çapraz bağlı PLC/Kol/HA iskeledeki bu parçalanmanın çapraz bağlama prosedürü sırasında kullanılan alkolün kollajenin aşırı dehidrasyonuna sebep olması nedeniyle daha kırılgan hale gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

PLC/Kol/HA iskelenin periyodik bir bozunmaya sahip olmasından, bu iskelenin erozyon süresi açısından doku mühendisliğinde kullanım için diğerlerinden daha ideal olduğu anlaşılmaktadır.

3.11. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.11.1. Anjiogenez Testi

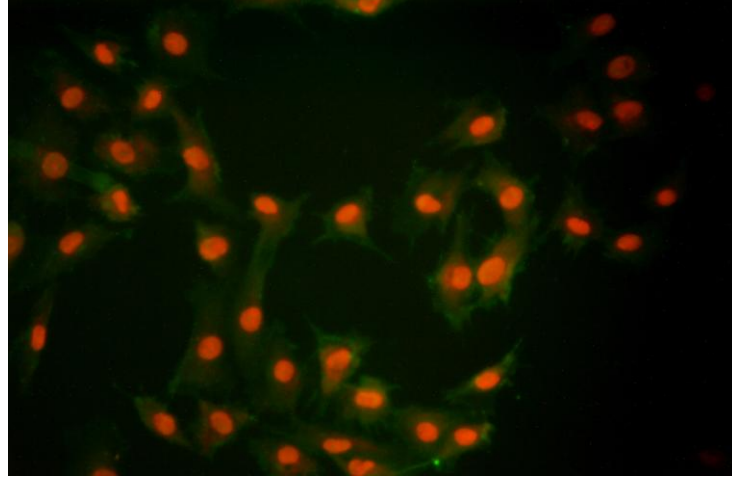
Üzerlerinde fibrin jel oluşan endotel hücreler bir hafta sonunda invert mikroskop altında incelendi ve damar ağı oluşturdıkları saptandı (Şekil 3.17). Bu test ile endotel hücrelerin damar ağı oluşturma potansiyeline sahip olduğu belirlendi.



Şekil 3.17. HUVEC'lerin 1 hafta sonunda fibrin jel altında oluşturduğu damar ağının invert mikroskop görüntüsü

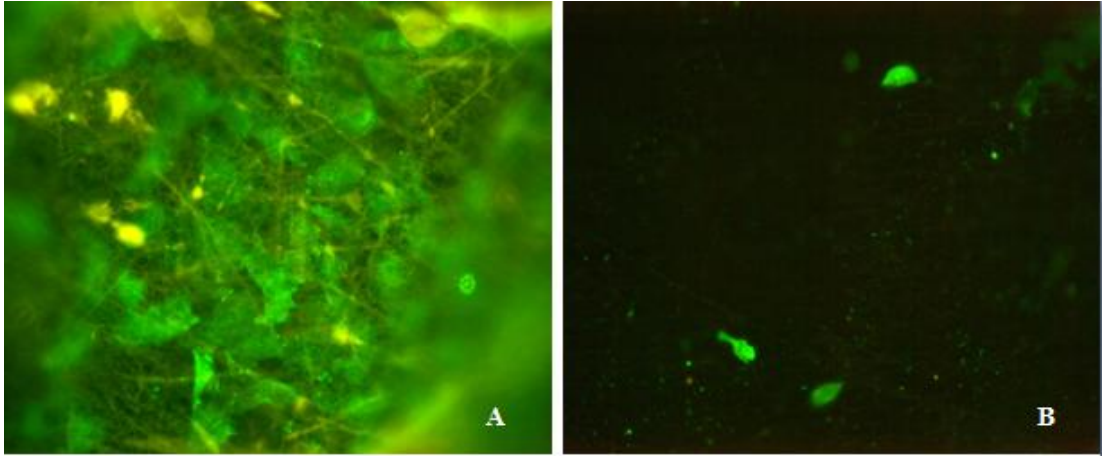
3.11.2. Endotel hücrelerin nano/mikrofibröz polimerik taşıyıcıların üzerinde çoğaltılması ve kılcal damar ağı oluşumunun değerlendirilmesi

DMEM/F12 besiyeri ortamında hücre kültürü petrilerinde büyütülen endotel hücrelerin 14 günlük inkübasyon sonunda anti-CD31 antikoru ile boyanıp floresan mikroskopta incelenmesi sırasında alınan görüntüler Şekil 3.18'deki gibidir.



Şekil 3.18. Endotel hücrelerin hücre kültürü kabında DMEM/F12 besiyeri ortamında 14 günlük inkübasyon sonundaki görüntüsü (x400)

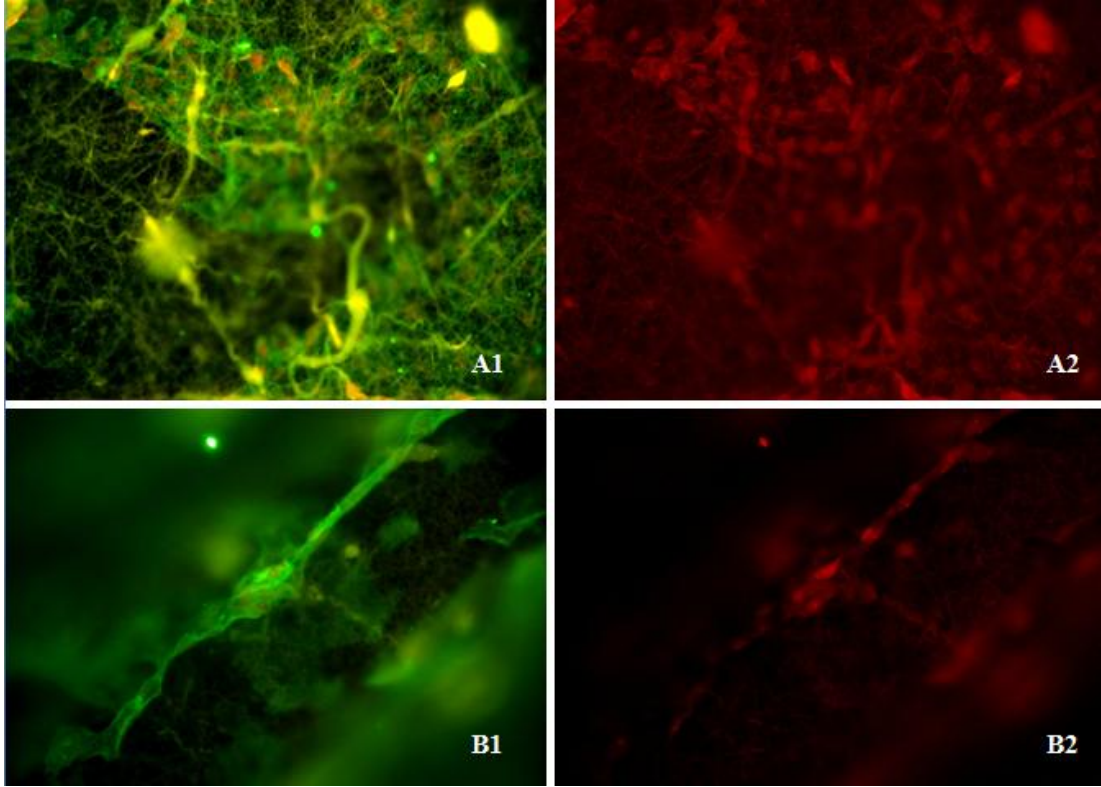
PLC/Kol/HA ve PLC iskeleler üzerine ekilen endotel hücrelerin DMEM/F12 besiyerinde inkübe edilmesi sonucu PLC/Kol/HA iskeleye hücrelerin tutundukları ve PLC iskeleye tutunamadıkları Şekil 3.19’de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Endotel hücrelerin iskeleler üzerinde 5 günlük inkübasyon sonundaki görüntüleri (x400). A. PLC/Kol/HA iskele B. PLC iskele. Yeşil: CD31 (endotel hücre belirteci)

Üretilen PLC/Kol/HA iskelenin hücre kültürü çalışmasında, iskelenin hücreler için toksik veya biyouyumlu olup olmadığını anlamak amaçlanmıştır. Hücrelerin 7 ve 14 gün sonunda iskeleye tutunmuş ve yayılmış olarak gözlemlenmeleri ve damar oluşumuna benzer yapıları oluşturmaları iskelenin yumuşak doku mühendisliği materyali olarak kullanılabilir olduğunu kanıtlamıştır.

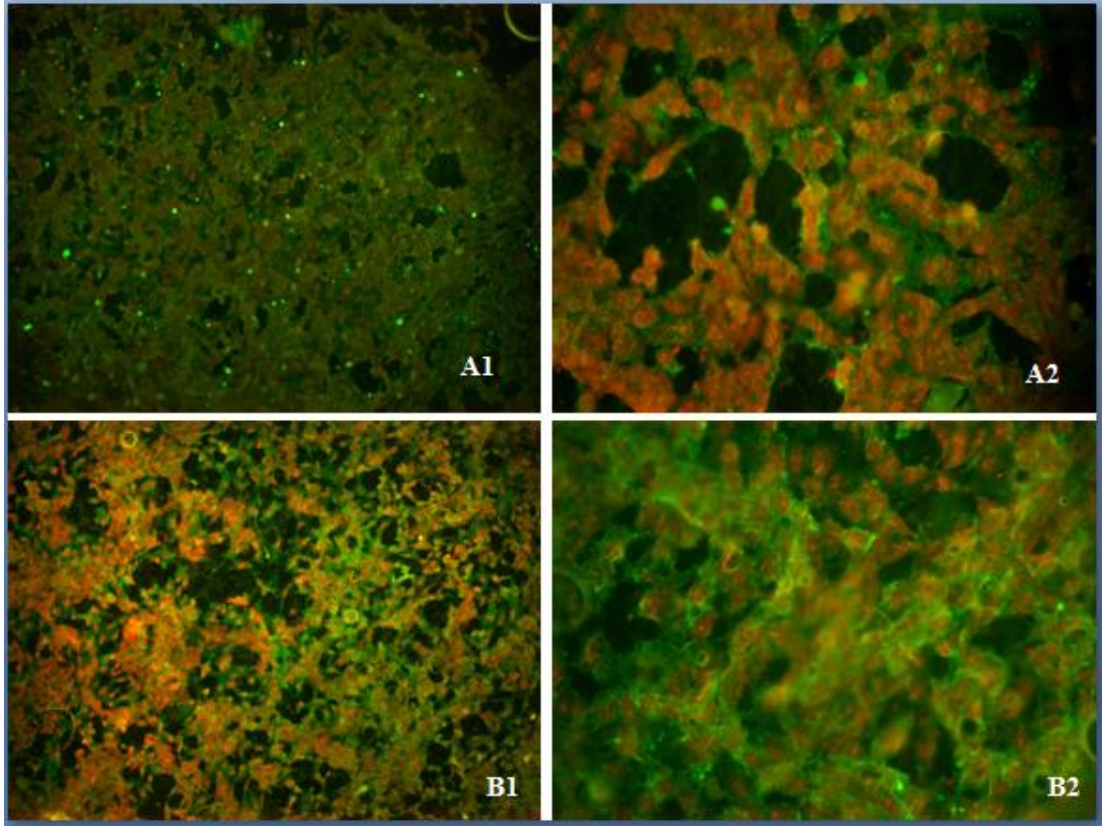
PLC/Kol/HA taşıyıcılar üzerinde, DMEM/F12 besiyerinde, 7 ve 14 günlük inkübasyonlar sonunda endotel hücreler anti-CD31 antikoru ile boyanıp floresan mikroskopta incelenmiş ve görüntülenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Endotel hücrelerin PLC/Kol/HA iskele üzerinde DMEM/F12 besiyerinde 7 ve 14 günlük inkübasyonu sonundaki görüntüleri (x400). A1 ve A2. 7 günlük inkübasyon; B1 ve B2. 14 günlük inkübasyon. Yeşil: CD 31, kırmızı: hücre çekirdekleri

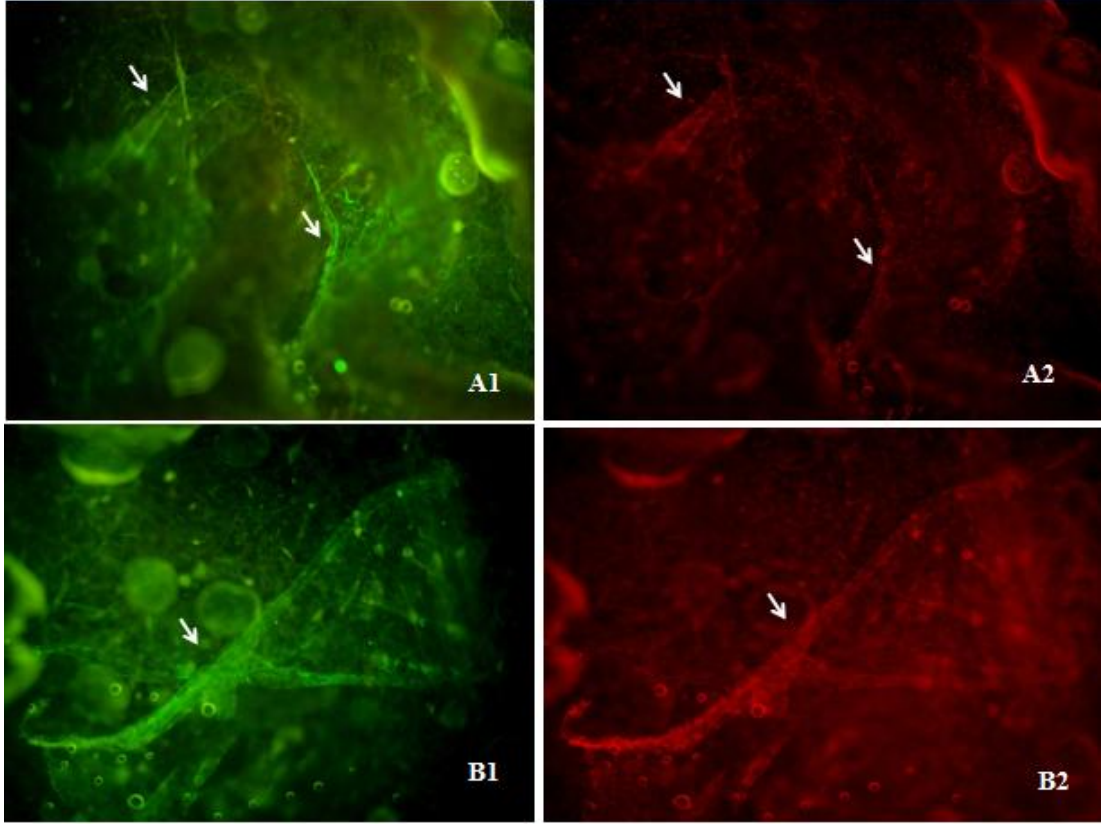
PLC/Kol/HA taşıyıcılar yapılarında ihtiva ettikleri kollajen nedeniyle otofloresan özellik göstermiş ancak üzerlerinde büyüyen endotel hücreler görüntülenebilmiştir. Endotel hücreler DMEM/F12 besiyeri kullanıldığında PLC/Kol/HA taşıyıcılara homojen olarak tutunmuş, hücreler yayılma gösterebilmiştir ki bu da yapıdaki kollajen sayesinde olmuştur. Endotel hücrelerin kılcal damar benzeri yapılar oluşturduğu görülmektedir (Şekil 3.20 B).

Endotel hücrelerin DMEM/F12+EGM-2 (1:1) besiyerinde, PLC taşıyıcılara tutunabildiği, 14 günlük inkübasyon sonunda kümelenmeler oluşturma eğiliminde olduğu fakat damar benzeri oluşumların var olmadığı Şekil 3.21’de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Endotel hücrelerin PLC iskele üzerinde DMEM/F12+EGM-2 (1:1) besiyerinde inkübasyonu sonundaki floresan mikroskobu görüntüleri A1. 7 günlük inkübasyon (x100), A2. 7 günlük inkübasyon (x400), B1. 14 günlük inkübasyon (x100), B2. 14 günlük inkübasyon (x400). Yeşil: CD31, kırmızı: hücre çekirdekleri

Endotel hücrelerin PLC/KoI/HA taşıyıcılar üzerinde DMEM/F12+EGM-2 besiyerinde damar oluşturma eğiliminde olduğu, damar benzeri yapıların oluştuğu Şekil 3.22’de gösterilmiştir.



Şekil 3.22. Endotel hücrelerin PLC/KoI/HA taşıyıcılar üzerinde DMEM/F12+EGM-2 besiyerinde 14 günlük inkübasyon sonunda oluşturdukları kılcal damarsı oluşumlar (x100), A1 ve B1. CD31, A2 ve B2. Hücre çekirdekleri

Literatürdeki benzer çalışmalarda poli-kaprolakton polimeri ile üretilmiş elektro-eğirilmiş fiber iskelelere ekilen endotel hücrelerin iskeleye tutunduğu, çoğaldığı ve etkileşim içerisinde olduğu gözlenmiştir [88]. Benzer farklı bir çalışmada elektro-eğirilmiş yarı sentetik bir iskele üzerine hem kas hücreleri hem de endotel hücreleri ekilerek, damar ağına sahip bir kas dokusu elde edilmeye çalışılmış ve her iki tür hücrenin de iskeleye tutunduğu ve çoğaldığı görülmüştür [89].

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunur, yumuşak doku iyileşmesinde yardımcı ya da açık yaralar için yama olarak kullanılabilecek bir malzeme üretmek amaçlanmıştır. İnsan göbek bağından izole edilen kollajenin ve hyaluronik asitin, poli L-laktid/kaprolakton kopolimeri (PLC) ve poli (L-laktid/DL-laktid) kopolimeri (PLDL) ile karışımları hazırlanmış ve elektro-eğirme yöntemi ile eğirilmiştir. Elektro-eğirilmiş iskelelere yapılan çapraz bağlanma işlemi sonrası PLDL ile hazırlanan iskelenin fonksiyonel olmadığı anlaşılmıştır. PCL/Kol/HA karışımından üretilen doku iskelesinin mekanik, termo-mekanik, ısı ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. PLC/Kol/HA karışımından üretilen iskelelere son olarak hücre kültürü yöntemi ile biyoyumluluk analizi yapılmıştır.

Karışım hazırlamada sentetik polimer olan PLC'nin miktarı elektro-eğirme işlemi için mümkün oldukça fazla miktarda kollajen içermesi önceliği temel alınarak, uygun bir yoğunluk yakalanacak miktarda kullanılmış ve bu miktar ölçülerek standart hazırlanmıştır. Burada amaç biyolojik içeriği olabildiğince fazla kullanmak ve aynı zamanda da sentetik polimer ile iskelenin mekanik özelliklerini istenilen seviyede tutmaktır.

PLC'nin kollajen ile yapılan karışımının biyoyumluluğu arttırması amaçlanmıştır. Ayrıca literatürde yalnızca kollajenin kullanılması durumunda elde edilen iskelelerin mekanik özelliklerinin bu karışıma göre yaklaşık 40 kat daha düşük olduğu görülmüştür [92,93]. Bu da kollajenin PLC ile harmanlanarak mekanik özelliklerinin istenilen değerlere yükseldiğinin bir göstergesidir.

Elektro-eğirilmiş iskelelere yapılan çekme testi sonucunda, kopma uzamasının ve modülünün yumuşak dokularda kullanılmaya uygun olduğu görülmüştür. İnsan vücudunda sürekli darbeye maruz kalan organ olan kalbin frekansının 1 ile 2 Hz arasında olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ışığında DMA analizinde 0 ile 9 frekansları aralığında, 37 °C'de tarama yapılmıştır. Kalbe bağlı arterin modülü 0,3 MPa, kalp kapakcığının modülü 0.19 MPa, vücudun değişik bölgelerindeki derinin modülü 1,6

MPa olarak bilinmektedir [89-91]. Analiz sonuçları, bilinen biyolojik dokuların modül değerleri göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır ve PLC/Kol/HA karışımından üretilen elektro-eğirilmiş doku iskelesinin biyolojik özdeşleri ile yakın mekanik özellikler gösterdiği saptanmıştır [89,90]. Üretilen elektro-eğirilmiş PLC/Kol/HA iskelenin vücut sıcaklığındaki su içerisinde yapılan çekme testi sonucu $0,89 \pm 0,10$ MPa ve DMA analizi sonucu elde edilen 1-2 Hz frekansları arasındaki kompleks modülünün 1,58 MPa olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, üretilen iskelenin ortalama bir yumuşak dokunun iyileşmesinde yama olarak kullanılmaya oldukça uygun mekanik özellikler taşıdığı sonucu çıkarılmıştır.

Çapraz bağlama işlemi doku iskelesinin biyoerozyon süresinin uzaması amacıyla yapılsa da bu işlemin hem mekanik özellikler hem de biyoerozyon açısından kayda değer olumlu sonuçlar doğurmadığından dolayı, PLC/Kol/HA iskelenin çapraz bağlanmasının gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Hyaluronik asitin molekül ağırlığının kollajene göre oldukça yüksek olmasına [94] ve doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmasına rağmen [95,96] hyaluronik asitin suda hızlıca çözünmesi ve biyoerozyon süresini gereğinden fazla kısaltmasının önüne geçmek amacıyla karışım içine kollajenle kıyaslandığında çok daha az bir miktarda karıştırılmıştır. Burada amaç, kollajen proteinine ek olarak iskelede biyolojik açıdan önem arz eden bir polisakkarit molekül kullanmaktır. Bunu seçerken de HA'e öncelik verilmesinin sebebi, dokularda yer alan bir polisakkarit olması ve kök hücre farklılaşmasında, dolayısıyla doku rejenerasyonunda olumlu etkisinin olmasıdır.

İdeal gözeneklilik oranları literatürde sıklıkla %60-90 olarak belirtilmektedir [84]. Gözeneklilik yumuşak doku iskelesi için en önemli özelliklerden biridir. İskelenin hücreler ile kaplanması çoğu zaman yeterli olmamaktadır ve hücrelerin iskelenin içlerindeki liflere de tutunarak tam bir doku özdeşi oluşturmaları gerekmektedir [85]. Hücrelerin bu liflerden oluşan yapının içlerine girebilmeleri için lifler arasında yeterli büyüklükteki gözeneklerin bulunması şarttır [86]. PLC/Kol/HA iskelede gözeneklilik oranı %52 olarak tespit edilmiştir. Bu oranların %60'ın altında değerlerde olmasının sebeplerinden biri liflerin nano/mikro yapıda olmasıdır. Bu durum gözeneklerin daha küçük boyutlarda olmasına sebep olmuştur fakat aynı zamanda birim alanda daha fazla gözenek oluşmasını da sağlamıştır. Daha fazla

gözenek bulunması, yüzey alanını arttırdığından dolayı, doku iskelesi hücre kültüründe biyorozyon ile birlikte kısa sürede gözenekliliğin artmasını sağlayacaktır. PLC/Kol/HA iskelelerin standart gözeneklilik oranının altında bir değerde olmasının dezavantajı, elektro-eğirilmiş olmasının getirdiği avantajla birlikte düşünüldüğünde ortadan kalkacaktır. Ayrıca bu iskelede elektroegirme sonucu polimer çözeltisinde kullanılan çözücülerden kaynaklanan yapının bütünlüğünü bozmayacak şekilde makro gözenekler oluşmuştur ki bu da hücre penetrasyonuna yardımcı olacaktır.

Su tutma kapasitesi doku iskelesine gerçek dokuya benzemesi yönünden ve çeşitli molekülleri (enzim, hormon, mineral vs.) bağlamasına yardımcı olması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca su tutma kapasitesinin yüksek olması hücre tutunmasını destekleyerek hücrenin doğal ortamına benzeyen bir çevrede olmasını sağlar, hücre bölünmesi ve de hücrenin bulunduğu ortamda daha az stresle mücadele etmesini sağlar [2]. Ayrıca su tutma kapasitesinin fazla olması iskelenin biyorozyon hızını artırarak, hücrelerin enzimatik biyorozyon sürecine katkıda bulunur [83]. Bu bilgilerin ışığında, üretilen iskelenin su tutma kapasitesinin %102,6 olması, onun bu yönüyle benzerlerine kıyaslandığında doku mühendisliği uygulamaları için kullanılabilecek potansiyel biyomalzemeler arasına sokmaktadır.

PLC/Kol/HA iskeleler üzerinde yapılan hücre kültürü deneylerinde iskelenin biyoyumlu olduğu gösterilmiştir. Elektroegirmede kullanılan ve organik bir çözücü olan HFIP'nin iskeleden tamamen uzaklaştığı da bu sayede kanıtlanmıştır. İskele üretiminde kullanılan PLC, kollajen ve HA polimerlerinin her birinin tek başına biyoyumlu olması, karışımdan elde edilen iskelenin de biyoyumlu olmasının en büyük sebebidir.

Damar oluşturma testi ile HUVEC'lerin damar ağı oluşturma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin endotel hücrelere özgü işaretleri göstermeleri, hücrelerin iskeleye tutunması ve damar oluşumuna benzer yapılar oluşturmaları ile iskelenin yumuşak doku mühendisliği materyali olarak kullanılabilecek özellikte olduğu kanıtlanmıştır.

İskelenin yönlendirilmiş fiberlerden oluşuyor olmasından dolayı özellikle kas doku mühendisliği çalışmalarında ön plana çıkarılabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmanın özellikle yönlenmiş yumuşak doku mühendisliği ile ilgili yeni fikirlere bir kaynak olması umulmaktadır. Bu alışma; yara örtüsü ve yaması olarak kullanılabilcek materyallerden yola çıkarak, karmaşık yapıda ve doğala özdeş bir doku iskelesi oluşturmanın günümüzde artık mümkün olabileceğinin bir kanıtıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Demirağ A., Ercan S., Küçükaksu S., Özmen M. M., Yapay Organlar, Editörler: Arslan Z., Tunca Z., *Yeni Ufuklara* 2,1. baskı, Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayınları, Ankara, 2005.
- [2] Vacanti C. A., The history of tissue engineering, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006, **10**(3), 569-57.
- [3] Lanza R., Langer R., Vacanti J. P., *History and scope of tissue engineering*, 4th ed., Academic Press, London, 2007.
- [4] Calvi L. M., Adams G. B., Weibrecht K. W., Weber J. M., Olson D. P., Knight M. C., Scadden D. T., Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche, *Nature*, 2003, **425**(6960), 841-846.
- [5] Freshney R. I., *Culture of specific cell types*, 1st ed., John Wiley and Sons, Inc., London, 2005.
- [6] Pachence J. M., Collagen-based devices for soft tissue repair, *Journal of biomedical materials research*, 1996, **33**(1), 35-40.
- [7] Angele P., Abke J., Kujat R., Faltermeier H., Schumann D., Nerlich M., Mueller R., Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices, *Biomaterials*, 2004, **25**(14), 2831-2841.
- [8] Sosnik A., Sefton M. V., Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for tissue engineering, *Biomaterials*, 2005, **26**(35), 7425-7435.
- [9] Akay M. T., *Genel histoloji*, 7. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008.
- [10] Marieb E. N., Hoehn K., *Human anatomy and physiology*, 1st ed., Pearson Education, London, 2007.
- [11] <http://greatcourse.cnu.edu.cn/xbfzswx/wlkc/kcxx/kcxx-4.htm> (Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2013).
- [12] Yalçın H., Özkalp B., Vücut hijyeninin önemi ve yara bakımında yeni gelişmeler, *IV. Ulusal Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi*, Karaman, Türkiye, 20-24 Nisan 2005.
- [13] Hajek M., Sedlarik K. M., Advantages of alginate bandages for coverage of extensive and poorly healing wounds, *Tissue Engineering*, 1992, **71**(3-4), 152-154.

- [14] Williams D. F., *Definitions in biomaterials; proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials*, 1st ed., Elsevier, New York, 1987.
- [15] Williams D. F., On the Mechanisms of Biocompatibility, *Biomaterials*, 2008, **29**(20), 2941-2953.
- [16] Coury A. J., Levy R. J., Ratner B. D., Schoen F. J., Williams D. F., Williams R. L., *Degradation of materials in the biological environment, biomaterials science an introduction to materials in medicine*, 2th ed., Elsevier, California, 2004.
- [17] Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*, 2th ed., Elsevier, California, 2004.
- [18] Akdemir Z. S., Doku mühendisliğine kullanılacak yeni polimerik malzemelerin geliştirilmesi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009, 256678.
- [19] Gümüşderelioğlu M., *Biyomalzemeler: Bilim ve Teknik*, TÜBİTAK, İstanbul, 2002.
- [20] Nair L. S., Laurencin C. T, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**(8), 762-798.
- [21] Watts D. R., Carr S. H., Hohf R. P., Poly (glycolic acid) sutures in canine vascular anastomoses, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1976, **10**(6), 867-877.
- [22] Jeong J. H., Park T. G., Novel polymer-DNA hybrid polymeric micelles composed of hydrophobic poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) and hydrophilic oligonucleotides, *Bioconjugate Chemistry*, 2001, **12**(6), 917-923.
- [23] Mikos A. G., Bao Y., Cima L. G., Ingber D. E., Vacanti J. P., Langer R., Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, **27**(2), 183-189.
- [24] Kulkarni R. K., Moore E. G., Hegyeli A. F., Leonard F., Biodegradable poly (lactic acid) polymers, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971, **5**(3), 169-181.
- [25] Gökçek E. I., Ortopedik implant ve protez tasarımı için biyomalzemenin mekanik özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 2006, 183369.
- [26] Maleki A., Kjoniksen A. L., Nystrom B., Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin, *Carbohydrate Research*, 2007, **343**(2), 328-340.

- [27] Gomes M. E., Godinho J. S., Tchalamov D., Cunha A. M., Reis R. L., Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties, *Materials Science and Engineering*, 2002, **20**(1), 19-26.
- [28] Fukuhira Y., Kitazono E., Hayashi T., Kaneko H., Tanaka M., Shimomura M., Sumi Y., Biodegradable honeycomb-patterned film composed of poly (lactic acid) and dioleoylphosphatidylethanolamine, *Biomaterials*, 2006, **27**(9), 1797-1802.
- [29] Kenar H., Köse G. T., Hasirci V., Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films, *Biomaterials*, 2006, **27**(6), 885-895.
- [30] Thomson R.C., Yaszemski M. J., Powers J. M., Mikos A. G., Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration, *Biomaterials*, 1998, **25**(7), 1279-1287.
- [31] Nikkola L., Sepala J., Harlin A., Ndreu A., Ashammakhi N., Electrospun multifunctional diclofenac sodium releasing nanoscaffold, *Nanoscience Nanotechnology*, 2006, **6**(9-10), 9-10.
- [32] Badami A. S., Kreke M. R., Thompson M. S., Riffle J. S., Goldstein A. S., Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates, *Biomaterials*, 2006, **27**(4), 596-606.
- [33] Ber S., Köse G. T., Hasirci V., Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study, *Biomaterials*, 2005, **26**(14), 1977-1986.
- [34] Zhang R., Ma P. X., Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, **52**(2), 430.
- [35] Rho K. S., Jeong L., Lee G., Seo B. M., Park Y. J., Hong S. D., Min B. M., Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*, 2006, **27**(8), 1452-1461.
- [36] Venugopal J., Ramakrishna S., Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration, *Tissue Engineering*, 2005, **11**(5-6), 847-854.
- [37] Reneker D. H., Chun I., Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, 1996, **7**(3), 216.
- [38] Kataphman W., *Electrospinning and potential applications*, 1st ed., The University of Akron, Ohio, 2004.
- [39] Lam H. L., *Electrospinning of single wall carbon nanotube reinforced aligned fibrils and yarns*, 1st ed., Drexel University, Philadelphia 2004.

- [40] Chun I., *Finer fibers spun by electrospinning process from polymer solutions and polymer melts in air and vacuum*, 1st. ed., UMI Dissertation Services, Ohio, 1995.
- [41] Yarin A. L., Koombhongse S. and Reneker D. H., Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers , *Journal of Applied Physics*, 2001, **90**(9), 4836-4846.
- [42] Formhals A., US Patent 1 975 504, 1934.
- [43] Desai K., *Electrospinning and phase characterization of polyaniline/poly methymethacrylate blends*, 1st. ed., University Of Massachusetts Lowell, Massachusetts, 2004.
- [44] Martin G. E., Cockshott I. D., U.S. Patent No: 4,043,331., DC: U.S. Patent and Trademark Office, Washington, 1977.
- [45] Bornat A., U.S. Patent No: 4,323,525., DC: U.S. Patent and Trademark Office, Washington, 1982.
- [46] Mohan A., *Formation and characterization of electrospun nonwoven webs*, 1st ed., The North Carolina State University, Raleigh, 2002.
- [47] Kozanoğlu G. S., Elektros�innig yöntemiyle nanolif üretim teknolojisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 222172.
- [48] <http://freeze-dryer.blogspot.com/> (Ziyaret tarihi: 15 Temmuz 2013).
- [49] <http://teknosem.com.tr/urun-detay.asp?UrunId=289&prn=235> (Ziyaret tarihi: 23 Temmuz 2013).
- [50] Saçak M., *Polimer Teknolojisi*, 1. baskı, Gazi Kitapevi, Ankara, 2005.
- [51] Dizdar Z., Poli(laktik asit) esaslı filmlerin ısı ve basınç yardımıyla kendine ve etilen vinil alkol kopolimerine yapışma davranışının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012, 301628.
- [52] Brundle C. R., Evans C. A., Wilson S., *Encyclopedia of Materials Characterization*, 1st ed., Reed Publishing, USA, 1992.
- [53] Yılmaz N. G., Karbon lif takviyeli termoplastik karmaların üretimi ve özelliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 8-12, Kocaeli, 2010, 238046.
- [54] Kemaloğlu Ş., Termal ara yüzey malzemesi olarak kullanılabilecek polimer/bor nitür mikro ve nano kompozitlerinin üretim teknolojilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 13-15, 259402, 2009.

- [55] <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm> (Ziyaret tarihi: 24 Temmuz 2013).
- [56] Bower D. I., *An Introduction to Polymer Physics*, 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- [57] Burches B. J., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley and Sons Inc., Chichester, 2005.
- [58] Cheremisinoff N. P., *Polymer characterization-laboratory techniques and analysis*, 1st ed., Noyes Publications, New Jersey, 1996.
- [59] <http://www.andersonmaterials.com/ftir.html> (Ziyaret tarihi: 24 Temmuz 2013).
- [60] http://www.polimernedir.com/polimer-fizigi/polimer-karakterizasyonu_dinamik-mekanik-analiz-dma/ (Ziyaret tarihi: 24 Temmuz 2013).
- [61] Instrument T. A., *Dynamic Mechanic Analysis (DMA)*, Theory and Aplication Training, USA, 2006.
- [62] Nairn J. A., *Polymer Characterization*, 1st ed., Materials Science and Engineering, USA, 2003.
- [63] <http://www.pslc.ws/macrog/dsc.htm> (Ziyaret tarihi: 29 Temmuz 2013).
- [64] <http://www.pslc.ws/macrog/dsc.htm> (Ziyaret tarihi: 29 Temmuz 2013).
- [65] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Coomassie> (Ziyaret tarihi: 29 Temmuz 2013).
- [66] http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis (Ziyaret tarihi: 29 Temmuz 2013).
- [67] http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/elektroforetik_yontemler.pdf (Ziyaret tarihi: 30 Temmuz 2013).
- [68] http://tr.wikipedia.org/wiki/H%C3%BCre_k%C3%BClt%C3%BCr%C3%BC (Ziyaret tarihi: 19 Ekim 2013).
- [69] Karakeçili A. G., Mikrodeseanlı biyoaktif malzemelerin dizaynı, karakterizasyonu ve doku mühendisliğindeki uygulamaları, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006, 182338.
- [70] <http://www.thphys.uni-heidelberg.de/~biophys/> (Ziyaret tarihi:18 Ekim 2013).
- [71] Wachem P. B., Beugeling T., Feijen J., Bantjes A., Detmers J. P., Aken W. G., Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials*, 1985, **6**(6), 403-408.
- [72] Cho K. Y., Chung T. W., Kim B. C., Kim M. K., Lee J. H., Wee W. R., Cho C. S., Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro, *International journal of pharmaceutics*, 2003, **260**(1), 83-91.

- [73] Weidner T., Breen N. F., Drobny G. P., Castner D. G., Amide or amine: Determining the origin of the 3300 cm⁻¹ NH mode in protein SFG spectra using 15N isotope labels, *The Journal of Physical Chemistry*, 2009, **113**(47), 15423-15426.
- [74] Rabotyagova O. S., Cebe P., Kaplan D. L., Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation, *Materials Science and Engineering*, 2008, **28**(8), 1420-1429.
- [75] Sionkowska A., *Effects of solar radiation on collagen-based biomaterials*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, London, 2006.
- [76] Kaminska A., Polymer Degradation and Stability, Biomaterial, 1996, **51**(19), 26,1996.
- [77] Payne K, Veis A., *Biopolymers.*, 1st ed., Elsevier, New York, 1988.
- [78] Muyonga J. H., Cole C. G. B., Duodu K. G., *Food Chemistry*, Elsevier, 2004.
- [79] Mann K., *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, Elsevier, New York, 1992.
- [80] Miyata T., Taira, T., Noishiki, Y., Collagen engineering for biomaterial use, *Clinical Materials*, 1992, **9**(3), 139-148.
- [81] Feinstein B., Lindegard B., Nyman E., Wohlfart G., Morphologic studies of motor units in normal human muscles, *Cells Tissues Organs*, 1955, **23**(2), 127-142.
- [82] Bergel D. H., The static elastic properties of the arterial wall, *The Journal of Physiology*, 1961, **156**, 445.
- [83] Nuttelman C. R, Henry S. M, Anseth K. S., Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds, *Biomat*, 2002, **23**, 3617-3626.
- [84] Chong E. J., Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution, *Acta Biomaterialia*, 2007, **3**, 321-330.
- [85] Li M., Mondrinos M. J., Gandhi M. R., Ko F. K., Weiss A. S., Lelkes P. I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, **26**(30), 5999-6008.
- [86] Gibson P., Schreuder Gibson H., Rivin D., Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2001, **187**, 469-481.
- [87] Wang P., Charlene A., Woodward K., Eric N., Poly (ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures, *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **64**, 290-297.

- [88] Ma Z., Grafting of gelatin on electrospun poly (caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation, *Tissue Engineering*, 2005, **11**, 7-8, 1149-1158.
- [89] Mo X., Electrospun Poly (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, *Biomaterials*, 2004, **25**(10), 1883-1890.
- [90] Cam S. F., Sekuri C., Sagcan A., Ercan E., Tengiz I., Alioglu E., Effect of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism in Turkish patients with premature coronary artery disease, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2008, **68**(8), 801-805.
- [91] Reihsner R., Balogh B., Menzel E. J., Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration, *Medical Engineering and Physics*, 1995, **17**(4), 304-313.
- [92] Kokini K., Sturgis J. E., Robinson J. P., Harbin S. L., *Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure*, 1st ed., Purdue University, West Lafayette, 2002.
- [93] Gildner C. D., Lerner A. L., Hocking D. C., Fibronectin matrix polymerization increases tensile strength of model tissue, *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2004, **287**(1), 46-53.
- [94] Kobayashi Y., A., Okamoto K., Nishinari K., Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights, *Biorheology*, 1994, **31**(3), 235.
- [95] Picart C., Lavalle P., Hubert P., Cuisinier F. J. G., Decher G., Schaaf, P., Voegel, J. C., Buildup mechanism for poly (L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface, *Langmuir*, 2001, **17**(23), 7414-7424.
- [96] Ohya S., Nakayama Y., Matsuda T., Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly (N-isopropylacrylamide) grafts, *Biomacromolecules*, 2001, **2**(3), 856-863.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

1. **Muratgul C.**, Kenar H., Hasirci V., Electrospinning and characterization of oriented semi-synthetic scaffolds for tissue engineering applications, *Biomedical Science and Technology Symposium*, Tokat, 10-13 September 2013
2. **Muratgul C.**, Kenar H., Doger E., Hasirci V., Electrospinning and characterization of oriented PLA/PCL (70.30)/ hyaluronic acid/collagen microfibrinous scaffolds for tissue engineering applications, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*, Istanbul, 17-20 June 2013.
3. Kenar H., **Muratgul C.**, Kose G., Kesemenli C., Karaoz E., Hasirci V., Microscopy techniques in muscle tissue engineering, *Microscopy Conference (MC)*, Jena/Germany, 25-30 August 2013.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İstanbul/Beyoğlu'nda doğdu. Lise eğitimini İzmit Lisesinde aldı ve 2005 yılında liseden mezun oldu. İzmit'te özel bir tiyatrodaki tiyatro ve müzik eğitimi aldı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. Üniversite okuduğu yıllarda aktif olarak KTÜ Fotoğraf ve Görsel Sanatlar Kulübünde bulundu ve 2011 yılında Üniversiteden mezun oldu. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Polimer Bilimi ve Teknolojisi Yüksek Lisans programında eğitime başladı ve halen devam etmektedir. 2011 Yılında Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, İşletme Bölüne başladı ve halen devam etmektedir.