POLİVİNİL ALKOL/KİTOSAN KRİYOJELLERİN BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE KAPLANMIŞ KOMPOZİTLERİNİN ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH GÜL

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

MERSİN
HAZİRAN-2018

POLİVİNİL ALKOL/KİTOSAN KRİYOJELLERİN BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE KAPLANMIŞ KOMPOZİTLERİNİN ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH GÜL

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE

MERSİN
HAZİRAN-2018

ONAY

Gülşah GÜL tarafından Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE danışmanlığında hazırlanan "Polivinil Alkol/Kitosan Kriyojellerin Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanmış Kompozitlerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 27.06.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE	.....
Üye	Doç. Dr. Gözde TANSUĞ	.....
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER	.....

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13/07/2018 tarih ve 2018/29/991 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Cahit BİLİM
Enstitü Müdürü

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

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLERATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University

27 Haziran 2018 / 27 June 2018

Gülşah GÜL

ÖZET

POLİVİNİL ALKOL/KİTOSAN KRİYOJELLERİN BİYOMİMETİK HİDROKSİAPATİT İLE KAPLANMIŞ KOMPOZİTLERİNİN ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Günümüzde, her yaştan yüzlerce insan, organ veya doku kaybından kaynaklanan kazalar veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle tedavi edilmektedir. Doku mühendisliği, tüm bu tedaviler için yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla doku ve organ fonksiyonlarını arttırmayı ve geri kazandırmayı amaçlayan bir bilim dalıdır. Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların donmuş çözeltilerinden üretilen açık hücre yapılı matrislerdir ve tipik olarak birbirine bağlı makro gözeneklerden oluşur. Kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturan kalsiyum fosfat esaslı hidroksiapait (HA), biyouyumluluğu nedeniyle yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılan biyoseramik bir malzemedir. Biyomimetik HA kaplama, insan vücudu sıcaklığı 37°C'de ve neredeyse insan kan plazmasına eşit iyon konsantrasyonuna sahip olan bir "Sentetik Vücut Sıvısı (SBF)" kullanılarak insan vücudu pH değeri 7.4'te biyomimetik koşullarda gerçekleştirilen benzersiz bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında, biyomimetik HA ile kaplanmış PVA/Kitosan kompozit kriyojeller kemik dokunun yenilenmesi için kullanılmak üzere üretilmiş ve karakterizasyonu sağlanmıştır. Çalışma sonucunda kitosan oranı ve kaplama süresi arttıkça kaplama veriminin arttığı gözlenmiştir. PVA/Kitosan oranının ve kaplama süresinin kaplanmış kriyojellerin özellikleri üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için şişme testi, gözeneklilik analizi, kaplama sonrası ağırlık artışı, in vitro degradasyon, FT-IR, SEM, EDXS ve XRD analizleri yapılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen gözenekli yapıya sahip, biyobozunur, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanım için üretilen biyomimetik HA kaplı PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gelecekte kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere potansiyel bir biyomalzeme olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kriyojel, PVA, Kitosan, Biyomimetik, HA, SBF

Danışman: Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE, Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOMIMETIC HYDROXYAPATITE COATED POLYVINYL ALCOHOL/CHITOSAN COMPOSITES

Nowadays, hundreds of people of all ages are treated due to accidents or various disabilities resulting from organ or tissue loss. Tissue engineering is a science that aims to increase and restore tissue and organ functions in order to improve quality of life for all these treatments. Cryogels are open cell structured matrices that are produced from frozen solutions of monomeric or polymeric initiators and they are typically composed of interconnected macropores. Hydroxyapatite, which forms the inorganic structure of bone tissue, is a calcium phosphate based bioceramic material used for the construction of various prostheses as artificial bone due to its biocompatibility, for the repair of defected bones, and for the coating of metallic biomaterials. Biomimetic hydroxyapatite coating is a unique method carried out in biomimetic conditions at 37°C, which is the human body temperature, and 7.4, which is the human body pH value, by using a "Synthetic Body Fluid (SBF)" which has almost equal ion concentration of human blood plasma. In this thesis study, PVA/Chitosan composite cryogels coated with biomimetic hydroxyapatite were produced to be used for the renewal of bone tissue, and characterization was achieved. It was observed that as the of chitosan ratio and coating duration increased, coating efficiency increased. The PVA/Chitosan ratio and coating duration were analyzed on the final properties of the coated cryogels. For characterization studiesswelling test, porosity analysis, weight increase after coating, in vitro degradation evaluation, FT-IR, SEM, EDXS and XRD analysis were performed.

As a result of the study, biomimetic hydroxyapatite coated PVA/Chitosan composite cryogels produced for use in biodegradable, bone tissue engineering applications with porous structures obtained are expected to be apotential biomaterials for use in future bone tissue engineering applications.

Keywords: Cryogel, PVA, Chitosan, Biomimetics, HA, SBF

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesinden yararlanma olanağı bulduğum, tez çalışmasının oluşmasında çok değerli katkılarda bulunan, güler yüzlü, her zaman yol gösterici çok değerli hocam Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen araştırma görevlisi Didem DEMİR ve Seda CEYLAN'a, aldığım derslerle yüksek lisans eğitiminde bana yol gösterici olan ve bilimsel açıdan yeni kazanımlar elde etmemi sağlayan bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Ayla ÖZER'e ve bölümdeki tüm hocalarıma, sevgilerini ve manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma, özellikle her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli arkadaşım Seda SABUNCU'ya

Çalışmamızın yürütülmesinde "2018-1-TP2-2733'' nolu proje ile maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca yanımda olan hiçbir zaman sevgisini eksik etmeyen bize annelik ve babalık yapan varlığına her zaman şükür ettiğim hayattaki en büyük destekçim canım anneme, birbirinden kıymetli canım kardeşlerim ve abime,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	4
2.1.1.Doku Mühendisliğinin Hedefi	4
2.1.2. Kemik Doku Mühendisliği	5
2.2. Doku Mühendisliği Ana Bileşenleri	6
2.2.1. Hücre	6
2.2.2. Doku İskelesi(Scaffold)	6
2.2.3. Biyosinyal Moleküller	7
2.3. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	7
2.3.1. Kriyojelasyon	7
2.4. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler	10
2.5. Polimerik Jeller(Hidrojel ve Kriyojel)	11
2.5.1. Hidrojel	11
2.5.2. Kriyojel	12
2.5.3.Kriyojellerin Hidrojellerden Farkları	12
2.6. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler	13
2.7. PVA	14
2.8. Kitosan	14
2.9. Çapraz Bağlanma	15
2.9.1. GA	16
2.10. Biyomimetik	17
2.10.1. Biyomimetik veya Biyomimikriye Doğadan Örnekler	17
2.11. Kemik	18
2.12. Hidroksiapatit (HA)	19
2.12.1.Kemik Dokusu ve HA'nın Kemik Dokusundaki Durumu	20
2.12.2. HA'nın Biyouyumluluğu	20
2.12.3. HA'nın Klinik Uygulamaları	20
2.13. Sentetik Vücut Sıvısı (SBF)	20
2.14. Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Yöntemi	21
2.15. Ülkelerin Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Alanında Yaptığı Çalışmaların Sayıları	22
2.16. Yıllara Göre Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Alanında Yapılan Çalışmalar	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kriyojel Üretiminde Kullanılan Materyaller	29
3.1.1.1. PVA	29
3.1.1.2. Kitosan	29
3.1.1.3. GA	29
3.1.1.4. Asetik asit	30
3.1.2. Sentetik Vücut Sıvısı Hazırlamada Kullanılan Materyaller	30

3.2. Yöntem 30
3.2.1. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerinin Üretilmesi 30
3.2.2. Sentetik Vücut Sıvısının Hazırlanması (Simulated Body Fluid, SBF) 31
3.2.3. PVA/Kitosan Kriyojellerin Sentetik Vücut Sıvısında (SBF) Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması 32
3.2.4. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Karakterizasyonu 32
3.2.4.1. FT-IR analizi 32
3.2.4.2. SEM analizi 33
3.2.4.3. EDXS analizi 33
3.2.4.4. XRD analizi 33
3.2.4.5. HA kaplama ile ağırlık artışının izlenmesi 33
3.2.4.6. Şişme çalışmaları 34
3.2.4.7. İn vitro degradasyon çalışmaları 34
3.2.4.8. Gözeneklilik çalışmaları 34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Özellikleri 36
4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları 36
4.1.2. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Üretilmesi, Biyomimetik HA ile Kaplanması ve Karakterizasyonu 43
4.1.2.1. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretilmesi ve karakterizasyonu 43
4.1.3. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin FT-IR analizi 44
4.1.4. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Şişme Davranışı 49
4.1.5. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Gözeneklilik Analizi 51
4.1.6. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin İn Vitro Degradasyonun İncelenmesi 53
4.1.7. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplanması Sonucu Ağırlık Artışının İzlenmesi 55
4.1.8. SEM Analizi 57
4.1.8.1. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplamadan önceki SEM görüntüleri 57
4.1.8.2. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplandıktan sonraki SEM görüntüleri 63
4.1.9. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplandıktan Sonraki EDXS Analizi 68
4.1.10. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplandıktan Sonraki XRD Analizi 71
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 74
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ 82

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri avantaj ve dezavantajları	9
Tablo 2.2. Hidrojellerin uygulama alanları	11
Tablo 2.3. Hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin karşılaştırılması	13
Tablo 2.4. Kriyojellerin üretimi için yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler ile kullanım alanları	13
Tablo 2.5. HA'nın mekanik özellikleri	19
Tablo 2.6. Biyomimetik HA kaplamayla ilgili yapılan çalışmalar	24
Tablo 3.1. 2xSBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	32
Tablo 4.1. Optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı koşullarda üretilen kriyojeller ve fiziksel özellikleri	37
Tablo 4.2. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki gözenek büyüklüklerinin ortalaması	63
Tablo 4.3. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplandıktan sonraki gözenek büyüklüklerinin ortalaması	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doku mühendisliği çalışma prensibi 4
Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi 5
Şekil 2.3. Kriyojelasyon yöntemi (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime 8
Şekil 2.4. Hidrojelin polimerik ağ yapısı 11
Şekil 2.5. Kriyojelin polimerik ağ yapısı 12
Şekil 2.6. PVA'nın kimyasal yapısı 14
Şekil 2.7. Kitinin kimyasal bağ yapısı 15
Şekil 2.8. Kitosanın kimyasal bağ yapısı 15
Şekil 2.9. Polimerin çapraz bağlanması sonucu oluşan yapı 15
Şekil 2.10. GA ($OHCCH_2CH_2CH_2CHO$) molekülünün kimyasal yapısı 16
Şekil 2.11. Kitosanın GA ile çapraz bağlanma reaksiyonu 16
Şekil 2.12. PVA'nın GA ile çapraz bağlanma reaksiyonu 17
Şekil 2.13. HA'nın yapısı 19
Şekil 2.14. Ülkelerin biyomimetik HA kaplama alanında yaptığı çalışmaların sayıları 22
Şekil 2.15. Yıllara göre biyomimetik HA kaplama alanında yapılan çalışmalar 23
Şekil 4.1. Optimizasyon çalışmaları kapsamında -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin şişme davranışı; A) Üretilen PVA/Kitosan kriyojelin başlangıçtaki hali, B) Bir kuvvet uyguladıktan sonraki hali, C) Uygulanan kuvvet arttırıldığında aldığı hal, D) Uygulanan kuvvet çekildiğinde aldığı hal 41
Şekil 4.2. %2 sabit polimer konsansantrasyonu %3 GA miktarı kullanılarak, -16°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüsü 42
Şekil 4.3. %2 sabit polimer konsansantrasyonu %3 GA miktarı kullanılarak, -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüsü 42
Şekil 4.4. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün süreyle HA ile kaplandıktan sonraki görüntüsü 43
Şekil 4.5. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün süreyle HA ile kaplandıktan sonraki görüntüsü 44
Şekil 4.6. Kitosan, PVA ve GA'nın kimyasal yapısı 44
Şekil 4.7. Çapraz bağlı kitosan 45
Şekil 4.8. Çapraz bağlı PVA 45
Şekil 4.9. (a) -16°C ve (b) -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki FT-IR spektrumu 46
Şekil 4.10. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün periyotlarda HA ile kaplandıktan sonraki FT-IR spektrumu. (a) 70:30, (b) 40:60 (c) 30:70, (d) 20:80, (e)10:90 47
Şekil 4.11. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA / Kitosan oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün periyotlarda HA ile kaplandıktan sonraki FT-IR spektrumu. (a) 70:30, (b) 40:60, (c) 30:70, (d) 20:80, (e) 10:90 48
Şekil 4.12. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışı 49
Şekil 4.13. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışı 50
Şekil 4.14. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği 52

Şekil 4.15. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği 52
Şekil 4.16. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerinin 3. gün sonunda ağırlık kaybı grafiği 54
Şekil 4.17. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 3. gün sonunda ağırlık kaybı grafiği 54
Şekil 4.18. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmasından sonra ağırlık artışı grafiği 56
Şekil 4.19. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmasından sonra ağırlık artışı grafiği 56
Şekil 4.20. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan A) x1000 B) x5000, 40:60 PVA/Kitosan C) x1000 D) x5000, 30:70 PVA/Kitosan E) x1000 F) x5000, 20:80 PVA/Kitosan G) x1000 H) x5000, 10:90 PVA/Kitosan I) x1000 İ) x5000, büyütmede SEM görüntüleri 59
Şekil 4.21. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan, A) x250 B) x1000, 40:60 PVA/Kitosan C) x2500 D) x1000, 30:70 PVA/Kitosan E) x250 F) x1000, 20:80 PVA/Kitosan G) x250 H) x1000, 10:90 PVA/Kitosan I) x250 İ) x1000, büyütmede SEM görüntüleri 61
Şekil 4.22. A) -16°C ve B) -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin kaplanmadan önceki x2500 büyütmede SEM görüntüsü 62
Şekil 4.23. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7 gün HA ile kaplama sonrası sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan, A) x5000 B) x20000, 40:60 PVA/Kitosan C) x5000 D) x20000, 30:70 PVA/Kitosan E) x5000 F) x20000, 20:80 PVA/Kitosan G) x5000 H) x20000, 10:90 PVA/Kitosan I) x5000 İ) x20000 büyütmede SEM görüntüleri 65
Şekil 4.24. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7 gün HA ile kaplama sonrası sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan, A) x5000 B) x20000, 40:60 PVA/Kitosan C) x5000 D) x20000, 30:70 PVA/Kitosan E) x5000 F) 20000, 20:80 PVA/Kitosan G) x5000 H) x20000, 10:90 PVA/Kitosan I) x5000 İ) x20000 büyütmede SEM görüntüleri 67
Şekil 4.25. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin 7. gün kaplama sonrası EDXS analizi 69
Şekil 4.26. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ,10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrasında EDXS analizi sonucu elde edilen iyon yüzdeleri 69
Şekil 4.27. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ,10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrasında EDXS analizi sonucu elde edilen iyon yüzdeleri 70
Şekil 4.28. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrası XRD analizi. 71
Şekil 4.29. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrası XRD analizi 72

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
PVA	PVA
CS	Kitosan
GA	Glutaraldehit
HA/HAp	Hidroksiapatit
ECM	Hücre dışı matris
SBF	Sentetik vücut sıvısı
m-SBF	Modifiye edilmiş sentetik vücut sıvısı
TRIS	Tris-hidroksimetil-aminometan
tas-SBF	27 mm HCO_3-TRIS-HCI tamponlu SBF
Sa	Yüzey pürüzlülüğü
Ti	Titanyum
CPTi	Saf titanyum
CaP	Kalsiyum fosfat
OCP	Oktakalsiyum fosfat
PLLA	Poli (L-laktik asit)
PLGA	Poli laktik-co-Glikolik Asit
Ti6Al4V ve Ta	Titanyum alaşımı ve gözenekli tantal
nHCP	NanoHA kitosan-pektin
CG	Kitosan-jelatin
BCA	Homojen kemik benzeri bir karbonatlı apatit
KOL-I	Tip I kollajen
TCP	Trikalsiyum fosfat
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometre
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
EDXS	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
XRD	X-ışını toz difraksiyonu

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği yaklaşımı mühendislik, tıp ve biyoloji prensiplerini kullanarak hücrelerin, doku iskelelerinin ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanımıyla doku onarımını ya da yenilenmesini sağlamaktadır [1].

Doku ve organ kayıpları çok sık karşılaşılan tedavisi pahalı bir problem olarak karşımıza çıkar. Kaza sonucu yaralanmalar başta olmak üzere çeşitli hastalıklar nedeniyle kemik kayıpları meydana gelmektedir. Kemik dokusu vücudun önemli bir parçasıdır. Kemikler, iç organları darbelere karşı korur, vücudun ağırlık taşıma kapasitesini belirler. Bunun gibi birçok önemli özelliğinden dolayı vücutta oluşan kemik hasarının giderilmesi çok önemlidir [2].

Hasarlı kemik dokunun onarımı için doku mühendisliği önemli bir alternatiftir. Kemik dokusu kendi kendini yeniler, fakat kayıp fazla ise çevredeki yumuşak dokular bu bölgeye göç ederek sağlıklı kemik dokunun oluşumunu engeller. Yumuşak doku çok çabuk, birkaç hafta gibi bir sürede yenilenebilirken, sert doku birkaç ay ya da bir yıl gibi uzun bir zaman periyodunda yenilenir. Bu süre içinde ise hasarlı doku korunmalıdır. Burada doku içindeki boşlukları doldurabilmek için doğal ya da sentetik polimerler kullanarak hazırlanmış gözenekli, biyouyumlu, biyobozunur doku iskeleleri kullanılmaktadır [2].

İdeal doku iskelesi yüksek gözenekli yapıda, biyouyumlu, biyobozunur, yüzey özellikleri hücre yapışması ve çoğalmasına uygun olmalıdır. Bu özellikler seçilen malzeme ya da kullanılan yönteme göre farklılık gösterebilir.

Doku iskelesi, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde gerekli desteği sağlayan biyomalzeme olarak tanımlanmaktadır. Doku iskeleleri doğal polimerler (kollajen, kitosan, jelatin vb.) ya da sentetik polimerlerden PVA, polistren, poliakrilamit, polietilen vb.) üretilebilirler. Doğal polimerler doğal hücresel çevreyi yakın olarak taklit edebilir, sentetik polimerlerin ise malzeme özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır [3,4].

PVA, hidrofilik, biyobozunur ve biyouyumlu geniş bir biyomedikal alanda kullanılan sentetik bir polimerdir. Son zamanlarda PVA hidrojeller özellikle doku mühendisliği alanında onarım ve yenileme için oldukça ilgi çekici malzemeler olarak görülmektedir [5,6].

Bunun yanında kitosan, biyouyumlu, biyobozunur olma, toksik olmama, hücre tutunması ve çoğalmasına olanak sağlama, antimikrobiyal etkinlik ve yaraların hızlı iyileşmesine katkı sağlama gibi özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen doğal bir polimerdir [7].

Doku iskesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler jel yapısında da oluşturulabilmektedir. Polimerik jelleri hidrojel ve kriyojel olarak iki ayrı başlık altında inceleyebiliriz [8].

Hidrojeller, çapraz bağlı hidrofilik homopolimerlerin ya da kopolimerlerin su ile şişebilen üç boyutlu ağ yapılı bileşikleridir. Günümüzde, hidrojeller, eczacılık, tıp, veterinerlik, ziraat, biyomühendislik, inşaat ve tekstil sektörlerinde; ilaç salımı, çocuk bezi, moleküler elek, kontak lens, yapay organ, nem tutucu olarak kullanılmaktadır. Kriyojeller ise, yarı donmuş sulu ortamda sentezlenen, heterojen açık gözenek yapısına sahip yapılar olup, yüksek mekanik dayanım ve elastikiyet özellik gösterirler. Bununla birlikte, kriyojellerin geniş gözenekli yapıları sebebiyle adsorpsiyon kapasiteleri düşüktür. Hidrojeller şişmiş halde iken yumuşak ve kırılgan olduklarından yüksek oranda şişmiş hidrojellerin mekanik dayanımları düşüktür. Kriyojeller ise hidrojellere göre çok daha dayanıklıdır. Kriyojeller, mikro yapılarında herhangi bir çatlak oluşmadan sıkıştırılabilirler. Bu özellik, yüksek oranda çapraz bağlanma ve kalın gözenek duvarlı şebeke yapısından kaynaklanır. Bu sebeple, kriyojel yapısı, hidrojel yapıya kıyasla biçim değiştirmeye karşı daha dirençlidir [9]. Kriyojeller ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları nedeniyle biyolojik uygulamalarda önem kazanmıştır. Bu yüzden biyosensör uygulamaları, ilaç salım sistemleri tasarımı, moleküler baskılama teknikleri gibi birçok uygulamada kullanılmıştır. Son yıllarda doku iskelesi üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır [10].

Kriyojelasyon, son yıllarda doku iskelesi üretiminde kullanılmaya başlanan birbiri ile bağlantılı gözeneklere sahip ve mekanik olarak stabilitesi yüksek doku iskelesi üretim tekniklerinden biri haline gelmiştir. Kriyojelasyon yönteminde, ilk olarak polimer ve monomer öncüler, çapraz bağlayıcı ve diğer istenen katkılar uygun çözücüde çözülür (veya dağıtılır) ve şekil verilecek kalıba (kaba) konulur. İkinci adımda negatif sıcaklıklarda polimerizasyon ve/veya çapraz bağlanma sağlanır ve son olarak ise kriyojeller oda sıcaklığına getirilir. Eriyen, donmuş çözücü arkasında izini (gözenekleri) bırakarak sıvı haline gelir, oluşan kriyojelin gözeneklerini oluşturur [11].

Gerek biyomimetik, gerekse biyomimikri doğadaki modelleri inceleyen, sonra da bu tasarımları taklit ederek veya bunlardan ilham alarak insanların problemlerine çözüm getirmeyi amaçlayan yeni bir bilim dalıdır [12].

Kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturan kalsiyum fosfat esaslı HA, tıp ve dişçilikte kullanılan bir biyoseramik malzeme olup, biyouyumluluğu nedeniyle yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılmaktadır. HA'nın en önemli özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu önde gelir. HA, sert dokularla direk kimyasal bağ kurar. HA partiküllerinin ya da gözenekli blokların kemiğe yerleştirilmesinde yeni doku, 4–8 haftada şekillenir. Ayrıca, HA'nın lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik proteinlerine karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğilimi olduğu saptanmıştır. HA non-toksik (zehir etkisi olmayan) özelliklere sahip olması sayesinde meydana gelebilecek vücut reaksiyonları da minimumdur [13].

Biyomimetik HA kaplama işlemi için, insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonunu taklit eden sentetik vücut sıvısı hazırlanarak polimer yüzeyleri kemik dokusuna benzer şekilde kaplanabilmekte ve biyoaktivite kazanabilmektedir. Hazırlanan bu sıvılar sayesinde kaplanmış malzemeler hem içerik olarak hem de mikro yapı olarak biyolojik sistemde (kemikte) yer alan inorganik fazı taklit etmekte ve kemik hücresi tutunmasını artırmaktadır [14].

Bu tez çalışması kapsamında, kriyojel oluşturma kavramından yararlanarak kemik doku mühendisliği için yeni doku iskelelerinin hazırlanması hedeflenmektedir. PVA, hidrofilik, biyobozunur ve biyouyumlu sentetik bir polimer olması gibi özellikleri göz önüne alınarak ilk polimer sistemi olarak, kitosan ise, antijenik yapıda olmaması, biyobozunur olması ve canlı vücudu tarafından tamamıyla emilen zararsız ürünler (amino şekerler) halinde parçalanması, toksik olmaması, yüksek biyouyumluluğu, adsorpsiyon özellikleri ve çeşitli tekniklerle proses edilebilmesi sebebiyle üretilecek kompozit doku iskelesinin ikinci bileşeni olarak seçilmiştir. İdeal bir doku iskelesinin taşıması gereken gözeneklilik, biyobozunurluk, mekanik özellikler açısından konak dokuya benzerlik gibi özelliklerinin geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve değiştirilmesi amacı ile bu çalışma kapsamında PVA/Kitosan kompozit kriyojeller farklı oranlarda üretilmiş ve HA ile kaplanmıştır.

Tez çalışmasının temel amacı, kemik doku yenilenmesini destekleyecek özelliklere sahip biyomimetik HA ile kaplanmış PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretilerek, karakterizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak kriyojelasyon yöntemi ile çapraz bağlayıcı kullanılarak, farklı oranlarda ve iki farklı kriyojelasyon sıcaklıklarında (-16°C ve -8°C) PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretilmiştir. Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonunu taklit eden sentetik vücut sıvısına farklı zaman periyotlarında (1, 3, ve 7 gün) daldırılarak hidroksiapatit (HA) ile kaplanması ve biyoaktivite kazanması sağlanmıştır.

Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında; şişme testi, gözeneklilik analizi, kaplama sonrası ağırlık artışının belirlenmesi, in vitro degradasyon, FT-IR, SEM, EDXS ve XRD analizleri yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm bulgular ışığında, biyoaktivite kazanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin kemik doku mühendisliğindeki doku kayıplarında, hasar gören bölgeye yerleştirilerek çatlak ve kırık kemiklerin onarımı için uygun bir biyomalzeme olması beklenmektedir.

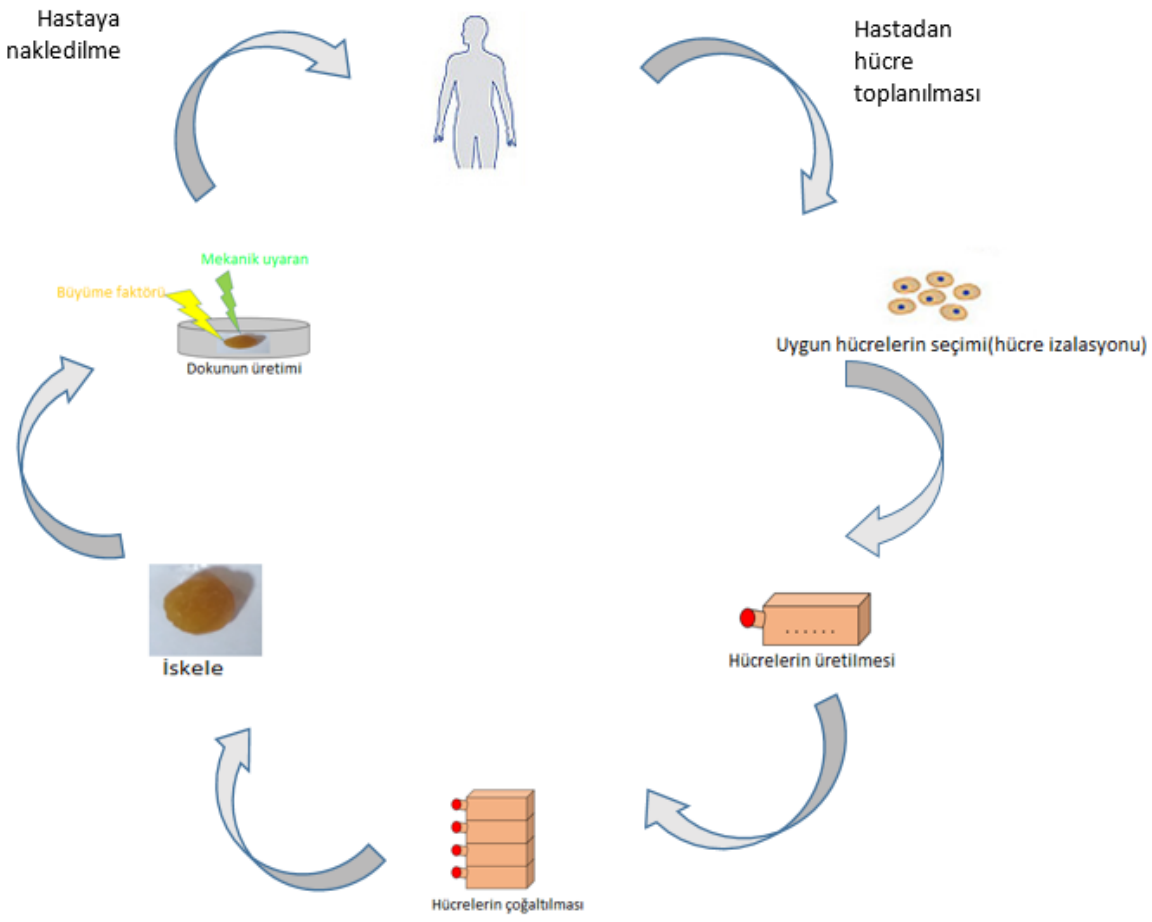
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği hasar görmüş doku ve organların fonksiyonlarının desteklenmesi, geliştirilmesi veya yeniden yapılandırılması için tıp, mühendislik ve biyoloji bilimleri çalışmalarının bir arada yürütüldüğü disiplinler arası bir alandır [15].

2.1.1. Doku Mühendisliğinin Hedefi

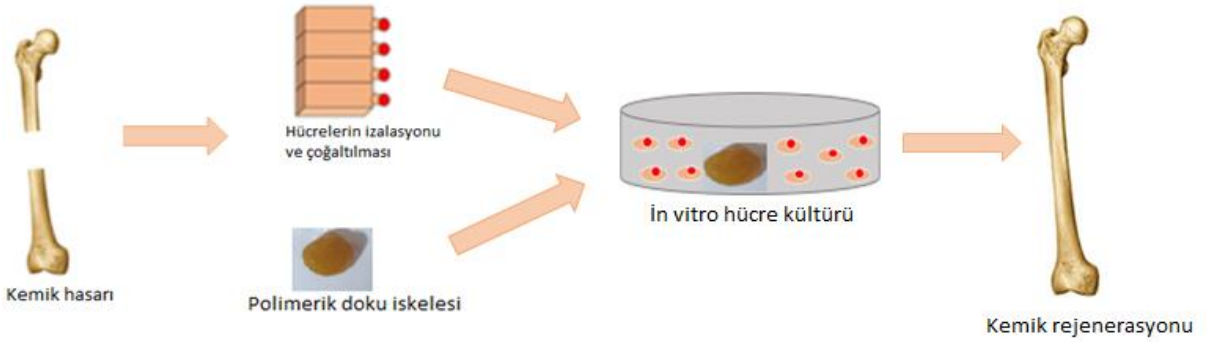
Doku mühendisliğinin hedefi hücre, doku iskelesi ve biyosinyal moleküllerini bir araya getirerek hasarlı dokuların tamir edilmesidir. Bu hedefe ulaşmak için Şekil 2.1'de gösterildiği gibi hastadan hücreler toplanır, çoğaltılır, üretilecek doku için hazırlanmış iskele yapının içine yerleştirdikten sonra dokuya uygun büyüme faktörleri, kimyasal ve mekanik uyaranlarla istenilen doku oluşuncaya kadar büyütülür [1].



Şekil 2.1. Doku mühendisliği çalışma prensibi [1].

2.1.2. Kemik Doku Mühendisliği

Tümörler, hastalıklar, enfeksiyonlar, travma, biyokimyasal bozukluklar ve normal olmayan iskelet gelişimi sonucu oluşan kemik hasarları önemli sağlık problemidir. Ayrıca kemik kanserleri nedeniyle oluşan tümörlerin cerrahi işlemle çıkarılmasıyla, kemiğin yenilenebilmesi için iskelet devamlılığının ve mekanik desteğin sağlanması gereken kritik büyüklükte hasarlar meydana gelebilir [16]. Kemik kendi kendine iyileşme ve yara dokusu oluşmadan yenilenebilme kapasitesine sahip bir doku olmasına rağmen, bu gibi büyük hasarların onarımında yetersiz kalabilmektedir [17]. Şekil 2.2'de kemik hasarında kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi [18].

Kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan malzemeler, kemik greftleri, seramikler ya da sentetik polimerlerdir. Kemik greftleri hastanın kendisinden (otogreft), başka bir vericiden (allogreft) ya da farklı bir türden (zenogreft) elde edilebilir [19]. Günümüzde kemik onarımı için, "altın standard'' hasarlı bölgeye otolog kemik naklidir [20]. Ancak bu işlem sırasında hastaya ikinci bir cerrahi işlem yapılmasına ihtiyaç duyulması ve hasarlı alanın büyüklüğü nedeniyle yeterli greftin alınamaması bu yöntemin önemli kısıtlamalarındandır. Patojenlerin taşınması ya da bağışıklık sistemi aktivasyonu gibi yan etkilerine karşın, allogreftler ve zenogreftler osteoindüktif özelliklerinden dolayı otogreftlere alternatif olarak tercih edilmektedir [19]. Tüm bu uygulamaların dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla tasarlanan kemik doku mühendisliği yaklaşımlarında, kemik hasarlarının onarılması ya da hasarlı dokunun yeniden yapılanması için doku iskeleleri (scaffold), hücreler ve büyüme faktörleri tek başlarına ya da bir arada kullanılmaktadır [21]. Şekil 2.2'de kemik doku mühendisliği yaklaşımında hücre dışı matrisi taklit ederek, kemik dokusunu üretmek amacıyla çok çeşitli doku iskeleleri geliştirilmiştir [20]. Hastanın kendisinden veya uygun bir kaynaktan alınan sağlıklı kemik hücreleri in vitro koşullarda çoğaltıldıktan sonra doku iskelelerine

ekilmekte ve doku oluşumu gerçekleşmektedir. Eş zamanlı olarak da biyobozunur özellikteki doku iskelesi bozunarak yerini gerçek dokuya bırakmaktadır. Elde edilen doku hasarlı bölgeye implante edilerek süreç tamamlanmaktadır.

2.2. Doku Mühendisliği Ana Bileşenleri

- Hücre
- Doku İskesi (scaffold)
- Biyosinyal moleküller

2.2.1. Hücre

Doku mühendisliği uygulamalarının temelini oluşturmaktadır. Uygun dokudan izole edilen hücre, özellikleri belirlendikten sonra yeterli sayı ve kalitede hedef organa enjekte edilmektedir.

Kaynaklarına göre hücreleri sınıflandırmak gerekirse;

- **Otolog hücreler;** Canlının kendisinden alınan hücrelerdir.
- **Allojenik hücreler;** Farklı bir insandan alınan hücreler
- **Zenojenik hücreler;** Farklı bir canlı türünden alınan hücrelerdir.

En iyi yaklaşım ise hastanın sağlıklı bölgesinden alınan hücrelerin (otolog hücre) vücut dışında hazırlanan hücre kültüründe çoğaltılarak hastaya nakledilmesidir [22].

2.2.2. Doku İskelesi (Scaffold)

İnsan vücudu sistemlerden, sistemler organlardan, organlar dokulardan, dokular ise hücreler ve hücre dışı matristen (ECM) oluşmaktadır. Hücre dışı matris (ECM) hücrelere fiziksel bir destek sağlamasının yanı sıra hücre-hücre etkileşimlerini organize etmekte ve hücrelerin yapışması, göçü, çoğalması, farklılaşması ve matris birikimi için çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarıları yapmaktadır. Doku iskeleleri ECM'yi taklit edecek biçimde tasarlanan yapılardır. Kısacası, yapay bir **"hücre dışı matris"** olarak düşünülebilir [23].

Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi çok önem arz etmektedir. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemede olması gereken başlıca özellikler şunlardır:

- Malzeme biyouyumlu olmalıdır, yani vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalıdır.
- Hücre yapışmasını ve işlevini artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalıdır.

- Hücreler yeni ECM oluşturacak kapasiteye ulaştıklarında iskeleye ihtiyaç kalmayacağından, doku iskelesinin vücut ortamında parçalanabilen bir malzemeden (biyobozunur madde) üretilmesi gerekmektedir.
- Malzeme parçalanırken biyouyumluluğunu kaybetmemeli ve zehirli ürünler oluşturmamalıdır.
- Ayrıca, hücrelerin ve besinlerin geçişini sağlayacak şekilde yüksek gözeneklilik oranına ve uygun gözenek büyüklüğüne sahip olmalıdır [3].

2.2.3. Biyosinyal Moleküller

Biyosinyal moleküller (hormonlar, büyüme faktörleri vb.) doku oluşumu süresince çeşitli hücresel işlevleri desteklemek amacıyla kullanılır [22].

2.3. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelesi tasarımı ve üretimi en önemli aşamalardan biridir. Doku iskelesi tasarımında gözenek yapısı, büyüklüğü ve gözeneklerin birbirleriyle yüksek oranda bağlantılı olması oluşan yeni dokuda damarlaşmanın sağlanması bakımından özel bir önem taşımaktadır. Bu gözenekler sayesinde doku iskelesi üzerinde büyütülen veya implantasyondan sonra çevre dokulardan buraya göç eden hücrelerin oksijen ve besin ihtiyaçları karşılanırken, aynı zamanda hücre atıkları da ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılır. Bu nedenle doku iskelesi üretim metotları başta gözeneklilik olmak üzere bir doku iskelesinin sahip olması gereken karakteristik özellikleri kazandırabilmelidir [2].

Seramikler ve metaller, işlenmesi ve şekil verilmesi zor malzemeler olduğundan ancak yüksek sıcaklıklarda işlenerek, belirli geometrilerde doku iskelesi üretimi yapılabilmektedir. Polimerler ise kolay işlenebilir malzemelerdir. Bu nedenle polimerik doku iskelelerinin fabrikasyonuna yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler **geleneksel yöntemler** ve **hızlı prototipleme yöntemleri** olarak iki grupta incelenmektedir. Geleneksel yöntemlerle üretilen doku iskelelerinde gözenek büyüklüğünün kontrolü ve gözeneklilik dağılımı, istenilen iskele geometrisinin oluşturulması açısından yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle üç boyutlu doku iskelesi üretimi için bilgisayar destekli tasarım teknikleri (hızlı prototipleme) geliştirilmiştir.

2.3.1. Kriyojelasyon

Kriyojel üretmek için kullanılan yönteme kriyojelasyon (karyotropik jelasyon) adı verilmektedir. Kriyojelasyon yönteminde, kriyojeller genellikle -5°C ile -20°C arasındaki

sıcaklıklarda hazırlanır. Jel öncüllerini içeren çözelti (monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar) dondurulur. Reaksiyon karışımı donarken, karışım iki ana bölümden oluşur; buz kristalleri ve buz kristalleri arasında dondurulmamış bir sıvı mikrofaz. Kimyasal reaksiyon bu donmamış sıvı mikrofazda gerçekleşir. Buz kristalleri, donma sırasında büyümeye devam eder ve birbirine bağlı buz kristallerinin tam bir donmuş formu oluşana kadar diğer kristallerle birleşirler. Jelleşme işleminin sonunda, kriyojel oda sıcaklığına getirilir. Buz kristallerinin çözülmesiyle birlikte sürekli birbirine bağlı makro gözenekli polimer ağı içeren bir matris elde edilir. Kriyojelasyon yönteminin şematik sunumu Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Buz kristallerinin şekli ve büyüklüğü, oluşan gözeneklerin şeklini ve büyüklüğünü belirler [24].

Şekil 2.3. Kriyojelasyon yöntemi (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime [24].

Tablo 2.1'de sıklıkla tercih edilen doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir [25,26].

Tablo 2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri avantaj ve dezavantajları [18].

Üretim Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Geleneksel yöntemler		
Elektroeğirme	Düşük, ayarlanabilir şekilli, büyüklük ve mekanik özelliğin iyi olması çok çeşitli polimer kullanabilme imkanı ve düzenlenmiş nanofiber üretiminin olması.	Organik çözücülerin kullanılması, üç boyutlu yapıların üretiminde elverişsiz olması.
Fiber Bağlama	Kolay işlenebilme özelliği, yüksek gözeneklilik ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı sahip olması.	Amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı, düşük mekanik dayanım ve çözücü uzaklaştırma probleminin olması.
Faz Ayırım	Biyoaktif ajanlarla etkileşime uygun olması yüksek gözenekli yapı, ayarlanabilir şekil büyüklük ve iyi bir mekanik özelliğe sahip olması.	Mikro yapının kontrolünde yetersiz olması, düşük üretim verimi, farklı büyüklüklerde gözenek elde etmek için elverişsizlik ve çözücü uzaklaştırma probleminin yaşanması.
Çözücü Döküm/Parçacık Uzaklaştırma	Farklı büyüklüklerde gözenek çapı, yüksek gözeneklilik ve kristalinitenin ayarlanabilir olması.	Düşük mekanik özellik, porojen ve çözücülerin yeterince uzaklaşamaması, membran kalınlığının sınırlı olması.
Membran Laminasyonu	Makro yapının kontrolü, gözeneklilik ve gözenek büyüklüğünün bağımsız kontrollü olması.	Düşük mekanik özellik, çözücünün uzaklaş tırılamaması, üretim süresinin uzunluğu, gözenekler arası zayıf bağlantı olması.
Eriyik kalıplama	Makro yapının kontrolü, gözeneklilik ve gözenek büyüklüğünün bağımsız kontrollü olması.	Amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı, porojenin uzaklaştırılamaması.
Hızlı prototipleme yöntemleri		
Üç boyutlu baskı tekniği (3DP)	Yüksek gözeneklilik, gözenek çapı: 45-100 μm, kolay işleme özelliği, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, gözenekler arası yüksek bağlantı ve farklı polimerleri işleyebilme özelliklerine sahip olması.	Toksik organik çözücülerin kullanımı, küçük gözenek çapı ve zayıf mekanik dayanım.

Tablo 2.1. Devamı

Eriterek birikim modellemesi (FDM)	Yüksek gözeneklilik, gözenek çapı: 250-1000 μm, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, gözenekler arası yüksek bağlantı, çözücü kullanımı gerektirmemesi, gözeneklilik ve gözenek büyüklüğünün bağımsız kontrollü olması.	Yüksek işleme sıcaklığı, sınırlı sayıda polimer için uygun olması, farklı yönlerde gözenek oluşturmanın kısıtlı olması ve farklı geometrilerde üretim zorluğunun yaşanması.
Lazerle Kalıplama (SLS)	Yüksek gözeneklilik, gözenek çapı: 45-100 μm, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması, gözenekler arası yüksek bağlantılı olması, çözücü kullanımı gerektirmemesi, farklı polimerler işleyebilme özelliği, gözeneklilik ve gözenek büyüklüğünün bağımsız kontrollü olması.	Yüksek işleme sıcaklığı ve küçük gözenek çapı.

2.4. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzemeler; İnsan vücudunda ki hasta, hasarlı ya da eksik dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik yöntemlerle elde edilmiş malzemeler olarak tanımlanmaktadır.

Malzeme seçimi, doku mühendisliğinde çok önemli bir kriterdir. Seçilen malzemeden istenilen olumlu sonuç malzemenin biyouyumluluk, biyobozunurluk gibi özelliklerinin iyi olmasıyla elde edilir. Çünkü seçilen malzeme biyouyumlu olursa kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmaz ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb.) meydana getirmez.

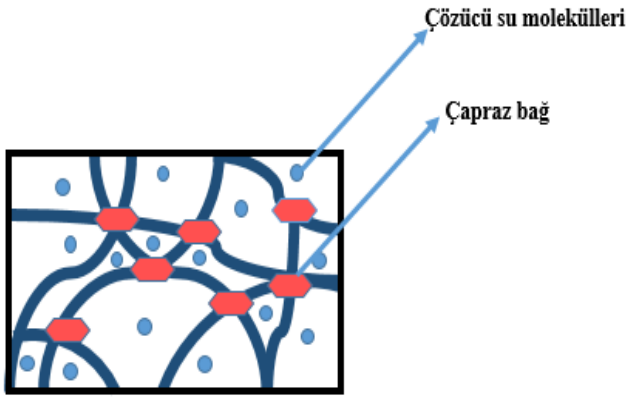
Doku iskelesi üretiminde kullanılan malzemeler; Metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler olarak sınıflandırılmaktadır. Fakat kolay işlenebilme, kullanım alanlarına yönelik çok değişik formlarda (lif, film, jel) hazırlanabilmeleri ve doğal dokulara benzerlikleri nedeniyle polimerler biyomalzeme olarak doku mühendisliği uygulamalarında en çok kullanılan malzeme çeşidi olmuştur [4].

2.5. Polimerik Jeller (Hidrojel ve Kriyojel)

Doku iskesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler farklı yapılarda oluşturulabildiği gibi (lif, film vb.) jel yapısında da oluşturulabilmektedir. Polimerik jelleri **hidrojel** ve **kriyojel** olarak iki ayrı başlık altında inceleyebiliriz [27].

2.5.1. Hidrojel

Hidrojeller, üç boyutlu ağlarında büyük miktarlarda su tutabilen hidrofilik yapıya sahiptir. Su sever olmaları nedeniyle "hidrofil polimerler" olarak da adlandırılırlar. Hidrojeller, son yıllarda geniş uygulama alanlarına sahip olmasından dolayı büyük ilgi görmüştür. Ayrıca, yapılarında büyük miktarda su tutabilme, yumuşak ve esnek yapıda olmalarından dolayı doğal dokuya oldukça benzerdir. Şekil 2.4'de hidrojelin polimerik ağ yapısı gösterilmektedir [28].



Şekil 2.4. Hidrojelin polimerik ağ yapısı [28].

Hidrojellerin birçok kullanım ve uygulama alanına sahiptir. Bunlardan birkaç tanesi Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

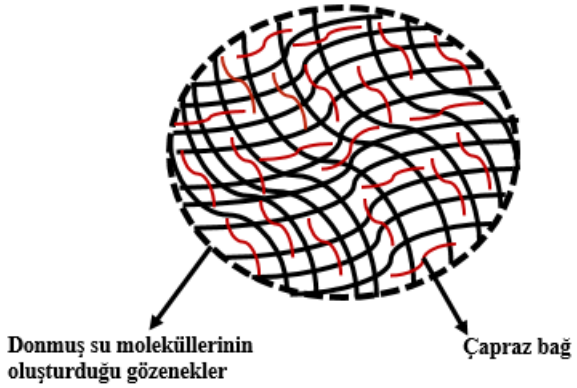
Tablo 2.2. Hidrojellerin uygulama alanları [28].

HİDROJELLERİN UYGULAMA ALANLARI	
Yapay organ yapımı	Kontak lens
Biyosensör	Kozmetik sektörü
Gıda sektöründe katkı maddesi	Kemik hastalıkları tedavisi
Yapay kornea	Ağır metal/boyarmadde uzaklaştırma
Su saflaştırma	Denetimli salınım sistemleri

2.5.2. Kriyojel

Kriyojeller, kısmen donmuş monomerik veya polimerik çözeltilerle hazırlanan üç boyutlu jel matrislerdir. Kriyojeller makrogözenekli veya süper makrogözenekli yapıda, süngerimsi morfolojiye sahip jellerdir. Sahip olduğu bu makrogözenekli yapısı sayesinde difüzyon akışı ve kütle aktarımı etkin bir şekilde gerçekleşir

Birbiri ile bağlantılı makrogözenekler ve süngerimsi morfoloji kriyojellerin en tipik özelliğidir. Süngerimsi kriyojeller içerisinde bulunan suyun büyük bir kısmı makrogözeneklerin içerisindedir ve mekanik olarak sıkıştırma ile makrogözeneklerden dışarı çıkarılabilir. Kriyojellerin özellikleri kriyojelasyon sıcaklığı, örneğin donmuş vaziyette kalma süresi, donma/erime hızları, çözücü cinsi, çözünen veya çözünmeyen katkı maddeleri ile değişir. Kriyojelin polimerik ağ yapısı Şekil 2.5'de gösterilmektedir [10].



Şekil 2.5. Kriyojelin polimerik ağ yapısı [26].

Kriyojeller ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları nedeniyle biyolojik uygulamalarda önem kazanmıştır. Bu yüzden birçok uygulamalarda kullanılmıştır. Ayrıca kriyojeller makrogözenekli yapısı sayesinde hızlı şişme kinetiği göstermektedir. Kriyojeller bu özellikleri sayesinde;

- Biyosensör uygulamaları
- İlaç salım sistemlerin tasarımında
- Moleküler baskılama tekniklerinde kullanılmaktadır.

2.5.3.Kriyojellerin Hidrojellerden Farkları

Hidrojeller, su ile şişebilen, çapraz bağlı gözenekli polimer yapılardır. Şişmiş halde iken yumuşak ve kırılgandır, bu nedenle yüksek oranda şişmiş hidrojellerin mekanik dayanımları düşüktür. Kriyojeller yarı donmuş sulu ortamda sentezlenen, makro gözenekli yapılar olup,

yüksek mekanik dayanım ve elastikiyet özelliği gösterirler. Tablo 2.3'de hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin karşılaştırılması gösterilmektedir [27].

Tablo 2.3. Hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin karşılaştırılması [27].

ÖZELLİKLER	HİDROJEL	KRİYOJEL
Stabilite	Düşük	Yüksek
Mekanik Dayanım	Düşük	Yüksek
Gözeneklilik	Düşük	Yüksek
Şekil	Jel	Sünger
Hazırlanması	Kısa	Uzun

2.6. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler

Doku iskeleleri doğal polimerler (kollajen, kitosan, jelatin vb.) ya da sentetik polimerlerden (PVA, polistren, poliakrilamit, polietilen vb.) üretilebilirler. Tablo 2.4'de kriyojellerin üretimi için yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler ile kullanım alanları verilmektedir. Doğal polimerler hücresel çevreyi yakın olarak taklit edebilirler, sentetik polimerlerin ise malzeme özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır [3,4]. Doğal polimerlerin (kitosan, jelatin, aljinat, nişasta, vb.) en büyük avantajı biyolojik olarak uyumlu olmaları, toksik etki göstermemeleri, biyolojik olarak parçalanma özelliklerinin iyi olması ve etken maddenin salınımı bittikten sonra vücuttan uzaklaştırılmalarının gerekmemesidir. Sentetik polimerlerin (PVA, poliakrilamid, polistiren, vb.) ise, malzeme özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır [4].

Tablo 2.4. Kriyojellerin üretimi için yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler ile kullanım alanları [4].

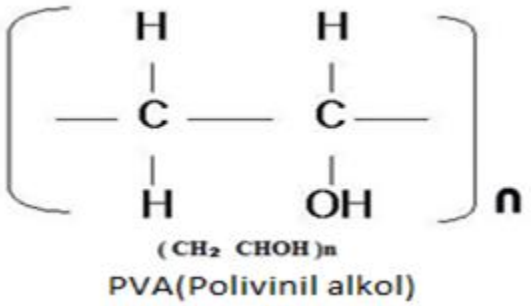
DOĞAL POLİMERLER	
Polimerin Adı	**Yaygın Kullanımı**
Aljinat-agaroz	Doku mühendisliği iskelesi (genel kullanım), afinite arıtımı
Selüloz	Doku mühendisliği iskele (sinir)
Kitosan	Enzim immobilizasyonu, doku mühendisliği iskele (kemik, deri, sinir), afinite saflaştırması, sorpsiyon işlemleri
Kitosan-agaroz-jelatin	Doku mühendisliği iskele (kıkırdak)
Kitosan-jelatin	Doku mühendisliği iskele (kemik, kıkırdak, deri)
Kollajen	Doku mühendisliği iskele (kemik)
Jelatin	Biyoreaktör, doku mühendisliği iskele (kemik, kıkırdak, deri, kardiyovasküler, intervertebral disk, nöral, iskelet kası)
Jelatin-fibrinojen	Doku mühendisliği iskele (deri)
Jelatin-laminin	Doku mühendisliği iskele (sinirsel)
İpek fibroin (SF)	Doku mühendisliği iskele (kemik, intervertebral disk)

Tablo 2.4. Devamı

SENTETİK POLİMERLER	
Polimerin Adı	**Yaygın Kullanımı**
N-vinil-2-pirolidon (NVP)	Biyoreaktör, doku mühendisliği iskele (kemik)
Poli (etilen glikol) (PEG)	Doku mühendisliği iskele (kıkırdak, deri)
Poli (etilen oksit) (PEO)	Biyoreaktör, doku mühendisliği iskele (genel kullanım)
Poli (vinil alkol) (PVA)	Biyoreaktör, hücre ve enzim immobilizasyonu, doku mühendisliği iskele (kıkırdak, deri, kardiyovasküler, intervertebral disk)

2.7. PVA

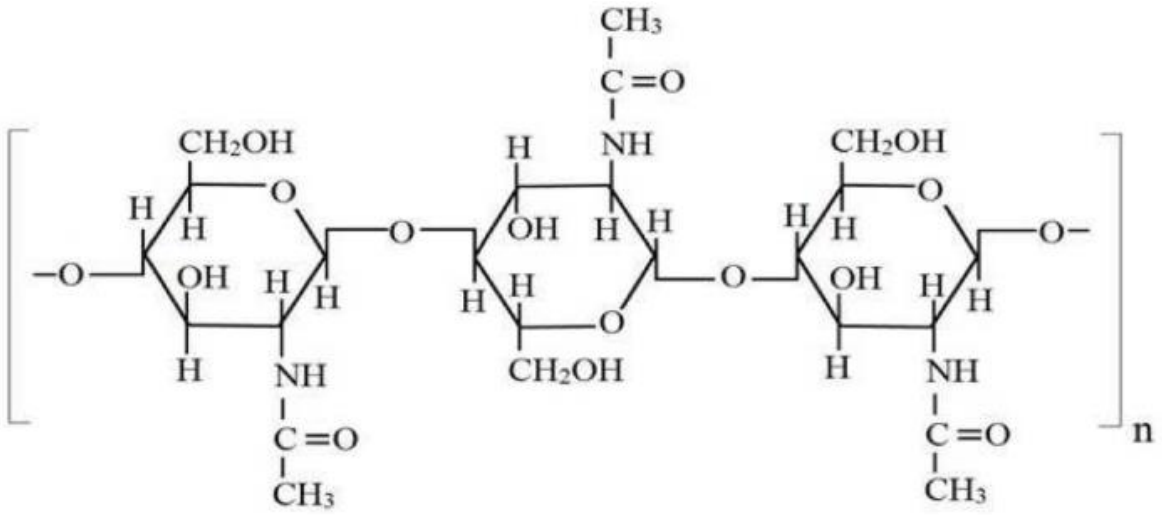
PVA hidrofilik, biyobozunur ve biyouyumlu sentetik bir polimerdir. Biyomedikal alanda oldukça geniş bir kullanıma sahiptir. PVA'nın kullanıldığı alanlar arasında kalp kapakçıkları, kornea implantları ve kıkırdak doku implantları bulunmaktadır. Şekil 2.6'da PVA'nın kimyasal yapısı gösterilmektedir [27].



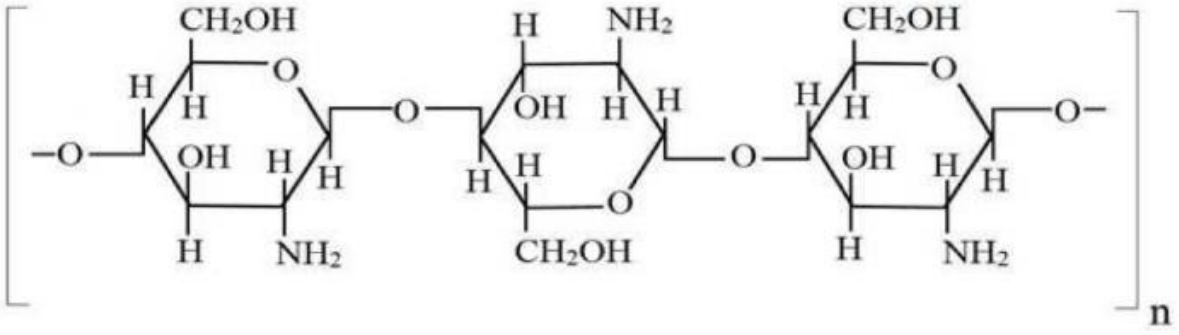
Şekil 2.6. PVA'nın kimyasal yapısı [27].

2.8. Kitosan

Kitosan, kitinin yüksek sıcaklıkta deasetilasyonu ile elde edilen, (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan katyonik ve doğrusal yapıda bir biyopoliaminosakkarittir. Biyouyumluluk, toksisite, düşük alerjenite ve biyobozunabilirlik gibi özellikleri, çeşitli uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlar. Şekil 2.7'de kitinin kimyasal bağ yapısı, Şekil 2.8'de ise kitosanın kimyasal bağ yapısı verilmiştir [28].



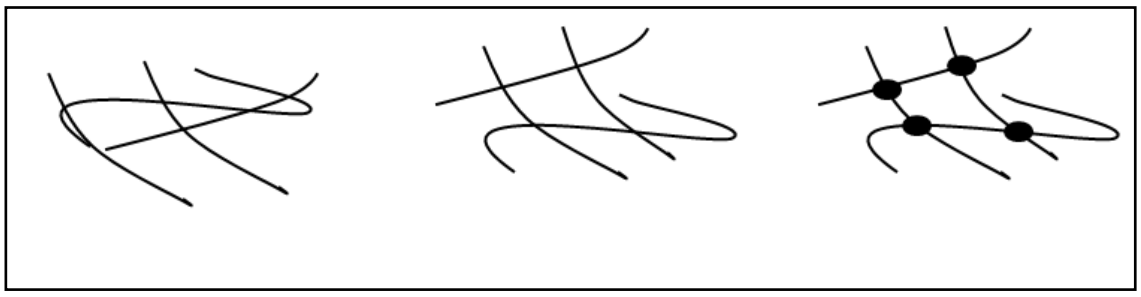
Şekil 2.7. Kitinin kimyasal bağ yapısı [28].



Şekil 2.8. Kitosanın kimyasal bağ yapısı [28].

2.9. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanma sonucunda bağımsız polimer molekülleri birleşerek kararlı, mekanik dayanımı yüksek yapılar oluşturur. Doku iskelelerinin degradasyonu, gözenekliliği ve mekanik özellikleri çapraz bağlanmayla kontrol edilebilmektedir. Şekil 2.9'da polimerin çapraz bağlanma sonucu oluşturduğu yapı gösterilmiştir.

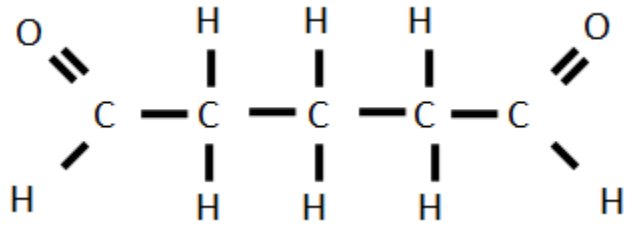


Şekil 2.9. Polimerin çapraz bağlanması sonucu oluşan yapı [2].

Sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılara, formaldehit, GA, genipin, trisodyum sitrat, 1-etil-3-3-di metal amino propil karbodiimit hidroklorid, divinilsülfan, 1,4 bütandiol, diglisid eter örnek verilebilir [2].

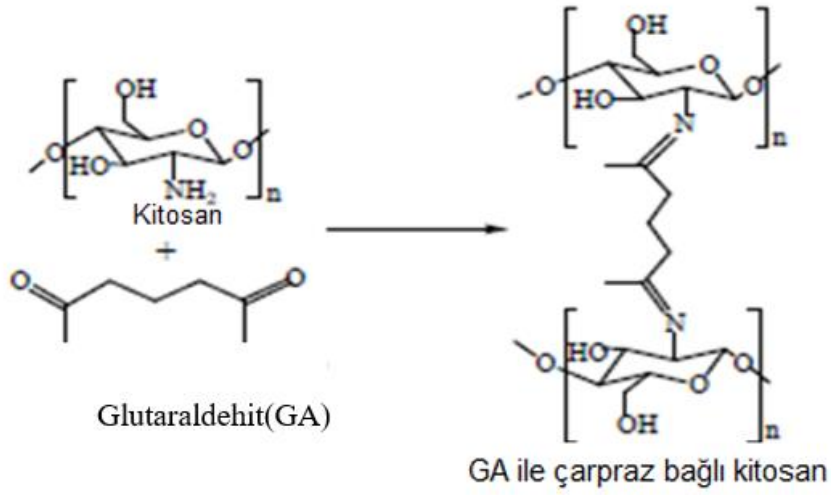
2.9.1. GA

GA, polimerlerin çapraz bağlanmasını sağlayan biyofonksiyonel çapraz bağlayıcı ajandır. Şekil 2.10'da GA molekülünün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



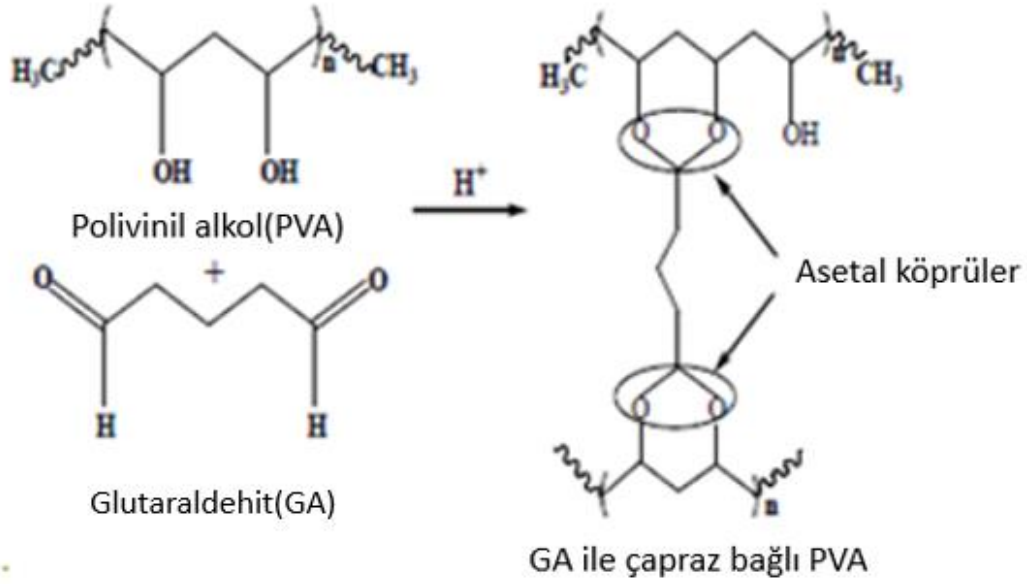
Şekil 2.10. GA ($OHCCH_2CH_2CH_2CHO$) molekülünün kimyasal yapısı [29].

GA kitosanın amino grupları arasında köprü kurarak kovalent bağlarla çapraz bağlanmasını sağlar. Şekil 2.11'de kitosanın amino grupları ile GA'nın aldehit grupları arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu gösterilmektedir [30].



Şekil 2.11. Kitosanın GA ile çapraz bağlanma reaksiyonu [30].

PVA ile GA arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu gösterilmektedir (Şekil 2.12) [30].



Şekil 2.12. PVA'nın GA ile çapraz bağlanma reaksiyonu [30].

Çapraz bağlayıcılar çoğu zaman toksik etki göstermeleri sebebiyle çapraz bağlanma sonucu oluşan jellerin zararlı moleküllerden arınması için ekstrakte edilmesi veya çok iyi yıkanması gerekmektedir [2].

2.10. Biyomimetik

Biyomimetik yaklaşımla üretim doğadaki tasarımlar örnek alınarak yapılmaktadır. Biyomimetik, özellikle nanoteknoloji, robot teknolojisi, yapay zeka (AI), tıbbi endüstri ve askeri donanım gibi alanlarda geniş bir kullanım alanına sahiptir [12].

2.10.1. Biyomimetik veya Biyomimikriye Doğadan Örnekler

- **Bir Ağaç Kurbağası; düz yüzeylere yapışma: negatif basınç**

Beyaz eşya ve cam gibi düz yüzeylere vakumlu yapışan pedler (yapışkanlar) ağaç kurbağalarının ayaklarının tabanından, emiş gücü ise ahtapotların dokunaçlarından esinlenilmiştir.

Günümüzde bu yapışkan pedler banyo perdesinin çengellerini fayansa tutturmada, bazı mutfak cihazlarının yerinin sabitlenmesi, duştaki lastik paspasların kaymasının engellenmesi, oyuncak oklarının düzgün yüzeylere yapışmasının sağlanması için kullanılır.

- **Gübre Böceği; kendi-kendini temizleme etkisi, doğada su geçirmezlik**

Gübre böcekleri gübreyi yuvarlarken oldukça temiz görünürler ve nadiren kirli bir kelebek veya yusufçuğa rastlanır. Bunun gibi bazı bitkiler kirleri atmada çok başarılıdır. Örneğin, Hint nilüferi çamurlu sularda yetişir ancak kir onun yapraklarına asla yapışmaz.

İnsanlar bu kendi-kendini temizleme etkisini birçok amaç için taklit etmişlerdir. Buna kendi-kendini temizleyen plastikler, çatı kiremitleri, pencere camları, seramikler, levha ve araba cilaları, yüzey boyaları, özel bir sprey emdirmeyle kir tutmaz elbiseler vb. örnek olarak verilebilir.

- **Kelebeklerin Kanatları**

Kelebeklerin kanatlarının kendi kendini temizlemesi suyun kanatlarına bağlanmamasıyla ilişkilendirilir. Su kanatlara bağlanmadığı için kanatlar kelebeğin uçmasını engelleyecek kadar ağır hale gelmez ve kendi kendini temizler.

İnsanlar bu su geçirmezliği taklit etmeye çalışan pek çok çeşitli teknolojiler geliştirmektedir. Örneğin emdirici spreyler, materyalleri balmumu gibi kaplayarak onları su geçirmez hale getirir. Bazı dış cephe boyaları ile boyanan yüzeyler bu şekilde süper su geçirmez olur [31].

2.11. Kemik

Kemik; kemik doku, kemik iliği ve bunları çevreleyen bir bağ doku olan periosteumdan oluşan oldukça damarlı ve sinirlerle donatılmış yapılardır [32]. Periosteum osteojenik özelliktedir [33]. Vücudu koruyan, destekleyen ve hareketini sağlayan iskelet sisteminin bir bileşeni olan kemik, aynı zamanda kanın oluşumunu sağlayan kemik iliği gibi özelleşmiş dokular için de bir koruma ve üretim bölgesidir [34].

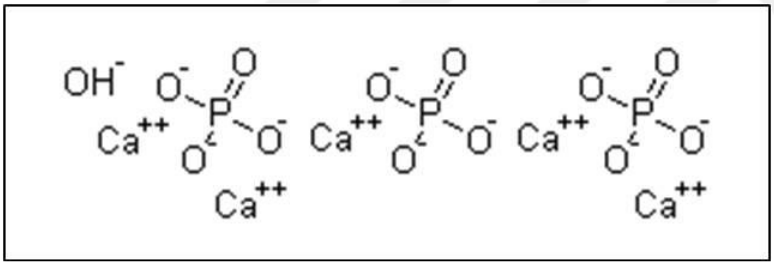
Vücudun diğer organlarında ve dokularında da olduğu gibi kemik doku da hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Kemik dokusu, kemik hücre dışı matrisi (ECM) ve Tip I kollajen (KOL-I) gibi mineralize olmayan organik yapıların yanı sıra mineralize olan inorganik karbonatlı apatit yapılarını da içermektedir. ECM içeriğinde proteoglikanlar, glikoproteinler ve sialoproteinler gibi çok sayıda matris proteini bulunur [35]. Kemiğin inorganik bileşenleri ise HA kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum ve fosfatların yanı sıra sitrat ve magnezyum gibi bileşenlerden oluşur. Kısacası kemik, genetik, metabolik ve mekanik faktörler tarafından etkilenen kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesiyle güçlenmiş bir organik matristen oluşan mineralize bir dokudur. Diğer bir deyişle kemik, doğal bir kompozit malzemedir [34].

2.12. Hidroksiapatit (HA)

HA, dişlerin mine ve dentin tabakasında veya kemikte bulunan, kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan kalsiyum tuzudur.

HA'nın en önemli özellikleri şunlardır;

- Oksijenle tepkimeye girmediği için yanmaz.
- Çelik burlarla veya zımparalamayla aşındırılamaz, sadece elmas ile aşındırılabilir.
- Esnekliği az, neredeyse tamamen kırılgandır.
- Doğada elmastan sonra bilinen en sert malzemedir.
- HA biyoaktif yapıda bir biyomalzemedir.
- Tatsız ve kokusuzdur.
- Organik çözücülerde çözünmez.
- Asit çözeltileri hariç inorganik çözeltilerde de çözünmez.
- Hidroksil (OH^-) iyonu, HA'yı yapıtaşlarına ayırabilir.
- HA'nın yapısını, mekanik açıdan ancak elmas kimyasal açıdan ise kuvvetli asit değiştirebilir. HA'nın yapısı Şekil 2.13'de verilmektedir [36].



Şekil 2.13. HA'nın yapısı [37].

HA'nın mekanik özellikleri Tablo 2.5'de verilmiştir [13].

Tablo 2.5. HA'nın mekanik özellikleri [13].

Mekanik Özellik	**Değer**
Elastisite modülü	4.0-117 GPa
Basınç mukavemeti	294 MPa
Eğilme mukavameti	147 MPa
Sertlik	3.43 GPa
Poisson oranı	0.27
Yoğunluk	3.16 g/cm^3

2.12.1. Kemik Dokusu ve HA'nın Kemik Dokusundaki Durumu

İnsan kemiklerinin kortikal ve trabeküler kısımlarının matrisleri iki fazdan oluşmaktadır. Bunlar; kalsiyum HA ve trikalsiyum fosfat (TCP:$Ca_3(PO_4)_2$)'dır. Asıl faz olan doğal kalsiyum HA, kortikal kemiklerde %50'den az olmamak üzere gözenekli bir yapı oluşturur [13].

2.12.2. HA'nın Biyouyumluluğu

HA gözenekli yapısı; hücrelerin, gözeneklerin içine doğru büyümesinden dolayı, dokuların implante nüfus etmesini sağlar. Ayrıca HA'nın yapısındaki gözenekler, bir kanallar sistemi gibi davranıp, kemik yapıya kanın ve diğer önemli vücut sıvılarının ulaşmasını sağlar. HA'nın emilimi yılda %5-10 hızıyla gerçekleşir. Yapılan deneylerde HA implantların, öncelikle fibrovasküler doku ile kaplandığı ve zamanla bu dokudaki olgun lamellerin, kemiğe dönüştüğü tespit edilmişti. HA'nın osteokonduktif özellikleri de implantların kemiğe sıkı yapışmasına ortam ve olanak sağlar [13].

2.12.3. HA'nın Klinik Uygulamaları

HA, plastik cerrahide; yanak, alt ve üst çene, burun, alın gibi yüz bölgesine ait kısımların rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır. Metal yüzeyine HA kaplama uygulaması; kimyasal bağlanma yolu ile kemik/implant sabitlemesi elde etmek için metalik malzemelerin mekanik özellikleri ile HA'nın yüksek biyouygunluğu ve biyoaktifliğini birleştirmektir. Metalik biyomalzemelerin HA ile kaplanmasında, ince bir HA tabakası biyoaktivite sağlar. Kalça eklem protezlerindeki gibi metal implantlar üzerine kaplama, HA'nın en önemli uygulamalarından biridir. PMMA'nın kullanımında oluşan komplikasyondan kaçınmak için bir fiksasyon (sabitleme) aracı olarak femur (büyük bacak kemiği) protezlerinde ve kapsüllerinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır [13].

2.13. Sentetik Vücut Sıvısı (SBF)

Kokubo ve Takadama yaptıkları çalışmada kalsiyum HA'yı, nanoboyutlarda yüksek kimyasal homojenlik ve saflıkta çeşitli tuzların özgün bir kompozisyona sahip "Sentetik Vücut Sıvısı (SBF-Simulated Body Fluid)" çözeltilerinde uygun oranlarda çözülmesi ile başlanarak, insan vücudu sıcaklığı olan 37°C'de ve yine insan vücudu pH değeri olan 7.4'te, biyomimetik koşullarda yürütülen özgün bir kimyasal sentez yöntemi ile elde etmiştir [38].

Malzemelerin kemik bağlanma yeteneği, iyon konsantrasyonu neredeyse insan kan plazmasına eşit olan ve SBF adı verilen bir çözelti sayesinde belirlenmektedir. Bu çözelti içerisinde, malzeme yüzeyinde apatit oluşumu, malzemenin biyoaktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi açısından oldukça önemlidir [38,39].

Yöntem kısaca, malzemenin belirli sürelerde SBF içerisinde bırakılması, daha sonra farklı yüzey analiz teknikleri ile HA tabakasının varlığının ve bu tabakanın ne kadar süre içerisinde oluştuğunun belirlenmesine dayanmaktadır [39].

Jalota ve arkadaşları, herhangi bir muamele görmemiş, NaOH ile muamele görmüş ve SBF ile kaplanmış titanyum köpükler elde etmişler ve bu yapılar içerisinde SBF kaplı yüzeylerin en yüksek protein üretimi ve hücre bağlanma özelliklerine sahip olduğunu göstermişlerdir [40-42].

Tas ve Bhaduri ise insan kan plazmasının 10 katı kadar kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip olan bir çözelti (10xSBF) hazırlayarak kaplama oluşum kinetiğini desteklemiş ve aynı zamanda kaplama süresini de azaltmışlardır. Bu yöntem sayesinde, Ti6Al4V yüzeylerinde 2-6 saat içerisinde kemik benzeri apatit kalsiyum fosfat oluşumunu sağlamışlardır [41].

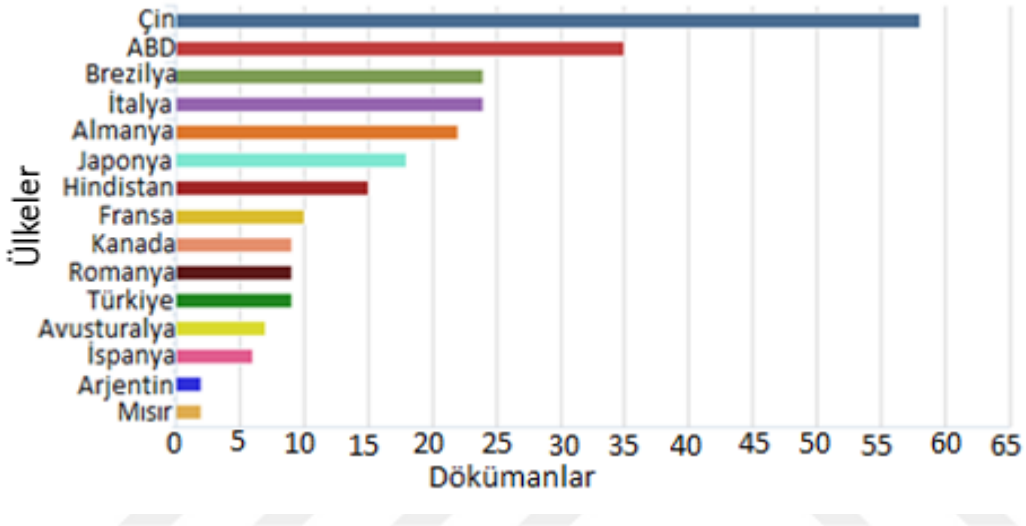
2.14. Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Yöntemi

HA kaplamaların yaygınlaşması, kaplama teknikleri açısından önem arz ettiği gibi biyomimetik uygulamaların günlük hayata entegre olması açısından da önemlidir. Biyomimetik (doğadan ilham alan teknoloji) söz konusu olduğunda biyomalzemeler de ilk sıralarda anılması gereken kavramlardan birisidir. Biyomalzemeler, insan vücudundaki organ ya da dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan malzemelerdir. Biyomalzemeler için en önemli özellik biyouyumluluk (vücuda uyuşabilirlik) olup, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı vb.) oluşturmayan malzemeler olmasıdır [43].

Metal yüzeyine HA kaplama uygulaması; kimyasal bağlanma yolu ile kemik/implant sabitlemesi elde etmek için metalik malzemelerin mekanik özellikleri ile HA'nın yüksek biyouygunluğu ve biyoaktifliğini birleştirmektir. Metalik biyomalzemelerin HA ile kaplanmasında, ince bir HA tabakası biyoaktivite sağlar. Metallerin biyoaktivitesini artırmak için yapılan birçok çalışma, kimyasal ve ısıl işlemle oluşmuş amorf sodyum titanat tabaka kalınlığının yaklaşık 1 μm olduğunu göstermiştir. HA kaplamalı metaller iyi sabitleme sağlasa da, HA ile metal arasındaki yapışma dayanımının düşüklüğü, HA tabakasının metal yüzeyinden kaybına neden olabilmektedir. Ayrıca, kaplama sırasında oluşacak yüksek sıcaklık da, gerek kaplama gerekse kaplanacak malzemede yapısal değişikliklere neden olmaktadır [44].

Kaplamanın in vivo stabilitesi, direkt olarak kristalinite ile ilgilidir. Kristalinite, kaplamadaki kristal HA yüzdesidir [45]. Başarılı bir kaplama için malzeme ve kaplama yönteminin iyi seçilmesi gereklidir. Örnek olarak Pasinli ve ark. yaptığı çalışmada Ti6Al4V metal yüzeyini HA ile kaplamışlardır. Çalışma sonucunda, biyolojik olarak uyumlu olan titanyum metal implant malzeme elde etmişlerdir.

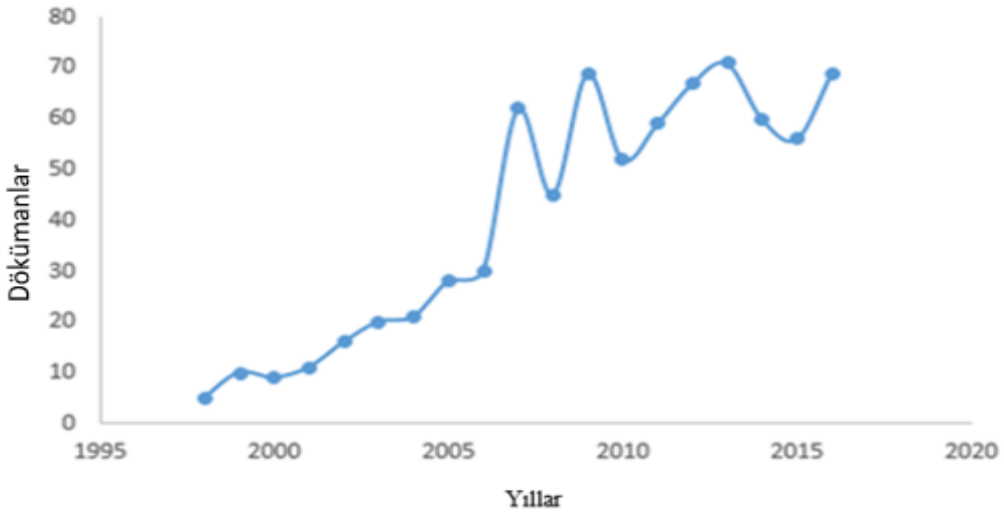
2.15. Ülkelerin Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Alanında Yaptığı Çalışmaların Sayıları



Şekil 2.14. Ülkelerin biyomimetik HA kaplama alanında yaptığı çalışmaların sayıları [46].

Şekil 2.14'de biyomimetik HA kaplama alanında yapılan çalışmaların ülkelere göre dağılımı gösterilmiştir. Şekil 2.14'de gösterildiği gibi Türkiye'de yaptığı çalışmalarla bu ülkeler arasında önemli bir yere sahiptir**.**

2.16. Yıllara Göre Biyomimetik Hidroksiapatit Kaplama Alanında Yapılan Çalışmalar



Şekil 2.15. Yıllara göre biyomimetik HA kaplama alanında yapılan çalışmalar [46].

Şekil 2.15'de yıllara göre biyomimetik hidroksiapatit kaplama çalışması için literatüre sunulan belgeler gösterilmiştir. Şekil 2.15'de görüldüğü üzere 1995-2005 yılları arasında biyomimetik hidrosiapatit kaplama alanında yapılan çalışmaların sayıları düzenli bir artış göstermiştir. Bununla birlikte 2005-2010 yıllarında önemli bir sıçrayış olmuştur. Daha sonra bu artış diğer yıllarda da devam etmiştir.

Şekil 2.15'de gösterildiği üzere çalışmalar yıllara göre gittikçe daha da artarak devam etmiştir. Bütün bu bulgular ve literatür taramaları ışığında biyouyumlu polimerik jellerin (hidrojel ve kriyojel) biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanıp biyoaktivite kazanabileceği ve elde edilen biyouyumlu malzemenin kemik doku mühendisliğinde çatlak ve kırık kemiklerin onarımında kullanabileceği bulgusu ortaya çıkarılabilir.

Tablo 2.6'da 1998'den 2016 yılına kadar biyomimetik HA kaplama alanında yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2.6. Biyomimetik HA kaplamayla ilgili yapılan çalışmalar.

Referans	Çalışma	Yöntem	Etki	Uygulama Alanı
Rhee et al. (1998)	Bir biyomimetik yöntemle kollajen membran üzerindeki HA kaplama üzerine çalışılmıştır.	Kollajen membranlar sitrik asit içeren ve içermeyen vücut sıvısı taklit eden (SBF) çözeltisi içine batırılmıştır. 1 hafta süreyle 36.5°C'de SBF çözeltisine batırılarak elde edilen numuneler karakterize edilmiştir.	Sadece sitrik asit içeren SBF çözeltisinde karbonat içeren hidroksiapatit (HA) oluşumu etkisi gözlemlenmiştir.	Biyomedikal uygulamalar
Habibovic et al. (2002)	Metal implantlar üzerinde biyomimetik HA kaplama üzerine çalışılmıştır.	İlk aşamada, implantlar normal simüle edilmiş vücut sıvısına göre 5 kat fazla konsantre bir çözeltiye (5xSBF çözeltisi) batırılmıştır. Metal üzerine ince, düzgün, amorf bir kalsiyum fosfat kaplama yapılmıştır.	Yoğun ve gözenekli ortopedik implantlara uygulanan biyomimetik kaplama, kemiğin aşırı gerilimi ve kemik büyümesini arttırarak protezlerin hızlı ve istikrarlı osteo entegrasyonunu sağlamaktadır.	Cerrahide metal implant uygulamaları
Barrere et al. (2003)	Keçilerde kalça kemiğinde yoğun ve gözenekli metal implantlara uygulanan biyomimetik apatit kaplamanın osteoentegrasyonu üzerine çalışılmıştır.	Biyomimetik kalsiyum fosfat (CaP) kaplamaları, simüle edilmiş vücut sıvısına 37°C'de ve daha sonra 50°C'de 24 saat daldırılarak yoğun titanyum alaşımı (Ti6Al4V) ve gözenekli tantal (Ta) silindirlerine uygulanmıştır.	Kaplanmamış ve BCA (homojen kemik benzeri bir karbonatlı apatit) kaplı implantlar, 14 yetişkin dişi keçi femoral diyafizine implante edilmiştir. BCA kaplamanın, kaplanmamış implantlarla karşılaştırıldığında kemik entegrasyonunu arttırdığını göstermektedir.	Kemik implant uygulamalarında

Tablo 2.6. Devamı

Kong et al. (2006)	Kemik doku mühendisliği için kitosan/nanoHA kompozit iskele yapılarının biyoaktivitesi üzerine çalışılmıştır.	Kitosanın biyolojik uyumluluğunu ve biyoaktivitesini arttırmak için, HA yerinde kitosan iskeleleriyle birleştirilmiştir.	Sonuçlar, nanoHA ilavesinin, kitosan/nanoHA bileşik iskelelerinin biyoaktivitesini geliştirdiğini göstermiştir.	Kemik doku mühendisliği
Han et al. (2008)	Kemik doku mühendisliği için biyomimetik kitosan-nanohidroksiapatit (nHA) kompozit iskeleler üzerine çalışılmıştır.	Mekanik özellikler kitosana %1 oranında nHA eklenerek arttırılmıştır.	Sonuç olarak kemik doku mühendisliği için gözenekli, iyi mekanik özelliklere sahip kitosan-nHA iskeleler elde edilmiştir.	Kemik doku mühendisliği
Li et al. (2010)	Kemik doku mühendisliği için biyomimetik çok elemanlı polisakkarit/ nanoHA kompozitler üzerine çalışılmıştır.	Nano-HA/kitosan-pektin (nHCP) kompozit, bir kitosan-pektin ağının mineralizasyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra nHCP/kitosan-jelatin (nHCP/CG) iskeleleri, nHCP ve kitosan-jelatin çözeltisinin harmanlanması yoluyla hazırlanmıştır	Sonuç olarak, nHCP/CG iskeleleri, MC 3T3-E1 hücrelerinin tutunması ve çoğalması için uygun mikro ortamlar sağlayabilen kararlı fiziksel ve kimyasal yapılara sahiptir. Bu nedenle, nHCP/CG iskeleleri, kemik doku mühendisliğinde potansiyel bir biyomalzemedir.	Kemik doku mühendisliği
Deplaine et al. (2012)	Gözenek duvarlarındaki biyomimetik HA kaplaması geliştirilen Poli (L-laktik asit) iskele osteo-entegrasyonu üzerine çalışılmıştır.	PLLA iskelesine SBF'ye daldırılmadan önce bir hava plazma işlemi uygulandığında, HA çekirdeklenme kabiliyeti önemli ölçüde geliştirildiği gözlemlenmiştir.	Plazma işlemine tabi tutulan ve biyomimetik apatit tabakasıyla kaplı bir hibrid PLLA/HAp nanokompozit iskele, kemik yenilenmesi için umut vaat eden bir implanttır.	Biyomedikal implant uygulamaları

Tablo 2.6. Devamı

Zo et al. (2012)	Kemik doku mühendisliği için kitosan-HA makro gözenekli matris incelenmiştir.	Dondurarak kurutma tekniğini kullanarak, basit iki aşamalı süreçte, kitosan-HA (CH-HA) makrogözenekli iskele sentezlenmiştir.	Mekanik özellikler ve iskele makro yapısının kemik doku mühendisliği için ideal olduğu bulunmuştur.	Kemik doku mühendisliği
Gonzales et al. (2014)	Potansiyel yapay kıkırdak olarak PVA/HA kriyojelin mekanik özellikleri incelenmiştir.	PVA sulu bir solüsyonunda ve ardından dondurma-çözme çevrimlerine farklı miktarlarda HA ilave edilerek hazırlanmıştır.	HA, PVA matrisine dahil edildiğinde mekanik özelliklerde önemli gelişmeler bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, bu materyallerin potansiyel bir kıkırdak replasmanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.	Yapay kıkırdak uygulamaları
Mali et al. (2016)	Metalik implant materyalleri üzerine biyomimetik nanoyapılı HA kaplamalar incelenmiştir.	Nanoyapılı HA kaplamaların paslanmaz çelik implant materyalleri üzerindeki biyomedikal uygulamalarında ilerlemeler, biyolojik aktiviteler vurgulanmıştır.	Nanoyapılı metalik malzemeler üzerine HA kaplamanın kullanılması, implantın uzun vadeli istikrarını destekleyen biyolojik ve mekanik özelliklerinde avantaj sağlamaktadır.	Metalik implant uygulamaları
Liu et al. (2016)	Biyomimetik depozisyon sırasında kalsiyum fosfat kaplamaları oluşumu üzerine TiO_2 nanotüplerinin kristal yapısının etkisi incelenmiştir.	SBF batırıldıktan sonra sırasıyla 1 gün ve 3 gün süresince iki TiO_2-NT substratında (hazırlandığı ve tavlandığında 450°C'de) CaP büyümesini karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.	CaP kaplamanın bileşiminin, TiO_2 substratının kristal yapısına ve kinetiklere (biriktirme süresi) güçlü bir bağımlılığa sahip olduğu bulunmuştur.	Titanyum esaslı tıbbi implantların uygulaması

Yukarıda verilen Tablo 2.6 dışında güncel olarak 2016 yılında ve 2015 yılında yapılan çalışmalar kısaca özetlenmiştir.

2016 yılında yapılan Park ve ark. yaptıkları çalışmada, Ti (titanyum) metalinin üzeri CS (kitosan) ile spin kaplanmış ve ardından doğal kemik hücre dışı matrisini taklit etmek için 3 gün süreyle modifiye edilmiş vücut sıvısına (m-SBF) daldırdıktan sonra 2 saat boyunca 80°C'de 1M NaOH ile muamele etmişlerdir. Park ve ark yaptıkları bu çalışmada spin kaplamanın avantajını, birkaç nanometreden birkaç mikron kalınlığa kadar hızlı ve kolay bir şekilde oldukça üniform filmler üretme kabiliyeti olarak açıklamışlardır. Çalışma sonucunda CaP/CS kompozitinin bileşimi ve yapısını, NaOH sonrası işlemden sonra oluşan apatit ile karşılaştırılarak yorumlamışlardır [47].

Park ve ark.'nın yaptığı bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular;

- Magnezyum iyonu içeren biyomimetik kemik benzeri apatit, m-SBF'de CS (kitosan) kaplı Ti'nin tasarlanması ve NaOH ile muamele edilmesinden sonra başarıyla sentezlenmiştir.
- Kitosan, m-SBF'ye daldırma ile hazırlanan kalsiyum fosfat büyüklüğü üzerinde bir kontrol sağlamıştır ve NaOH sonrası işlem, kalsiyum fosfat bileşiğinin Ti yüzeyi üzerinde bağlanmasını desteklemiştir. NaOH sonrası işlem, biyomedikal uygulama potansiyelini arttıran karbonat apatitin hidrofilikliğini ve kristalliğini arttırmıştır.
- Park ve ark.'nın yaptıkları bu çalışmada önemli bulgulardan birisi, OCP (Oktakalsiyum fosfat)'nin, m-SBF'ye daldırılarak CaP/CS kompozitinde oluşmasıdır.
- CaP/CS kompozitinin karakterizasyon işlemi için yapılan FTIR, XRD ve SEM çalışmalarında, NaOH ile işlem sonrası çok kısa sürede karbonat apatit oluşumu gözlenmiştir.
- Çalışma sonucunda kaplanan Ti metalinin korozyondan koruma sağlaması beklenmiştir. Ayrıca ileri biyomedikal implantların üretimi için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

2015 yılında yapılan Nazir ve ark. yaptıkları çalışmada, Jalota ve ark. çalışmaları temel alınarak hazırlanmış TRIS (tris-hidroksimetil-aminometan) tamponlu 1.5 tas-SBF (27 mM HCO_3-TRIS-HCI tamponlu SBF) çözeltisi kullanarak kumlama ve asit sürtünme yoluyla modifiye edilmiş ticari olarak saf titanyum (CPTi) yüzeylerinin HA/trikalsiyum fosfat kaplamaları ile kaplanabilme kabiliyetini araştırmışlardır. Örnekler tas-SBF'ye 37°C'de 3 ile 7 gün daldırılıp, HA/trikalsiyum fosfat kaplamanın kimyası ve morfolojisi analiz edilmiştir [48].

Tas-SBF'ye daldırmadan önce numuneler, ticari olarak temin edilebilen diş implantlarının şekillerini ve pürüzlülüklerini taklit etmek için kumlanmış ve asitle kazınmıştır. Tas-SBF, tüm numunelerde kristalin HA/trikalsiyum fosfat kaplamaların oluşumunda yardımcı olmuştur.

Yüzeyler üzerindeki kaplamalar için en yüksek pürüzlülük değerleri, 2.9±0.2 μm ortalama Sa (yüzey pürüzlülüğü) değeri, tas-SBF'ye daldırıldıktan sonraki 7. günde elde edilmiştir.

Sonuç olarak Nazir ve ark.'nın yaptığı bu çalışma, üniform ve ince kaplamalar elde etmek için 7 gün boyunca Tas-SBF çözeltisinde bekletilerek titanyum yüzeyler üzerinde elde edilen HA/trikalsiyum fosfat kaplamanın, titanyum yüzeyleri biyo işlevselleştirmek için uygun bir seçenek olduğunu araştırmada başarılı olmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan materyaller aşağıda sunulmuştur.

3.1.1. Kriyojel Üretiminde Kullanılan Materyaller

3.1.1.1. PVA

PVA, hafif kokulu, beyaz, granüler haldedir. Son zamanlarda PVA hidrojeller özellikle doku mühendisliği alanında onarım ve yenileme için oldukça ilgi çekici bir malzeme olarak görülmektedir. PVA ortam sıcaklığında suda çok az çözünebilirken, yüksek sıcaklıktaki suda çözünebilir bir polimerdir. Sulu çözeltisi nötral veya hafif asidik karakterdedir. Ticari PVA yüksek hidroliz derecesiyle (%98,5'in üzerinde) elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan PVA, (Sigma – Aldrich, ABD) firmasından alınmıştır moleküler ağırlığı 89,000 - 98,000 g/mol değerleri arasındadır.

3.1.1.2. Kitosan

Başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanına sahip olan kitosan, yengeç, karides gibi kabuklu deniz canlılarında bulunan kitinden elde edilen bir aminopolisakkaritir. Bu çalışmada kullanılan kitosan, düşük molekül ağırlıklı (low molecular weight) 'dır. Sigma – Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

3.1.1.3. GA

GA, $CHO(CH_2)_3CHO$ molekül formülüne sahip; alifatik dialdehit dezenfektan, yüzey aktif madde ve deterjanların önemli bileşenlerinden birini oluşturan kimyasal bir maddedir. Proteinlerin çapraz bağlanmasında kullanılmasının yanı sıra; histokimya, enzim teknolojisi, kimyasal dezenfeksiyon ve sterilizasyon, biyomedikal, eczacılık bilimi ve deri endüstrisi gibi çeşitli alanlarda geniş kullanım alanına sahiptir.

Bu çalışmada PVA ve kitosan polimerlerinin çapraz bağlanmasında GA kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan GA, %25 sulu çözelti formundadır ve Merck (Almanya) firmasından alınmıştır.

3.1.1.4. Asetik asit

Asetik asit bir organik asittir, sirkeye ekşi tadını ve keskin kokusunu vermesiyle bilinmekte ve doğada karbonhidratların yükseltgenmesiyle oluşmaktadır. Polimer çözeltilerini hazırlama sürecinde kitosan, asetik asitin %6'lık konsantrasyonu kullanılarak çözülmüştür. Bu çalışmada kullanılan asetik asit, Sigma – Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

Deneyler kapsamında; çözeltilerin hazırlanmasında asetik asit ve distile su kullanılmıştır.

3.1.2. Sentetik Vücut Sıvısı Hazırlamada Kullanılan Materyaller

Sentetik vücut sıvısı hazırlanırken NaCl, $NaHCO_3$, KCl, $K_2HPO_4.3H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$, HCl, $CaCl_2$, Na_2SO_4 ve $(CH_2OH)_3CNH_2$ kimyasalları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan NaCl, $NaHCO_3$, KCl, $MgCl_2.6H_2O$ kimyasalları Emir Kimya (Türkiye) firmasından, %37'lik saflığa sahip olan HCI kimyasalı Riedel-de Haën (Almanya) firmasından, $K_2HPO_4.3H_2O$ kimyasalı Emsure Merc (Almanya) firmasından, $CaCl_2$ ve Na_2SO_4 kimyasalları CARLO ERBA Reagents (Fransa), $(CH_2OH)_3CNH_2$ kimyasalı Panreac Quimica SLU (İspanya) firmasından alınmıştır.

3.2. Yöntem

Bu tez çalışması kapsamında PVA/Kitosan kriyojellerin biyomimetik HA ile kaplanmış kompozitleri üretilerek karakterize edilmiştir. Öncelikle optimizasyon çalışmaları sonucu PVA/Kitosan oranları ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılacak olan GA miktarına karar verilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda %2'lik toplam polimer konsantrasyonu kullanılarak 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 PVA/Kitosan oranlarına ve çapraz bağlayıcı olarak %3'lük GA sulu çözeltisine karar verilmiştir. Belirtilen oranlarda kriyojellerin üretimi iki farklı sıcaklıkta (-16°C ve -8°C) kriyojelasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretim aşamasından sonra, sentetik vücut sıvısı SBF (Simulated Body Fluid) kullanılarak HA ile kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerinin Üretilmesi

Toplam polimer miktarı %2, PVA/Kitosan oranları ise 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 olacak şekilde polimerler tartılmıştır. Daha sonra 0.14, 0.008, 0.06, 0.04, 0.02 g PVA 90°C'de 5ml distile suda 1 saat çözülmüştür. Çözünen PVA oda sıcaklığına gelmesi için 15 min bekletilmiştir.

0.006, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 g kitosan ise 5 ml, %6'lık asetik asit içerisinde 1 saat çözdürülmüştür. Ayrı olarak çözdürülüp hazırlanan PVA ve kitosan çözeltileri birbiri ile belirtilen oranlarda karıştırılmış ve homojen hali alana kadar yarım saat daha karıştırma işlemine devam edilmiştir.

Karışım homojen hali aldıktan sonra, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında hazırlanan PVA/Kitosan çözeltilerine çapraz bağlayıcı olarak polimer konsantrasyonunun %5'i olacak şekilde %3'lük çapraz bağlayıcı ajan GA çözeltisi eklendikten hemen sonra çözelti karıştırılıp 2.5 ml şırıngalara koyularak, donma işleminin gerçekleşmesi için kriyostatta 2 saat bekletilmeye bırakılmıştır.

PVA/Kitosan kriyojellerini hazırlamak için kriyostat cihazı (WiseCircu Wisd Laboratory Instrument (Almanya) kullanılmıştır.

Kriyostat sıcaklığı -16°C'ye ayarlanmıştır. Kriyostatta iki saat bekletilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin donma işleminin devam etmesi için örnekler -16°C buzlukta 12 saat bekletilmiştir. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında PVA/Kitosan kriyojellerini hazırlamak için, yine aynı oranlarda (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) olacak şekilde polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra kriyostat sıcaklığı -8°C'ye ayarlanmış ve hazırlanan örnekler iki saat boyunca kriyostatta bekletilmiştir. Donma işleminin devam etmesi için kriyostattan çıkarılan örnekler buzlukta (-16°C) 12 saat daha bekletilmiştir. Buzluktan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında eritilmiştir.

Hazırlanan örnekler 1000 ml beherde distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla 3 kez yıkanmıştır. Böylelikle reaksiyon karışımındaki reaksiyona girmemiş polimerler ve GA'nın giderilmesi sağlanmıştır. Yıkanmış olan numuneler -80°C dondurucuda 1 gün bekletilmiş ve daha sonra 1 tam gün süre ile liyofilizatörde kurutulmuştur.

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

Sentetik vücut sıvısı hazırlanırken NaCl, $NaHCO_3$, KCl, $K_2HPO_4.3H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$, HCl, $CaCl_2$, Na_2SO_4 ve $(CH_2OH)_3CNH_2$ kimyasalları kullanılmıştır. Belirtilen kimyasallar Kokubo ve Takadama tarafından belirtilen miktarlar (Tablo 3.1) baz alınarak 2xSBF çözeltisi hazırlanmıştır [38].

Çözeltinin hazırlanması için aşağıda verilen yöntem kullanılmıştır:

<u>Çözeltinin Hazırlanması</u>

- İlk olarak 500 ml'lik plastik behere 375 ml saf su eklenmiştir.
- Beher karıştırıcıya koyularak, sıcaklık 37°C'de tutulmuştur.
- Suyun içerisine Tablo 3.1'de belirtilen kimyasal maddeler sırayla eklenerek karıştırma işlemine devam edilmiştir.

Tablo 3.1. 2xSBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların miktarları.

1	NaCl	7,996 g
2	$NaHC_3$	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	$K_2HPO_4.3H_2O$	0,228 g
5	$MgCl_2.6H_2O$	0,305 g
6	HCl	40 cm3
7	$CaCl_2$	0,278 g
8	Na_2SO_4	0,071 g
9	$(CH_2OH)_3CNH_2$	6,057 g
10	1kmol/m^3 HCl	pH'ın ayarlaması için

- Tablo 3.1'de yer alan kimyasalların her birinin sırayla tek tek çözeltiye eklenip, tamamen çözülüp homojen olarak dağılması sağlanmıştır.
- 9. kimyasal $(CH_2OH)_3CNH_2$ (tris) yavaş yavaş eklenmiştir.
- 9. kimyasal da konulduktan sonra beherin sıcaklığı ve pH'ı kontrol edilmiştir.
- Çözeltinin pH'ı 1 kmol/m^3 HCl çözeltisiyle 7.40'a getirilmiştir.
- Hazırlanan çözelti daha sonra 500 ml'lik balon jojeye alınmıştır.
- Hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan 2xSBF çözeltisinin stabilitesini kontrol etmek için çözeltiden beher içerisine 50 ml ayırarak 37°C'de inkübatörde 1 gün tutulmuştur, çökelme gözlenmemiştir.

3.2.3. PVA/Kitosan Kriyojellerin Sentetik Vücut Sıvısında (SBF) Biyomimetik Hidroksiapatit ile Kaplanması

70:30 40:60 30:70 20:80 ve 10:90 oranlarında, farklı kriyojelasyon sıcaklıklarında(-16°C ve -8°C) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller, çapı 0.3 cm ve yüksekliği 0.3 cm olacak şekilde kesilerek tartılmış, ve santrifüj tüplerine konulmuş ve üzerlerine hazırlanan 2xSBF çözeltisinden yaklaşık 10 ml eklenerek kaplama işlemi 1, 3 ve 7 gün sürelerde 37°C'de su banyosunda (Daihan Scientific CO. LTD., WiseBath WB-22, Kore) bekletilerek yapılmıştır.

3.2.4. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.2.4.1. FT-IR analizi

Üretilen PVA/Kitosan kriyojeller ve bunların biyomimetik hidroksiapatit ile kaplanmış kompozitlerinin kimyasal yapısı FT-IR (Perkin-Elmer Spectrum 100 (ABD) marka-model cihaz) ile analiz edilmiştir. Analizler 500 - 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında yapılmıştır.

3.2.4.2. SEM analizi

PVA/Kitosan kriyojellerin morfolojisini (gözenek yapısı ve büyüklüğü, gözenek duvarlarının kalınlıkları ve homojenitesi) belirlemek, ayrıca HA ile kapanmış kriyojellerin kaplama ile yüzey morfolojisindeki değişimi ortaya koymak için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission, Zeis marka, Supra 55 model) kullanılmıştır. Örneklerin yüzeyi elektrik iletkenliğini sağlayabilmesi için platin/paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri elde edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile x250, x1000 x2500, x5000, x20000 büyütme oranlarında SEM görüntüleri elde edilmiştir.

3.2.4.3. EDXS analizi

Taramalı elektron mikroskobu ile seçilmiş bir noktada X-ışın haritalanması yapılarak bu bölgelerde kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır. EDXS analizi yapılmadan önce PVA/Kitosan kompozit kriyojeller platin/paladyum ile kaplanmıştır. EDXS analizi ile bir nokta üzerinde kimyasal analiz yapılarak o noktadaki iyonların ağırlık yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2.4.4. XRD analizi

X-ışını toz difraksiyonu (XRD), bir kristalin materyalin faz tanımlaması için kullanılan hızlı bir analitik tekniktir ve birim hücre boyutları hakkında bilgi sağlayabilir. Bu yöntemle analiz edilen malzeme iyice öğütülür, homojenize edilir ve ortalama yığın bileşimi belirlenir. Burada numune üzerine gönderilen X ışını ile oluşan, floresans X ışınları kristal spektrometre ile analiz edilerek farklı açılardan gelen pik şiddetlerine bağlı olarak malzeme elementleri ve konsantrasyonları belirlenir. XRD analiziyle 2θ açısı ve 5°C/min tarama hızı kullanılarak PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin kaplama sonrası nitel ve nicel analizleri yapılmıştır [49,50].

3.2.4.5. HA kaplama ile ağırlık artışının izlenmesi

SBF içerisinde HA kaplanan PVA/Kitosan kompozit kriyojeller 1, 3 ve 7 gün zaman aralıklarında 37°C'de su banyosunda bekletilip daha sonra liyofilizatörde kurutularak ağırlıkları ölçülmüştür. Her bir zaman dilimi sonunda PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ilk ağırlığına göre % ağırlık artışı tespit edilmiştir.

3.2.4.6. Şişme çalışmaları

Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin, şişme davranışlarının ve şişme oranlarının belirlenmesi için -80°C dondurucuda bekletilen ve daha sonra bir gün süreyle liyofilizatörde kurutulan örnekler kesilerek (0.3 cm çaplı ve 0.3 cm yüksekliğinde) kuru ağırlığı (Mi) tartılmıştır. Daha sonra örnekler distile suya konularak belirlenen zaman aralıklarında (5, 15, 30, 60, 90, 120 min) şişmeden sonraki ağırlık ölçümleri (Mf) yapılmıştır. Yüzey üzerindeki fazla suyun alınması için, her tartımdan önce filtre kâğıdı kullanılarak örneklerin fazla suyu alınmıştır. Örnek sayısı üç adet olarak belirlenmiş (n=3), şişme değerlerinin ortalaması hesaplanmış ve standart sapmaları belirlenmiştir.

Eşitlik (1)'de şişme oranının hesaplanması için kullanılan formül belirtilmiştir [51].

$$Mt\ (\%) = [(Mf-Mi)/Mi] \times 100 \quad (1)$$

Eşitlik (1)'de verilen;

Mt: şişme oranı (%), Mi: ilk ağırlık (g) ve Mf: son ağırlık (g) olarak tanımlanmıştır.

3.2.4.7. İn vitro degradasyon çalışmaları

Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin degradasyonu, 37°C'de su banyosunda, distile su içerisinde bekletilerek incelenmiştir. PVA/Kitosan kompozit kriyojeller santrifüj tüplerine koyularak su banyosunda sabit sıcaklıkta (37°C) bekletilmiştir. Belirli zaman dilimlerinde örnekler ortamdan alınmış, kurutulmuş ve tekrar ağırlık ölçümleri yapılarak, örneklerin degradasyon davranışları tespit edilmiştir. Örnek sayısı üç adet olarak belirlenmiş (n=3), degradasyon sonuçlarının ortalaması hesaplanmış ve standart sapmaları belirlenmiştir. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin yüzde degradasyon oranları eşitlik (2)'ye göre belirlenmiştir [52].

$$DD\ (\%) = [(Wi-Wf)/Wi] \times 100 \quad (2)$$

Eşitlik (2)'de verilen;

Wi: ilk ağırlık (g), Wf: kurutulduktan sonraki ağırlık (g) , DD; degradasyon derecesi (%) olarak tanımlanmıştır.

3.2.4.8. Gözeneklilik çalışmaları

PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği (P), kriyojellerin hacmi (Vs) ve gözenek hacmi (Vp) ölçülerek hesaplanmıştır. Kriyojellerin hacmini (Vs) hesaplamak için de iskele geometrisi (uzunluk, genişlik ve yükseklik) kullanılmıştır. Etanole daldırılarak 15 min bekledikten sonra kriyolojellerin (Wo) yüzeyindeki fazla etanol filtre kağıdı kullanılarak alınmış ve daha sonra tartılmıştır (We). Kriyojellerin gözenek hacmi (Vp), $(We-W_o)/qe$ olarak

tanımlanmıştır. Burada qe (0.789 mg/ml), oda sıcaklığında etanol yoğunluğunu temsil etmektedir.

PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği (P) ise aşağıdaki eşitlik (3)'e göre hesaplanmıştır [53].

$$P\ (\%) = (Vp / Vs) \times 100 \quad (3)$$

Ayrıca kriyojellerin görünür yoğunluğu Wo/Vs'dir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere farklı oranlarda hazırlanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretimi, biyomimetik HA ile kaplanması ve karakterizasyonu ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Özellikleri

4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada hedef, kriyojelasyon metodu ile, açık ve birbiri ile bağlantılı, süper makro gözenek yapısına sahip PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretmek ve üretilen kriyojellerin HA ile kaplanmasını sağlamaktır. Kriyojelasyon sırasında çözücü sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurulur ve donmuş çözücünün kristalleri gözenek yapıcı olarak görev görür. Çözücü kristalleri donma sırasında büyür, donmuş sürekli bir ağ sistemini oluşturana kadar diğer kristallerle birleşir. Bu sırada monomerler ve diğer bileşenler küçük donmamış bölgelerde konsantre olurlar. Bu bölgelerde polimerizasyon/çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleşir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, sistem oda sıcaklığına getirilir, birbiri ile bağlantılı gözenekleri sıvı çözücü ile dolu makro gözeneklerden oluşan matris elde edilmiş olur [54].

Polimerin cinsi ve özellikleri (molekül ağırlığı ve dağılımı, hidrofilitesi, çözücü cinsi ve kriyojelasyon koşulları (sıcaklık, soğutma hızı, vb.), toplam gözeneklilik ve dağılımı, gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu, çapraz bağlanma yoğunluğu vb. kriyojel özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Tüm bu özellikler kriyojelin taşıyacağı özelliklerin oluşumunda görev alır [55].

Bu tez çalışmasında, biyobozunur ve biyouyumlu PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretmek için malzeme olarak; biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan sentetik polimer PVA ve biyouyumlu doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır. PVA suda çözünen bir polimerdir. Bu nedenle PVA suda çözünmüştür. Kitosanın ise zayıf asitlerde çözündüğü bilinmektedir . Bu nedenle kitosan için çözücü ortam olarak %6'lık asetik asit kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarında, polimer konsantrasyonu ve çapraz bağlayıcı (glutaraldahit) miktarı değiştirilerek farklı bileşimde ve yapıda bir seri PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretilmiştir. Optimizasyon çalışmalarıyla üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin özellikleri ve içerikleri Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı koşullarda üretilen kriyojeller ve fiziksel özellikleri.

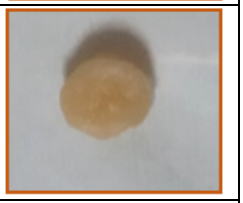
PVA/Kitosan Oranları	Toplam Polimer Konsantrasyonu	GA miktarı	Kriyojel Özellikleri	Görüntüsü
90:10	%5	%5	Krem renkli, şişme özelliği çok düşük, kırılgan	
80:20	%5	%5	Açık sarı renkli, şişme özelliği az, kırılgan	
60:40	%5	%5	Rengi koyu sarı, şişme özelliği biraz daha iyi, daha az kırılgan	
90:10*	%5	%5	Rengi çok açık, daha dayanıklı fakat şişme özelliği çok az	
80:20*	%5	%5	Sarı renkli, daha dayanıklı ve şişme özelliği biraz daha iyi	
60:40*	%5	%5	Koyu sarı renkli, şişme özelliği iyi dayanıklılık daha iyi	
70:30	%4	%5	Açık sarı renkli, şişme özelliği çok az, kırılgan	
50:50	%4	%5	Koyu sarı renkli, şişme özelliği biraz daha iyi, kırılgan	
30:70	%4	%5	Krem renkli, şişme özelliği iyi, dayanıklılık çok az	

**Dondurma çözdürme işleminin üç kerede tekrar etmesi.*

Tablo 4.1. Devamı

70:30	%3	%5	Açık sarı renkli, şişme özelliği çok, az kırılgan	
50:50	%3	%5	Sarı renkli, şişme özelliği daha iyi, kırılgan	
30:70	%3	%5	Rengi çok koyu sarı, şişme özelliği iyi, kırılgan	
10:90	%3	%3	Rengi koyu sarı, şişme özelliği oldukça iyi, dayanıklılık az	
20:80	%3	%3	Sarı renkli, şişme özelliği daha iyi, kırılgan	
30:70	%3	%3	Sarı renkli, şişmesi iyi fakat dayanıksız	
70:30	%3	%2.5	Çok açık sarı renkli, şişmesi az, dayanıksız	
50:50	%3	%2.5	Çok açık sarı renkli, şişmesi iyi, dayanıksız	
30:70	%3	%2.5	Rengi açık sarı, şişmesi daha iyi, kırılgan	

Tablo 4.1. Devamı

70:30	%2	%5	Rengi açık sarı, şişmesi az, dayanıksız	
50:50	%2	%5	Rengi açık sarı, şişmesi iyi, dayanıksız	
30:70	%2	%5	Rengi koyu sarı, şişmesi daha iyi, dayanıksız	
10:90	%2	%3	Sarı renkli, şişmesi oldukça iyi, dayanıklılık iyi	
20:80	%2	%3	Rengi koyu sarıya dönük, şişmesi iyi, dayanıklılık iyi	
30:70	%2	%3	Rengi açık sarı, şişmesi iyi, dayanıklılık çok iyi değil	
90:10	%2	%3	Açık krem renkli, şişme çok düşük, kırılgan	
80:20	%2	%3	Krem renkli, şişmesi düşük, kırılgan	
70:30	%2	%3	Sarı renkli, şişmesi çok düşük, dayanıksız	

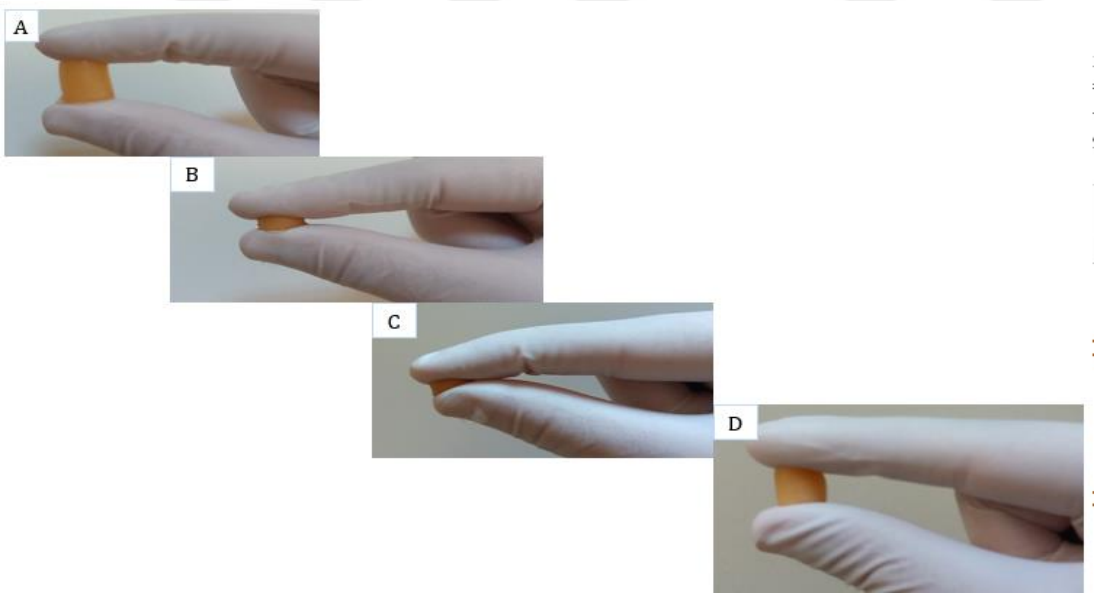
Tablo 4.1. Devamı

90:10	%2	%5	Açık krem renkli, şişmesi çok düşük, kırılgan	
80:20	%2	%5	Koyu krem renkli, şişmesi çok iyi değil, kırılgan	
60:40	%2	%5	Rengi koyu sarı, şişmesi iyi, kırılgan	
70:30	%2	%2.5	Açık krem renkli, şişmesi çok düşük, kırılgan	
50:50	%2	%2.5	Açık krem renkli, şişmesi biraz daha iyi, kırılgan	
30:70	%2	%2.5	Açık sarı renkli, şişmesi iyi, kırılgan	
40:60	%2	%3	Koyu sarı renkli, şişmesi çok düşük, kırılgan	
50:50	%2	%3	Koyu sarı renkli, şişmesi daha iyi, kırılgan	
60:40	%2	%3	Sarı renkli, şişmesi azda olsa iyi, kırılgan	

Tablo 4.1. Devamı

10:90	%2	%3	Rengi açık sarı, şişmesi çok iyi, dayanıklılık çok iyi	
20:80	%2	%3	Sarı renkli, şişmesi iyi, dayanıklılık iyi	
30:70	%2	%3	Rengi daha açık sarı, şişmesi iyi, dayanıklılık iyi	
40:60	%2	%3	Sarı renkli, şişmesi iyi, dayanıklılık az	

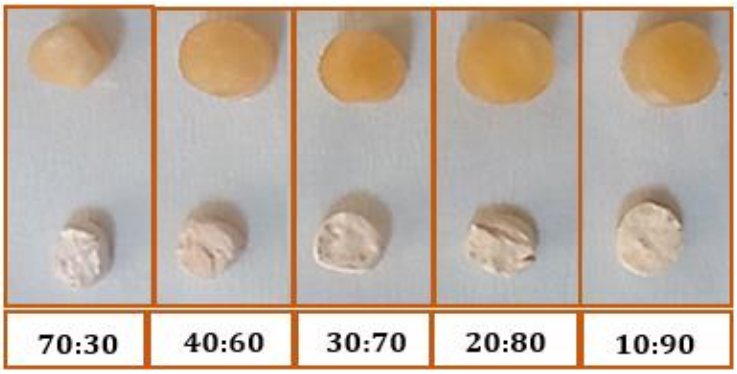
Şekil 4.1'de optimizasyon çalışmaları kapsamında en iyi şişme özelliği gösteren -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin şişme davranışı gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Optimizasyon çalışmaları kapsamında -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin şişme davranışı; A) Üretilen PVA/Kitosan kriyojelin başlangıçtaki hali, B) Bir kuvvet uyguladıktan sonraki hali, C) Uygulanan kuvvet arttırıldığında aldığı hal, D) Uygulanan kuvvet çekildiğinde aldığı hal.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, şişme oranı ve dayanıklılığı yüksek olan kriyojeller ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. %2'lik sabit polimer konsantrasyonu, %3 GA miktarı ve 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 PVA/Kitosan oranına sahip kriyojeller ile çalışmalara devam edilmiştir.

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de %2 sabit polimer konsansantrasyonu %3 GA miktarı kullanılarak, sırasıyla -16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.2. %2 sabit polimer konsansantrasyonu %3 GA miktarı kullanılarak, -16°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüsü.

Şekil 4.3. %2 sabit polimer konsansantrasyonu %3 GA miktarı kullanılarak, -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüsü.

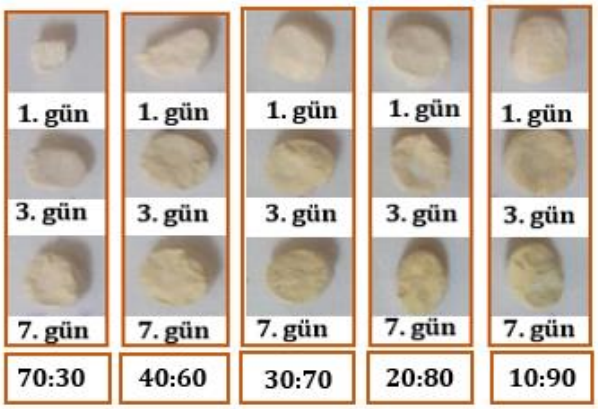
4.1.2. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Üretilmesi, Biyomimetik HA ile Kaplanması ve Karakterizasyonu

4.1.2.1. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretilmesi ve karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında yapılan optimizasyon çalışmalarının ışığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin -16°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilmesine karar verilmiştir. Yapılan literatür araştırmaları daha düşük sıcaklıklarda yüksek oranda gözenekli yapının oluşabildiği sonucuna ulaştırmıştır. Bu nedenle optimizasyon çalışmaları sonucu 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilmesine karar verilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin düşük kriyojelasyon sıcaklığında üretilmesi sonucu oluşan yapısal değişiklikler incelenmek istenmiştir. Bunun için düşük bir (-8°C) kriyojelasyon sıcaklığı seçilerek yine aynı oranlara sahip (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretilmiştir.

Bu tez çalışmasında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ileriye yönelik kullanım amacı kemik doku mühendisliği uygulamalarıdır. Üretilen kompozit jellerin fizyolojik ortamda istenilen süre boyunca (hücrelerle etkileşime geçip, yeni doku oluşumuna izin verecek süre kadar) mekanik stabilitelerini koruması gerekmektedir. Bu amaçla, PVA/Kitosan'dan oluşan kompozit jeller çapraz bağlanma olayına tabi tutularak, mekanik stabiliteleri arttırılmıştır. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin mekanik stabilitelerini arttırmak için de çapraz bağlacı ajan olarak %3'lük GA miktarına karar verilmiştir.

Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller 2xSBF konsantrasyonunda hazırlanan sentetik vücut sıvısına 1, 3 ve 7 gün süre ile daldırılarak HA ile kaplanması sağlanmıştır. Her iki kriyojelasyon sıcaklığında HA ile kaplanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellere ait görüntüler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.

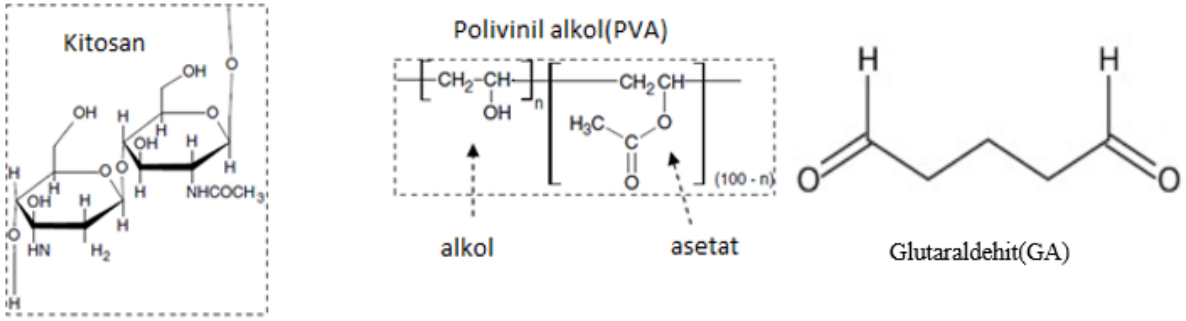


Şekil 4.4. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün süreyle HA ile kaplandıktan sonraki görüntüsü.

Şekil 4.5. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün süreyle HA ile kaplandıktan sonraki görüntüsü.

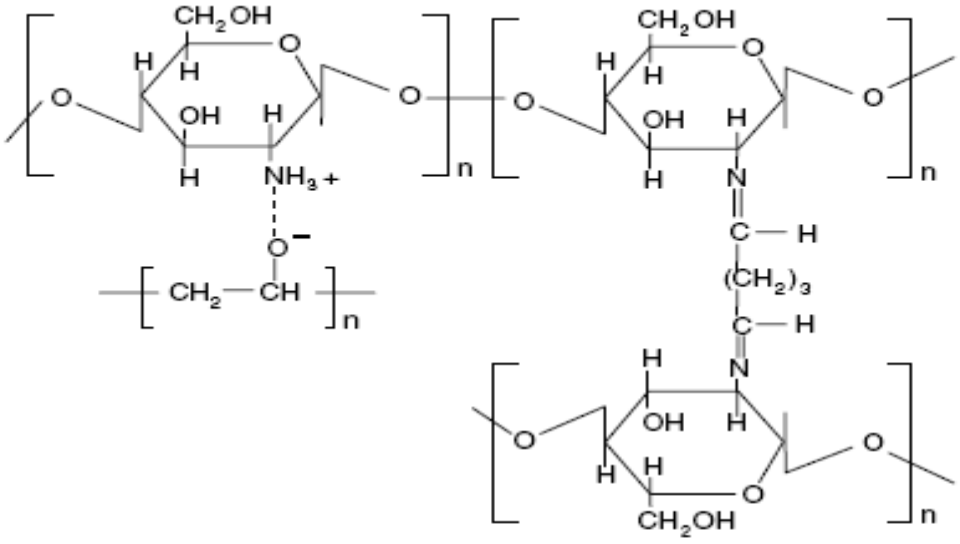
4.1.3. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin FT-IR Analizi

Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin kimyasal yapısı FT-IR ile analiz edilmiştir. FT-IR analizi 500-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında yapılmıştır. FT-IR analizi sonucunda PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki ve kaplama sonrasındaki FT-IR spektrumları elde edilmiştir. Şekil 4.6'da PVA, Kitosan ve GA'nın kimyasal yapısı sunulmuştur.



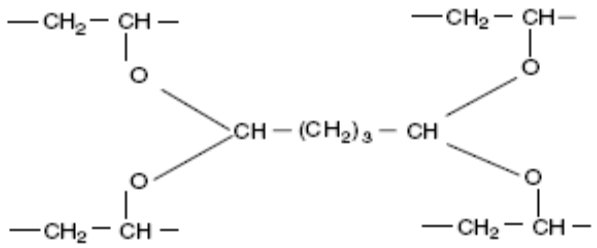
Şekil 4.6. Kitosan, PVA ve GA'nın kimyasal yapısı [56,57].

Yukarıda açık formülü verilen PVA ve kitosan polimerleri PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin üretiminde kullanılmıştır. Burada GA çapraz bağlayıcı ajanı kullanılarak, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) ve iki farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) PVA/Kitosan kompozit kriyojeller üretilmiştir. Kitosanın GA ile çapraz bağlanması sonucu elde edilen yapı Şekil 4.7'de verilmektedir.



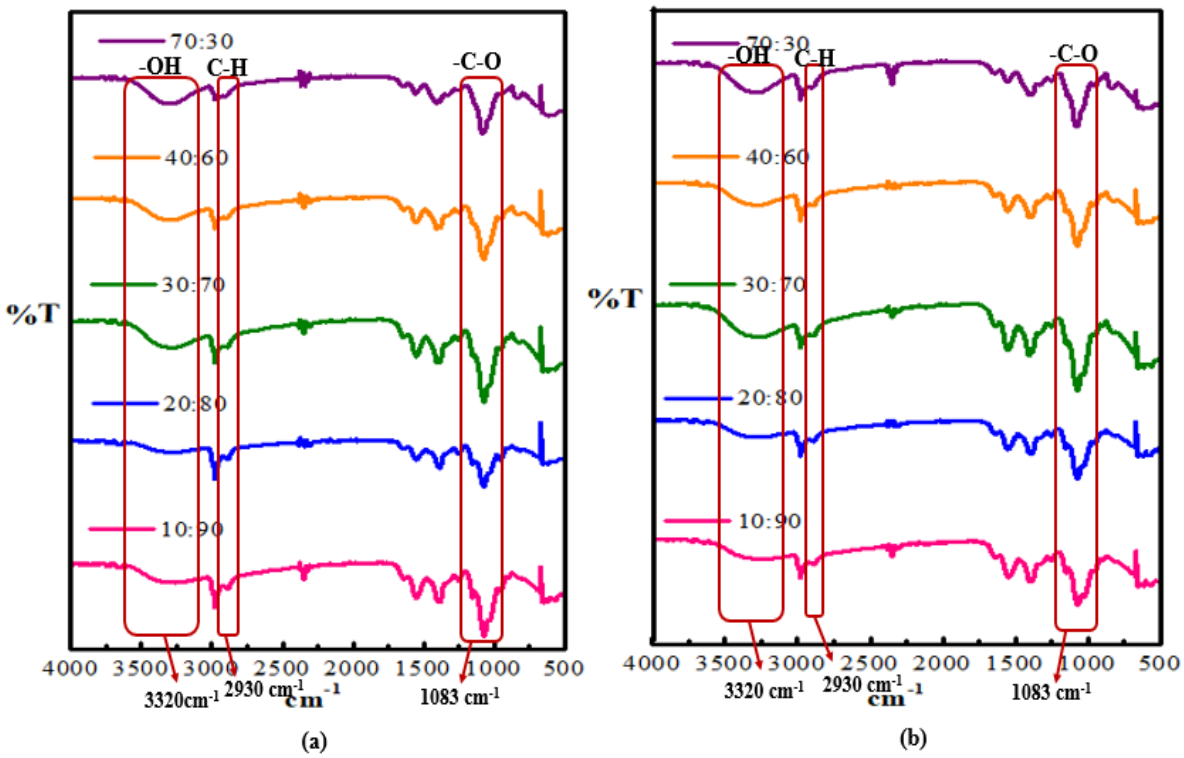
Şekil 4.7. Çapraz bağlı kitosan [58].

PVA'nın GA ile çapraz bağlanması sonucu elde edilen yapı Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



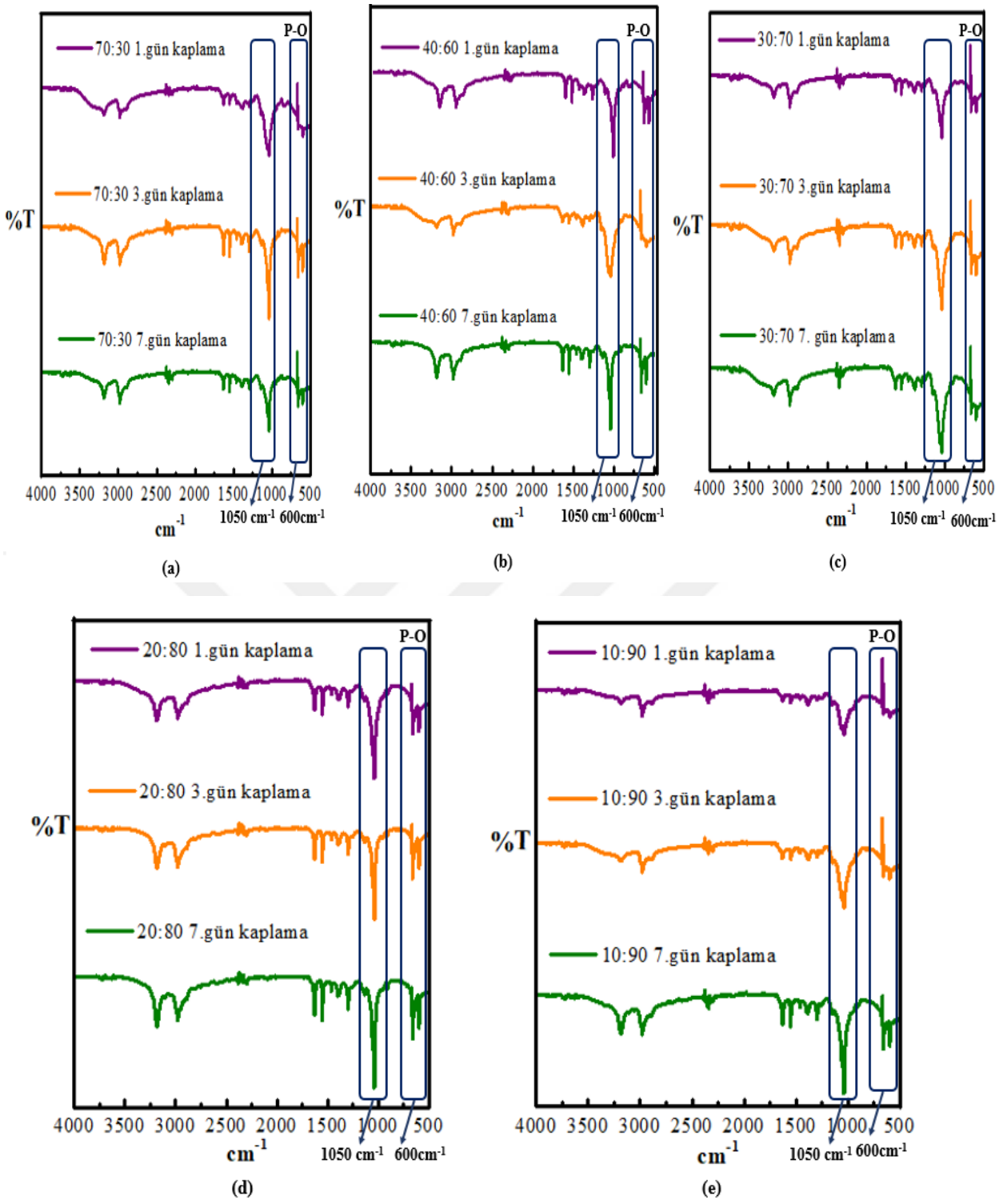
Şekil 4.8. Çapraz bağlı PVA [58].

Farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) ve GA ile çapraz bağlanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki FT-IR spekturumu Şekil 4.9'da gösterilmektedir. İki farklı kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerinin 1, 3 ve 7 gün periyotlarında hidroksiapatit ile kaplandıktan sonraki FT-IR spekturumları da sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de sunulmuştur.

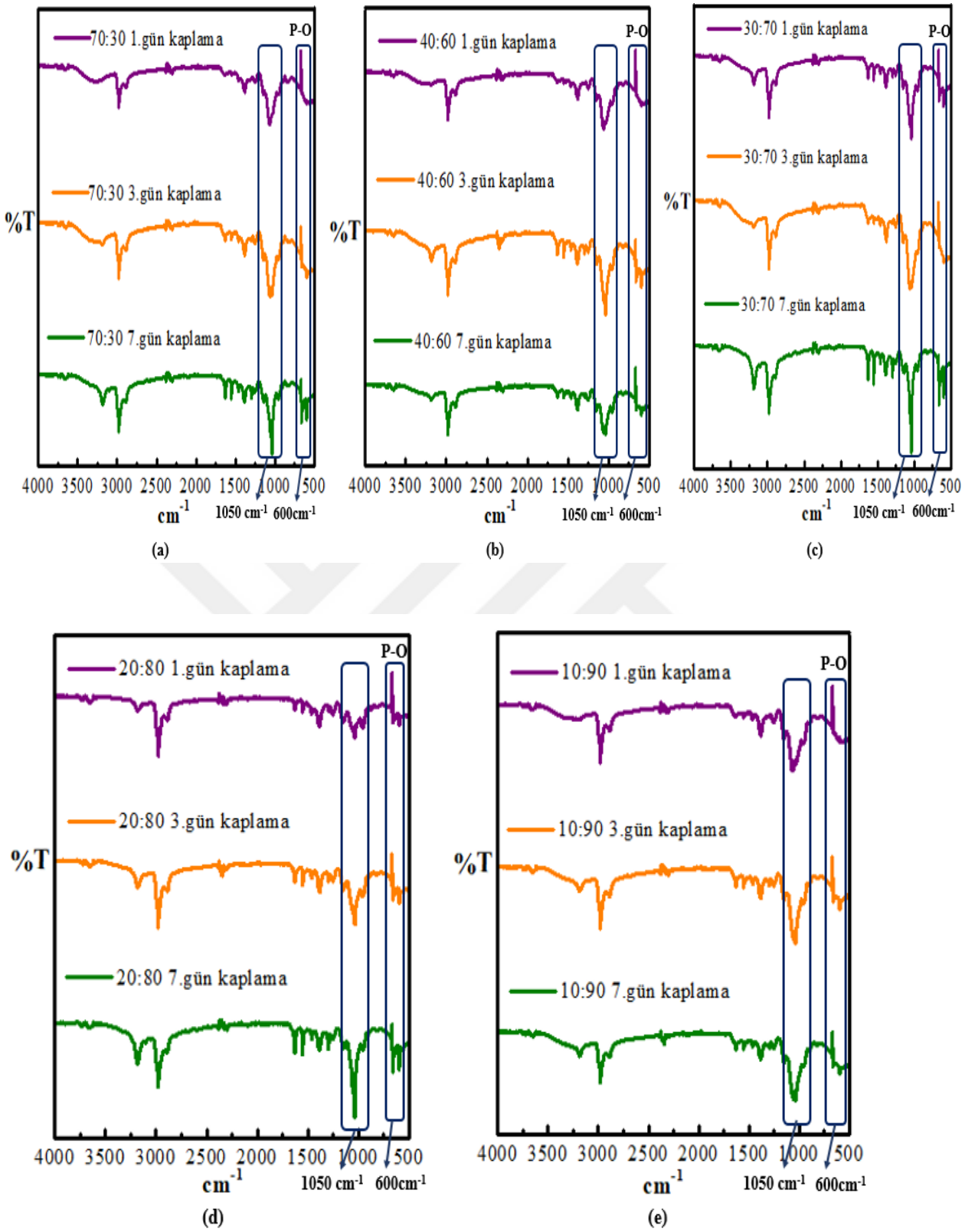


Şekil 4.9. (a) -16°C ve (b) -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki FT-IR spektrumu.

Şekil 4.9'da -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmadan önceki FT-IR spektrumları incelendiğinde, PVA 3328 cm^{-1}'de bir emilim piki göstermektedir. Bu da molekül içi hidrojen bağlanmasına ve -OH gerilim titreşime karşılık gelmektedir. Alkil gruplarından uzanan 2930 cm^{-1}'de gözlemlenen titreşim bandı C-H ile bağlantılıdır. -C-O gerilmesine denk gelen emilim 1083 cm^{-1}'de gerçekleşmektedir. Saf kitosanın FT-IR spektrumu 3320 cm^{-1}'de geniş bir bant gösterir, buda -OH gerilmesinden kaynaklanmaktadır. NH bükülmesiyle (amid II) (NH_2) grubunu gösteren bant 1560 cm^{-1}'dedir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi PVA konsantrasyonundaki azalma, 1560 cm^{-1} kitosanın NH bükülmesinden (amid II) kaynaklanan bant yoğunluğunda bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, PVA içeriği arttıkça yaklaşık 2925 cm^{-1}'de -CH grubunun yoğunluğunda bir artış gözlenmektedir [59].



Şekil 4.10. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün periyotlarda HA ile kaplandıktan sonraki FT-IR spektrumu. (a) 70:30, (b) 40:60 (c) 30:70, (d) 20:80, (e) 10:90



Şekil 4.11. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 1, 3 ve 7 gün periyotlarda HA ile kaplandıktan sonraki FT-IR spektrumu. (a) 70:30, (b) 40:60, (c) 30:70, (d) 20:80, (e) 10:90

Çapraz bağlı PVA/Kitosan kriyojellerin FT-IR spektrumda 3437 cm^{-1}'de geniş pik -NH ve -OH simetrik gerilme frekansını gösterir. 1610 cm^{-1} ve 1010 cm^{-1}'deki pikler , -C=N ve -C-O

gerilme frekanslarını, imin grubunun oluşumunu, kitosan ve PVA'nın GA ile çapraz bağlanmasını açıklamaktadır [58].

Karbonatlı HA karakterize eden CO_3^{2-} grubu ile ilgili 1410 cm^{-1}'de bant gözlemlenmiştir. 1033 cm^{-1}'deki bant P-O gerilmesine karşılık gelir. 566 ve 605 cm^{-1}'deki bantlar PO_4 grubunda P-O'nun titreşimi ile ilişkilendirilmiştir. HA karakteristik piki etrafında PO_4^{-3}'ün germe bandı Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'deki FT-IR spektrumunlarında görüldüğü gibi 1050 cm^{-1}'dir [60].

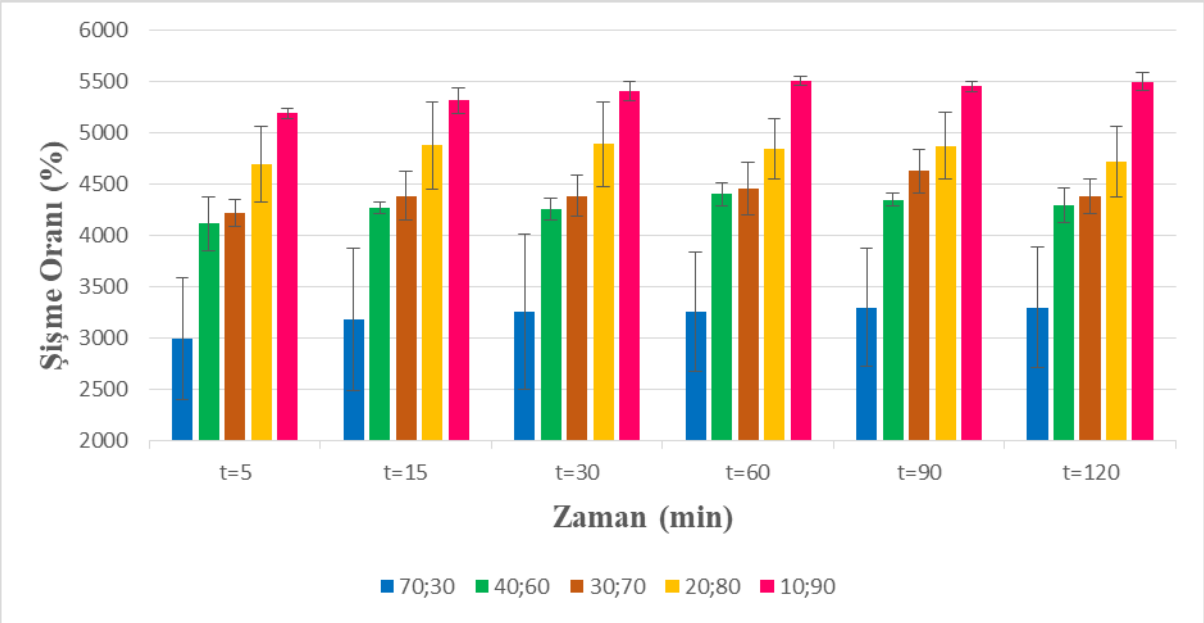
Müller ve ark., ayrıca Jalota ve ark. yaptıkları çalışmada 600 cm^{-1} civarında P-O bağlarının oluştuğunu ve sentetik vücut sıvısında bekleme süresi arttıkça piklerin şiddetlerinin arttığını belirtmişlerdir. Bunun yanında sentetik vücut sıvısı içerisindeki iyon konsantrasyonu arttığında P-O piklerinin şiddetlerinin arttığını belirtmişlerdir [42,61].

4.1.4. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Şişme Davranışı

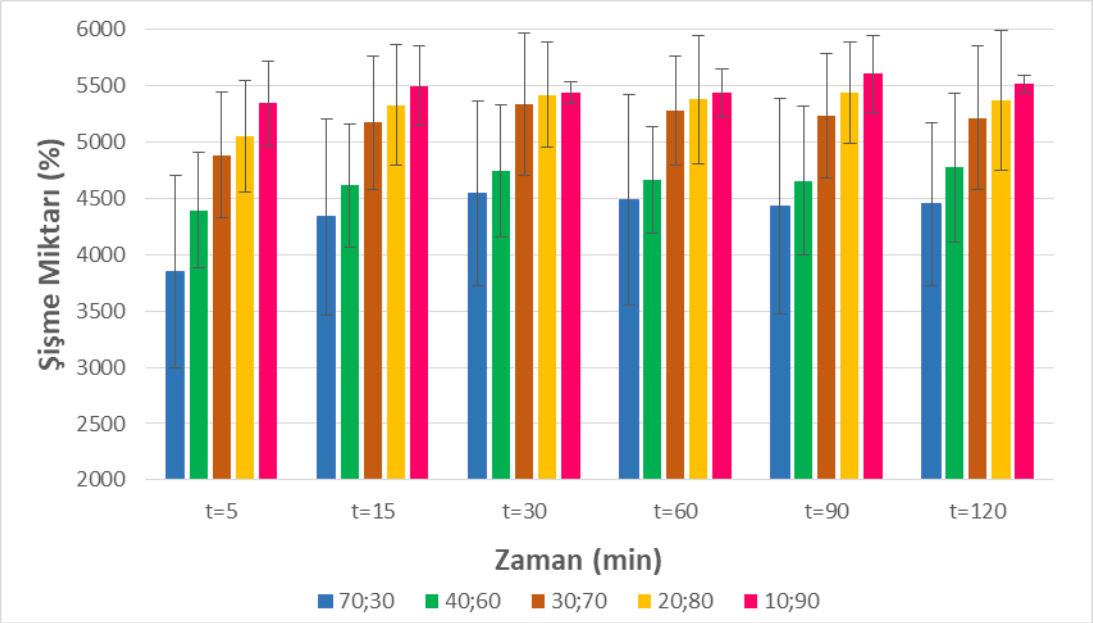
Kriyojellerin karakteristik özelliklerinden biri, bastırılarak içlerinden su çıkışı sağlandıktan sonra, tekrar suyun içine bırakıldıklarında şişmeleridir. Bu işlemin birkaç kez tekrarlanması, kriyojelin yapısının bozulmasına neden olmamaktadır.

Kriyojellerin yapılarına su alabilmeleri, gözeneklilik ve gözeneklerin birbiri ile bağlantılı oluşu hakkında bilgi verebilecek bir özelliktir. Kriyojeller, canlı dokulara kuru halde implante edildiğinde hızlı bir şekilde vücut sıvılarını emerek boşluğu doldururlar.

-16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışı Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de sunulmuştur.



Şekil 4.12. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışı.



Şekil 4.13. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışı.

Wang ve ark. yaptıkları çalışmada izoproponolün pervaporasyon (membran prosesi) giderme işlemi için farklı oranlarda Kitosan/PVA/Poliviniliden florür içi boş fiber kompozit membranlar üreterek karakterize etmişlerdir. Kitosan içeriğinin şişme davranışına etkisini incelediklerinde, kitosan içeriğinin artmasının membranların şişme davranışınıda arttırdığını ortaya koymuşlardır. Bunun sebebini ise, kitosanın yapısında bulunan pozitif yüklü amonyum tuz grubunun sudaki negatif yüklü hidroksil (-OH) iyonlarını çekerek kitosanın bünyesinde daha fazla su tutmasını sağladığı ve buna bağlı olarak da şişmenin arttığı şeklinde açıklamışlardır [62].

Tang ve ark. yaptıkları çalışmada ısıya duyarlı PVA/Kitosan hidrojellerin yapısal karakterizasyonunun incelemişlerdir. Çalışma sonucunda yapılan şişme çalışmalarında kitosan içeriğinin aynı olması durumunda PVA içeriği arttırıldığında şişme oranı azalmıştır. Bunun nedenini ise, yüksek PVA içeriğinin artışının şişme oranına olumsuz etki yapan daha yoğun jel yapısına neden olması şeklinde açıklamışlardır [63].

Chaturvedi ve ark. yaptıkları çalışmada biyomedikal uygulamalar için antimikrobiyal PVA kriyojel-bakır nanokompozitleri elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettikleri PVA kriyojel-bakır nanokompozitlerinin şişme özelliği incelediklerinde PVA içeriğinin artması ile şişme oranını azaldığı sonucuna varmışlardır [64].

Bajpai ve ark. yaptıkları çalışmada PVA/Jelatin gözenekli kriyojeller üreterek şişme davranışını incemişlerdir. Çalışma sonucunda PVA oranının artması PVA/Jelatin kriyojelinin

şişmesini azaltmıştır. Bunun sebebini PVA'nın polimerik ağ yapısından kaynaklı şişme kapasitesinin jelatine göre daha düşük olduğu şeklinde açıklamışlardır [65].

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görüldüğü üzere iki farklı (-16°C ve -8°C) kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişmesi zamanla ve kitosan oranı arttıkça artmıştır. Kitosan kriyojeller, çapraz bağlı hidrofilik matrise sahiptir. Sulu ortamda çözünmez, fakat çapraz bağ derecesine bağlı olarak oluşan gözeneklilik yapısına ve matrisin hidrofilitesine bağlı olarak şişerler. Suyun PVA/Kitosan kompozit kriyojel tarafından emilim olayı, PVA ve kitosanın kimyasal yapısıyla da ilişkilendirilebilir. PVA molekülünde PVA' nın hidroksil (-OH) grupları su molekülleri ile etkileşime girerek hidrojen bağı oluşturur. Kitosanın ise amino ($-NH_2$) grupları su molekülleri ile etkileşime girer ve hidrojen bağı oluşturur[53]. Diğer yandan kriyojelin su emilim olayı kriyojel de gözenekli ağın varlığı ile de açıklanabilir. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'ü kıyasladığımızda iki durumda da şişme zamanla ve kitosan oranı arttıkça artmaktadır. Ama -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller daha fazla şişme özelliği göstermiştir.

Nikonorov ve ark. yaptığı çalışmada çapraz bağlı kitosan kriyojellerin sentezi ve karakterizasyonu incelemişlerdir. Farklı kriyojelasyon sıcaklıklarında (-15°C, -25°C ve -30°C) çapraz bağlı kitosan kriyojeller üretmişlerdir. Çalışma sonucunda düşük sıcaklıkta kriyojelasyon işleminde büyük gözenekli jel yapılarının elde edildiği sonucuna varmışlardır. Düşük sıcaklıklarda elde edilen makro gözenekli yapılar kriyojelin şişme karakteristiği üzerinde güçlü bir etki yaratarak şişme özelliğini arttırmıştır [66].

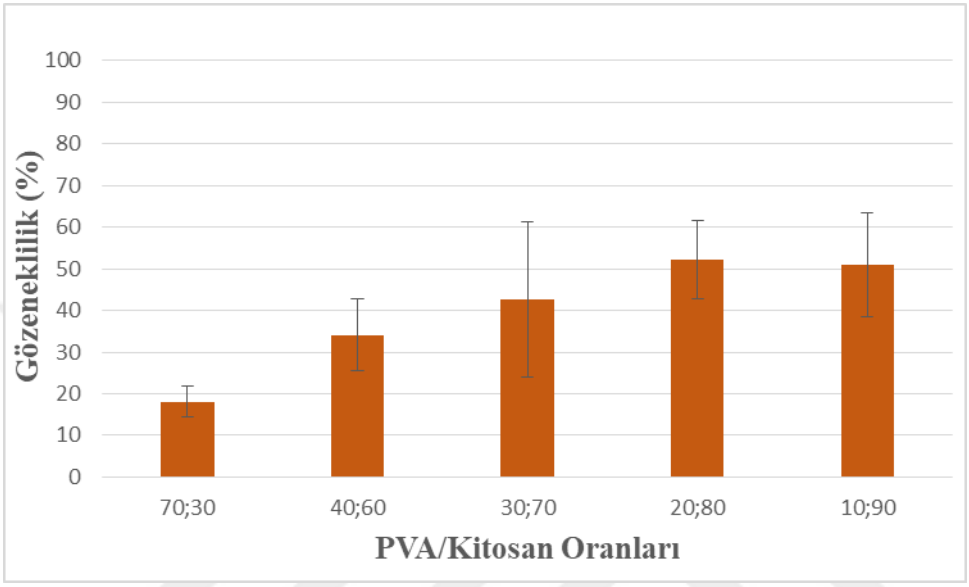
Şekil 4.13'de görüldüğü üzere -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller -16°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellere göre zamanla ve kitosan oranı arttıkça daha fazla şişme özelliği göstermektedir. Bu durum Nikonorov ve ark.'nın yaptığı çalışmada olduğu gibi gözeneklilik yapısıyla ilişkilendirilebilir. Çünkü -8°C düşük sıcaklıkta oluşan makro gözenekler daha fazla suyu içine hapsederek PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme oranını arttırmıştır.

4.1.5. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin Gözeneklilik Analizi

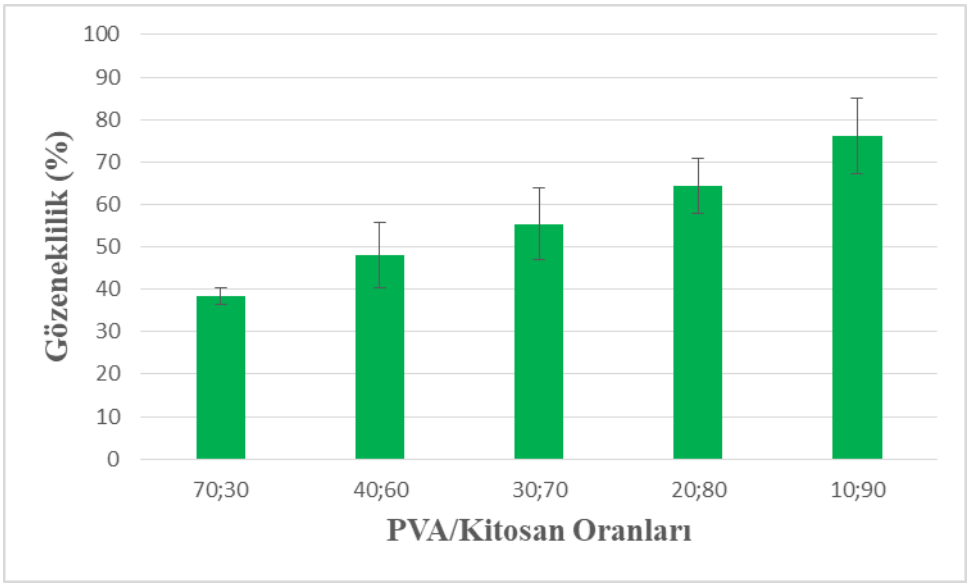
Doku mühendisliğinde doku iskelelerinin gözenekli olması önemli bir parametredir. Bu nedenle doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelelerinin, hücre büyümesi ve yeni doku matrisinin oluşumuna ortam sağlaması için, birbiri ile bağlantılı, kontrol edilebilir, yüksek gözeneklilikte ve uygun gözenek büyüklüklerinde bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Gözenekler hücreler için besin temin edebilmesi ve atıkların uzaklaştırılması, hücrelerin doku

iskelesinin iç bölgelerine yapışıp, yayılması ve üremesi, damarlaşmanın gerçekleşmesi için oldukça önemlidir.

-16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de sunulmuştur.



Şekil 4.14. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği.



Şekil 4.15. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin gözenekliliği.

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de görüldüğü üzere kitosan oranının artması ve farklı kriyojelasyon sıcaklıkları (-16°C ve -8°C) gözeneklilik üzerinde önemli derecede etkili olmuştur. Şekil 4.15'de, -8°C kriyojelasyon sıcaklığında gözeneklerin büyüyerek daha gözenekli bir yapıda PVA/Kitosan kompozit kriyojel elde edildiği görülmektedir.

PVA toksik olmayan, suda çözünen sentetik bir polimerdir. Kitosan ise kitinden elde edilen doğal bir polimerdir, günümüzde doku ve organ rejenerasyonu için doğal polimerler yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü bunlar hücre eklentisini ve farklılaşma fonksiyonunu sürdürmeyi kolaylaştırmaktadır. PVA kitosana göre daha az gözenekli yapıya sahiptir [67].

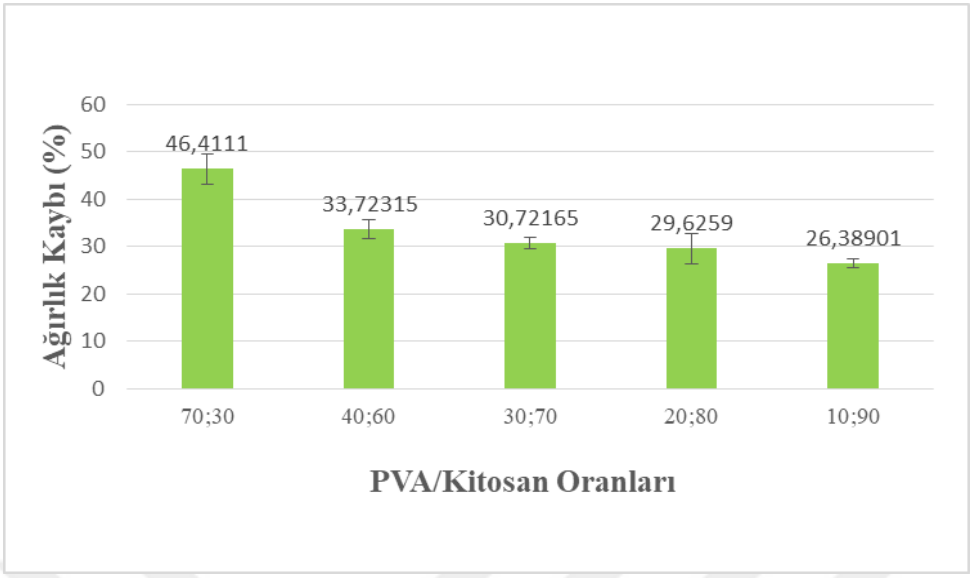
Chae ve ark. yaptıkları çalışmada basit bir yöntem kullanarak hava ve çoklu çözücü karışımları ile akciğer epitel sistemde kullanmak üzere çok ince ve gözenekli PVA matrisi elde etmişlerdir. Chae ve ark. yaptıkları bu çalışmada dondurma çözdürme, eriyik kalıplama, parçacık eritme gibi farklı yöntemler kullanarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere gözenekli PVA matrisinin elde edilebileceğini savunmuşlardır. Çalışma sonucunda elde ettikleri ince ve gözenekli PVA matrisi, akciğer epitel sisteminin etkin bir fonksiyonel modelini sağlamıştır [67].

Kanimozhi ve ark. dondurarak kurutma yöntemiyle yaptıkları çalışmada gözenekli PVA/Kitosan/Metilselüloz kompozit doku iskelelerini üretmişlerdir. Çalışmanın sonucunda yapılan gözeneklilik çalışmalarında, PVA tek başına değil de kitosan ve metilselüloz eklendiğinde gözenekliliğinin oldukça artığı sonucuna varmışlardır [68]

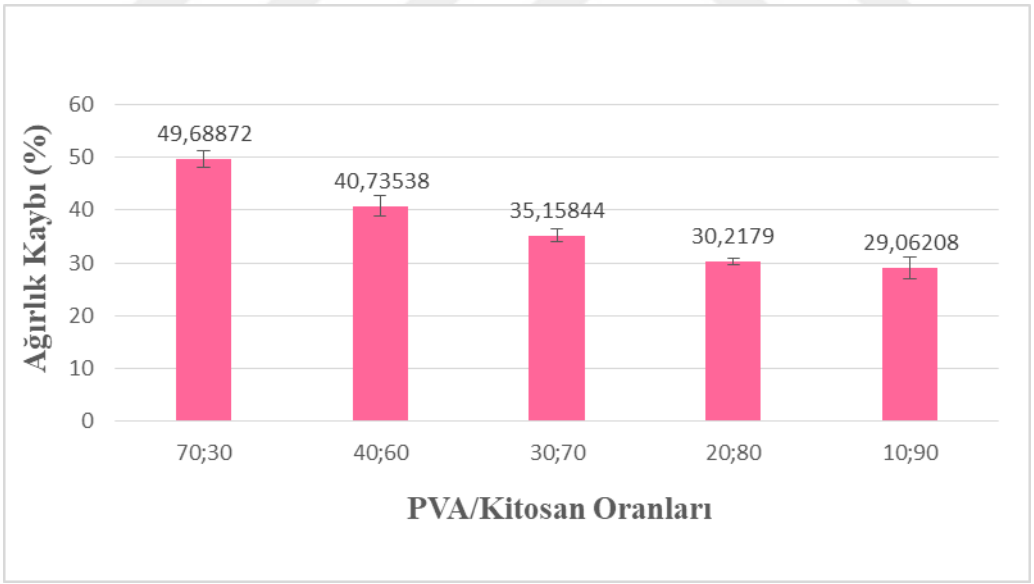
Chae ve ark. ayrıca Kannimozhi ve ark. yaptıkları çalışmalarda da görüldüğü gibi kullanılan yöntem ve kitosan oranı gözenekliliği etkilemektedir. Gözeneklilik çalışmasında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelleri üzerinde farklı kriyojelasyon sıcaklıklarında (-16°C ve -8°C) gözenekliliğin etkisine bakılmıştır. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de görüldüğü üzere farklı kriyojelasyon sıcaklıkları gözenekliliği oldukça etkilemiştir. Her iki durumda (-16°C ve -8°C) gözeneklilik kitosan oranı arttıkça artmıştır. Fakat iki farklı sıcaklıklarda elde edilen gözeneklilik sonuçları karşılaştırıldığında gözeneklilik Şekil 4.15'de görüldüğü gibi -8°C kriyojelasyon sıcaklığında daha da çok artmıştır. Bu durum PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin şişme davranışlarıyla da ilişkilendirilebilir. -8°C'de büyüyen gözenekler şişmeyi de arttırmıştır (Şekil 4.13).

4.1.6. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin İn Vitro Degradasyonun İncelenmesi

PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin degradasyon çalışmaları 37°C'de su banyosu içerisinde 3 gün de gerçekleştirilmiştir. -16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 3. gün degradasyon sonucunda elde edilen degradasyon davranışları Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.16. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerinin 3. gün sonunda ağırlık kaybı grafiği.



Şekil 4.17. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 3. gün sonunda ağırlık kaybı grafiği.

-16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA / Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 3. gün sonunda degradasyon miktarları verilmiştir (Şekil 4.16, 4.17).

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de görüldüğü üzere kitosan oranının artması yapıyı iyileştirerek iki farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) degradasyonu azaltmıştır.

Silva ve ark. yaptıkları liyofilizasyon ile elde edilen Kitosan/PVA/biyoaktif cam hibrid iskelelerin sentezi, karakterizasyonu ve sitotoksisitesi çalışmalarında Kitosan/PVA farklı molar oranlarda (3:1 ve 1:1) hazırlayarak, GA ile çapraz bağlamışlardır. Yapılan degradasyon çalışması sonucunda kitosan oranı (3:1) yüksek olan hibrid malzemenin degradasyon oranı düşük çıkmıştır. Bunun sebebini ise, kitosanın amino grubunun GA ile çapraz bağlı C=N grubu oluşturmasıyla yapının güçlendiği ve buna bağlı olarak degradasyonun azaldığı şeklinde açıklamışlardır [69].

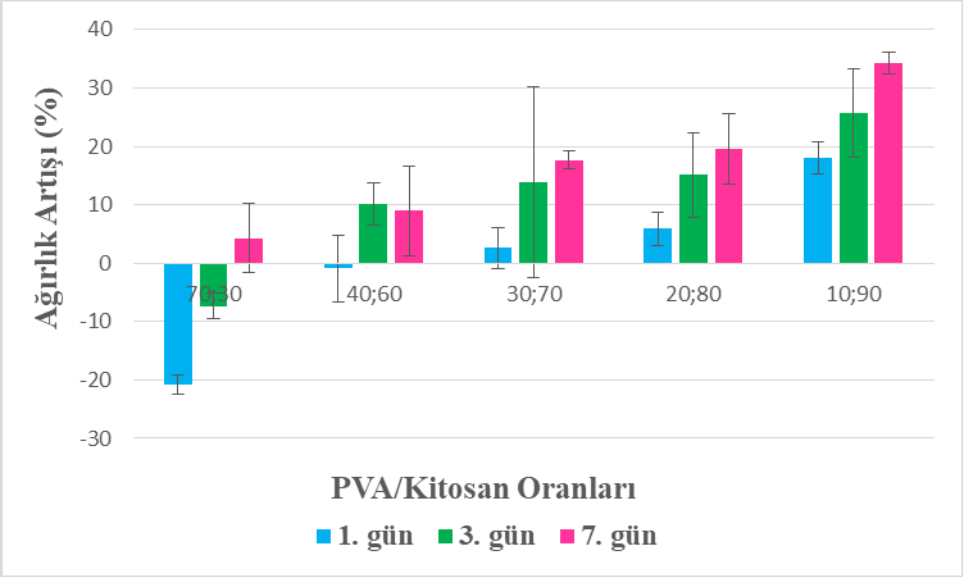
Zhu ve ark. Poli(L-laktik)(PLLA)/Kitosan mikroküreleriniin in vitro degradasyonunu araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda sentetik PLLA'nın biyolojik uyumluluk, mekanik özellikler gibi bazı dezavantajlarının kitosan mikro küreleri ile giderildiği sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte elde edilen malzemenin degradasyonunu incelediklerin de PLLA tek başına daha hızlı degradasyona uğramıştır. Fakat PLLA'ya kitosan mikroküreleri eklendiğinde degradasyonun azaldığı sonucuna varılmıştır [70].

Silva ayrıca Zhu ve ark. yaptıkları çalışmalarda da görüldüğü üzere sentetik bir polimer olan PVA'nın özelliklerini doğal bir polimer olan kitosan iyileştirebilmektedir. Bu nedenle her iki kriyojelasyon sıcaklığında Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de kitosan oranın artması yapıyı daha sağlam hale getirerek degradasyonu azaltmıştır.

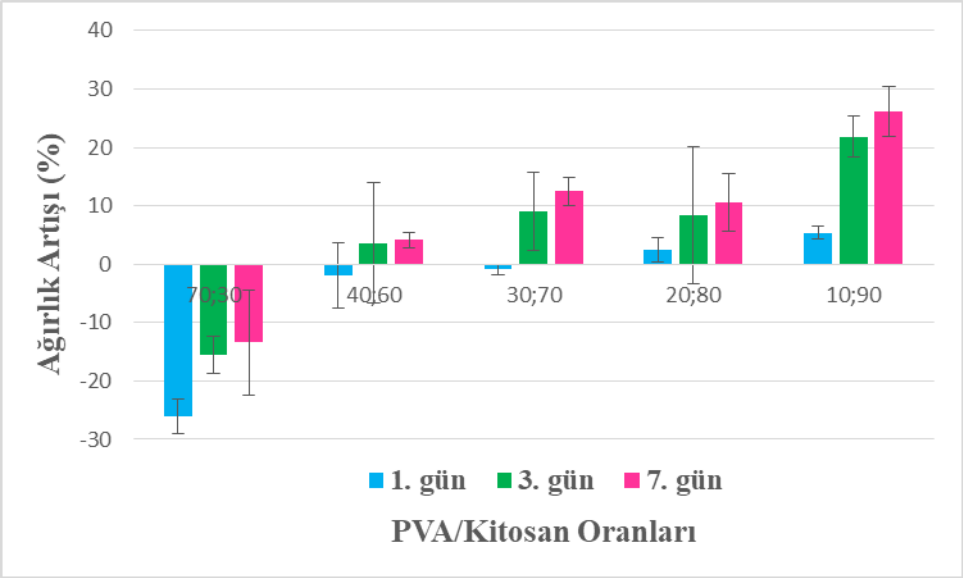
Degradasyonun nedeni, polimerin çözücünün içinde çözülmesi, polimerik malzemeler arasındaki bağın parçalanması olabilir. PVA suda çözünen sentetik bir polimerdir kimyasal yapısından dolayı hidroksil (-OH) grupları ile karşılaştığında polimer zinciri suyun içerisinde çözülebilir, bu nedenle PVA degradasyona uğrayabilir. Yüksek kimyasal stabiliteye sahip polimerler degradasyona karşı dirençlidir. Kitosan yapısal olarak yüksek kimyasal stabiliteye sahip doğal bir polimerdir. Bu sebepten dolayı degradasyonunun PVA'ya göre daha yavaş olduğu söylenebilir. -8°C'de üretilen PVA/Kitosan kriyojeller genel olarak daha hızlı degradasyona uğramıştır. Bu durum gözeneklilik ile ilişkilendirilebilir (Şekil 4.15). Çünkü -8°C kriyojelasyon sıcaklığında elde edilen fazla gözenekli yapı şişmeyi arttırarak üretilen kriyojel içerisinde daha fazla su tutulmasını sağlamıştır (Şekil 4.13).

4.1.7. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplanması Sonucu Ağırlık Artışının İzlenmesi

Sentetik vücut sıvısı (2xSBF) içerisinde belirli sürelerde (1. 3. ve 7. gün) HA ile kaplanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin ağırlık artışı takip edilmiştir. HA ile kaplama sonucunda elde edilen ağırlık artışı grafikleri Şekil 4.18 ve 4.19'da sunulmuştur.



Şekil 4.18. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmasından sonra ağırlık artışı grafiği.



Şekil 4.19. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmasından sonra ağırlık artışı grafiği.

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilen HA ile kaplama sonucu ağırlık artışı grafiklerinde kitosan oranı ve kaplama süresi arttıkça kaplama miktarları artmıştır. Bunu bağlı olarak ağırlık artışı meydana gelmiştir. Her iki kriyojelasyon sıcaklığında da kaplama sonrası 70:30 PVA/Kitosan oranında ağırlık artışı beklenirken, ağırlığında azalma meydana gelmiştir. Bu durum 70:30 PVA/Kitosan kompozit kriyojelin degradasyona uğradığını göstermektedir.

Cai ve ark. yaptıkları çalışmada, doku iskeleleri üzerine kaplama süresi ve SBF konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda kaplama süresi arttıkça ağırlık artışı gözlendiğinin ve SBF konsantrasyonu arttıkça da ağırlık artışının daha hızlı bir şekilde gerçekleştiğinin sonucuna varmışlardır [71].

Cai ve ark yaptıkları çalışmaya paralel olarak, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da iki farklı kriyojelasyon sıcaklığında kaplama süresi boyunca (1, 3 ve 7 gün) ağırlık artışı gözlemlenmiştir ve en yüksek kaplama miktarına 7. gün sonunda ulaşılmıştır.

Kitosanın avantajı hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemesidir. Kitosanın bu durumu kimyasal özelliğinden kaynaklanmaktadır. Kitosanın polisakkarit omurgası yapısal olarak kemik ve kıkırdağın ekstraselüler matriksinin ana bileşeni olan glikozaminoglikonlara benzemektedir. Diğer bir avantajı ise kemik oluşumunu geliştirmek için birbirine bağlı gözenekli iskele formlarını oluşturmasıdır [72]

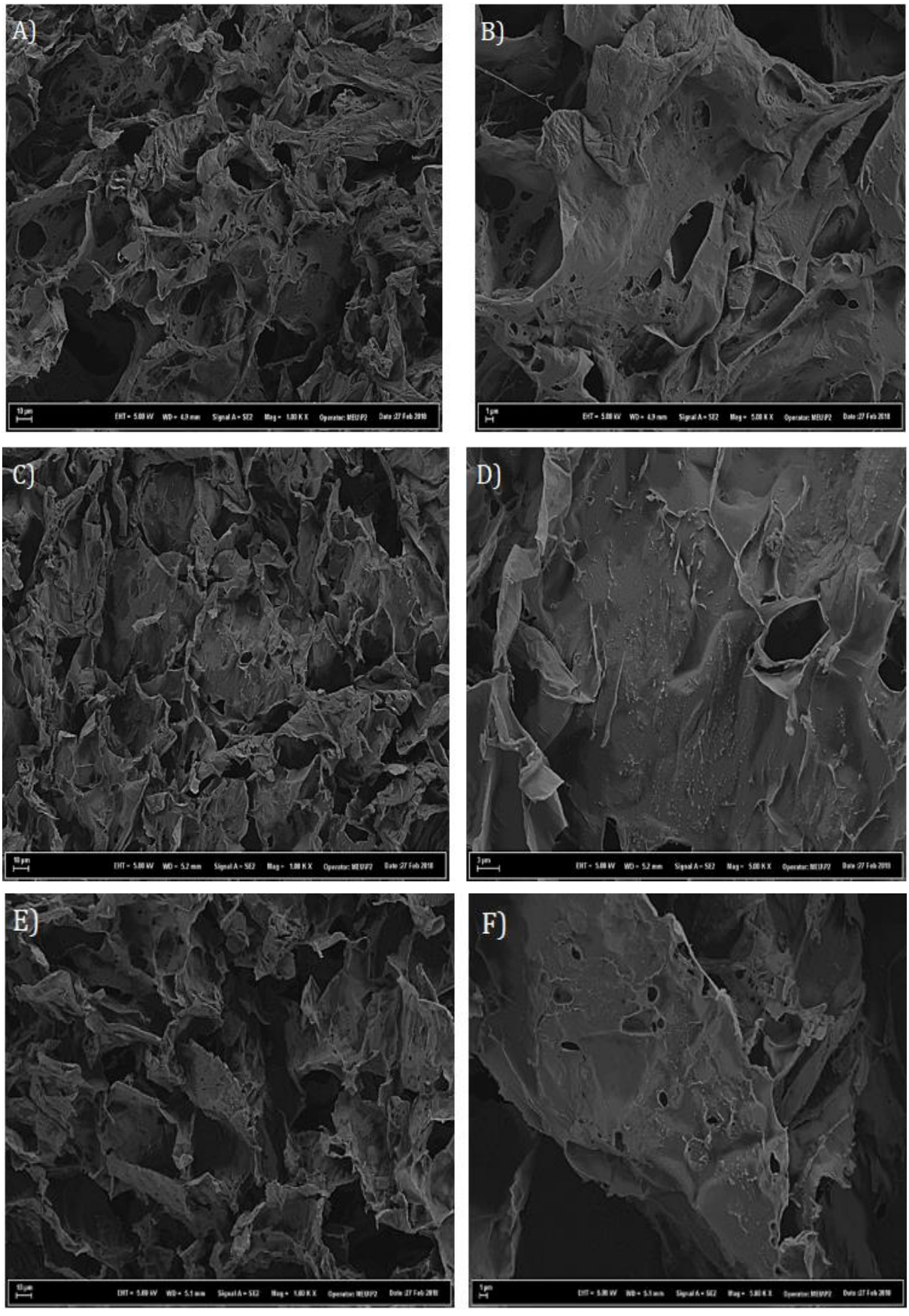
Thein-Han ve ark. yaptıkları çalışmada kemik doku mühendisliği için kitosan/nanoHA kompozit doku iskelesi üretmişlerdir. Çalışma sonucunda saf kitosana göre nanoHA eklenmiş kompozit iskeleleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Biyolojik olarak bozunabilir kitosan/nanoHA kompozit iskeleler saf kitosana göre üstün mekanik özellik, fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Thein-Han ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda kitosan/nanoHA kompozitinin kemik rejenerasyonu için potansiyel bir malzeme olduğu sonucuna ulaşmışlardır [72].

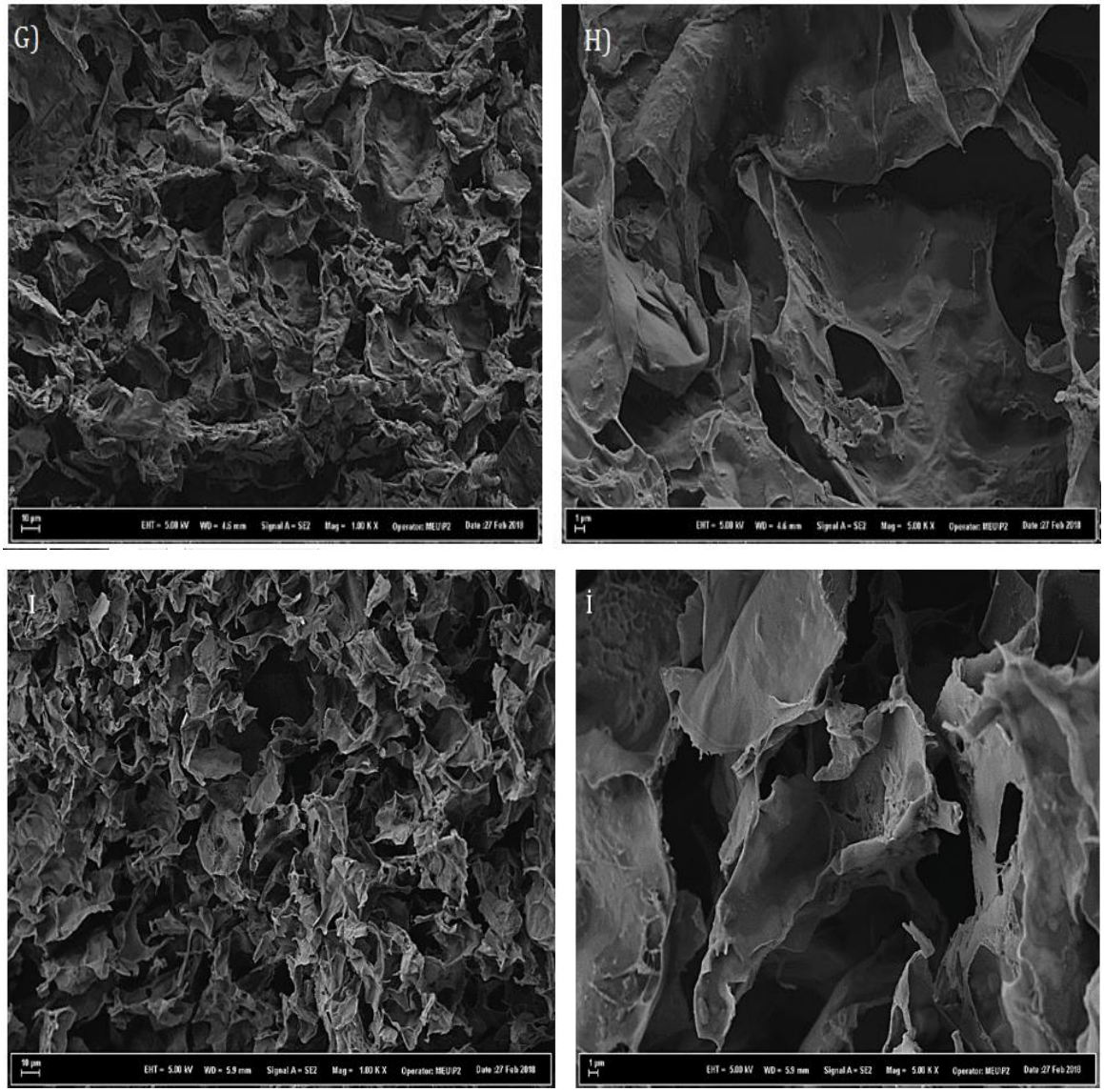
Doğal bir polimer olan kitosan, kemiğin inorganik kısmını oluşturan HA ile oldukça benzer kimyasal özelliklere sahiptir. Kitosan ve HA arasındaki bu uyum kitosanın daha fazla kaplanmasını sağlayabilir. Bu durum, kitosan oranının artmasının kaplama miktarını arttırdığı şeklinde açıklanabilir (Şekil 4.18, 4.19).

4.1.8. SEM Analizi

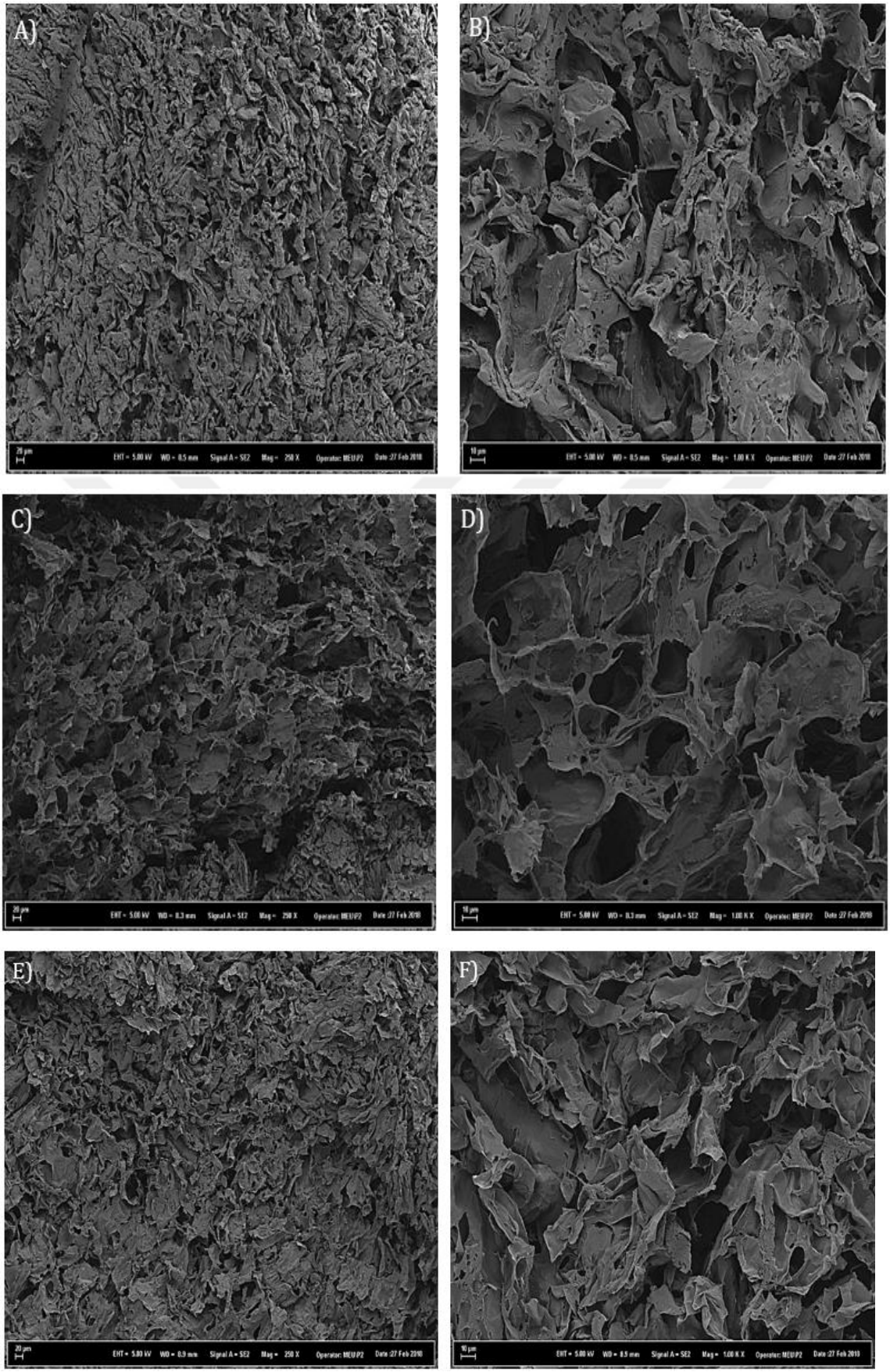
4.1.8.1. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplamadan önceki SEM görüntüleri

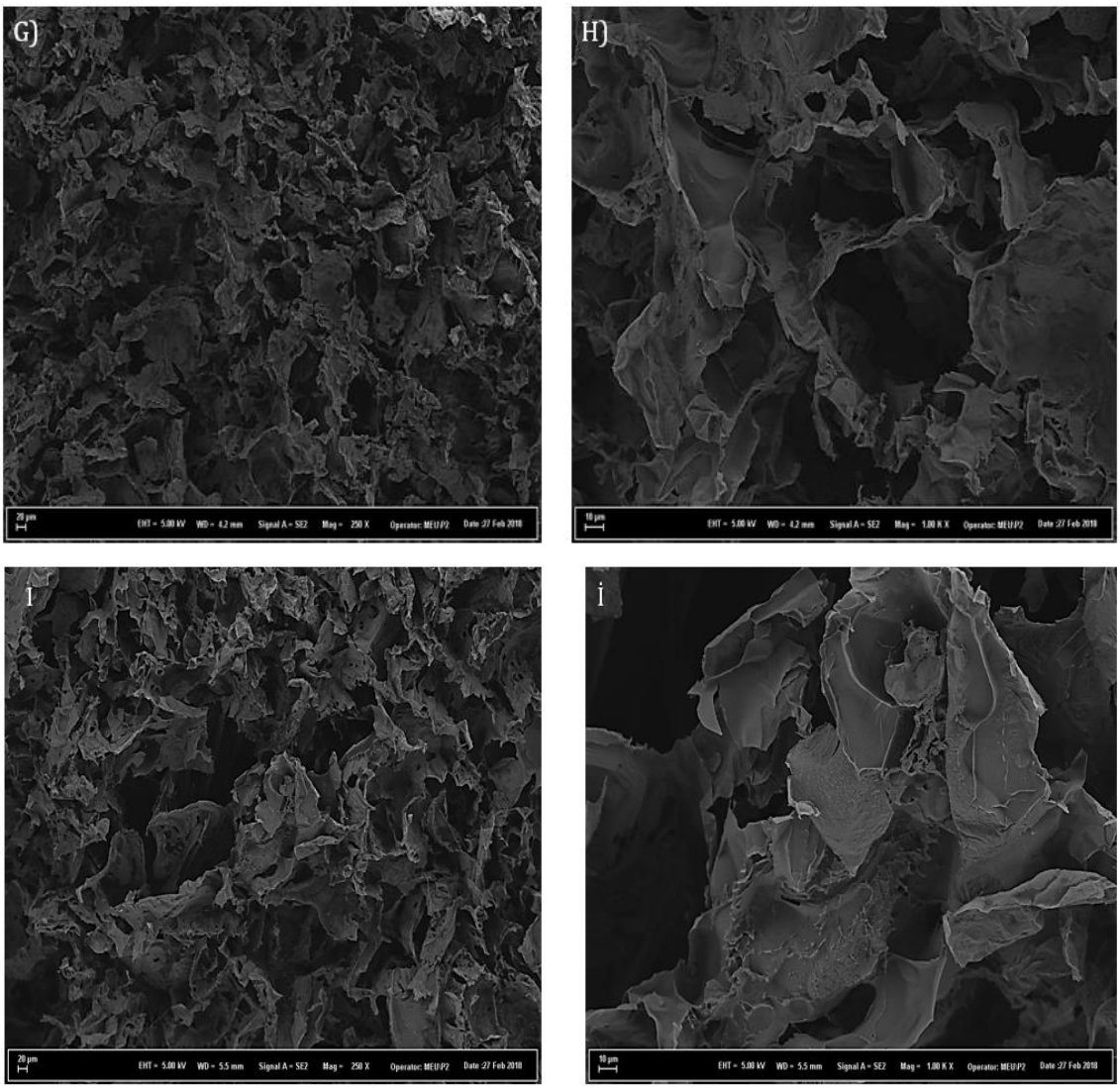
PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmadan önceki morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. -16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) üretilen kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmadan önce SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de sunulmuştur.


A)
B)
C)
D)
E)
F)



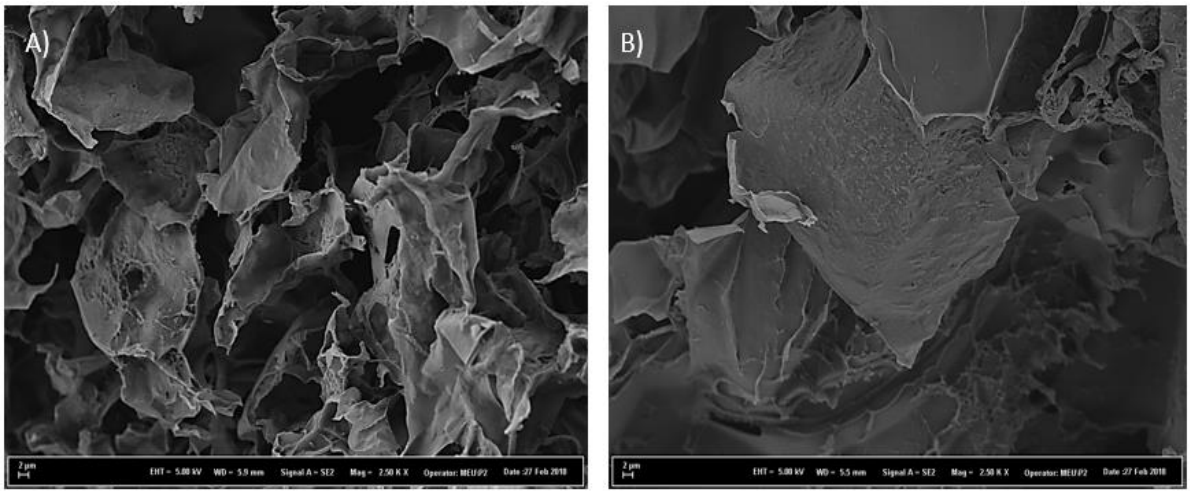
Şekil 4.20. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla, 70:30 PVA/Kitosan A) x1000 B) x5000, 40:60 PVA/Kitosan C) x1000 D) x5000, 30:70 PVA/Kitosan E) x1000 F) x5000, 20:80 PVA/Kitosan G) x1000 H) x5000, 10:90 PVA/Kitosan I) x1000 İ) x5000, büyütmede SEM görüntüleri.


A)
B)
C)
D)
E)
F)



Şekil 4.21. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sırasıyla, 70:30 PVA/Kitosan A) x250 B) x1000, 40:60 PVA/Kitosan C) x250 D) x1000, 30:70 PVA/Kitosan E) x250 F) x1000, 20:80 PVA/Kitosan G) x250 H) x1000, 10:90 PVA/Kitosan I) x250 İ) x1000, büyütmede SEM görüntüleri.

Estrada ve ark. yaptıkları çalışmada kitosan/poli (D, L-laktit-ko-glikolit) (Ch/DLPLG) gözenekli kompozit iskeleleri üretmişlerdir. Üretilen iskelelerin in vitro biyoaktivite değerlendirmesini, 1.5xSBF çözeltisinde 28 gün beklettikten sonra elde ettikleri apatit tabakalarını analiz ederek gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda gözeneklilik yüzdesi kitosan içeriği arttıkça artmıştır. Kitosan içeriği arttıkça daha yüksek gözenekli kitosan/poli (D, L-laktit-ko-glikolit) kompozit iskele yapıları elde etmişlerdir [73].



Şekil 4.22. A) -16°C ve B) -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin kaplanmadan önceki x2500 büyütmede SEM görüntüsü.

Her iki kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin farklı (x250, x1000 ve x5000) büyütmelerde SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.20, 4.21) gözenekler kitosan oranı arttıkça artmıştır. Diğer SEM görüntülerinden farklı bir büyütmede (x2500) yapılan SEM görüntüsünde, iki farklı sıcaklıkta üretilen 10:90 PVA/Kitosan kompozit kriyojelini kıyasladığımızda büyük gözenekler -8°C'de, 10:90 PVA/Kitosan oranında elde edilmiştir (Şekil 4.22).

Nikonorov ve ark. yaptıkları çalışmada düşük sıcaklıkta kriyojelasyon işleminde büyük gözenekli jel yapılarının elde edildiği sonucuna varmışlardır [66]. Nikonorov ve ark. yaptıkları çalışmaya parelel olarak, -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin x250 ve x1000 büyütmede SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.21) gözenekler -16°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellere göre daha çok büyümüştür. Bu durum gözeneklilik için yapılan çalışmalarda -8°C elde edilen makro gözenekli yapıyı destekler niteliktedir (Şekil 4.15). Ayrıca gözenekliliğin -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerde artmış olması şişme oranının artmasına neden olmaktadır (Şekil 4.13).

SEM analizi sonucu, gözenek büyüklükleri kantitatif olarak 20 tane gözenek büyüklüğünün ölçülüp ortalamasının alınmasıyla hesaplanmıştır. -16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında ve farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki gözenek büyüklükleri ortalaması Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

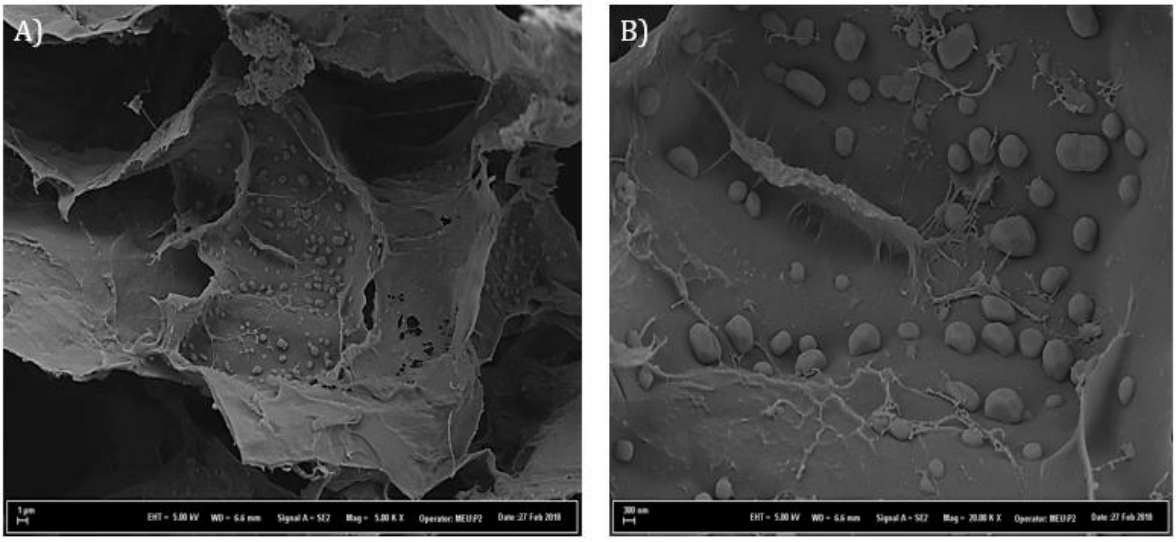
Tablo 4.2. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplanmadan önceki gözenek büyüklüklerinin ortalaması.

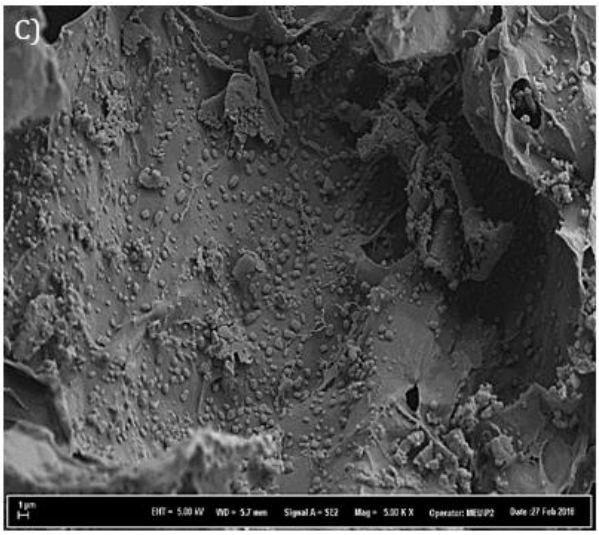
PVA/Kitosan Oranları	-16°C'de gözenek büyüklüğü ortalaması (μm)	-8°C'de gözenek büyüklüğü ortalaması (μm)
70:30	14.900±2.078	20.818±2.868
40:60	22.093±4.763	31.995±4.292
30:70	28.235±5.632	35.550±5.514
20:80	30.158±3.232	44.233±7.186
10:90	37.347±7.539	61.066±16.735

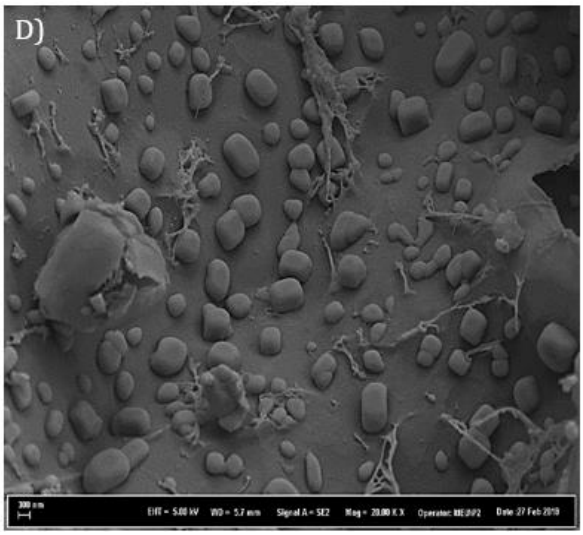
Tablo 4.2'de verilen gözenek büyüklüğü ortalaması verileri incelendiğinde -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen kriyojeller, -16°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellere göre gözenek büyüklüğü ortalamaları daha yüksektir. Kitosan oranı arttıkça gözenek büyüklüğü ortalamasıda artmıştır. En fazla gözenek büyüklüğü ortalaması -8°C'de 10:90 PVA/Kitosan oranında 61.066±16.735 μm olarak elde edilmiştir.

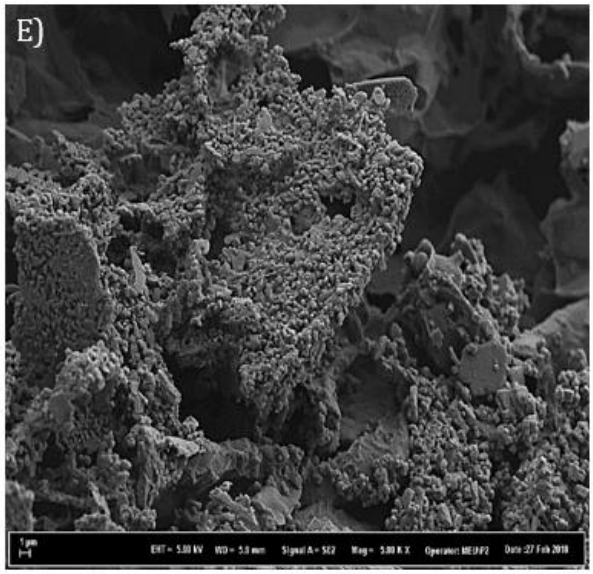
4.1.8.2. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplandıktan sonraki SEM görüntüleri

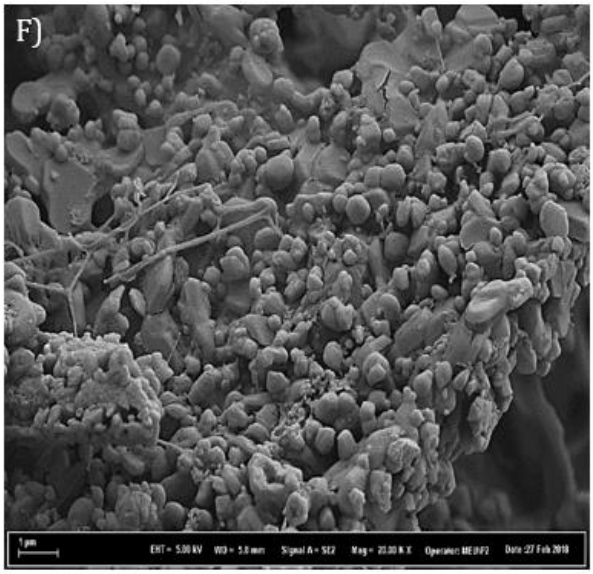
Her iki kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) ve farklı PVA/Kitosan oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplama sonrası yapısındaki değişiklikler SEM görüntüleriyle incelenmiştir (Şekil 4.23, 4.24).



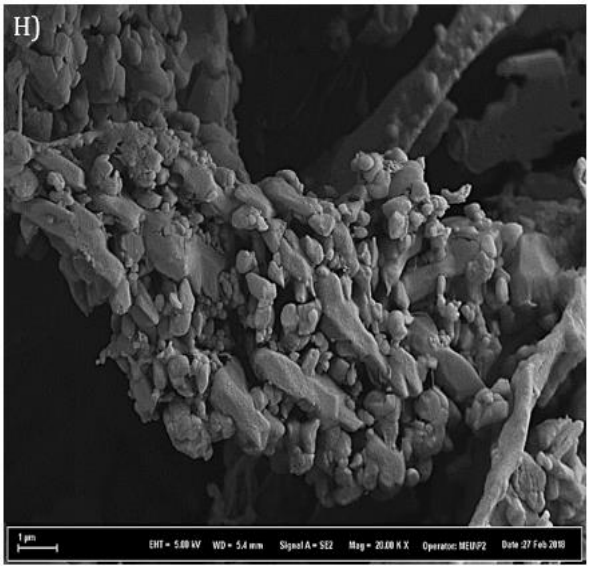

C)

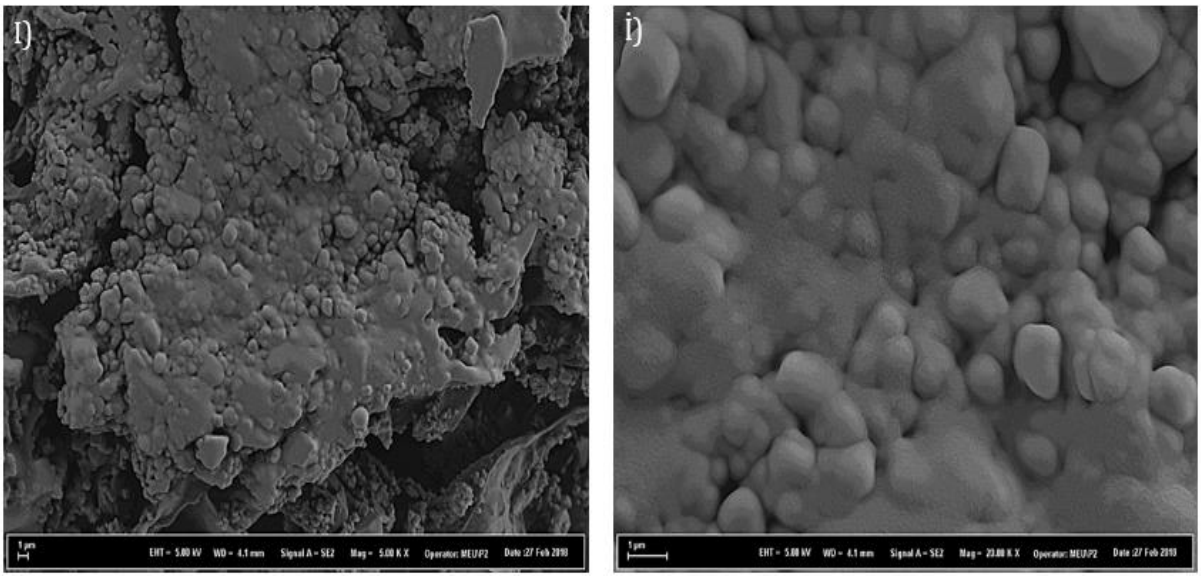

D)


E)

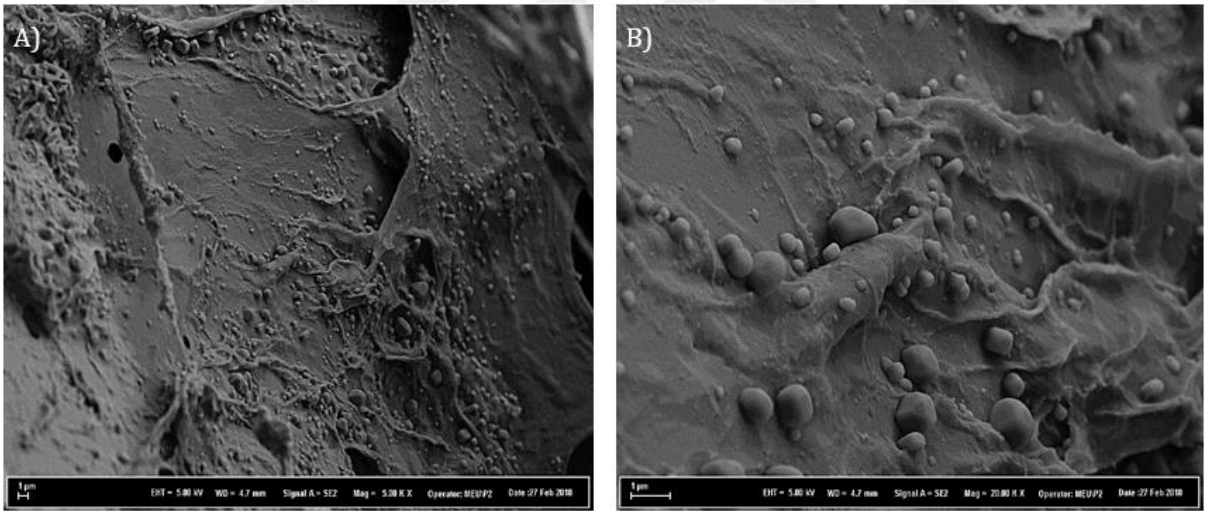

F)

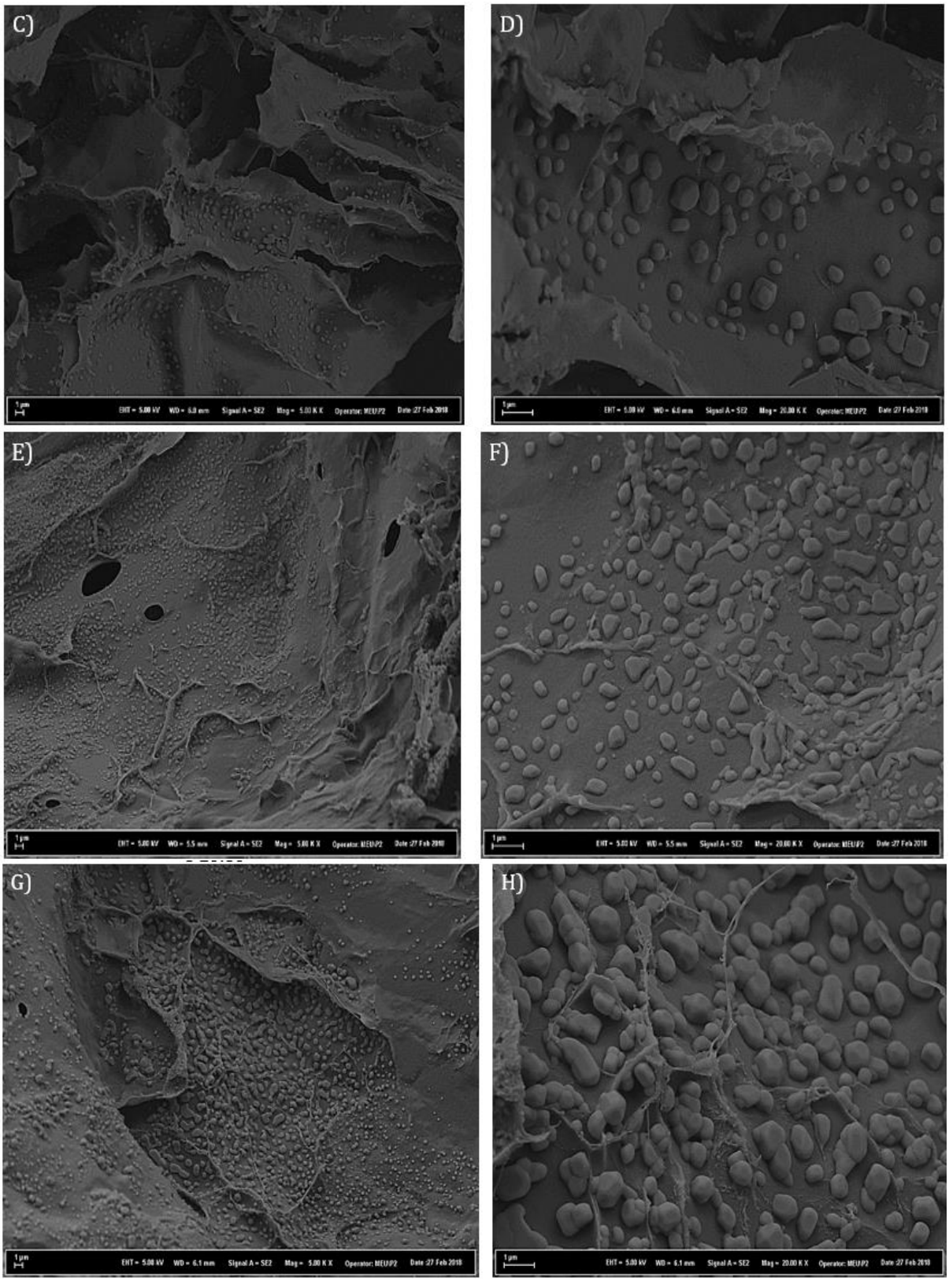
G)

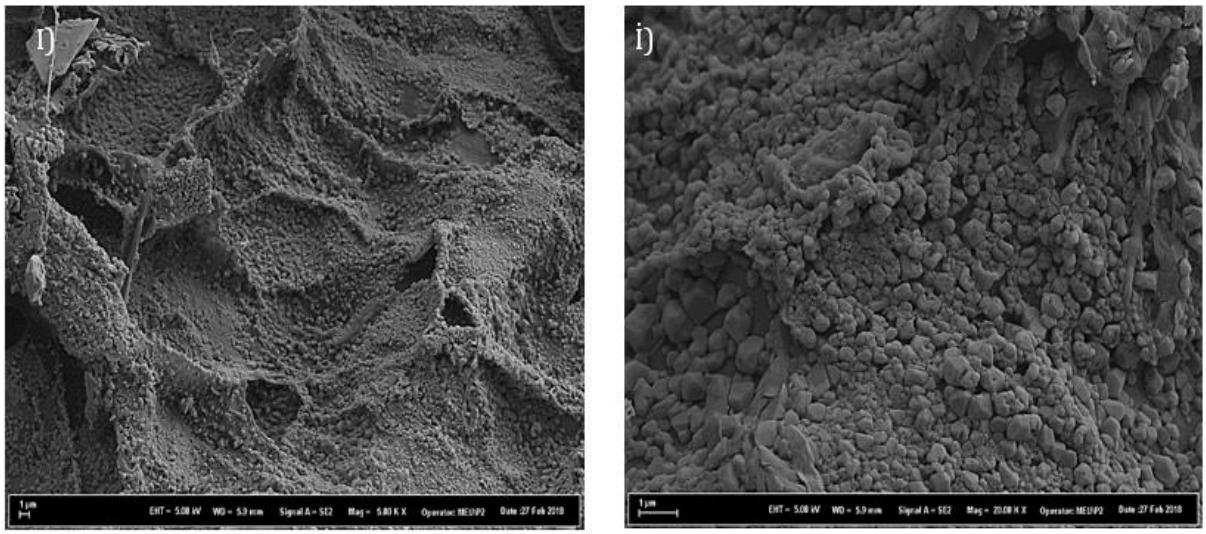

H)



Şekil 4.23. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7 gün HA ile kaplama sonrası sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan A) x5000 B) x20000, 40:60 PVA/Kitosan C) x5000 D) x20000, 30:70 PVA/Kitosan E) x5000 F) x20000, 20:80 PVA/Kitosan G) x5000 H) x20000, 10:90 PVA/Kitosan I) x5000 İ) x20000 büyütmede SEM görüntüleri.




C)
D)
E)
F)
G)
H)



Şekil 4.24. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7 gün HA ile kaplama sonrası sırasıyla 70:30 PVA/Kitosan, A) x5000 B) x20000, 40:60 PVA/Kitosan C) x5000 D) x20000, 30:70 PVA/Kitosan E) x5000 F) x20000, 20:80 PVA/Kitosan G) x5000 H) x20000, 10:90 PVA/Kitosan I) x5000 İ) x20000 büyütmede SEM görüntüleri.

Kaplamadan sonra SEM görüntüleri incelendiğinde her iki kriyojelasyon sıcaklığında kaplama süresi ve kitosan oranı arttıkça kaplama miktarı artmıştır. En yüksek kaplama miktarına 7. gün sonunda ulaşılmıştır. HA kaplamayla ağırlık artışı çalışmalarında en fazla ağırlık artışının 7. gün sonunda elde edilmesi kaplama miktarının 7. gün sonunda arttığı ve böylelikle kaplamayla birlikte ağırlık artışınında meydana geldiği sonucunu destekler niteliktedir (Şekil 4.18, 4.19).

Kim ve ark. yaptıkları çalışmada ürettikleri Poli Laktik-co-Glikolik Asit/nanoHA (PLGA/HA) kompozit iskeleleri 1xSBF ve 5xSBF konsantrasyonlarında hazırladıkları çözeltilere 1 ve 5 günlük periyotlarda daldırarak Poli Laktik-co-Glikolik Asit/nanoHA (PLGA/HA) kompozit iskelelerin HA ile kaplanmasını sağlamaya çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda, 5xSBF çözeltisine daldırılan PLGA/HA iskeleleri üzerinde oluşan apatit oluşumunun, 1xSBF çözeltisine daldırılan PLGA/HA iskelelerinden daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Yalnızca 5 günlük süre sonunda apatit kristallerinin sayısı ve büyüklüğünün arttığını gözlemlemişlerdir. Bu sebepten dolayı kaplamanın süreyle de ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır [74].

Kaplama sonrası SEM analizi sonucu, gözenek büyüklükleri kantitatif olarak 20 tane gözenek büyüklüğünün ölçülüp ortalamasının alınmasıyla hesaplanmıştır. -16°C ve -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, farklı PVA/Kitosan oranlarında (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplandıktan sonraki gözenek büyüklükleri ortalaması Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

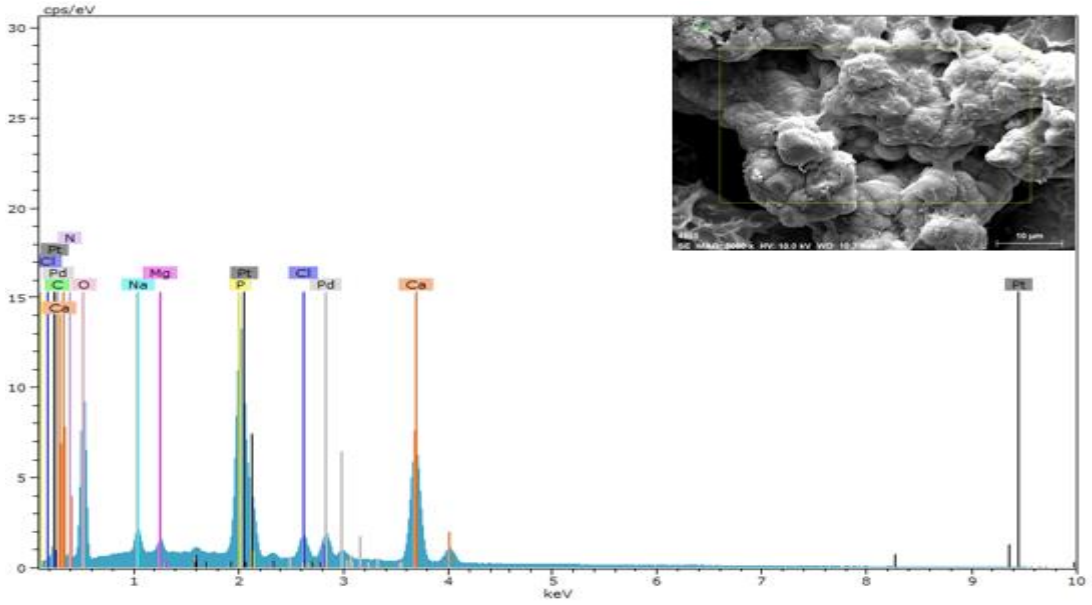
Tablo 4.3. PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin hidroksiapatit ile kaplandıktan sonraki gözenek büyüklüklerinin ortalaması.

PVA/Kitosan Oranları	-16˚C'de gözenek büyüklüğü ortalaması (μm)	-8˚C'de gözenek büyüklüğü ortalaması (μm)
70:30	10.512±1.659	8.398±1.986
40:60	8.719±2.137	6.180±1.690
30:70	7.246±1.460	4.948±2.521
20:80	6.714±1.455	3.862±3.086
10:90	4.498± 1.206	2.955±1.434

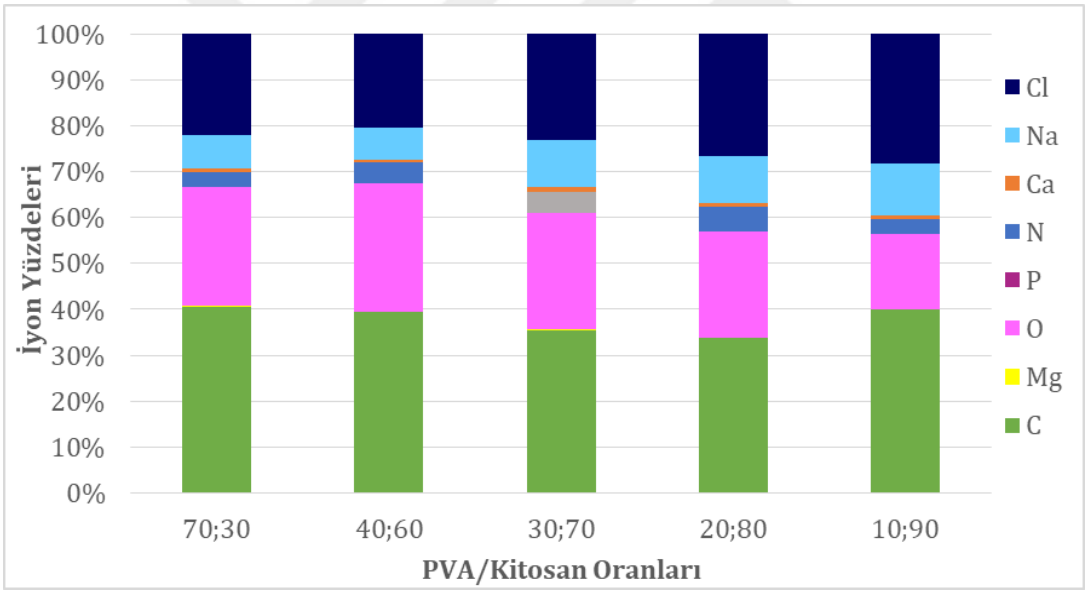
Tablo 4.3'de verilen gözenek büyüklüğü ortalaması verileri incelendiğinde HA ile kaplama sonucu gözenek büyüklükleri küçülmüştür. Kaplama sonrası -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen kriyojeller -16°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellere göre daha küçük gözenek büyüklüğüne sahiptir. Kaplama sonrası kitosan oranı arttıkça gözenek büyüklükleri daha çok küçülmüştür. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelinde en az gözenek büyüklüğü ortalaması 2.955±1.434 μm olarak bulunmuştur. -8°C'de makro gözeneklerin HA kaplamayla ve kitosan oranı arttıkça küçülmesi makro gözeneklerin HA kristalleri ile dolarak kapandığı sonucuna ulaştırır.

4.1.9. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplandıktan Sonraki EDXS Analizi

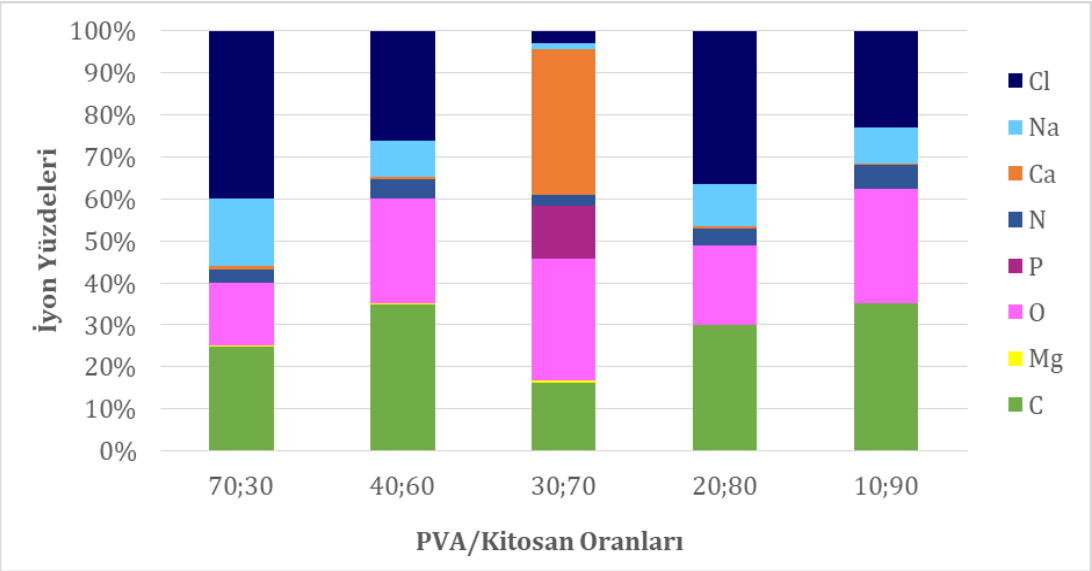
-8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin 7. gün kaplama sonrası EDXS analizi Şekil 4.25'de sunulmuştur.



Şekil 4.25. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin 7. gün kaplama sonrası EDXS analizi.



Şekil 4.26. -16°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrasında EDXS analizi sonucu elde edilen iyon yüzdeleri.



Şekil 4.27. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 70:30, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 oranlarında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin 7. gün kaplama sonrasında EDXS analizi sonucu elde edilen iyon yüzdeleri.

-16°C ve -8°C'de üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin sentetik vücut sıvısı (SBF) içerisinde 7 gün süreyle HA kaplanması sonucu yüzeyde bir noktada biriken iyonların ağırlık yüzdeleri Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de gösterilmiştir. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen 30:70 PVA/Kitosan oranında belirgin olarak Ca/P değeri 2.78 olarak bulunmuştur (Şekil 4.25). Literatürde HA için bulunan Ca/P değeri 1.67'dir [75]. Bulunan Ca/P değeri HA için bulunan değere göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu durum yüzeyde apatit kristallerinin homojen bir şekilde oluştuğunu ve kaplamanın tüm yüzeyde homojen olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşılmasını sağlar.

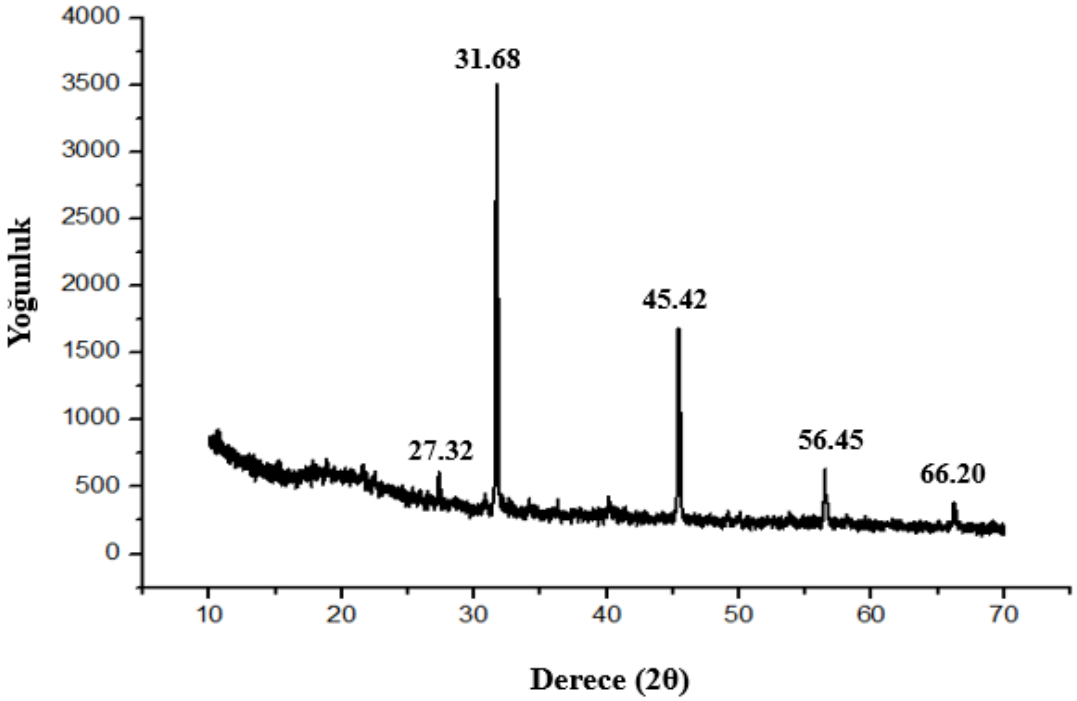
Estrada ve ark. yaptıkları çalışmada kitosan/poli (D, L-laktit-ko-glikolit)(Ch/DLPLG) gözenekli kompozit iskelelerini 70:30, 50:50 ve 30:70 oranlarında üretip, 1.5xSBF çözeltisine 28 gün boyunca daldırarak biyoaktivitesini incelemişlerdir. Apatit oluşumunu gözlemlemek için FTIR, SEM ve EDXS analizlerini yapmışlardır. EDXS analiz sonucunda Ca ve P içeriğine baktıklarında en yüksek Ca/P içeriği 1.33 olarak 30:70 oranında üretilen Ch/ DLPLG iskelesinde bulmuşlardır. Diğer oranlarda Ca/P içeriği oldukça düşük çıkmıştır. Ca/P içeriği 1.33 olarak bulunan bu değer, HA için bulunan 1.67 değerine oldukça yakındır. Bu durumu 30:70 oranında üretilen iskelenin diğer oranlarda üretilen iskelelere göre daha homojen kaplandığı şeklinde açıklamışlardır [73].

EDXS analizinde, iki farklı sıcaklıkta üretilip 7 gün HA ile kaplanmış PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin yüzeyinde bir noktada biriken iyon yüzdeleri farklı renklerle simgelenmiştir (Şekil 4.26, 4.27). Her iki şekilde, Na ve Cl iyonlarının miktarı oldukça yüksektir. Na ve Cl iyonlarının bu kadar fazla olmasının sebebi, kaplama için hazırlanan 2xSBF çözeltisinde

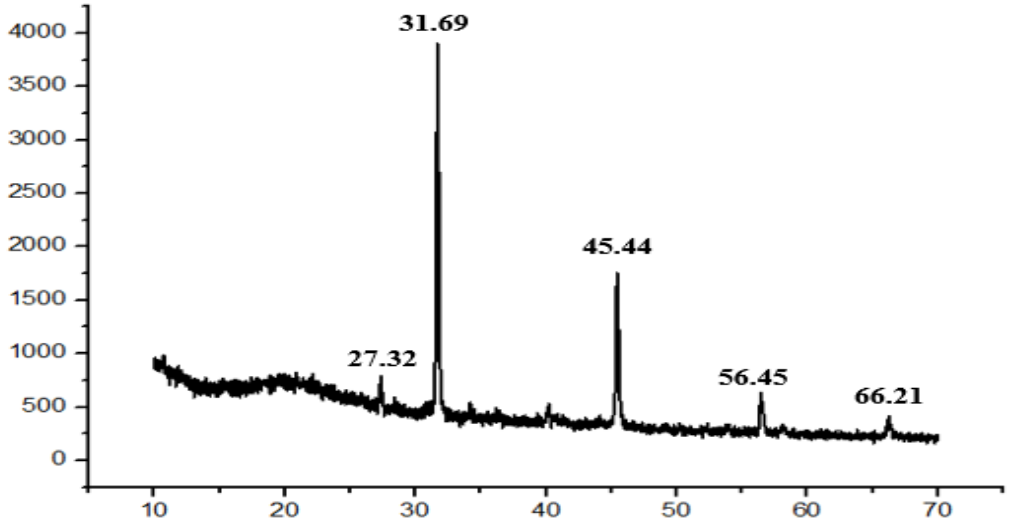
bir kısım Na ve Cl iyonunun tam olarak çözünmediği, NaCl tuzunun oluşmasına sebep olduğu şeklinde açıklanabilir.

4.1.10. PVA/Kitosan Kompozit Kriyojellerin HA ile Kaplandıktan Sonraki XRD Analizi

-8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 ve 10:90 PVA/Kitosan oranlarında üretilip HA ile kaplanan PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin XRD sonuçları Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da sunulmuştur.



Şekil 4.28. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 30:70 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin 7. gün kaplama sonrası XRD analizi.



Şekil 4.29. -8°C kriyojelasyon sıcaklığında, 10:90 PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojelin 7. gün kaplama sonrası XRD analizi.

Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da, -8°C kriyojelasyon sıcaklığında hazırlanan 30:70 ve 10:90 PVA/Kitosan kompozit kriyojelleri üzerinde 7. gün kaplama sonucunda apatit kristallerinin oluşumu XRD analizi ile gösterilmiştir.

Aday ve ark. dondurarak kurutma yöntemiyle gözenekli kitosan iskeleler üreterek, kemik benzeri apatit oluşumunu 6 ve 24 saat boyunca konsantre 10xSBF çözeltisi içerisinde bekleterek gerçekleştirmişlerdir. 24 saat boyunca 10xSBF benzeri kalsiyum fosfat solüsyonunda bekletilen gözenekli kitosan iskeleleri için yapılan X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonucunda, 25.5°, 31.7° ve 45°'de gözlenen pikleri, apatit kalsiyum fosfatlara ait olarak ve 31.7°'de gözlenen tepeyi de, HA spektrumundaki en yoğun tepe noktası olarak tanımlamışlardır [49].

Biranje ve ark. yaptıkları çalışmada, yara bandı olarak kullanılmak üzere Kitosan/PVA polimerik filmler elde etmişlerdir. Üretilen Kitosan/PVA filmlerinin in vitro biyouyumluluk özelliklerini 2, 4 ve 6 gün periyotlarda SBF çözeltisi içerisinde bekleterek incelemişlerdir. 2, 4 ve 6 gün süreyle SBF içerisinde bekletilen Kitosan/PVA filmlerinin üzerinde HA kristallerinin oluşumunu XRD sonuçları ile doğrulamışlardır. XRD sonuçlarına bakarak 20.19° ortaya çıkan geniş piki kitosan, 31.8° ve 25.8°'de ortaya çıkan keskin kırınım piklerini ise HA'nın kırınım piklerine karşılık geldiği şeklinde açıklamışlardır. Biranje ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda karakteristik, HA'nın tepe yoğunluklarının, SBF'de maruz kalma süresinin artmasıyla daha da çok artığını gözlemlemişlerdir [50].

Aday ve ark.'nın yaptığı çalışmada olduğu gibi, XRD analizinde apatit kristallerinin karakteristik piklerinin 25.5°, 31.7° ve 45° olduğunu söylenilebilir.

Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da, XRD analizi sonucunda elde edilen pikler birbirine yakındır. Şekil 4.28'de XRD analizi sonucunda 27.32°, 31.68° ve 45.42° elde edilen piklerin Aday ve ark.

çalışmalarına paralel olarak HA piklerine ait olduğu söylenebilir. Aynı şekilde Şekil 4.29'da XRD analizi sonucunda 27.32°, 31.69° ve 45.44°'de görülen pikler HA piklerine aittir denilebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında PVA/Kitosan kompozit kriyojeller farklı oranlarda üretilmiş ve hidroksiapatit ile kaplanarak karakterize edilmiştir.

Çalışmanın temel amacı, kemik doku yenilenmesini destekleyecek özelliklere sahip biyomimetik HA ile kaplanmış PVA/Kitosan kompozit doku iskeleleri üretilerek, karakterizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu amaca yönelik PVA/Kitosan kompozit kriyojelleri (70:30, 40:60, 30:70, 20:80 ve 10:90) oranlarında ve iki farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) üretilmiştir. Üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonunu taklit eden sentetik vücut sıvısı 2xSBF (Simulated Body Fluid) konsantrasyonundaki sıvıya farklı zaman periyotlarında (1, 3 ve 7 gün) daldırılarak HA ile kaplanması ve biyoaktivite kazanması sağlanmıştır.

İki farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları için şişme testi, in vitro degradasyon çalışması, FT-IR, SEM, XRD, EDXS analizi, kaplama sonrası ağırlık artışının belirlenmesi ve gözeneklilik analizleri yapılmıştır.

Her iki kriyojelasyon sıcaklığında şişme kitosan oranı arttıkça artmıştır. Fakat -8°C kriyojelasyon sıcaklığında büyüyen gözenekler sayesinde üretilen kriyojelerde bütün zaman aralıklarında şişmenin arttığı gözlemlenmiştir.

Degradasyon çalışmasının sonucunda degradasyon miktarı 3. gün sonunda elde edilmiştir. Degradasyon miktarı kitosan oranı artmasıyla birlikte azalmıştır. En az degradasyon miktarına 10:90 PVA/Kitosan kriyojelinde ulaşılmıştır.

FT-IR sonuçları incelendiğinde, kaplama öncesi PVA 3328 cm^{-1}'de bir emilim piki göstermektedir. Saf kitosanın spektrumu 3320 cm^{-1}'de geniş bir bant gösterir, buda -OH gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1610 cm^{-1} ve 1010 cm^{-1}'deki pikler, -C=N ve -C-O gerilme frekanslarını, imin grubunun oluşumunu, kitosan ve PVA'nın GA ile çapraz bağlanmasını açıklamaktadır. Kaplama sonrası yaklaşık 600 cm^{-1} P-0 bağları oluşmuştur ve sentetik vücut sıvısında (SBF) bekleme süresi arttıkça piklerin yoğunluğu artmıştır. HA karakteristik piki etrafında PO_4^{-3}'ün germe bandı 1050 cm^{-1} olarak bulunmuştur.

İki farklı kriyojelasyon sıcaklığında (-16°C ve -8°C) üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerin HA ile kaplanmadan önce SEM analizi sonucunda -8°C kriyojelasyon sıcaklığında daha büyük gözenekler elde edilmiştir. Kitosan oranının fazla olması gözenekliliği arttırmıştır. En yüksek kaplama miktarı 7. gün sonunda elde edilmiştir.

Kaplama öncesi en fazla gözenek büyüklüğü ortalaması -8°C'de 10:90 PVA/Kitosan oranında 61.066±16.735 μm olarak elde edilmiştir. Kaplama sonrası -8°C kriyojelasyon sıcaklığında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojeller daha küçük gözenek büyüklüklerine

sahiptir. Kitosan oranı arttıkça kaplama miktarı artmış gözenek büyüklükleri daha çok küçülmüştür. Kaplama sonrası en az gözenek büyüklükleri ortalaması -8°C'de 10:90 PVA/Kitosan oranında 2.955±1.434 µm olarak bulunmuştur.

EDXS analizinde sadece 30:70 oranında Ca/P değeri HA için bulunan değere göre yüksek çıkmıştır. Bu durum yüzeyde apatit kristallerinin homojen bir şekilde oluştuğunu ve kaplamanın tüm yüzeyde homojen olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır.

XRD analizi sonucunda -8°C kriyojelasyon sıcaklığında 30:70 ve 10:90 iki farklı PVA/Kitosan oranında üretilen PVA/Kitosan kompozit kriyojellerde yaklaşık 27.32°, 31.68° ve 45.42° olmak üzere birbirine yakın pikler elde edilmiştir. Literatür araştırmaları sonucu elde edilen piklerin HA piklerine ait olduğu saptanmıştır.

Tüm bu bulgular ışığında kitosan oranı ve kaplama süresi arttıkça kaplama veriminin arttığı gözlemlenmiştir.

Sentetik vücut sıvısı içinde biyomimetik hidroksiapatit ile kaplama yöntemi biyomedikal uygulamalar alanında yeni ve gelecek vadeden bir prosestir. HA ile biyomimetik koşullarda kaplanmış doku iskeleleri, kemik doku onarımında kullanılmak üzere potansiyel birer biyomalzemedir.

KAYNAKLAR

[1]. Yalgın, Ç., Uyar, T., Ürkmez, B., Öztürk, K., Arıcan, I. (2017). *Açık Bilim internet dergisi*. 10 Mart 2017 tarihinde http://www.acikbilim.com/2013/01/dosyalar/az-bir-dnadan-leelooyuyaratmak.html adresinden erişildi.

[2]. Kemençe, N., Bölgen N. (2011). *Jelatin ve kalsiyum fosfat temelli kriyojellerin üretimi ve karakterizasyonu.* Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.

[3]. Peter, X. Ma. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 7 (5), 30-40.

[4]. Gümüşderelioğlu, M. (2002). Biyomalzemeler. *Yeni Ufuklar, Bilim ve Teknik TÜBİTAK Dergisi,* 1-23.

[5]. Jiang, S., Liu, S., Feng, W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4 (7), 1228-1233.

[6]. Taboada, O. M., Sobral, P. J. do A., Carvalho, R. A., Habitante, A. M. B. Q. (2008). Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22 (8), 1485-1492.

[7]. Nicol, S. (1991). Life after death for empty shells. *New Science*, 129, 46-48.

[8]. Kart, S. (2015). Hidrojeller ve uygulama alanları*. İnovatif Kimya Dergisi*, 3 (26), 1-42.

[9]. Bal, A., Özkahraman, B., Gök, K. M., Acar, I. (2014). Sodyum akrilat esaslı hidrojel ve kriyojellerin şişme, adsorpsiyon ve mekanik özelliklerinin incelenmesi*. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20 (7), 258-265.

[10]. Öncel, P. (2013). *İlaç salımı için moleküler baskılanmış kriyojel membranlar*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

[11]. Kemençe, N., Bölgen, N. (2013). Gelatin- and hydroxyapatite-based cryogels for bone tissue engineering: synthesis, characterization, in vitro and in vivo biocompatibility. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11 (1), 20-33.

[12]. Dedeoğlu, Y., Aydın, Y. (2017). *biyologlar /ders notları/ biyoteknoloji biyomimetik nedir?.* 10 Mart 2017 tarihinde http://biyologlar.com/biyomimetik-nedir-1 adresinden erişildi.

[13]. Pasinli, A., Aksoy, R. S. (2010). Yapay kemik uygulamaları için HA. *Biyoteknoloji Elektronik Dergisi*, 1 (1), 41-51.

[14]. Taş, A. C. (2000). Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21 (14), 1429–1438.

[15]. Yıkar E., Bölgen N. (2012). *Elektrospinning yöntemi ile jelatin/kitosan nanofiberlerin üretimi ve biyomimetik HA ile kaplanması*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.

[16]. Shea, L. D., Wang, D., Franceschi, R. T., Mooney, D. J. (2000). Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Engineering,* 6 (6), 605-617.

[17]. Huri, P. Y., Hasırcı, N., Hasırcı, V. (2010). Bone tissue engineering, *Archives Medical Review Journal*, 19, 206-219.

[18]. Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö. (2013). *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

[19]. Yaszemski, M. J. (2003*). Biomaterials in Orthopedics*. 2. Baskı, Taylor & Francis.

[20]. Healy, K., Guldberg, R. (2007). Bone tissue engineering. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 7 (4), 328-330.

[21]. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. Lemons J. E. (2014). *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 3. Baskı, Elsevier Science.

[22]. Yıldız, F., Meydan, U., Aydın, F. (2017). *Biyomalzemeler*. 12 Mart 2017 tarihinde http://www.muhendislik.istanbul.edu.tr/ metalürji /wpcontent /uploads /2013/09/bm06.pptx adresinden erişildi.

[23]. Gümüşderelioğlu, M., Maviş, B., Karakeçili, A., Kahraman, A. S., Çakmak, S., Tığlı, S., Demirtaş, T., Aday, S. (2007). Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji, *Yeni Ufuklar Bilim ve Teknik Tübitak Dergisi*, 1-16.

[24]. Ertürk, G., Mattiassona, B. (2014). Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*, 1357, 24–35.

[25]. Leong, K., Cheah, C., Chua, C. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24 (13), 2363-2378.

[26]. Tsang, V.L., Bhatia, S.N. (2004). Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (11), 1635-1647.

[27]. Hariharasakthisudhan P., Swaminathan J. (2016). Characterizing the compression behavior of Al_2O_3 /Si_3N_4 nano sized particulate reinforced ceramic matrix composites. *Indian Journal of Science and Technology*, 9 (43), 1-6.

[28]. Carneiro, L. A. B. C., Costa, S. A., Souza, C. R. F., Bachmann, L., Oliveira, W. P., Said S. (2014). Immobilization of lipases produced by the endophytic fungus cercospora kikuchii on chitosan microparticles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (4), 578-586.

[29]. Australian Microscopy and Microanalysis Research Facility. (2018). 12 Mayıs 2018 tarihinde http://www.ammrf.org.au/myscope/tem/practice/prep/fixation/ adresinden erişildi.

[30]. Chauhan, D., Dwivedi, J., and Sankararamakrishnan, N. (2014). Facile synthesis of smart biopolymeric nanofibers towards toxic ions removal and disinfection control. *The Royal Society of Chemistry's*, 4, 54694-54702.

[31]. Wonisch, A., Delefant, M., Rau, M., Gürses, C., Geçkil H. (2017). 10 Mart 2017 tarihinde http://www.scienceinschool. org/tr/2011/issue18/ biomimetic adresinden erişildi.

[32]. Topaloğlu, U., Ketani, M. A., Saruhan, B. G. (2017). Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri, *Dicle Üniversitesi Veteterinerlik Fakültesi Derg*isi, 10 (1), 62-71.

[33]. Bayçu, C., Bayram, N., (Ed.). (1995). Kemik dokusu, Histoloji, *T.C. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları*, Eskişehir.

[34]. Barrere, F.; Van Blitterswijk, C.A., de Groot, K. (2006). Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *International Journal of Nanomedicine*, 1 (3), 317-332.

[35]. Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today,* 11 (5), 18-25.

[36]. Aslanhan, H. (2017). *Biyomalzemeler.* Sol-jel yöntemiyle hidroksiapatit üretimi. 12 Mart 2017 tarihinde http://www.muhendislik.istanbul.edu.tr/metalurji/wpcontent/uploads/ 2013/09/bm09.ppt adresinden erişildi.

[37]. Arıkan, A. (2013). *Doku iskelelerinin süperkritik karbondioksit ortamında hazırlanması ve karakterizayonu.* Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

[38]. Kokubo, T., Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27 (15), 2907-2915.

[39]. Lööf, J., Svah, F., Jarmar, T., Engqvist, H, Pameijer, C.H. (2008). A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications. *Dental Materials*, 24 (5), 653–659.

[40]. Jalota, S., Bhaduri, B. S., Tas, A. C. (2006). In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers, *Wiley Inter Science*, 78A (3), 481-490.

[41]. Tas, A. C., Bhaduri, S. B. (2004). Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10xsimulated body fluid. *Journal of Materials Research*, 19 (9), 2742-2749.

[42]. Jalota, S., Bhaduri, B. S., Tas, A. C. (2007). Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mM HCO_3^- to make bone substitutes more osteointegrative. *Materials Science and Engineering C*, 28 (2008), 129-140.

[43]. Melemez, F. (2009). HA kaplamalar. Sakarya Üniversitesi metalurji malzeme mühendisliği, yüzey işlemleri ödevi.

[44]. Weng, W., and Baptista, J.L. (1999). Preparation and characterization of HA coatings on Ti6Al4V alloy by a sol-gel method. *J. of American Cer. Soc.*, 82 (1), 27-32.

[45]. Tong, W., Chen, J., and Zhang, X. (1995). Amorphization and crystallization during plasma spraying of HA. *Biomaterials*, 16 (11), 829-832.

[46]. Scopus.(2017). 16 Mart 2018 tarihinde https:// www.scopus.com/ term/analyzer.uri?sid =e9e9f7fdcf3b47df0657c6b2337252ff&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABKEY%28 biomimetic+hydroxyapatite+coating adresinden erişildi.

[47]. Park, K. H., Kim, S. J., Hwang, M. J., Song, H. J., Park, Y. J. (2016). Biomimetic fabrication of calcium phosphate/chitosan nanohybrid composite in modified simulated body fluids. *eXPRESS Polymer Letters*, 11 (1), 14–20.

[48]. Nazir, M.; Ting, O. P., See, Yee T. (2015). Pushparajan S., Swaminathan D., Kutty M. G., Biomimetic coating of modified titanium surfaces with hydroxyapatite using simulated body fluid, Hindawi Publishing Corporation Advances. *Materials Science and Engineering*, 1-8.

[49]. Aday, S., Gümüşderelioğlu, M. (2010). Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity. *Polymer Composites*, 31 (8), 1418-1426.

[50]. Biranje, S., Madiwale, P., Adivarekar, R. V. (2017). Preparation and characterization of Chitosan/PVA polymeric film for its potential application as wound dressing material. *Indian J.Sci.Res*., 14 (2), 250-256.

[51]. Ceylan, S., Göktürk, D., Bölgen N. (2016). Effect of crosslinking methods on the structure and biocompatibility of polyvinyl alcohol/gelatin cryogels. *Biomedical Materials and Engineering*, *27* (4), 327-340.

[52]. Choi, S. M., Singh, D., Kumar, A., Oh, T. H., Cho, Y. W., Han, S. S. (2013). Porous three-dimensional PVA/Gelatin sponge for skin tissue engineering, *International Journal of Polymeric Materials,* 62 (7), 384–389.

[53]. Choudhury, M., Mohanty, S., and Nayak, S. (2014). Effect of different solvents in solvent casting of porous pla scaffolds in biomedical and tissue engineering applications. *Journal of Tissue Science and Engineering*, 6 (1), 142.

[54]. Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2004). Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticle. *Journal of Chromatography B*., 807 (1), 129-137.

[55]. Plieva, F. M.; Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (2006). Pore structure of macroporous monolithic cryogels prepared from poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science*, 100 (2), 1057-1066.

[56]. Júnior, E. S. C.; Stancioli, E. F. B., Mansur, A. A. P., Vasconcelos W. L., Mansur H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers.* 76 (3), 472–481

[57]. Mansur, H.S., Sadahira, C.M., Souza, A.N., Mansur, A.A.P. (2008), FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C,* 28 (4), 539–548.

[58]. Ramakrishna, P., Mallikarjuna, B., Chandra Babu, A., Sudhakar, P.,Chowdoji Rao, K., Subha, M. C. S. (2011). Interpenetrating polymer network of crosslinked blend microspheres for controlled release of Acebutolol HCl. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (06), 212-219.

[59]. Parparita, E., Cheaburu, C.N., Vasile, C. (2012). Morphological, thermal and rheological characterizatıon of polyvinyl alcohol/chitosan blends cellulose. *Chemistry and Technology*, 46 (9-10), 571-581.

[60]. Yang, D., Jin, Y., Ma, G., Chen, X., Lu, F., Nie, J. (2008). Fabrication and characterization of Chitosan/PVA with hydroxyapatite biocomposite nanoscaffolds. *Journal of Applied Polymer Science,* 110, 3328–3335.

[61]. Müller, L., Müller Frank, A. (2006). Preparation of SBF with different HCO_3 content and its influence on the composition of biomimetic apatites*, Acta Biomaterialia*, 2 (2), 181–189.

[62]. Wang, J., Zhang W., Li W., Xing W. (2015). Preparation and characterization of chitosan-poly (vinyl alcohol)/polyvinylidene fluoride hollow fiber composite membranes for pervaporation dehydration of isopropanol. *Korean J. Chem. Eng*., 32 (7), 1369-1376.

[63]. Tang, Y. F., Du, Y. M., Hu, X. W., Shi, X. W., Kennedy J. F. (2007). Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. *Carbohydrate Polymers***,** 67 (4), 491–499.

[64]. Chaturvedi, A., Bajpai, A. K., Bajpai, J., Sharma, A., Antimicrobial poly(vinyl alcohol) cryogel–copper nanocomposites for possible applications in biomedical fields, *Designed Monomers and Polymers*, 18 (4) , 385–400.

[65]. Bajpai, AK., Saini R. (2005). Preparation and characterization of biocompatible spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)–gelatin and study of water sorption behaviour. *Society of Chemical Industry. Polym Int.,*54 (9), 1233–1242.

[66]. Nikonorov, V., IvanovR, V., Kil'deeva, N. R., Bulatnikova, L. N., Lozinskii, V. I. (2010) Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde*. ISSN 0965_545X, Polymer Science, Ser. A*, 52 (8), 828–834.

[67]. Chae, S. K., Mun, C. H., Noh, D. Y., Kang, E., Lee, S. H. (2014). Simple fabrication method for a porous poly(vinyl alcohol) matrix by multisolvent mixtures for an air-exposed model of the lung epithelial system, *Langmuir,* 30 (41), 12107−12113.

[68]. Kanimozhi, K., Basha, S. K., Kumari, V. S. (2016). Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 61, 484–491.

[69]. Silva Alexandra, R. P., Macedo, T. L., Coletta, D. J., Feldman, S., Pereira, M. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization. *Matéria (Rio J.)*, 21 (4), 964 – 973.

[70]. Zhu, N., Cooper, D., Chen, X. B., Nıu, C. H. (2013). A study on the in vitro degradation of poly(L-lactide)/chitosan microspheres scaffolds. *Front. Mater. Sci.,* 7 (1), 76–82.

[71]. Cai, X. Y., Gouty, D., Baughman, S., Ramakrishnan, M. S., Cullen C. (2011). Recommendations and requirements for the design of bioanalytical testing used in comparability studies for biosimilar drug development Review. *Bioanalysis*, 3 (5), 535-540.

[72]. Thein-Han, W. W., Misra, R. D. (2009). Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5 (4), 1182–1197.

[73]. Martel-Estrada, S. A., Martínez-Pérez, C. A., Chacón-Nava, J. G., García-Casillas, P. E., Olivas–Armendáriz, I. (2011). In vitro bioactivity of chitosan/poly (D,L-lactide-co-glycolide) composites. *Materials Letters*, 65 (1), 137–141.

[74]. Kim, S. S., Park M. S., Gwak, S. J., Choi, C. Y., Kim, B. S. (2006). Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro. *Tissue Engineering*, 12 (10), 2997-3006.

[75]. Lin, X., Groot, De. K., Wang, D., Hu, Q., Wismeijer, D., Liu, Y. (2015). A review paper on biomimetic calcium phosphate coatings. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 9, 56–64.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı : Gülşah GÜL

Doğum Tarihi: 08.05.1992

E-mail : Sah_8865@hotmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Bilişim Teknolojileri	Ticaret Meslek Lisesi	2005-2011
Lisans	Kimya Mühendisliği	İnönü Üniversitesi	2012-2016
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2016-Halen

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Stajyer	İsken Su gözü Termik Santrali	08.2015-09.2015
Kimya Mühendisi	Nurs Lokman Hekim Gıda Bitki Medikal Sanayi ve Tic. Ltd. Şti	06.2016-08.2016

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Şeker pancarı atığı olan melastan etil alkol üretimi (Bitirme projesi), **2016.**
2. DEMİR, D.; CEYLAN, S.; GÜL, G.; İYİGÜNDOĞDU, Z.; BÖLGEN, N., Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized From Aloe Barbadensis Leaf Extract. International Advanced Researches & Engineering Congress-2017, 2017-11-16, 2017-11-18, Osmaniye, Türkiye, **2017**.
3. ÖFKELİ, F.; DEMİR, D.; GÜL, G.; BÖLGEN KARAGÜLLE, N., Production And Characterization Of Biomimetic Hydroxyapatite Coated Chitosan Based Cryogels. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017), 2017-10-25, 2017-10-27, Adana, Türkiye, **2017**.
4. DEMİR, D.; GÜL, G.; BÖLGEN KARAGÜLLE, N., Synthesis of Silver Particles Using Aloe Vera Extract and Their Characterization. International Conference on Advances and Innovations in Engineering (ICAIE), 2017-05-10, 2017-05-12, Elazığ, Türkiye, **2017**.
5. DEMİR , D.; GÜL, G.; BÖLGEN KARAGÜLLE, N., Fabrication of Curcumin Loaded Chitosan and Silver Based Spheres for Biomedical Applications. 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress (MOLBIOTECH), 25-27 April 2018, Konya, Turkey, **2018 (Poster sunumu).**
6. GÜL, G.; BÖLGEN KARAGÜLLE, N., Production And Characterization Of Biomimetic Hydroxyapatite Coated Polyvinyl Alcohol/Chitosan Composites. 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress (MOLBIOTECH), 25-27 April 2018, Konya, Turkey, **2018 (Sözlü sunum).**