

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İPEK FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE MEKANİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih AK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Anabilim Dalı : Herhangi Mühendislik, Bilim

Programı : Herhangi Program

OCAK 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İPEK FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE MEKANİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Fatih AK
(509091042)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz OKAY
Anabilim Dalı : Herhangi Mühendislik, Bilim
Programı : Herhangi Program**

OCAK 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509091042 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Fatih AK**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**İPEK FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Oğuz OKAY**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ**

İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Nermin Orakdoğan

İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **17 Aralık 2012**

Savunma Tarihi : **24 Ocak 2013**

Çok Değerli ve Sevgili Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince; sabrı disiplini, kişiliği, tecrübesi titizliği ile bu çalışmanın var olmasını sağlayan ve her türlü olanağı sunan, her daim saygıyla hatırlayacağım sevgili hocam Prof. Dr. Oğuz OKAY'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Polimerik Jeller Araştırma Laboratuvarındaki yüksek lisans çalışmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen, tecrübelerini benimle paylaşan Deniz CEYLAN TUNCABOYLU'na, Pınar KARACAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma, Anlayışı, desteği ve yardımlarıyla yanımda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olduklarını gönülden hissettiğim Melahat ŞAHİN, Hüsniye ÇAKMAK, Tuğrul UĞUR ve Şafak YERLİ'ye, Son olarak beni bugünlere getiren, yaşama sevincini bana aşılayan, her daim yanımda olan çok değerli ve sevgili aileme teşekkür ederim.

Aralık 2012

Fatih AK
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1 GİRİŞ	1
2 TEORİK KISIM	5
2.1 Polimerik Malzemeler	5
2.2 Hidrojeller	6
2.3 Makrogözenekli Jeller	7
2.4 İpek Fibroin	10
2.4.1 İpek fibroin yapısında β -tabaka oluşumu ve jelleşme.....	15
3 DENEYSEL KISIM.....	19
3.1 Kullanılan Kimyasallar	19
3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	21
3.3 Deneyin Yapılışı.....	24
3.3.1 İpek fibroin çözeltilisinin hazırlanması	24
3.3.2 İpek Fibroin jellerinin sentezlenmesi	27
3.3.3 İpek fibroin çözeltilisinin çapraz bağlanması sırasında primer amin grubu tayini	30
3.4 Jellerin Karakterizasyonu.....	32
3.4.1 Şişme ölçümleri.....	32
3.4.2 Diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) ölçümleri.....	33
3.4.3 UV - Görünür spektrofotometre ölçümleri	33
3.4.4 ATR - FTIR ölçümleri	34
3.4.5 Mekanik ölçümler	34
3.4.6 Reolojik ölçümler.....	34
3.4.7 Morfolojik ölçümler	35
4 SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	37
4.1 % 4,2 İpek Fibroin Konsantrasyonunda Elde Edilen Hidrojel ve Kriyojel	38
4.2 Farklı İpek Fibroin Konsantrasyonlarında Elde Edilen Kriyojeller.....	53
5 SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	67

KISALTMALAR

İF	: İpek fibroin proteini
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
BDDE	: 1,4 Bütandioldigisidileter
TNBS	: 2,4,6 Trinitrobenzen sülfonik asit
PEG	: Polietilenglikol
Gly	: Glisin amino asiti
Ala	: Alanin amino asiti
Ser	: Serin amino asiti
Tyr	: Tirosin amino asiti
Cys	: Sistein amino asiti

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Bombyx Mori ipek böceğinden elde edilen ipeğin bileşimi.....	11
Çizelge 2.2: İpek fibroin proteinindeki amino asit yüzdeleri.	12
Çizelge 2.3: İpek fibroin proteininde bulunan amino asitlerdeki hidrofobik ve hidrofilik kısımlar	13
Çizelge 2.4: Makrogözenekli polimerik iskeletlerin mekanik özellikleri	17

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Polimerlerin fiziksel şekillerine göre ayrımı	6
Şekil 2.2 : Polimerik jel ağyapısının şematik gösterimi	6
Şekil 2.3 : Kriyojelyasyon prosesi: 1. çözültideki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makrogözenekler; 8. çözücü [12].	9
Şekil 2.4 : Akrilamid/2-akrilamido-2-metilpropan sulfonik asit monomerleri ile sentezlenen kriyojellerin sıkıştırma ve gevşemesi sırasında çekilen fotoğraflar [36]	10
Şekil 2.5 : İpek fibroini oluşturan amino asitlerin genel gösterimi	12
Şekil 2.6 : Paralel ve antiparalel β -tabaka gösterimi [Url-1]	14
Şekil 2.7 : β -Döngü gösterimi[Url-1]	14
Şekil 3.1 : Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	19
Şekil 3.2 : <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin (TEMED)	19
Şekil 3.3 : 1,4 Bütandioldiglisidileter (BDDE)	20
Şekil 3.4 : 2,4,6 Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS).....	20
Şekil 3.5 : Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	20
Şekil 3.6 : Sodyum dodesilsülfat (SDS)	21
Şekil 3.7 : Dondurmalı Kurutucu (solda), Vakum Pompası (sağda)	22
Şekil 3.8 : Zwick mekanik test cihazı (A), Basma aparatları (B), 500 N'luk yük hücresi (C)	23
Şekil 3.9 : UV Görünür Spektrofotometre	23
Şekil 3.10 : Peltier sıcaklık ünitesi ve reometre cihazı (A), PC Ekranı ve hava kurutucu (B), Kompresör (C)	24
Şekil 3.11 : Zambak çıkarma (A) ve Yıkama işlemi (B).....	25
Şekil 3.12 : İpek fibroini kurutma işlemi	25
Şekil 3.13 : LiBr çözeltisi içinde ipek fibroini çözme işlemi	26
Şekil 3.14 : İpek fibroinden LiBr'ü uzaklaştırmak için uygulanan diyaliz işlemi.....	26
Şekil 3.15 : İpek fibroin üzerindeki serbest amino grupları ile çapraz bağlayıcının epoksi grupları arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu	28
Şekil 3.16 : BDDE çapraz bağlayıcısı ile ipek fibroinin jelleşmesi esnasındaki konformasyonel geçişler [67]	29
Şekil 3.17 : Çapraz bağlanma sırasında primer amin grubu tayini için TNBS yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	31
Şekil 4.1 : Şişmiş ve kuru durumdaki hidrojel ve kriyojel fotoğrafları	39
Şekil 4.2 : % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin m_{relatif} ve V_{relatif} değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir.	39
Şekil 4.3 : % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin q_w ve q_v değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir.	40

- Şekil 4.4 :** % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacımca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin W_g değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir. 41
- Şekil 4.5 :** + 50 ve -18°C’de sentezlenen hidrojel (A) ve kriyojellerin (B) fotoğrafları görülmektedir. C_{IF} : % 4,2 (ağ/hac), BDDE; 20 mmol / g İF, C_{TEMED} : % 0,10 (hac/hac) 42
- Şekil 4.6 :** Çapraz bağlanma sırasında primer amin grubu tayini için 335 nm’de yapılan absorbans ölçüm değerleri ve reaksiyona giren % NH_2 miktarları. İçi boş semboller; % 0,0 (○), 0,10 ve (Δ), 0,25 (□) TEMED (hac/hac) konsantrasyonlarındaki reaksiyon çözeltilerinin absorbans ölçümlerinin zamana bağlı değişimini, içi dolu semboller % 0,0 (●), % 0,10 (▲) ve % 0,25 (■) TEMED (hac/hac) konsantrasyondaki reaksiyon çözeltilerinde reaksiyona giren % NH_2 miktarını göstermektedir. 44
- Şekil 4.7 :** İlk 30 dakika içinde primer amin gruplarının % 70-80’in reaksiyona girdiği görülmektedir (A) Elastik modül (G') (●), ve Viskoz modülün (G'') (○) zamana bağlı değişimi görülmektedir. 45
- Şekil 4.8 :** Çapraz bağlayıcının (nokta), dondurmali kurutucuda kurutulmuş % 4,2 İF ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda elde edilen kuru durumdaki hidrojel (çizgi-nokta) ve kriyojelin (uzun çizgi), dondurmali kurutucuda kurutulmuş % 5 konsantrasyondaki ipek fibroinin (ince çizgi) tipik ATR-FTIR spektrumları 46
- Şekil 4.9 :** % 4,2 ipek fibroin ve farklı TEMED konsantrasyonlarında kuru durumdaki hidrojel (T_{sentez} : +50°C), kriyojel (T_{sentez} : -18°C) ve ipek fibroinin ATR - FTIR spektrumları görülmektedir. İpek fibroin çözeltisi (○) % 0,07 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (●), % 0,10 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (▲), % 0,13 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (▼), % 0,25 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (Δ), % 0,42 TEMED konsantrasyonunda kriyojel (▽), % 0,50 TEMED konsantrasyonunda kriyojel (□) sembolleri ile gösterilmiştir. 47
- Şekil 4.10 :** % 0,07 ve % 0,10 TEMED konsantrasyonunda elde edilen ipek fibroin hidrojel ve kriyojellerin ATR-FTIR spektrumlarına peak fit yazılımıyla Gaus modelinin uygulanması sonucu elde edilen eğriler. ATR-FTIR spektrumundan elde edilen orijinal spekturum (●), Peak fit yazılımı ile orijinal spektruma düzeltme uygulanmasıyla elde edilen spektrum (kalın çizgi) ve orijinal spektrumlardaki pikin altındaki saklı pikler (ince çizgiler) ile gösterilmiştir. 48
- Şekil 4.11 :** Dondurmali kurutucuda kurutulmuş ipek fibroin çözeltisinin, % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda ve hacımca farklı TEMED konsantrasyonlarında elde edilen hidrojel ve kriyojellerin konformasyon oranları. Gri semboller ipek fibroini, içi boş semboller hidrojelleri, içi dolu semboller kriyojelleri, göstermektedir. β -döngü (▼, ▽, ▼), β -tabaka (●, ○, ●), rastgele yumak ve α -heliks (▲, Δ, ▲) sembolleri ile gösterilmiştir. 49
- Şekil 4.12 :** % 4,2 ipek fibroin ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda elde edilen, dondurmali kurutucuda kurutulmuş hidrojel ve kriyojellerin gerilim-gerinim eğrisi 50
- Şekil 4.13 :** % 4,2 ipek fibroin ve hacımca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin elastik modülleri ile basınç dayanımları. Koyu semboller elastik modül, açık semboller basınç

- dayanımı değerlerini göstermektedir. Kriyojeller (●) sembolü ile, hidrojjeller (▲) sembolü ile gösterilmiştir..... 51
- şekil 4.14 :** % 0,07 ve 0,25 TEMED konsantrasyonlarında, +50 ve -18°C’de sentezlenen hidrojel ile kriyojellerin SEM görüntüleri. Skala ubuğu soldan sağa doğru 1 mm, 100 m ve 50 m iken SEM fotoğrafları soldan sağa doğru x20, x100 ve x500 büyütmelerde çekilmiştir. 52
- şekil 4.15 :** % 0,25 TEMED ve % 4,2, 8,4 ve 12 ipek fibroin konsantrasyonlarında -18°C’de hazırlanan kriyojellerin m_{relatif} (●), V_{relatif} (○), (A) q_w (▲), q_v (Δ), (B) W_g (▼) (C) değerleri. 53
- şekil 4.16 :** Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş % 8,4 ve 12,6 ipek fibroin ile aynı ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin konfarmasyon oranları. İpek fibroindeki; β -döngü (▼), β -tabaka (●), rastgele yumak ve α -heliks (▲), % 8,4 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojellerdeki; β -döngü (▼), β -tabaka (●), rastgele yumak ve α -heliks (▲), % 12,6 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojellerdeki β -döngü (▽), β -tabaka (○), rastgele yumak ve α -heliks (Δ) sembolleri ile gösterilmiştir..... 54
- şekil 4.17 :** % 0,25 TEMED ve farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin tipik gerilim-gerinim eğrisi..... 55
- şekil 4.18 :** Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş kriyojellerin ipek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak elastik modül değişimleri (●) ile basınc dayanımı değerleri (○)..... 56
- şekil 4.19 :** % 0,25 TEMED ve farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen makrogözenekli ipek fibroin iskeletlerinin SEM görüntüleri. Fibroin konsantrasyonu fotoğrafların üstünde verilmiştir. Skala ubuğu soldan sağa doğru 100 m, 50 m ve 10 m’dir. SEM fotoğrafları soldan sağa doğru x100, x500 ve x1000 büyütmelerde çekilmiştir..... 57

İPEK FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

İpek genellikle *Bombyx mori* adı verilen ipek böcekleri tarafından üretilen bir biyopolimerdir. İpek; fibroin ve serisin olarak isimlendirilen iki proteinden oluşmakta olup ipek liflerinin yapısal proteini olan fibroini bir arada tutan serisin yüksek alkali çözeltilerde çözünür. İpek fibroini, başlıca glisin ve alanin amino asit ünitelerinden oluşan büyük hidrofobik bloklar ile bunların aralarında ve zincir uçlarında daha küçük hidrofilik bloklardan (arjinin ve rizin üniteleri) ibaret çok-bloklu bir kopolimer mimarisine sahiptir. Hidrofilik bloklar suda çözünürlüğü sağlarken, hidrofobik bloklar arası asosiyasyonlar, fibroinin rastgele yumak yapısından β -tabaka yapısına bir konformasyon geçişine neden olur. İpek fibroinin yapısındaki β -tabakaları malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırırken, daha düzensiz olan hidrofilik bloklar tokluğu ve elastisiteyi artırır. İpek fibroinde jelleşmenin fibroin proteininin ikincil yapısındaki konformasyonel geçişlerle meydana geldiği bilinmektedir. Çapraz bağlayıcı ile ipek fibroindeki konformasyonel geçişler kısa sürede gerçekleşerek jel elde edilebileceği son yıllarda grubumuzda yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur. Fibroin molekülleri, birbirlerine 1,4 bütandioldiglisidileter (BDDE) çapraz bağlacısıyla bağlandıkça, moleküllerin hareketliliği azalır. Bunun bir sonucu olarak, moleküller arası hidrofobik etkileşmeler kuvvetlenerek β -tabaka yapısının çekirdeklenme ve büyüme süreci kolaylaşır. Böylece kısa süre içerisinde jelleşme meydana gelir.

Bu çalışmanın amacı mekanik olarak dayanıklı, dışarıdan gelen uyarılara hızlı cevap verebilen kemik hücre mühendisliğinde kullanıma uygun makrogözenekli ipek fibroin iskeletlerinin sentezlenmesidir. Bunun için literatürde ilk defa olarak fibroin moleküllerinin kriyojelleşme yani düşük sıcaklık jelleşme yöntemi uygulanarak -18°C sıcaklıkta donmuş sulu çözeltilerinde çapraz bağlanması sağlanmıştır. Kriyojelleşme tekniğinde; jelleşme reaksiyonları, reaksiyon sisteminin donma noktasının altında ilerlediği için ortamdaki çözücü kristalleri kalıp etkisi yaparak gözenekli bir yapının oluşmasını sağlamış ve böylece makrogözenekli fibroin iskeletleri elde edilebilmiştir. Karşılaştırma amacıyla $+50^{\circ}\text{C}$ ' de fibroin hidrojelleri de sentezlenmiştir. Sentezler suda çözünmüş fibroin moleküllerinin 1,4 bütandioldiglisidileter çapraz bağlayıcısı ile N,N,N',N' tetrametiletilediamin (TEMED) katalizörlüğünde -18°C ve $+50^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Jelleşme reaksiyonları sırasında fibroin molekülleri üzerindeki fonksiyonel grupların BDDE ile çapraz bağlanma reaksiyonu fotometrik yöntemlerle izlenmiştir. Elde edilen jellerin şişme davranışları, mekanik ve morfolojik özellikleri incelenmiştir.

PREPARATION OF SILK FIBROIN CRYOGELS AND INVESTIGATION OF THEIR MECHANICAL PROPERTIES

SUMMARY

Silk fibroin derived from *Bombyx mori* is a fibrous protein exhibiting extraordinary material properties such as good biocompatibility, biodegradability, high strength and toughness, and ease of processability. Silk fibroin has been used for cell culture, wound dressing, drug delivery, enzyme immobilization, and as a scaffold for bone tissue engineering. Silk fibroin has a blocky structure consisting of less ordered hydrophilic and crystallizable hydrophobic blocks. Hydrophilic blocks provide solubility in water and, are responsible for fibroin elasticity and toughness, while hydrophobic blocks form intermolecular β -sheet structures leading to the insolubility and high strength of fibroin. Several techniques have been developed to produce porous fibroin scaffolds such as freeze-thawing, porogen leaching, gas foaming, electrospinning, and freeze-drying. It was shown that porogen leaching and gas foaming techniques produce scaffolds having larger pores (100-200 μm) as compared to the scaffolds formed by freeze-drying (10-50 μm). The compressive moduli of the scaffolds vary depending on the preparation conditions between 10 kPa and 3 MPa.

An alternative simple route to produce 3D highly porous fibroin networks is the low temperature gelation technique, known as cryotropic gelation or cryogelation. Since the pioneering works of Lozinsky and coworkers, cryogelation technique has been widely used to produce macroporous gels (cryogels) of high toughness and superfast responsiveness. By this technique, polymerization and/or cross-linking reactions are conducted in apparently frozen reaction solutions. During freezing of an aqueous polymer solution containing a chemical cross-linker, the polymer chains and the cross-linker molecules expelled from the ice concentrate within the liquid channels between the ice crystals, so that the cross-linking reactions only proceed in these unfrozen domains. After cross-linking and, after thawing of ice, a macroporous material is produced whose microstructure is a negative replica of the ice formed. In contrast to the mechanically weak macroporous gels prepared by phase separation technique, cryogels are very tough and withstand very large strains without permanent deformation or fracture.

The aim of the present study is the preparation of silk fibroin cryogels with tunable properties starting from frozen fibroin solutions in the presence of 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) as a crosslinker. BDDE contains epoxide groups on both ends that can react with nucleophiles, including amino groups, sulfhydryls, and hydroxyls. Recently, our research group has shown that the introduction of ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) cross-links between the fibroin molecules decreases the mobility of the chains, which triggers the conformational transition from random-coil to β -sheet structure and hence fibroin gelation. Gelation reactions conducted at +50°C showed formation of strong to weak fibroin hydrogels depending on the pH of

the solutions, which was adjusted by the addition of *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED).

Here, we conducted the gelation reactions of fibroin in frozen solutions -18°C . The reactions were first carried out at a fibroin concentration of 4.2 w/v % in the presence of 20 mmol/g epoxide while the amount of TEMED was varied. Gelation at -18°C results in cryogels with a gel fraction $W_g = 1$ over the whole range of TEMED investigated. Both the swelling ratio and the modulus of the cryogels do not change much with the TEMED content and they remain at 16 and 53 kPa, respectively. This is in contrast to the fibroin hydrogels where the modulus decreases while the swelling ratio increases with rising amount of TEMED and, no gel forms at or above 0.25 % TEMED.

The reaction between BDDE and fibroin was assessed by the ATR-FTIR spectra of freeze-dried fibroin samples. In addition to a shift of the Amide I absorption band to lower wavenumbers, new bands at $1040 - 1100\text{ cm}^{-1}$ appear upon gelation, which were assigned to the ether stretching bands of BDDE cross-linkages. Amide I band region of the spectra presenting the carbonyl stretching vibration of amide groups on silk fibroin is characterized by a peak at 1640 cm^{-1} indicating the presence of primarily random coil and/or α -helix conformations. After cryogelation, all samples display a main peak at 1620 cm^{-1} which was assigned to β -sheet conformation. In addition to the main peak, shoulders at 1660 and 1698 cm^{-1} appear after gelation, which can be assigned to α -helix and β -turn conformations, respectively. This indicates the occurrence of a conformational transition from random coil to β -sheet structure in frozen fibroin solutions. A further evidence for the β -sheet formation comes from the X-ray profiles of freeze-dried cryogels. Silk fibroin before gelation exhibits a broad peak at around 22° indicating an amorphous structure. After gelation, all the cryogels show a distinct peak at 20.9° and two minor peaks at 9.8 and 24.5° . These are the characteristic peaks of the β -sheet crystalline structure of silk fibroin corresponding to β -crystalline spacing distances of 4.3, 9.0, and 3.6 \AA , respectively. To estimate the conformation of the fibroin network chains, peak separation of Amide I band was carried out after base line correction by selecting a Gaussian model for curve fitting. The peak positions were fixed at 1620, 1640, 1660, and 1698 cm^{-1} , representing β -sheet, random coil, α -helix, and β -turn conformations, respectively. The results of β -sheet contents show that fibroin chains before gelation have $12 \pm 2\%$ β -sheet structures, while their contribution increases to $33 \pm 2\%$, independent on the amount of TEMED.

Mechanical tests showed that the fibroin hydrogels formed at 50°C fractured under low deformation indicating that the mechanical stress applied is localized without effective dissipation. However, fibroin cryogel remained mechanically stable up to complete compression. Important point is that, as the cryogel is squeezed under the piston or, via manual hand compression, the gel releases all its water so that it can completely be compressed. After the release of the load, the gel sample immediately recovers its original shape by absorbing the released water. Successive compression tests conducted on the same gel sample between 0 and 99.8 % strain showed reversibility of the stress-strain curves of the cryogels revealing that no crack occurs during the experiments. The results indicate that fibroin cryogels prepared as beads or high flow-path monolith columns can be used in separation processes in which the separated compounds such as particulate matter or proteins deposited in the internal pore surface can easily be recovered by compression of the gels under a piston.

Macroporous fibroin scaffolds were obtained by freeze-drying of the cryogels and hydrogels under identical conditions. The hydrogel samples were transparent (> 0.10 % TEMED) or translucent, indicating the existence of scattering centers for light, while all the cryogels had an opaque white color. After freeze-drying, scaffolds derived from the cryogels retained their original shape while a lateral distortion in the cylindrical shape of the hydrogel scaffolds was observed. SEM images of these samples after freeze-drying also show that the cylindrical shape of the hydrogel scaffold is partially destroyed due to the weak pore structure. In contrast, cryogel scaffolds were mechanically stable and consisted of regular pores of sizes $10^1 \mu\text{m}$ which are typical for macroporous networks created by the cryogelation technique. The pore size of the cryogel scaffold could be regulated depending on the cryogelation conditions. Increasing fibroin concentration C_{SF} led to scaffolds with thicker pore walls but a smaller pore size. For instance, the pore diameter decreased from 33 to 10 μm as C_{SF} increased from 4.2 % to 12.6 %. The inverse relation between C_{SF} and the pore size is possibly related to the higher amount of unfrozen microdomains during gelation as the amount of fibroin is increased.

Mechanical properties of the scaffolds were investigated by uniaxial compression tests. Three different regimes were observed in the stress-strain curve of the cryogel scaffold. First, the curve is quite linear indicating that the porous structure remains mechanically stable in this range of strain. This linear elastic regime is followed by a near-plateau regime indicating that the network easily deforms due to the collapse of its pores under the pressure. The critical stress corresponding to the plateau regime, denoted by σ_p , is thus a measure of the mechanical stability of the porous structure. Finally, the steep increase of the curve in the third regime corresponds to the compression of the nearly non-porous fibroin network. Although freeze-dried hydrogels are also porous, no distinct plateau was observed in stress-strain curves, which is attributed to the weak pore structure and irregularity of the porous structure. Inspection of stress-strain curves of cryogel scaffolds revealed that the critical stress σ_p increases with decreasing size of the pores, that is, with increasing fibroin content C_{SF} . The results thus suggest increasing mechanical stability of the porous structure of fibroin scaffolds with decreasing size of the pores. Indeed, the compressive modulus and the compressive stress measurements of the scaffolds support this finding. The cryogel scaffolds formed at $C_{\text{SF}} = 4.2$ % exhibit a compressive modulus E of 8 MPa over the whole range of TEMED with a compressive nominal stress σ_{comp} of 0.224 MPa. These values are about 1 order of magnitude higher than those of the hydrogel scaffolds formed below 0.25 % TEMED ($E = 1.0$ MPa, $\sigma_{\text{comp}} = 0.030$ MPa). The most significant variations in the modulus and strength of the cryogel networks were observed by changing fibroin concentration C_{SF} at the gel preparation. E increases from 7 to 48 MPa while σ_{comp} increases from 0.2 to 1 MPa as C_{SF} is increased from 4.2 to 12.6 %. The extraordinary strength of the cryogel scaffolds originates from the high fibroin concentration of the pore walls; gelation in frozen solutions confines fibroin in a small region of the reaction volume forming the pore walls of the final material. This also provides a high degree of toughness to cryogels in their swollen states.

1 GİRİŞ

Hidrojeller, hidrofilik polimer ağyapısı ile ağyapı içindeki çözücünden (su veya sulu çözelti) oluşan iki fazlı bir sistem olarak tanımlanabilir [1,2]. Polimer ağyapı, çözücünün jel dışına akmasını engellerken çözücü ağyapının çökmemesini sağlar. Polimerik hidrojeller konusunda günümüzde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bilim insanlarının hidrojel sistemlerine olan ilgisi bu sistemlerin yüksek su emme kapasiteleri, dıştan gelen uyarılara bağlı olarak ani hacim değiştirebilme yetenekleri, biyolojik sistemlere benzerlikleri, bunun sonucu olarak biyomoleküllerde molekül-içi etkileşmelere bağlı konformasyon değişimlerini izlemekte ve anlamakta model sistemler oluşturmaları ve hidrojel halinde kimyasal reaksiyonlara girebilmeleri nedeniyledir.

Polimerik hidrojellerinin üstün özellikleri sonucu ileri teknoloji malzemesi olarak insan yaşamında geniş bir yer tutmakta olup uygulama alanları giderek genişlemektedir. Günümüzde hidrojeller en çok süperabsorban polimer (SAP) olarak çocuk bezi ve hijyenik ped yapımında kullanılmaktadır. Diğer yandan ziraatta toprakta su tutucu malzeme olarak, oral ve transdermal kontrollü salınım sistemlerinde, kontakt lenslerde, yara örtülerinde, harekete geçiricilerde, biyosensörlerde, yapay organların yapımında da uygulama alanı giderek genişlemektedir [3,4]. Hidrojellerin sensör uygulamalarına bir örnek olarak vücuda yerleştirilebilen ve “telsiz glikoz sensörü” işlevi gören fenilboronik asit esaslı hidrojeller verilebilir [5]. Vücuttaki glüköz seviyesindeki artış hidrojelin şişmesine yol açmakta, bunun sonucu ortaya çıkan frekanstaki değişim uzaktan algılanarak hastaya anında müdahale edilebilmektedir. Hidrojellerin potansiyel uygulama alanları ise son derece geniş olup sınırları ancak bilim insanının hayal gücünün sınırı ile çizilebilmektedir.

Hidrojellerin pratik uygulamalarında, dışarıdan gelen uyarılara bağlı olarak hacim değişimlerinin çok hızlı olması istenmektedir. Ancak, klasik hidrojellerin hacim değişimleri çok yavaş olarak gerçekleşir. Uyarılara hızlı cevap verebilen hidrojellerin sentezi amacıyla jel boyutlarının küçültülmesi (mikrojel sentezleri), jel

yüzeyine linear zincirlerin bağlanması, ve makrogözenekli jellerin tasarımı konularında araştırmalar yapılmaktadır [6-8]. Hidrojellerin pratik uygulamalarını sınırlayan diğer bir büyük etken ise mekanik olarak dayanıksız oluşlarıdır. Dayanıklı ve tok hidrojellerin eldesi için son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmakta ve çeşitli teknikler geliştirilmektedir. Bu tekniklerden başlıca dört tanesi dikkat çekmekte ve mekanik özellikleri iyi jellerin elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Bunlar; çift-ağyapılı, topolojik, nanokompozit ve kriyojeller olarak tanımlanmaktadır [9-12].

Kriyojelasyon, makrogözenekli malzemelerin eldesi için üzerinde son yıllarda yoğun çalışmaların yapıldığı bir sentez tekniğidir [12]. Çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklarda reaksiyonların gerçekleştirildiği kriyojelasyon tekniği kullanılarak süper hızlı cevap verebilen makrogözenekli jeller elde edilmiştir [14-20]. Düşük sıcaklıklardaki jelleşme reaksiyonlarıyla, polimer ağyapı içerisinde birbirine bağlı bir gözenek yapı elde edilmektedir. Uygulanan yöntemle, çapraz bağlanma reaksiyonları sadece donmamış mikrobölgelerde ilerlemekte ve reaksiyon sonucu elde edilen jelin oda sıcaklığına getirilmesi ile donmuş bölgelerdeki çözücü kristalleri eriyerek hidrojel içerisinde boşluklar oluşturmaktadır. Böylece birbiri ile bağlantılı açık hücre yapısında mikrometre boyutlarında gözeneklere sahip malzemeler elde edilmektedir. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Örneğin, nano veya mikro partiküller mikroorganizmalar ve hücrelerin kütle transfer ve difüzyon mekanizmalarına destek olurken biyolojik nanopartiküllerin (plazmitler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür [21]. İlk olarak 1960'lı yıllarda rapor edilmiş ve büyük ilgi görmüş bu malzemeler biyotıp ve biyoteknolojide, kromatografik ayırma, hücrelerin veya biyomoleküllerin immobilizasyonu gibi alanlarda kullanılmak üzere tasarlanmış ve uygulanmıştır [22].

Bu tezin amacı hem mekanik dayanıklılığı çok iyi olan hem de dışarıdan gelen uyarılara hızlı cevap verebilen makrogözenekli ipek fibroin jellerinin sentezlenmesidir. Bu amaçla ipek fibroini TEMED katölizörü varlığında BDDE çapraz bağlayıcısıyla -18°C'de donmuş sulu ortamlarda çapraz bağlanma reaksiyonlarına tabi tutulmuş ve ipek fibroin jelleri elde edilmiştir. Kriyojelasyon tekniği kullanılarak elde edilen bu jellerin +50°C'de sentezlenen ipek fibroin jellerine

oranla daha iyi mekanik özellikler gösterdikleri ve dışarıdan gelen uyarılara çok hızlı cevap verdikleri saptanmıştır. Kullanılan solventin (su) donma noktasının altındaki sıcaklıklarda reaksiyonların gerçekleşmesi sonucu, ipek fibroin ve çapraz bağlayıcının görünürde donmuş gibi gözükken sistemin donmamış bölgelerinde yoğunlaşmaları sağlanmaktadır. Bu sayede mekanik olarak dayanıklı kemik hücre mühendisliğinde iskelet olarak kullanıma uygun makro gözenekli ipek fibroin iskeletleri sentezlenmiştir.

2 TEORİK KISIM

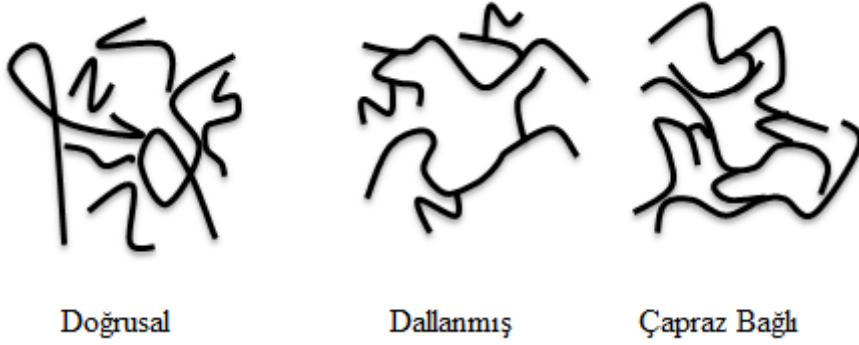
2.1 Polimerik Malzemeler

Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin, yani makromoleküllerin varlığı ilk olarak 1920'li yıllarda Hermann Staudinger tarafından öne sürülmüştür. Staudinger'in bu önerisi 10 yıl sonra 1930' da kabul edilmiş ve polimer kelimesi 1930'lardan sonra bilimsel alanda kullanılmaya başlanmıştır. Polimerler monomer adı verilen küçük molekülün art arda dizilmesi ile oluşan uzun zincirli yapılardır. Tek bir polimer zincirinde binlerce ya da milyonlarca monomer bulunur. Polimer zincirini oluşturan monomerlerin özellikleri ve zincirlerin birbirleri ile olan etkileşimleri polimer malzeme özelliklerinde belirleyici olmaktadır. Sahip oldukları üstün özellikleri nedeniyle polimerik malzemelerin kullanım alanları giderek yaygınlaşmaktadır. Polimerlerin başlıca avantajları, hafif oluşları, korozyona karşı dayanıklı oluşları ve kolay işlenebilirlikleridir.

Polimer zincirlerinin fiziksel şekli göz önüne alınarak kendi içlerinde doğrusal, dallanmış ve çapraz bağlı polimerler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Şekil 2.1).

1. Doğrusal polimerler : Ana zincirleri üzerindeki atomlara yalnız yan grupların bağlı olduğu polimerlere, doğrusal polimer denir. Doğrusal polimerlerin ana zincirleri, kovalent bağlarla başka zincirlere de bağlı değildir. Uygun çözücülerde çözünürler ve eritilerek defalarca şekillendirilebilirler (işleme, kalıplama, biçimlendirme).
2. Dallanmış Polimerler : Ana zincirler üzerinde kendi kimyasal yapısıyla özdeş, kovalent bağlarla bağlı ve dal görüntüsünde başka zincirler bulunan yapılardır. Dallanmış polimerler polimerizasyon sırasında dallanmaya yol açan yan tepkimeler ya da ikincil tepkimeler sonucu oluşur. Yan dalların (zincirlerin) uzunlukları birbirinden farklı olabileceği gibi yan dalların üzerlerinde ayrıca başka dallar da bulunabilir. Dallanmış polimerlerin özellikleri genelde doğrusal yapılarına yakındır.

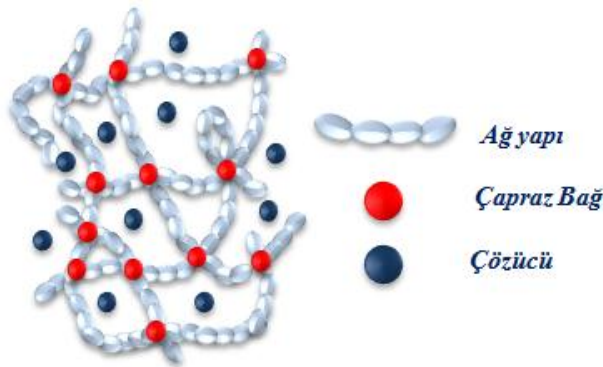
3. Çapraz Bağlı Polimerler : Ana zincirler birbirlerine değişik uzunluktaki zincir parçalarıyla kovalent bağlar üzerinden bağlıdır. Çapraz bağın yoğun olması halinde ağyapılı polimer yapısı elde edilir. Ağyapılı polimerlerin tüm zincirleri birbirlerine bağlı olduğu için sistem tek bir molekül gibi düşünülebilir ve polimer örneğinden bir zincirin çekilmesi, tüm polimer örneğinin hareketi anlamına gelir [23].



Şekil 2.1 : Polimerlerin fiziksel şekillerine göre ayrımı

2.2 Hidrojeller

Hidrojeller, hidrofilik polimer ağyapısı ile ağyapı içindeki çözücünden (su veya sulu çözelti) oluşan iki fazlı bir sistem olarak tanımlanabilir [1,2]. Şekil 2.2’de polimer ağyapısının şematik gösterimi verilmiştir. Polimer ağyapı, çözücünün jel dışına akmasını engellerken çözücü ağyapının çökmemesini sağlar. Jeller fiziksel ve kimyasal olmak üzere ikiye ayrılabilir. Kimyasal jeller; polimer zincirlerinin birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak meydana getirdiği ağyapılardır. Fiziksel jeller ise Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimler ile bir araya gelen moleküllerin oluşturduğu polimer yapılarıdır [24].



Şekil 2.2 : Polimerik jel ağyapısının şematik gösterimi

Polimerik hidrojelere konusunda günümüzde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bilim elemanlarının hidrojel sistemlerine olan ilgisi bu sistemlerin yüksek su emme kapasiteleri, dıştan gelen uyarılara bağlı olarak ani hacim değiştirebilme yetenekleri, biyolojik sistemlere benzerlikleri, bunun sonucu olarak biyomoleküllerde moleköl-içi etkileşmelere bağlı konformasyon değişimlerini izlemekte ve anlamakta model sistemler oluşturmaları ve hidrojel halinde kimyasal reaksiyonlara girebilmeleri nedeniyledir. Polimerik jellerin bu gibi üstün özellikleri sonucu süperabsorban, iyon değiştirici reğine, selektif reğine, GPC kolon dolgu maddesi, fotorezist, katalizör, dişçilik malzemesi, kontakt lens, kontrollü salınım sistemi, enzim ve hücrelerin immobilizasyonunda taşıyıcı, yapay organlar, yapay kar, zirai uygulamalarda su tutucu, kayaları parçalayıcı gibi birçok geniş uygulama alanı vardır.

2.3 Makrogözenekli Jeller

Hidrojelere pratik uygulamalarında, dışarıdan gelen uyarılara bağlı olarak hacim değişimlerinin çok hızlı olması istenmektedir. Ancak, klasik hidrojelere hacim değişimleri çok yavaş olarak gerçekteşir. Uyarılara hızlı cevap verebilen hidrojelere sentezi amacıyla;

- i. Jel boyutlarının küçültölmesi (mikrojel sentezleri)
- ii. Jel yüzeyine doğrusal zincirlerin bağlanması
- iii. Makrogözenekli jellerin tasarımı

konularında araştırmalar yapılmaktadır [6-8]. Hidrojelere pratik uygulamalarını sınırlayan diğer bir büyük etken ise mekanik olarak dayanıksız oluşlarıdır. Dayanıklı ve tok hidrojelere eldesi için son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmakta ve çeşitli teknikler geliştirilmektedir. Bu tekniklerden başlıca dört tanesi dikkat çekmekte olup mekanik özellikleri iyi jellerin elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu teknikler aşağıda sıralandığı gibidir [9-12].

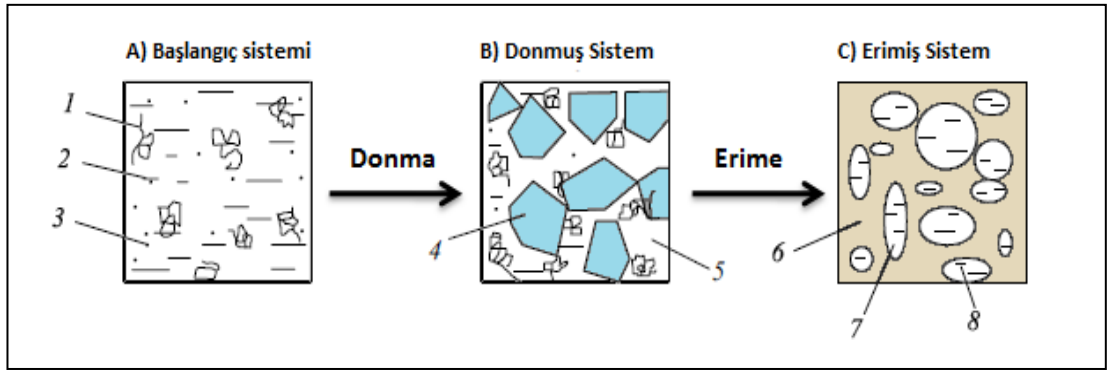
- Çift-ağyapılı jeller
- Topolojik jeller
- Nanokompozit jeller
- Kriyojelere

Makrogözenekli ve dolayısıyla uyarılara hızlı cevap verebilen hidrojenlerin sentezinde en yoğun olarak “faz ayrımı tekniği” uygulanmıştır. Bu tekniğe göre, jelleşme reaksiyonları sırasında çözücü, çapraz bağlayıcı ve inert katkı maddelerinin (gözenek oluşturucu, porogen) miktarlarına, reaksiyon sistemindeki polimer-çözücü etkileşmelerinin boyutlarına bağlı olarak bir makrofaz ayrımı gerçekleştirilmektedir [8,25]. Faz ayrımı sonucu polimerizasyon sistemi polimer ve çözücü-monomer olmak üzere iki sürekli faza ayrılır. Monomerlerin polimere dönüşümü ile çözücü-monomer fazındaki monomer konsantrasyonu giderek azalır ve reaksiyon sonunda sadece çözücünden oluşan ayrı bir sıvı faz jel içerisinde kalır. Bu şekilde, polimerizasyon ve çapraz bağlanma reaksiyonlarının tamamlanmasından ve çözücünün uzaklaştırılmasından sonra mikro ve nano boyutlarda gözenekler içeren makrogözenekli polimer ağyapıları elde edilmektedir [8,26,27]. Ancak, faz ayrımı tekniği uygulanarak makrogözenekli hidrojenlerin sentezi yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında mümkün olabilmekte ve dolayısıyla hidrojenler çok fazla çözücü emememektedir. Diğer yandan hidrojenlerin içerisindeki gözenekler tekdüze olmayıp 10^1 nm’den 10^3 µm ye kadar değişen geniş bir dağılım göstermektedir. Faz ayrımı tekniği ile elde edilen makrogözenekli malzemelerin en büyük dezavantajı ise mekanik özelliklerinin iyi olmaması, % 10 - 30 deformasyon oranlarında bile parçalanmalarıdır. Makrogözenekli ve aynı zamanda üstün mekanik özellikler gösterebilen hidrojenlerin sentezi “kriyojelleşme tekniği” uygulanarak mümkün olmaktadır [12].

Faz ayrımı tekniği ile makrogözenekli jellerin oluşumuna alternatif bir yöntem kriyojelleşme tekniği olup bu teknik uygulanarak elde edilen jellere kriyojel adı verilmektedir. Kriyojelleşme tekniği ile hidrojenler içerisinde makrogözenekli bir yapı oluşturmasının yanı sıra elde edilen jellerin mekanik özelliklerinin çok iyi oluşu nedeniyle kriyojelleşme ile yapılan araştırmalar artmaktadır. Kriyojelleşme tekniğinin ana prensibi, jelleşme reaksiyonlarının reaksiyon sisteminin donma noktasının altında ilerlemesi ve dolayısıyla, ortamdaki buz kristallerinin kalıp etkisi yaparak gözenekli bir yapının oluşmasıdır [12,28-34]. Bu amaçla, reaksiyon çözeltisi donma noktasının altındaki bir sıcaklığa getirilerek dondurulur ve reaksiyonlar donmuş reaksiyon sisteminin donmamış mikrobölgelerinde ilerler.

Kriyojenik şartlarda, buz kristallerinin büyümesi gözeneklerin oluşmasına olanak sağlarken, erimesinden sonra, birbirine bağlı gözenekler için kalıp davranışı sergilediğinden dolayı tipik olarak kriyojeller, -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı mikrofaz içinde gerçekleşir. Çözücünün kristalleri donma esnasında büyürken içerdiği reaktifleri dışarı verme eğiliminde olup, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşmektedir. Kimyasal reaksiyonların bitmesinden sonra erime ile birlikte sistem sıvı çözücü ile doldurulmuş sürekli makrogözenekli bölgeler içeren bir matriksten oluşmaktadır (Şekil 2.3) [81].

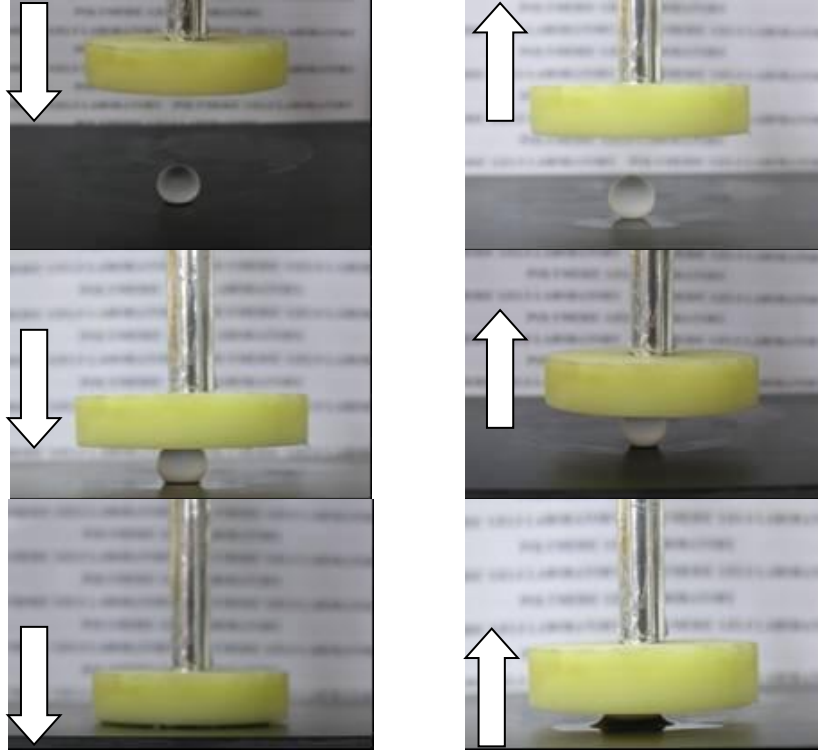
Yarı donmuş reaksiyon ortamında çözünmüş reaktifler (jel öncülleri) kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği donmamış sıvı mikrofaz içinde yoğunlaşır. Böylece polimer zincirleri gözeneklerden gözenek duvarlarına taşınarak kriyojeller oluşturulur. Klasik bir jel içindeki polimer derişimi ile karşılaştırıldığında gözenek duvarları daha yüksek bir polimer konsantrasyonuna sahip olur. Gözenek duvarları içindeki artan polimer konsantrasyonu kriyojelin mekanik sertliğinin yeterli olmasını sağlar [82-85].



Şekil 2.3 : Kriyojelasyon prosesi: 1. çözeltideki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makrogözenekler; 8. çözücü [12].

Donmamış mikrobölgelerdeki monomer ve başlatıcı konsantrasyonunun çok yüksek olması nedeniyle, reaksiyonlar -22°C'ye kadar olan çok düşük sıcaklıklarda bile, normal sıcaklıklara oranla, daha hızlı ve daha verimli olarak gerçekleşmektedir [12,28,35].

Kriyojellerin en dikkat çeken özelliği ise, kuvvet altında, içlerindeki çözücü vererek % 100'e yakın bir oranda sıkıştırılabilmeleri, ardından çözücü eklendiğinde anında şişerek başlangıç konumuna geri dönebilmeleridir. Şekil 2.4'te akrilamid/2-akrilamido-2-metilpropan sulfonik asit monomerlerinin -18°C 'de donmuş sulu çözeltilerinden elde edilen kriyojel küreciklerinin sıkıştırma ve sıkıştırma gevşemesi testleri sırasında çekilen fotoğrafları görülmektedir. Kuvvet altında kriyojelin % 100'e kadar sıkıştırılabildiği ve kuvvet kaldırıldığında tekrar eski haline geri dönebildiği görülmektedir [36].



Şekil 2.4 : Akrilamid/2-akrilamido-2-metilpropan sulfonik asit monomerleri ile sentezlenen kriyojellerin sıkıştırma ve gevşemesi sırasında çekilen fotoğraflar [36]

Kriyojeller sentetik akrilamid/2-akrilamido-2-metilpropan sulfonik asit monomerleri gibi sentetik malzemelerden elde edilebileceği gibi doğal malzemelerden de sentezlenebilir. Üstün mekanik özellikleri ile öne çıkan doğal bir malzeme olan lif yapısındaki ipek fibroin proteini de kriyojel eldesi için uygundur.

2.4 İpek Fibroin

Proteinlerin temel yapı taşı olan amino asitler; hem amino hem de karboksilik fonksiyonel grupları içerirler. Aminoasitte bulunan artı ve eksi yüklerin birbirine eşit

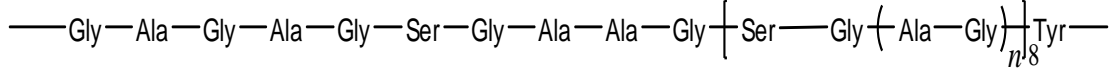
olduğu, yani amino asitin net yükünün 0 olduğu pH değeri izoelektronik nokta olarak tanımlanır. Doğada 300 amino asit bulunduğu halde, bunların sadece 20'si proteinlerde bulunur. Proteinler yüksek organizmalarda 1 imino asit monomeri ve 19 amino asit monomerine kadar monomerlerin farklı kombinasyonlarla amid bağları ile monomerler arasından bağlanmasıyla oluşur. Proteinler üzerindeki amino asit ünitelerine amino asit kalıntısı denilmektedir. Yüksek organizmalarda sadece L amino asit monomer olarak bulunabilirken düşük yaşam formlarında, örneğin bakteri veya gelişmemiş bitkilerde D amino asit monomer olarak bulunur [37].

Doğada ipek; ipek böceği ve örümcekler tarafından özel epitel hücreleri içinde sentezlenen bir biyopolimerdir. En yaygın olarak Bombyx mori ipek böceği ile Nephila calavipes ve Araneus diadematus gibi bazı örümcek türlerinden elde edilir. Bombyx mori ipek böceğinin fibroin lifleri yaklaşık 10-25 mm çapında ve moleköl ağırlığı 26 kDa olan hafif ve 390 kDa olan ağır zincirlerin 1:1 oranında disülfid bağları ile bağlanmasıyla oluşur. Bu proteinler hidrofilik polimer ailesinden olan serisin ile (20-310 kDa) örtülmüştür. Disülfid bağı ağır zincirin Cys-c20 (karbonil ucundan 20. amino asit kalıntısı) ile hafif zincirin Cys-172 arasında olur ve fibroini bir arada tutar. P25 olarak isimlendirilen bir glikoprotein kovalent olmayan bağ ile bu proteinlere bağlanmıştır [38,39]. Ağır ve hafif zincirler ile P25 proteinin molar oranları ise 6:6:1 şeklindedir. P25 proteininin yapının bütünlüğünü koruduğu düşünülmektedir. İpek liflerinin yapısal proteini olan fibroini bir arada tutan serisin proteini yüksek alkali çözeltilerde çözünür. İpek kozasının kütlece % 25-30'unu serisin oluşturmaktadır. İpek; fibroin ve serisinin yanında yağ, wax (mum) boya ve inorganik tuzlar gibi çeşitli artıklar da içerir [37,38,40,41]. Çizelge 2.1'de Bombyx Mori ipek böceğinden elde edilen ipeğin bileşimi verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Bombyx Mori ipek böceğinden elde edilen ipeğin bileşimi.

Bileşen	Bileşenin Yüzdesi
Fibroin	70 - 80
Serisin	20 - 30
Wax	0,4 - 0,8
Karbonhidratlar	1,2 - 1, 6
İnorganik maddeler	0,7
Pigment	0,2
Toplam	100

İpek fibroin glisin, alanin ve serin amino asitlerinin baskın olarak bulunduğu doğal bir proteindir [39]. Glisin, alanin, serin ve tirozin kalıntılarının dizilişi şekil 2.5'te görülmektedir ve bu amino asit kalıntılarının molce oranı % 90'dır.



Şekil 2.5 : İpek fibroini oluşturan amino asitlerin genel gösterimi

İpek fibroindeki diğer amino asitler ve bunların hafif ve ağır alanlardaki oranları çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Polimerin ağır alanı ile molekül ağırlığı 350-370 kDa olan düzenli hidrofobik makromoleküller, hafif alan ile molekül ağırlığı yaklaşık 25 kDa olan büyük polar amino asit kalıntıları kastedilmiştir [40].

Çizelge 2.2 : İpek fibroin proteinindeki amino asit yüzdeleri [40].

Amino Asit	Bileşen (% mol)		
	Toplam	Ağır Alan	Hafif Alan
Glisin	42,9	49,4	10,0
Alanin	30,0	29,8	16,9
Serin	12,2	11,3	7,9
Tirosin	4,8	4,6	3,4
Valin	2,5	2,0	7,4
Aspartik Asit	1,9	0,65	15,4
Glutamik Asit	1,4	0,70	8,4
Treonin	0,92	0,45	2,8
Fenilalanin	0,67	0,39	2,7
Metionin	0,37	-	0,37
İzolösin	0,64	0,14	7,3
Lösin	0,55	0,09	7,2
Pirolin	0,45	0,31	3,0
Arginin	0,51	0,18	3,8
Histidin	0,19	0,09	1,6
Lisin	0,38	0,06	1,5

Fibroin proteinini oluşturan amino asitlerin; apolar hidrofobik alifatik hidrokarbon içerenleri; alanin, glisin, lösin, izolösin, valin ve pirolin ile aromatik sübstient içeren fenilalanin amino asitleridir [40]. Pirolin amino asiti serbest amino grubu içermeyen fakat karboksil grubuna bağlı olan pirolidin halkasındaki alifatik hidrokarbonlardan dolayı hidrofobik özellik gösterir. Polar hidrofilik hidroksil grubu içeren amino asitler; aspartik asit, glutamik asit, serin, treonin ve tirozin amino asitleridir. Lisin amino asitinin içerdiği amino grubu ve arginin amino asitinin içerdiği guanidine

grubu bu amino asitlerin hidrofilik olmasını sağlamaktadır. Çizelge 2.3'te ipek fibroinde bulunan amino asitlerdeki hidrofobik ve hidrofilik kısımlar görülmektedir.

Çizelge 2.3 : İpek fibroin proteininde bulunan amino asitlerdeki hidrofobik ve hidrofilik kısımlar [40].

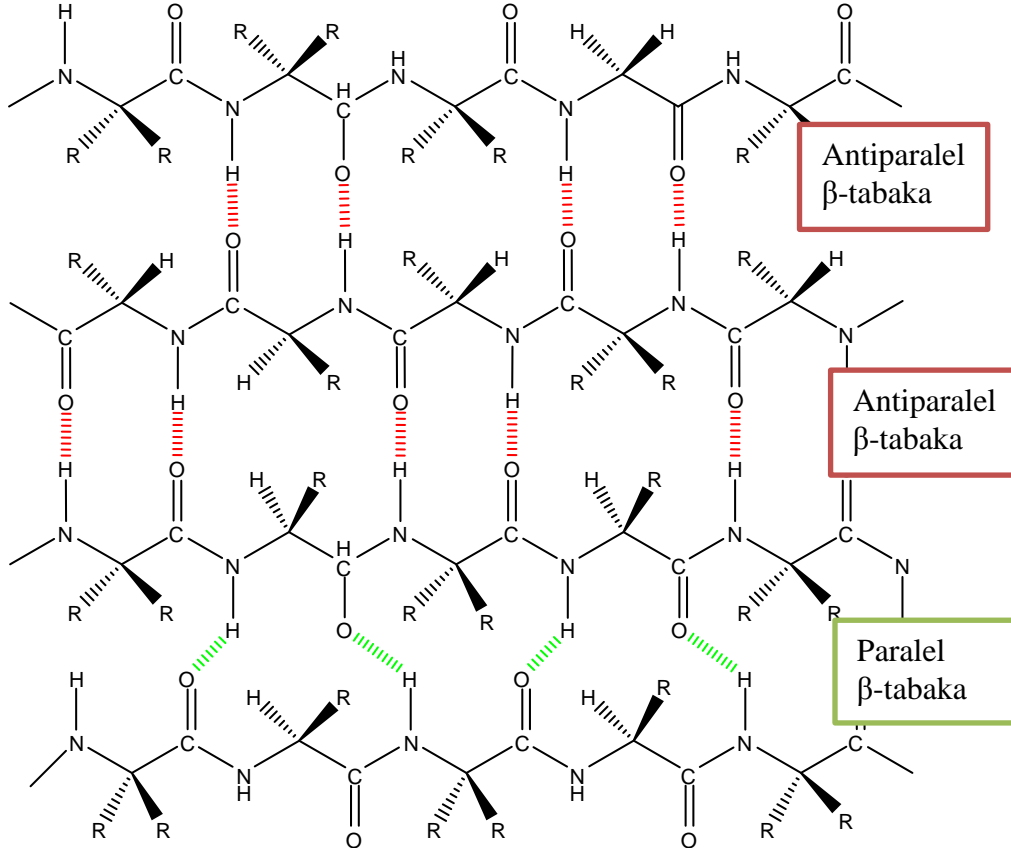
Amino Asit	Hidrofobik grup içeren amino asitlerin R grupları	Hidrofilik hidroksil grubu içeren amino asitlerin R grupları	Amino asitlerin genel formülü
Alanin	H ₃ C-		$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CHNH}_2 \\ \\ \text{R} \end{array}$
Valin	(CH ₃) ₂ CH-		
Lösin	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -		
İzolösin	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)HC-		
Serin		HOCH ₂ -	
Treonin		CH ₃ (OH)HC-	
Tirozin		C ₆ H ₅ (OH)CH ₂ -	
Aspartik asit		HOOCCH ₂ -	
Glutamik asit		HOOC(CH ₂) ₂ -	
Lisin		H ₂ N-(CH ₂) ₄ -	

İpek fibroinde doğal bir protein olması sebebiyle proteinlerde bulunan birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılar görülür. Proteinlerdeki amino asit kalıntılarının sıralanışı proteinlerin birincil yapılarını oluşturur. Amino asit kalıntılarında farklı fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. Bu gruplar polar, apolar, aromatik, anyonik ve kationik olarak sınıflandırılabilirler. Protein molekülleri arası etkileşimler (amid bağları arasındaki hidrojen bağları veya aromatik gruplar arasındaki π etkileşimleri) onların ikincil yapısı olarak bilinen konformasyonunu oluşturur. İkincil yapıya örnek olarak ipek fibroinde de bulunan α -heliks, β -tabaka ve β -döngü verilebilir.

Hidrojen bağları; bir peptidin azot atomuna bağlı hidrojen atomu ile 4. sıradaki amino asit kalıntısının karbonil oksijenleri arasında oluşur ve protein bir eksen etrafında dolanarak α -heliks yapıyı oluşturur. Heliksin her dönüşünde 3,6 amino asit kalıntısı bulunur ve her dönüşte gidilen uzaklık 0,54 nm'dir [37].

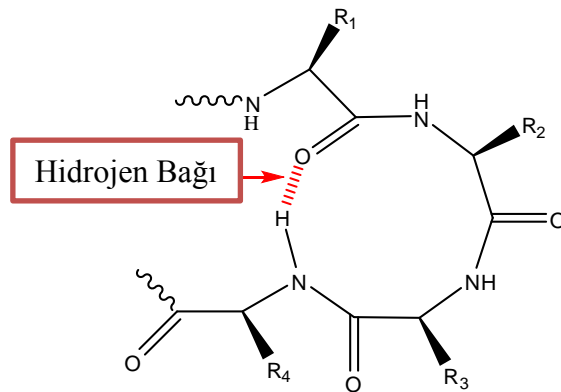
Zincirler arasındaki hidrojen bağları, yan yana olan polipeptid zincirinin β -tabaka olarak bilinen zikzak konformasyona sahip olmasına neden olur. Glisin ve alanin gibi amino asitler küçük yan zincirlerle β -tabakanın istiflenmesine imkan verirken kitleli amino asitler bu birleşmeyi engeller [37]. β -tabakalar antiparalel ve paralel β -tabaka olmak üzere iki farklı şekilde bulunabilirler. Bitişik peptid zincirleri zıt yönlerde (azot atomu ucundan karbon atomu ucuna doğru) gittikleri takdirde bu

yapıya antiparalel β -tabaka, zincirler aynı yönde giderse bu yapıya paralel β -tabaka adı verilir. Şekil 2.6’da paralel ve antiparalel β -tabakalar gösterilmiştir.



Şekil 2.6 : Paralel ve antiparalel β -tabaka gösterimi [Url-1]

Döngü ve düğüm olarak isimlendirilen konformasyonlar polipeptidlerin ikincil yapılarında görülürler. Özellikle dört amino asitin kendi eksenini etrafında 180° dönmesi ile oluşan konformasyon β -döngü olarak bilinir. Birinci amino asitteki karbonil oksijeni ile dördüncü amino asitteki hidrojen arasında hidrojen bağı meydana gelir. İkinci ve üçüncü amino asitlerde ise hidrojen bağına katılım olmaz [37]. Şekil 2.7’de β -döngü konformasyonu görülmektedir.



Şekil 2.7 : β -Döngü gösterimi[Url-1]

Heliks, β -tabaka veya β -döngü şeklinde düzenlenmemiş olan protein bölgelerinin rastgele yumak olarak düzenlendiği söylenir [43].

İpek fibroini büyük hidrofobik bloklar ile bunların aralarında ve zincir uçlarında bulunan daha küçük hidrofilik bloklardan ibaret çok-bloklu bir kopolimer mimarisine sahiptir [44-47]. Hidrofilik bloklar suda çözünürlüğü sağlarken, hidrofobik bloklar arası asosiyasyonlar, fibroinin rastgele yumak yapısından β -tabaka yapısına bir konformasyon geçişine neden olur. İpek fibroinin yapısındaki β -tabakaları malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırırken, daha düzensiz olan hidrofilik bloklar tokluğu ve elastisiteyi artırır. Fibroin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, metal iyonları, çözücünün dielektrik sabiti, elektriksel alan, eğirme ya da kesme kuvvetleri gibi çeşitli dış faktörler ipek fibroin yapısındaki konformasyon geçişlerini kolaylaştırır. Fibroin çözeltilerinde oluşan moleküller arası β -tabakaları, fiziksel çapraz bağ etkisi yaparak kararlı hidrojellerin oluşmasını sağlar [48-60].

2.4.1 İpek fibroin yapısında β -tabaka oluşumu ve jelleşme

Bombyx mori ipek böceğinden elde edilen fibroin, lif yapısında bir protein olup üstün malzeme özelliklerinin yanı sıra biyoyumurluluğu, biyobozunurluğu, yüksek derecede dayanıklı ve tok oluşu, kolaylıkla işlenebilirliği ile öne çıkan bir malzemedir [61-63]. İpek fibroin popüler olarak tekstil endüstrisinin yanında hücre kültürü, yara örtüsü, ilaç salınımı, enzim immobilizasyonu ve kemik hücre mühendisliğinde iskelet olarak kullanım alanı bulmaktadır.

Fibroin çözeltilerinde oluşan moleküller arası β -tabakaları, fiziksel çapraz bağ etkisi yaparak kararlı hidrojellerin oluşmasını sağlamasına rağmen çoğu protein hidrojellerine kıyasla, sulu çözeltilerde fibroinin jelleşmesi çok yavaş gerçekleşen bir süreçtir. Örneğin, 37°C sıcaklıkta ve % 1 - 7 konsantrasyon aralığında fibroin çözeltilerinde sol-jel faz geçişi 5 – 7 günde olur [64]. Çözeltinin pH değeri 9'un üzerine çıktığında jelleşme daha da yavaş olarak gerçekleşir ve pH = 10'da çözelti 1 ayda jelleşir. Bu yavaş jelleşme prosesi, fibroin üzerindeki karboksil gruplarının karşı-iyonlarının yarattığı ozmotik basıncı nedeniyle molekülün suda genleşmesi ve moleküller arası hidrofobik etkileşmelerin zayıflamasının bir sonucudur. Asidik pH değerlerinde ise, karboksil grupları iyonize durumda olmadıklarından, fibroin molekülü sulu çözeltide daha küçük boyutlardadır ve bu durum β -tabakalarının oluşumunu tetikler [65]. Ancak, izoelektrik noktanın (pI = 3,8 – 3,9) yakınlarındaki

pH değerlerinde bile % 3 konsantrasyondaki fibroin çözeltilerinin 2 günde jelleştiği rapor edilmiştir [66].

Fibroin çözeltilerine diepoksitlerin ilavesi ile jelleşme prosesinin çok hızlı olarak gerçekteştiği araştırma grubumuz tarafından ortaya konmuştur [67]. 1,4 Bütandioldiglisidileter, polisakkaritlerin, proteinlerin, DNA'nın ve bir çok organik molekülün çapraz bağlanmasında yaygın olarak kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. Amino, tiyol ve hidroksil grupları gibi nükleofillerle reaksiyona girebilen epoksit fonksiyonel gruplarını her iki ucunda taşıyan BDDE, 50°C'de % 4,2 konsantrasyondaki sulu fibroin çözeltilerinde geniş bir pH aralığında (8 - 11) jel oluşumunu sağlamaktadır [67]. Çözeltilinin pH değerine bağlı olarak elastik modülü (G') 10^5 Pa ile 10^1 Pa arasında değişen fibroin hidrojelleri 2 saat içerisinde elde edilebilmektedir. ATR - FTIR ve X-ışını difraksiyon teknikleri ile yapılan analizler sonucunda, fibroin jelleşmesinde BDDE çapraz bağlarının sadece "tetikleyici" etkisi yaptığı, jelleşme prosesinden ve jellerin elastik modüllerinden rastgele yumak yapısından β -tabaka yapısına konformasyonel değişimin sorumlu olduğu saptanmıştır [67].

Fibroin moleküllerinde BDDE ile uyarılan konformasyonel değişim şu şekilde açıklanabilir: Fibroin molekülleri, birbirleri ile BDDE çapraz bağlayıcısıyla bağlandıkça, moleküllerin hareketliliği azalır. Bunun bir sonucu olarak, moleküller arası hidrofobik etkileşmeler kuvvetlenerek β -tabaka yapısının çekirdeklenme ve büyüme süreci kolaylaşır. Yapılan reolojik ölçümler, jellerin elastik modüllerinde yani etkin çapraz bağ yoğunluklarında belirleyici olan etkenin β -tabakalar olduğu, BDDE çapraz bağlayıcısının etkisinin ise ihmal edilir boyutlarda olduğunu ortaya koymuştur [67].

Fibroin hidrojellerine makrogözenekli bir yapı kazandırılması ile onların doku mühendisliğinde iskelet olarak kullanımı sağlanmaktadır [68]. İskelet olarak kullanılacak biyomalzemeler için başlıca kriterler, üç-boyutlu, birbirleriyle bağlantılı makrogözenekler içermesi ve hücre onarım bölgesinde gerekli mekanik dayanıklılığa sahip olmasıdır. Özellikle kemik doku mühendisliğinde kullanılacak iskeletler için mekanik dayanıklılık çok önemlidir. Kemik iskeleti olarak çok sayıda polimerik malzeme denenmiş olmasına rağmen, bozunurluk, kontrollü gözeneklilik, stabilite, biyouyumluluk ve işlenebilirlik şartlarının optimum bir kombinasyonunun gerekliliği çoğu polimerin kullanımını sınırlamaktadır [69-71]. İpek fibroin, üstün mekanik

özellikleri, biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu ile kemik doku mühendisliğinde öne çıkan bir malzemedir. Gözenekli ipek fibroin iskeletleri, hekzafloroizopropil alkol ve metanol çözücüleri ile muamele sonucu elde edilebilmektedir [68]. Diğer yandan sulu çözeltilerden de gözenekli ipek fibroin iskeletleri elde edilebilir. Bu amaçla dondurarak-eritme, dondurarak-kurutma, gözenek oluşturuucu (porogen) ekleme, gaz oluşturma, elektro-eğirme işlemi gibi çeşitli teknikler geliştirilmiştir [72-77]. Örneğin, gözenek oluşturuucu olarak sodyum klorür ve şeker, gaz oluşturuucu olarak amonyum bikarbonat parçacıkları kullanılmıştır. Tüm bu teknikler yardımıyla oluşan gözenekli ipek fibroinin suda çözünmez bir duruma geçmesi için, yani moleküller arası β -tabakalarının oluşması için, metanol ile muamele prosesi gerekmektedir.

Biyoyumluluğu, biyobozunurluluğunun yanında kolay ve ucuz elde edilebilen ipekfibroin mekanik özellikleri ile de dikkat çekmektedir. Çizelge 2.4'te bir seri gözenekli biyobozunur polimerik iskeletlerin mekanik özellikleri, kemiğin özellikleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İpek fibroin iskeletlerinin, kemik ile ilgili hücre mühendisliği uygulamalarına uygun üstün mekanik özellikleri olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.4 : Makrogözenekli polimerik iskeletlerin mekanik özellikleri [70].

Malzeme	Basınç dayanımı (kPa)	Elastik modül (kPa)
<i>Kortikal kemik</i>	131,000 – 224,000	$\sim 20 \times 10^6$
<i>Süngerimsi kemik</i>	5,000 - 10,000	50,000 – 100,000
Kolajen ^a	~ 15	~ 150
Kitosan ^a	~ 45	~ 750
İpek fibroin ^b	175 – 320	450 – 3,300

- a) Dondurma-kurutma prosesi ile,
b) Dondurma-kurutma, gaz oluşturma ve gözenek-oluşturuucu olarak tuz ilavesi ile.

Bu tez çalışması kapsamında makrogözenekli ipek fibroin iskeletleri kriyojelleşme tekniği uygulanarak elde edilmiş olup literatürde bu konuda daha önce bir çalışma yayınlanmamıştır. Çalışma sonuçlarından görüleceği üzere, gerek basma dayanımı ve gerek elastik modül çizelge 2.4'te verilen polimer iskeletlerine ait değerlerden çok daha yüksek olan fibroin iskeletlerinin kriyojelleşme tekniği ile sentezi mümkün olmuştur.

3 DENEYSEL KISIM

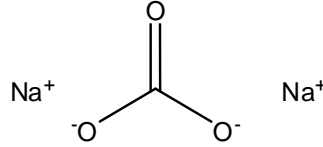
3.1 Kullanılan Kimyasallar

İpek Kozaları

Bursa Koza birlik firmasından temin edilen Bombyx mori ipek böceği kozaları ipek fibroin eldesi için kullanılmıştır.

Sodyum Karbonat

Molekül ağırlığı 105,98 g/mol olan, açık formülü şekil 3.1’de görülen, MERCK marka sodyum karbonat (Na_2CO_3) ile 0,02 M Na_2CO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti ipekteki serisin proteinini fibroin proteininden uzaklaştırmak için kullanılmıştır.



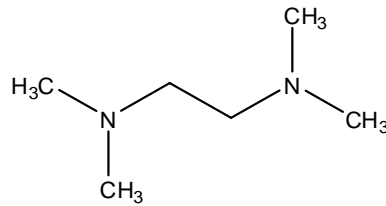
Şekil 3.1 : Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)

Lityum Bromür

Molekül ağırlığı 86,84 g/mol MERCK marka lityum bromür (LiBr) ile 9,3 M LiBr çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti ipek fibroini çözmek amacıyla kullanılmıştır.

N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin

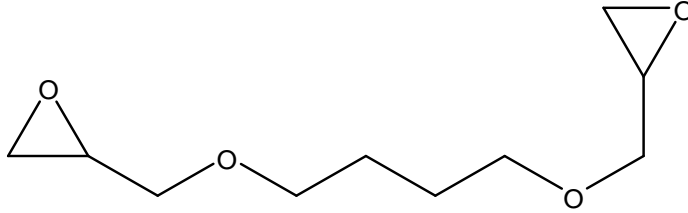
Molekül ağırlığı 116,24 g/mol olan, açık formülü şekil 3.2’de görülen, SİGMA marka *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) jel sentezinde hızlandırıcı ve pH ayarlayıcı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 : *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED)

1,4 Bütandioldiglisidileter

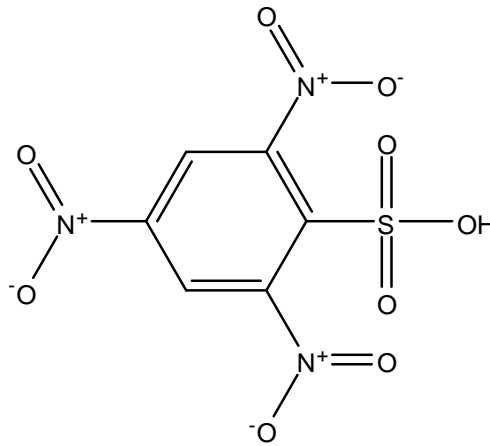
Molekül ağırlığı 340,01 g/mol olan, açık formülü şekil 3.3'te görülen, ALDRİCH marka 1,4 bütandioldiglisidileter ($C_{12}H_{24}O_4$) jel sentezinde çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.3 : 1,4 Bütandioldiglisidileter (BDDE)

2,4,6 Trinitrobenzen Sülfonik Asit

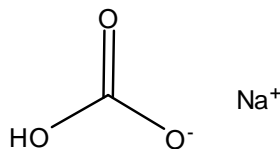
Yoğunluğu 1,14 g/mL olan, açık formülü şekil 3.4'te görülen FLUKA marka 2,4,6 trinitrobenzen sülfonik asitin ($C_6H_3N_3O_9S$) su içerisinde hazırlanmış 1M'lık çözeltisi primer amin grubu tayini için kullanılmıştır.



Şekil 3.4 : 2,4,6 Trinitrobenzenesülfonik asit (TNBS)

Sodyum Bikarbonat

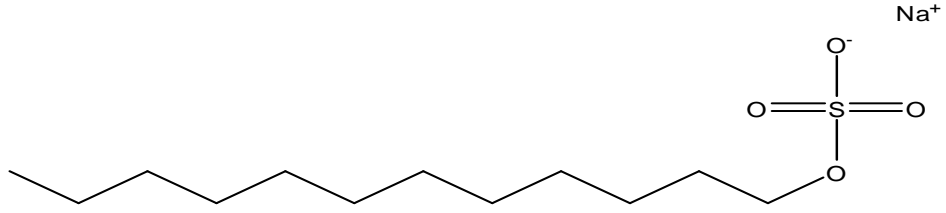
Molekül ağırlığı 84,01 g/mol olan açık formülü şekil 3.5'te verilen Sigma-Aldrich marka sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ile primer amin grubu tayininde kullanılmak üzere tampon çözelti hazırlanmıştır.



Şekil 3.5 : Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)

Sodyum Dodesilsülfat

Molekül ağırlığı 288,372 g/mol olan, açık formülü şekil 3.6'da verilen sodyum dodesilsulfat ($C_{12}H_{25}OSO_2ONa$) primer amin grubu tayininde kullanılmıştır.



Şekil 3.6 : Sodyum dodesilsülfat (SDS)

Hidroklorik Asit

Molekül ağırlığı 36,5 g/mol olan MERCK marka, % 37'lik hidroklorik asit primer amin grubu tayininde kullanılmıştır.

Polietilen Glikol

Molekül ağırlığı 10000 olan FLUKA marka polietilen glikol ile % 10 ve 15 (ağ/hac) konsantrasyonda polietilen glikol çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler ipek fibroin sulu çözeltilisinin konsantrasyonunun artırılmasında kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Hassas Terazı

Deneylerde kullanılan kimyasallar ile jellerin şişmiş ve kuru durumdaki tartımları için 205 g ağırlık kapasitesine sahip 0,1 miligrama duyarlı Sartorius model elektronik terazi kullanılmıştır.

Vakumlu Desikatör

İpek fibroinin kurutulması için kullanılmıştır.

Plastik Şırınga

Çapraz bağlanma reaksiyonları iç çapı 4,5-5 mm olan 1 mL'lik tek kullanımlık plastik şırıngalar içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Hassas Sıcaklık Ayarlı Etüv

Hidrojellerin +50 °C'de sentezi için 1°C'ye duyarlı 0-80 °C arasında çalışan Nüve EN 400 marka etüv kullanılmıştır.

Buzdolabı

Kriyojellerin sentezi için -18°C 'de çalışabilen derindonduruculu buzdolabı kullanılmıştır.

Elektronik Kumpas

Sentezlenen silindirik jel örneklerinin çaplarını ölçmek için ölçüm aralığı 0-150 mm olan Mitutoyo marka elektronik kumpas kullanılmıştır.

pH Metre

Reaksiyon çözeltilerinin oda sıcaklığında pH ölçümleri için WTW marka pH315i model pH metre kullanılmıştır.

Diyaliz Tüpleri

- i. MWCO 10000

9,3 M LiBr içinde çözülerek elde edilen ipek fibroin çözeltisinden LiBr'ü uzaklaştırıp sulu ipek fibroin çözeltisi elde etmek için Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka MWCO 10000 olan diyaliz tüpü kullanılmıştır.

- ii. MWCO 3500

Sulu ipek fibroin çözeltisinin konsantrasyonunu artırmak için MWCO 3500 olan Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka diyaliz tüpü kullanılmıştır.

Dondurmalı Kurutucu (Freeze-Dryer)

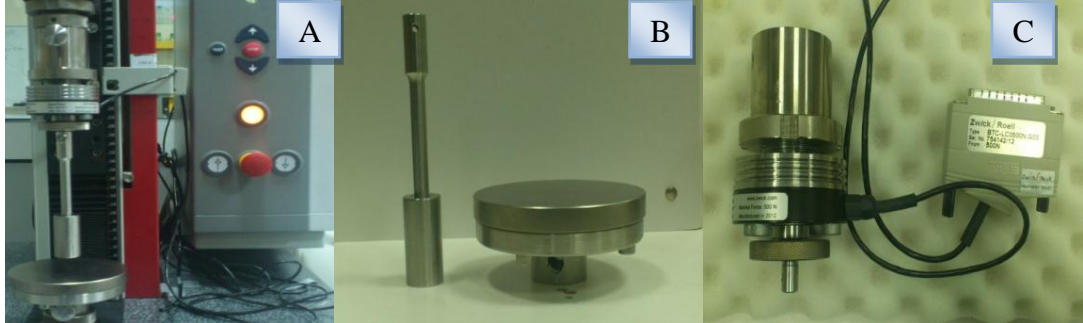
Elde edilen jellerin mekanik ölçümlerini yapabilmek ve morfolojik özelliklerini inceleyebilmek için Şekil 3.7'de gösterilen Christ marka Alpha 2-4 LD Plus model kurutucu ile jellerin kurutulması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 : Dondurmalı Kurutucu (solda), Vakum Pompası (sağda)

Mekanik Test Cihazı

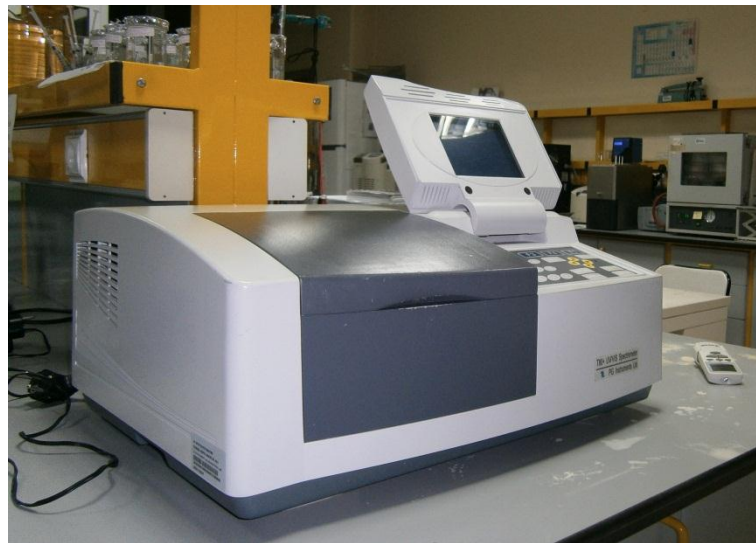
Sentezlenen jellerin mekanik ölçümleri için şekil 3.8’de gösterilen Zwick-Roell marka mekanik test cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3.8 : Zwick mekanik test cihazı (A), Basma aparatları (B), 500 N’luk yük hücresi (C)

UV-Görünür Spektrofotometre

İpek fibroinin diepoksitlerle çapraz bağlanması sırasında ipek fibroin molekülleri üzerindeki primer amin gruplarının miktarını belirleyebilmek için şekil 3.9’da gösterilen T80-UV görünür spektrofotometresi kullanılmıştır.



Şekil 3.9 : UV Görünür Spektrofotometre

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Jellerin morfolojik analizi için Jeol JSM 6335F Field Emission marka taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

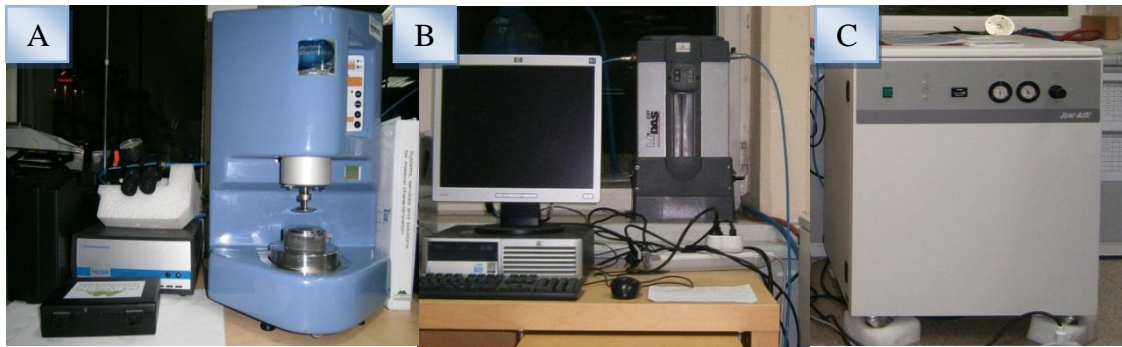
Kriyojellerdeki donmamış bölge hesabı için Perkin-Elmer Diamond marka DSC cihazı kullanılmıştır.

ATR-FTIR Spektrofotometre

İpek fibroin ağ zincirlerinin konformasyonunu belirleyebilmek için Nicolet Nexus 6700 marka ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Reometre Cihazı

Reolojik ölçümler için Bohlin marka, Gemini 150 model reometre cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3.10 : Peltier sıcaklık ünitesi ve reometre cihazı (A), PC Ekranı ve hava kurutucu (B), Kompresör (C)

3.3 Deneyin Yapılışı

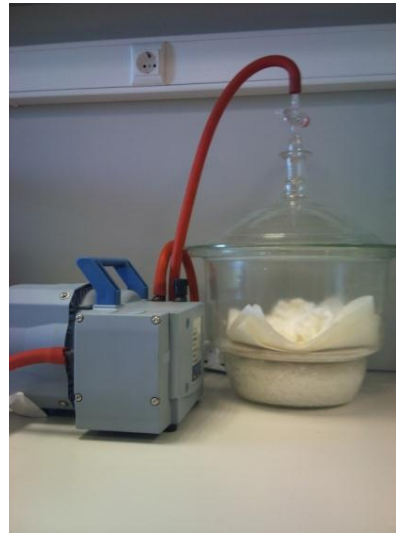
3.3.1 İpek fibroin çözeltisinin hazırlanması

Yaklaşık 10 g ipek kozası kesildikten sonra, alüminyum folyo ile ağzı kapatılmış, kaynamakta olan 1 L 0,02 M Na₂CO₃ çözeltisi içine fibroin proteinlerini bir arada tutan serisin proteinini uzaklaştırmak için atılmıştır. Şekil 3.11 A'da görülen, zambak çıkarma olarak tanımlanan bu işlem manyetik karıştırıcıda balık ile karıştırarak 1 saat süresince yapılmıştır. Wax ve kalmış olabilecek serisini uzaklaştırmak için, Şekil 3.11 B'de gösterilen, 70°C'de yaklaşık 1 L saf suda her biri 20 dakika olan 5 yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11 : Zamk çıkarma (A) ve Yıkama işlemi (B)

Saf su içerisinde çıkarılan ipek fibroin oda sıcaklığında desikatör içerisinde vakum altında 24 saatte kurutulmuştur. Şekil 3.12’de ipek fibroinin kurutulması işlemi görülmektedir.



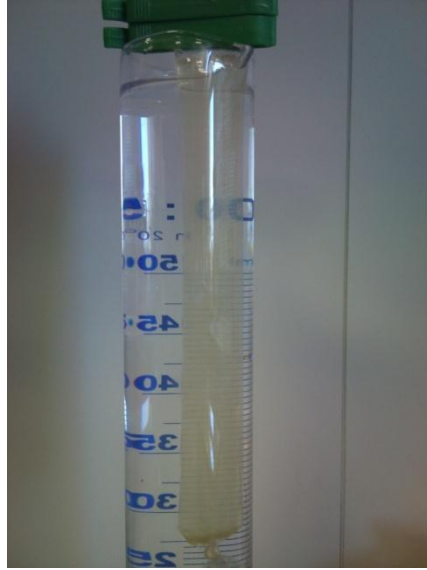
Şekil 3.12 : İpek fibroini kurutma işlemi

10 g ipek kozasının zamk çıkarma ve yıkama işleminden sonra kurutulması ile yaklaşık 7,5 gram ipek fibroin elde edilmiştir. Şekil 3.13’te görüldüğü gibi elde edilen ipek fibroin 9,3 M LiBr içerisinde 60°C sıcaklıkta yaklaşık 1,5 saatte çözülmüştür. Çözme işlemi sonunda elde edilen ipek fibroin çözeltisi 1-2 saat buzdolabında bekletildikten sonra çözeltinin üst kısmındaki safsızlıklar spatül ile uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.13 : LiBr çözeltisi içinde ipek fibroini çözme işlemi

Çözeltideki LiBr'ü uzaklaştırıp sulu ipek fibroin çözeltisi elde edebilmek için diyaliz tüpü (Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka Diyaliz tüpü, MWCO 10000) içinde 500 mL'lik mezürde suya karşı 3 gün boyunca diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işlemi sırasında LiBr'ün kısa sürede tamamen uzaklaşmasını sağlamak için saf su sık sık değiştirilmiştir. Şekil 3.14'te LiBr'ün uzaklaştırılması için uygulanan diyaliz işlemi görülmektedir.



Şekil 3.14 : İpek fibroinden LiBr'ü uzaklaştırmak için uygulanan diyaliz işlemi

3 günlük diyaliz işlemi sonunda elde edilen çözeltinin ağırlıkça % fibroin miktarı boş beher içerisine konulan 1 mL ipek fibroin çözeltisinden suyun ısıtılarak uzaklaştırılması ile belirlenmiştir. Elde edilen fibroin çözeltisinin konsantrasyonunun yaklaşık % 6 (ağ/hac) olduğu görülmüştür. Saf su ile seyreltilerek % 5 (ağ/hac) konsantrasyonda sulu ipek fibroin çözeltisi elde edilmiş ve

fibroin çözeltisi buzdolabında saklanmıştır. +4°C saklama koşullarında tutulan fibroin çözeltilerinin 1 ay sonunda kendiliğinden jelleştiği görülmüştür. Bu nedenle, jel sentezlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlandıktan sonra en geç 10 gün içinde kullanılmasına dikkat edilmiştir.

% 5'lik ipek fibroin (ağ/hac) çözeltisi ile çapraz bağlayıcı varlığında literatürde ilk defa olarak ipek fibroin iskeletleri kriyojelleşme şartlarında sentezlenmiştir. Sentezler +50 ve -18°C olmak üzere iki farklı sıcaklık değerinde yapılmıştır. +50°C'de etüv içerisinde sentezlenen jeller hidrojel, -18°C'deki derin donduruculu buzdolabında sentezlenen jeller ise kriyojel olarak isimlendirilmiştir. Sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin karakterizasyonu gravimetrik, volumetrik, fotometrik, mekanik ve morfolojik olarak yapılmıştır. Daha sonra -18°C'de farklı ipek fibroin konsantrasyonunda kriyojeller sentezlenerek karakterizasyonu yapılmıştır.

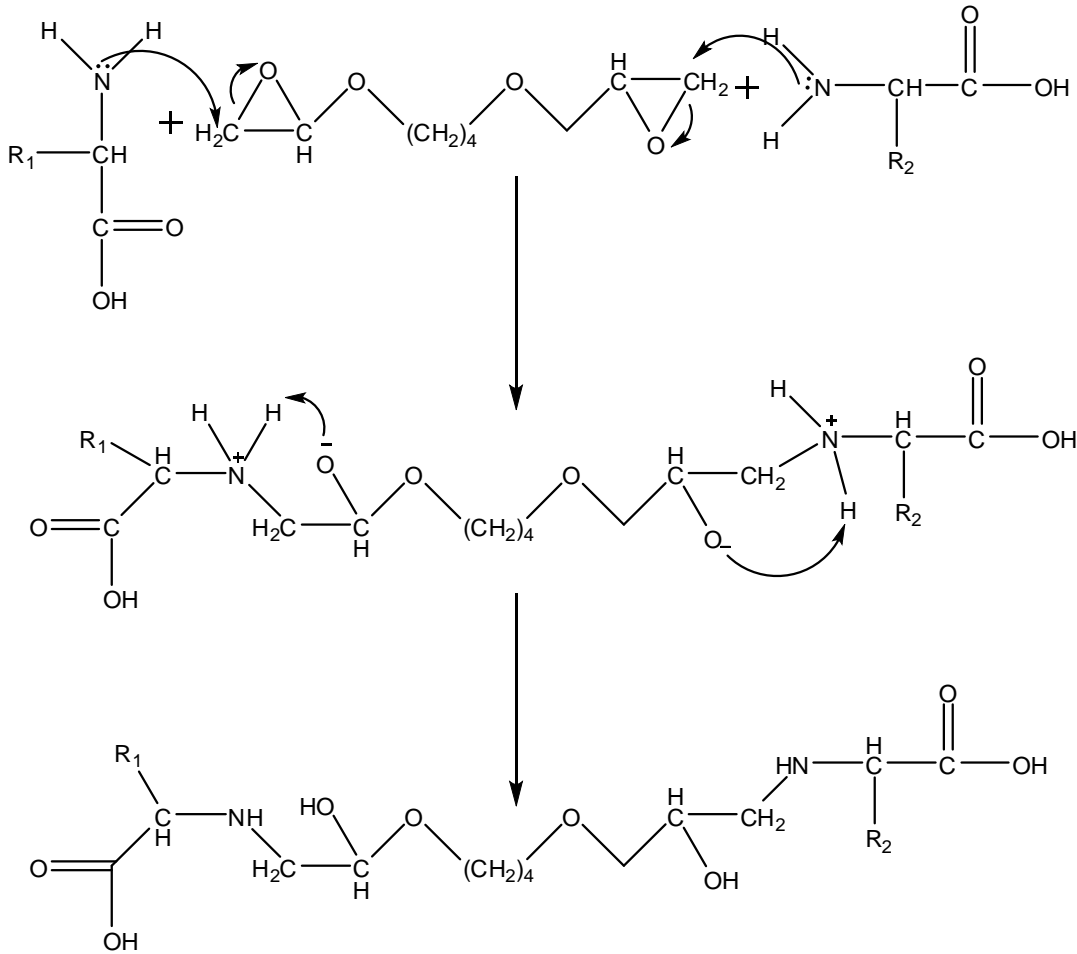
3.3.2 İpek Fibroin jellerinin sentezlenmesi

a) % 4,2 (ağ/hac) İpek Fibroin Konsantrasyonunda Hidrojel ve Kriyojel Sentezi
% 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, TEMED katalizörü varlığında BDDE çapraz bağlayıcısı ile +50 ve -18°C'de jel sentezleri yapılmıştır. BDDE miktarı 20 mmol epoksi / 1 g ipek fibroin olacak şekilde sabit tutulmuştur ki bu aynı zamanda % 200 (hac/ağ) olarak da ifade edilebilir. Hacimca % 0,07 - 0,50 TEMED konsantrasyon aralığında kriyojeller sentezlenmiş, fakat % 0,25 TEMED değerinin üzerinde hidrojel sentezi ipek fibroindeki karşı iyonların β -tabaka oluşumunu engellemesinden dolayı mümkün olmamıştır. Çapraz bağlayıcının olmadığı reaksiyon çözeltilerinde 24 saat içinde her iki sıcaklık değerinde de jelleşme olmadığı gözlemlenmiştir.

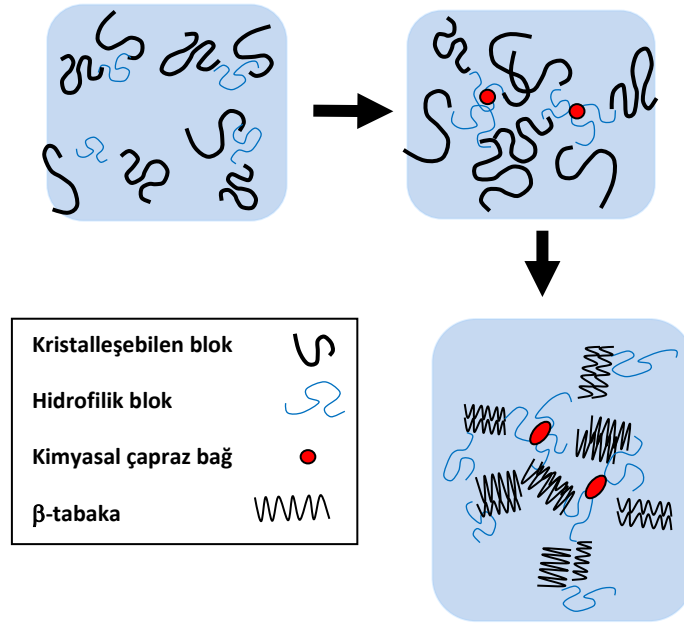
Jel sentezlerinde reaksiyon çözeltisinin toplam hacmi 6 mL olacak şekilde sabit tutulmuştur. Tipik bir sentez prosedürü şu şekildedir. % 0,25 TEMED konsantrasyonundaki jel sentezi için; 5 mL % 5 ipek fibroin çözeltisi üzerine 0,529 mL saf su, 0,015 mL saf TEMED ve 0,499 mL saf BDDE eklenip balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Şırıngalara çekilen homojen reaksiyon çözeltisi hidrojel sentezi için +50°C'ye ayarlanmış etüve, kriyojel sentezi için ise buzdolabının -18°C'deki derindondurucu kısmına konulmuştur. 24 saatlik reaksiyon süresi sonunda etüv ve/veya buzdolabından çıkarılan jeller yaklaşık 5 mm uzunluğunda kesilip şişme dengesine gelmesi için su içerisine konulmuştur. % 0,25 ve üzerindeki TEMED konsantrasyonlarında jel sentezi için saf TEMED, % 0,25 altındaki TEMED

konsantrasyonlarında jel sentezi için ise stok TEMED çözeltisi kullanılmıştır. Stok TEMED çözeltisi, 0,420 mL saf TEMED üzerine 0,958 mL saf su eklenmesi ile hazırlanmıştır.

Şekil 3.15’de ipek fibroin proteininde bulunan amino asitlerdeki serbest amino grupları ile çapraz bağlayıcı olan BDDE’nin epoksi grupları arasındaki reaksiyonu görülmektedir. Epoksit gergin üç üyeli halkaya sahip olduğu için; nükleofilik yer değiştirme tepkimelerinde oldukça etkindir ve kolaylıkla halka açılmasına uğrar. BDDE çapraz bağlayıcısının polisakkaritlerin, proteinlerin, DNA’nın ve bir çok organik molekülün çapraz bağlanmasında yaygın olarak kullanılan bir çapraz bağlayıcı olduğu bilinmektedir. İpek fibroin üzerindeki amino asitlerde bulunan serbest amino gruplarındaki azot atomu epoksi grubundaki kısmi pozitif yüklü karbon atomuna atak yaparak halka açılmasına sebep olur. S_N2 reaksiyonu ile yürüyen çapraz bağlanma reaksiyonlarında amino grupları nükleofil görevi görmektedir.



Şekil 3.15 : İpek fibroin üzerindeki serbest amino grupları ile çapraz bağlayıcının epoksi grupları arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu



Şekil 3.16 : BDDE çapraz bağlayıcısı ile ipek fibroinin jelleşmesi esnasındaki konformasyonel geçişler [67]

Fibroin moleküllerinin BDDE ile çapraz bağlanması esnasındaki konformasyonel geçişler Şekil 3.16'da gösterilmektedir [67]. Bu konformasyonel değişim şu şekilde açıklanabilir: Fibroin molekülleri, birbirleriyle BDDE çapraz bağlayıcısıyla bağlandıkça, moleküllerin hareketliliği azalır. Bunun bir sonucu olarak, moleküller arası hidrofobik etkileşimler kuvvetlenerek β -tabaka yapısının çekirdeklenme ve büyüme süreci kolaylaşır. Böylece kısa süre içerisinde jelleşme meydana gelir.

b) % 8,4 - 12 (ağ/hac) İpek Fibroin Konsantrasyonunda Jel Sentezi

% 5 İpek fibroin (ağ/hac) içeren çözelti konsantrasyonunu arttırmak için diyaliz tüpü (Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka Diyaliz Tüpü, MWCO 3500) içindeki fibroin çözeltisi farklı konsantrasyonlardaki PEG (ağ/hac) çözeltilerine karşı 24 saat süresince diyaliz edilmiştir. % 8,4 ve 12,6 ipek fibroin konsantrasyonlarında jel eldesi için sırasıyla % 10 ve 15 konsantrasyondaki PEG çözeltileri kullanılmıştır. Diyaliz işlemi sırasında ipek fibroin çözeltisinin PEG'e oranı hacimce sırasıyla 1:20 ve 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Diyaliz işlemleri sonunda yaklaşık % 13 ve 23 konsantrasyonlarda (ağ/hac) ipek fibroin sulu çözeltileri elde edilmiştir. Elde edilen bu çözeltilerin konsantrasyonu % 12 ve 18'e sabitlenerek -18°C 'de % 0,25 - 0,50 TEMED (hac/hac) konsantrasyon aralığında jel sentezleri yapılmıştır. BDDE miktarı sentezlenen jellerde 20 mmol epoksi / 1 g ipek fibroin olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Jel sentezlerinde reaksiyon çözeltisinin toplam hacmi % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonundaki jellerde olduğu gibi 6 mL olarak sabit tutulmuştur. Tipik bir sentez prosedürü şu şekildedir. % 8,4 ve % 0,25 TEMED konsantrasyonlarında jel eldesi için 4,2 mL % 12 ipek fibroin çözeltisi üzerine 0,785 mL saf su, 0,015 mL saf TEMED ve 1,0 mL BDDE eklenip balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. % 12,6 ve % 0,25 TEMED konsantrasyonlarında jel eldesi için ise 4,2 mL % 18 ipek fibroin çözeltisi üzerine 0,285 mL saf su, 0,015 mL saf TEMED eklenip balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışmakta olan çözelti üzerine 1,5 mL BDDE damla damla ilave edilmiştir. Daha sonra reaksiyon çözeltileri 1 mL'lik şırıngalara çekilip kriyojel sentezi için buzdolabının -18°C'deki derindondurucu kısmına konulup, şırıngalar 24 saat süresince bu sıcaklık değerlerinde sabit tutulmuştur. Reaksiyon süresi sonunda buzdolabından çıkarılan jeller yaklaşık 5 mm uzunluğunda kesilip şişme dengesine gelmesi için su içerisine konulmuştur.

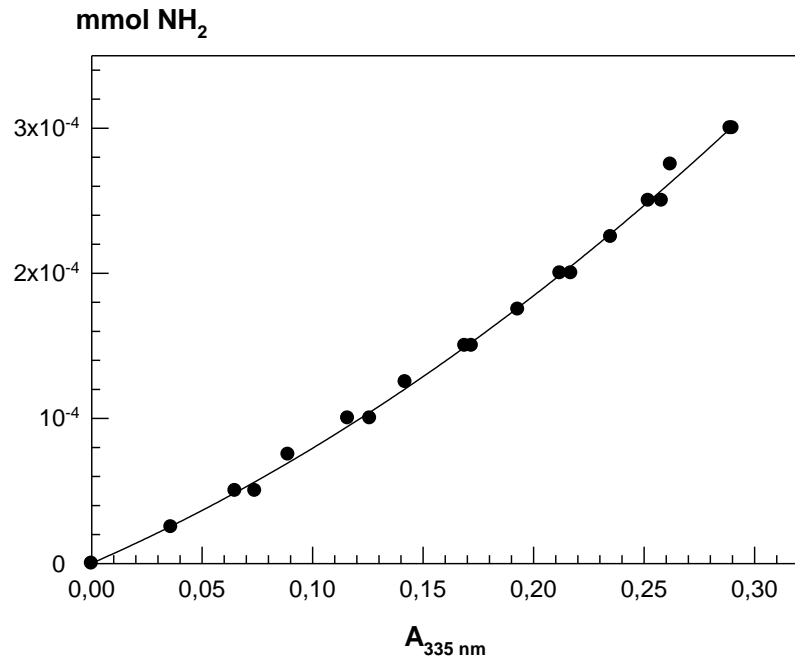
3.3.3 İpek fibroin çözeltisinin çapraz bağlanması sırasında primer amin grubu tayini

Çapraz bağlanma sırasında primer amin gruplarının tayini için 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi ile ilk önce kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş, daha sonra bu eğriden yararlanılarak çapraz bağlanma sırasında amin grubu tayini yapılmıştır. % 5 (ağ/hac) konsantrasyondaki ipek fibroin çözeltisi kullanılarak % 1 konsantrasyonda fibroin çözeltisi hazırlanmış ve hazırlanan bu çözeltilerden 0,025 ile 0,5 mL arasında değişen hacimlerde ipek fibroin çözeltisi plastik UV küvetlerine alınmış ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde 0,1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi ile tamamlanmıştır. Sonuçta farklı hacimlerde ipek fibroin çözeltisi alınmasıyla 0 ile 5 mg ipek fibroin içeren 1 mL çözeltiler elde edilmiştir. 1 mg ipek fibroinin 1x10⁻⁴ mmol NH₂ içerdiği bilinmektedir [78]. Bu yüzden bu çözeltiler içerisindeki NH₂ miktarı 0 ile 5x10⁻⁴ mmol arasındadır. Hazırlanan bu çözeltiler üzerine tampon çözeltisi içinde hazırlanmış % 0,01 TNBS (ağ/hac) çözeltisinden 0,5 mL eklenip vortex ile 500 rpm'de karıştırıldıktan sonra ağzı parafilm ile kapatılmış ve 37°C'ye ayarlanmış etüv içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Plastik UV küvetlerinde artan NH₂ miktarı ve buna bağlı olarak amin gruplarının TNBS ile reaksiyona girmesiyle çözeltinin renginin açık sarıdan koyu sarıya doğru değiştiği görülmüştür. 2 saat sonunda etüv içinden çıkartılan örnekler üzerine sırasıyla 0,5 mL % 10 SDS (ağ/hac),

0,25 mL 1 N HCl, ve UV küvetlerinde hacim azlığından dolayı absorbansın değişmesini önlemek için 1 mL su konulduktan sonra 300 rpm'de vortex ile karıştırılmıştır. Daha sonra UV görünür spektrofotometre ile 335 nm'de absorbans ölçümleri (A_{335nm}) alınmıştır. Artan NH_2 miktarına bağlı olarak absorbansın (A_{335nm}) arttığı görülmüş, absorbansa karşılık çizilen mmol NH_2 grafiği ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 3.17'de görülmekte olup en uygun eğri:

$$\text{mmol } NH_2 = 1,849 \times 10^{-7} + 6,645 \times 10^{-7} \times A_{335nm} + 1,288 \times 10^{-7} \times (A_{335nm})^2 \quad (3.1)$$

bağıntısını vermiştir.



Şekil 3.17 : Çapraz bağlanma sırasında primer amin grubu tayini için TNBS yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Çapraz bağlanma sırasında tipik bir amin grubu tayini şu şekilde gerçekleştirilmiştir. % 4,2 ipek fibroin ve % 0,25 TEMED konsantrasyonunda ipek fibroinin çapraz bağlanması sırasında amin grubu tayini için 5 mL % 5 ipek fibroin çözeltisi üzerine 0,529 mL saf su, 0,015 mL saf TEMED ve 0,499 mL BDDE eklenip balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden hemen sonra t=0 olarak kaydedilen bu anda 50 µL örnek plastik UV küvetine konulup, 1 mL'ye 0,1 M $NaHCO_3$ tampon çözeltisi ile tamamlanmış ve % 0,01 TNBS (ağ/hac) çözeltisinden 0,5 mL eklenip 37°C'deki etüv içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Etüv içerisinde çıkarılan örnek üzerine 0,5 mL % 10 SDS (ağ/hac), 0,25 mL 1 N HCl ve

1 mL su eklenerek UV-görünür spektrofotometre ile 335 nm’de absorbands ölçümü alınmıştır. Reaksiyon çözeltisinden farklı zaman aralıklarında 50 µL örnek alınarak aynı işlem uygulanmıştır.

3.4 Jellerin Karekterizasyonu

3.4.1 Şişme ölçümleri

Jellerin şişme ölçümleri hem gravimetrik hem de volumetrik olarak yapılmıştır. Gravimetrik yöntemde jel örnekleri hassas terazi yardımıyla tartılmıştır. Volumetrik yöntemde ise jel örneklerinin çapları elektronik kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Jellerin bağıl ve kuru duruma göre şişme oranları aşağıdaki bağıntılardan hesaplanmıştır.

Hacımca şişme oranı $q_v = (\text{Şişmiş jel çapı} / \text{Kuru jel çapı})^3$

Hacımca bağıl şişme oranı $V_{\text{relatif}} = (\text{Şişmiş jel çapı} / \text{Sentez sonrası jel çapı})^3$

Ağırlıkça şişme oranı $q_w = \text{Şişmiş jel ağırlığı} / \text{Kuru jel ağırlığı}$

Ağırlıkça bağıl şişme oranı $m_{\text{relatif}} = \text{Şişmiş jel ağırlığı} / \text{Sentez sonrası jel ağırlığı}$

1 g ipek fibroinden elde edilen çapraz bağıl ipek fibroin miktarı olan jel kesri

$$W_g = \frac{m_{\text{kuru}}}{m_o c_o / 100} \quad (3.2)$$

bağıntısından elde edilmiş olup denklemde m_{kuru} kuru durumdaki jel ağırlığı, m_o sentez sonrası jel ağırlığıdır. C_o ise jel sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisindeki ipek fibroin konsantrasyonudur.

Jellerin kuru durumdaki ağırlıkları ve çap ölçümleri için kurutma işlemi dondurmali kurutucuda gerçekleştirilmiştir. Kurutma prosedürüne göre şişme dengesine gelmiş jeller -25°C’de 1 gün dondurulduktan sonra 1 gün -40°C / 0,12 mbar ve 1 gün -60°C / 0,011 mbar’da tutulmuştur. ATR-FTIR, mekanik ve morfolojik ölçümler için de jel örnekleri aynı kurutma prosedürüne tabi tutulmuştur.

3.4.2 Diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) ölçümleri

Su içinde şişme dengesine gelen kriyojel örnekleri pan aparatının içine yerleştirilmiş ve -18°C 'de 1 gün dondurulduktan sonra $2,5^{\circ}\text{C} / \text{dak}$ ısıtma hızında $+80^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılmıştır. DSC cihazından alınan şişmiş jeli içeren pan $+80^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tartıma gelene kadar tutulmuştur.

Reaksiyon sistemindeki donmamış bölge

$$f_w = [1 - (\Delta H / \Delta H_m) / m_{su}] \times 10^2 \quad (3.3)$$

bağıntısından hesaplanmış olup denklemde ΔH_m , buzun erime ısısını, ($334,45 \text{ j/g}$), ΔH , jel içerisindeki donmuş suyun erimesi sırasında ölçülen geçiş entalpisini, m_{su} ise jel içerisindeki toplam su miktarını göstermektedir. Denklemdeki m_{su} değeri

$$m_{su} = m_1 - m_2 \quad (3.4)$$

bağıntısından hesaplanmış, m_1 , pan ile birlikte şişmiş jelin ağırlığı, m_2 , DSC ölçümünden sonra sabit tartıma gelene kadar $+80^{\circ}\text{C}$ 'de tutularak kurutulan jelin pan ile birlikteki toplam ağırlığıdır.

İpek fibroini ile BDDE'nin çapraz bağlanması sırasında donmamış bölgedeki ipek fibroin konsantrasyonu ve/veya TEMED konsantrasyonu

$$\text{Donmamış Bölgedeki \% Konsantrasyon} = \frac{100 \times C_0}{f_w} \quad (3.5)$$

bağıntısından hesaplanmış olup denklemde f_w reaksiyon sistemindeki donmamış bölge, C_0 ise jel sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisindeki ipek fibroin ve/veya TEMED konsantrasyonudur.

3.4.3 UV - Görünür spektrofotometre ölçümleri

Çapraz bağlanma sırasında, çapraz bağlayıcıdaki diepoksitlerin fibroin ile reaksiyonunu izlemek ve ipek fibroin molekülleri üzerindeki primer amin gruplarının miktarını belirlemek için T80-UV görünür spektrofotometresi kullanılmış ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi uygulanmıştır [13,24]. Bu yöntem ipek fibroin proteininde bulunan aminoasitler üzerindeki primer amin grupları ile 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asitin reaksiyona girerek yüksek kromojenik trinitrofenil türevleri oluşturmasına dayanır. İpek fibroindeki primer amin gruplarının miktarına

bağlı olarak oluşan kromojenik trinitrofenil türevlerinin miktarının farklı olmasından yararlanılarak 335 nm’de kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve çapraz bağlanma sırasında primer amin grubu miktarı değişimi incelenmiştir.

3.4.4 ATR - FTIR ölçümleri

İpek fibroin moleküllerinde diepoksit çapraz bağlayıcısı ile uyarılan konformasyonel değişimler ATR-FTIR ölçümleri ile izlenmiştir. Dondurmalı kurutucuda kurutulan ipek fibroin çözeltisi ile ipek fibroin hidrojel ve kriyojellerinin spektrumları 500-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında alınmıştır. FTIR spektrumlarının Amit-I bölgesi (1580 – 1720 cm^{-1}) analiz edilmiş ve sırasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü konformasyonlarına karşılık gelen 1620, 1640, 1660, ve 1698 cm^{-1} piklerinden fibroin ağyapı zincirlerinin yapısı kantitatif olarak belirlenmiştir.

3.4.5 Mekanik ölçümler

Tek eksenli sıkıştırma testi yaklaşık 4-5 mm boyunda, 4 mm çapında silindirik ipek fibroin jel örneklerine 500 N’luk yük hücresi ile 24°C’de uygulanmıştır. Test sırasında basma hızı 0,3 mm / dk olarak ayarlanmıştır. Basma aparatı ile örneğin tamamen temasını sağlamak için 0,1 N’luk ön yük uygulanmıştır. Basma gerilimi σ ile ifade edilmiştir. σ ; numuneyi deforme etmek için gerekli kuvvetin, numunenin başlangıç kesit alanına oranlanması ile hesaplanmaktadır. Gerinim ise deformasyon oranı α ile verilmiştir.

α = deforme edilen numunenin herhangi bir andaki boyu / numunenin başlangıç boyu’dur. Gerilim-gerinim eğrisinin % 2-4 deformasyon aralığındaki eğimi elastik modül değerini vermektedir.

3.4.6 Reolojik ölçümler

Tüm ölçümler, reometre cihazının 4° konik açılı ve 40 mm çapa sahip plakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların +50°C’de gerçekleştirilebilmesi için Peltier sıcaklık ünitesi kullanılmıştır. Ölçümler sırasında reometre plakaları arasındaki jel çözeltisinden buharlaşma yolu ile gerçekleşen su kaybını önlemek amacıyla sistem, koruyucu bir kapak yardımıyla kapatılmış ve kapalı bölme içerisinde su tuzağı kullanılmıştır. Bunun yanında plakalar etrafına viskozitesi düşük silikon yağı koyularak buharlaşmanın minimum olması sağlanmıştır. Salınım

deformasyonunun lineer bölgede olmasını sağlamak için frekans $\omega=1$ Hz ve deformasyon genliği $\Upsilon_o=0,01$ olarak seçilmiştir.

3.4.7 Morfolojik ölçümler

Sentezlenen jellerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskop yardımıyla (SEM) çeşitli büyütmelerde (20 ile 1000 büyütme arasında) incelenmiştir. Su içerisinde şişme dengesine gelmiş olan jeller dondurmalı kurutucuda vakum altında kurutulduktan sonra kuru örnekler altın ile kaplanarak SEM ölçümleri alınmıştır.

4 SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmanın amacı biyoloji ve biyotıp gibi alanlarda kullanılacak yeni fonksiyonel özellikleri, mikroyapıları ve ayarlanabilir mekanik özellikleri olan makrogözenekli ipek fibroin jelleri sentezlemektir. Bu jellere makrogözenekli bir yapı kazandırılması ile onların doku mühendisliğinde iskelet olarak kullanımı amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ipek fibroin sulu çözeltisinden -18°C sıcaklıkta BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında makrogözenekli ipek fibroin kriyojelleri ve mukayase amacıyla $+50^{\circ}\text{C}$ 'de ipek fibroin hidrojenelleri sentezlenmiştir. Kriyojelleşme tekniği ile mekanik olarak dayanıklı, kemik hücre mühendisliğinde kullanım için uygun ipek fibroin iskeletlerinin sentezlenmesi sağlanmıştır.

Deneysel sonuçlar iki bölümde tartışılmıştır. Birinci bölümde $+50$ ve -18°C 'de ipek fibroin hidrojel ve kriyojelleri sentezlenmiş ve bunların karakterizasyonu gravimetrik, volumetrik, fotometrik, mekanik ve morfolojik olarak yapılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise farklı ipek fibroin konsantrasyonlarındaki makrogözenekli ipek fibroin iskeletleri -18°C 'de kriyojelleşme tekniği ile sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. İpek fibroin moleküllerinde diepoksitlerle uyarılan konformasyonel geçişler literatürde ilk defa olarak laboratuvarımızda yapılmıştır. BDDE çapraz bağlayıcısıyla fibroin molekülleri birbirlerine bağlandıkça moleküllerin hareketliliği azalmış ve bunun bir sonucu olarak, moleküller arası hidrofobik etkileşimler kuvvetlenerek β -tabaka yapısının çekirdeklenme ve büyüme süreci kolaylaştırılarak kısa sürede jel oluşumu sağlanmıştır. Kriyojelleşme tekniği ile dışarıdan gelen uyarılara anında cevap verebilen makrogözenekli ipek fibroin hidrojenelleri sentezlenmiştir. BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında ipek fibroin moleküllerinin çapraz bağlanma reaksiyonlarının reaksiyon sisteminin donma noktasının altında bir sıcaklık olan -18°C 'de bile kolaylıkla ilerlediği görülmüştür. Bu şartlar altında elde edilen jellerin kurutulmaları sonrası mikrometre boyutlarında gözenekler içerdikleri saptanmıştır. Literatüre göre, görünür olarak donmuş böyle sistemlerde, çözücü kristalleri arasında yüksek konsantrasyonda polimer-çapraz bağlayıcı içeren donmamış mikro bölgeler bulunmaktadır [68]. Dolayısıyla,

reaksiyonlar sadece bu mikrobölgelerde ilerlemekte ve reaksiyon sonrası donmuş bölgelerin eritilmesi ile gözenekler ortaya çıkmaktadır. Bu da mekanik olarak dayanıklı ipek fibroin iskeletlerinin eldesini mümkün kılmaktadır.

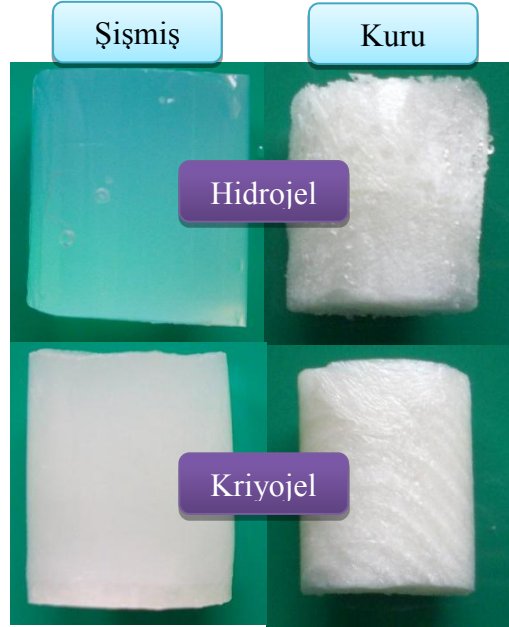
4.1 % 4,2 İpek Fibroin Konsantrasyonunda Elde Edilen Hidrojel ve Kriyojel

% 4,2 (ağ/hac) ipek fibroin ve farklı TEMED konsantrasyonlarında, iki farklı sıcaklıkta (+50 ve -18°C) jel sentezleri yapılmıştır. +50°C'de hazırlanan jeller hidrojel, -18°C'de kriyojelleşme tekniği ile sentezlenen jeller ise kriyojel olarak isimlendirilmiştir. İpek fibroin çözeltisinin pH değeri yaklaşık 5,5 olarak ölçülmüştür. Hidrojeller ve kriyojellerde çapraz bağlanma öncesindeki reaksiyon çözeltisinin TEMED ilavesi ile pH değerinin arttığı gözlemlenmiştir. Reaksiyon çözeltisinde % 0,07- 0,50 TEMED (hac/hac) konsantrasyon aralığında pH değeri 8,3 ile 11 arasında ölçülmüştür. Çapraz bağlayıcı ilave edildiğinde ise pH değerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Şekil 4.1'de şişme dengesine gelmiş ve kuru durumdaki hidrojel ile kriyojellerin fotoğrafları verilmiştir. Kurutma işlemi bölüm 3.4.1'de belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Hidrojelin transparan, kriyojelin ise jel sentezi sırasında reaksiyonun donmamış mikrobölgelerde ilerlemesinden dolayı konsantrasyon artışı olduğu için opak olduğu görülmektedir.

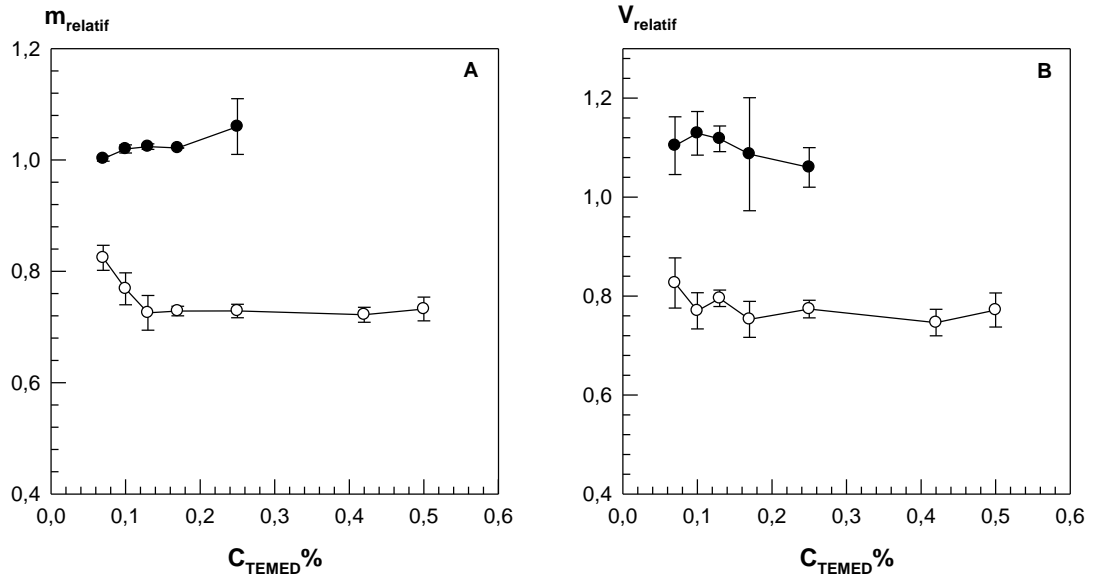
Dondurmalı kurutucuda kurutulan kriyojellerin içerisinde kalan su miktarı Karl Fischer metodu uygulanarak ölçülmüştür. Bu jellerde % bakiye su miktarı yaklaşık % 4 olarak bulunmuş ve jel kesri (W_g) ile ağırlıkça şişme oranı (q_w) % bakiye suya göre düzeltilerek tekrar hesaplanmıştır. Düzeltme yapıldıktan sonra jel kesri ve ağırlıkça şişme oranı değerlerinin çok fazla değişmediği görülmüştür. Böylece dondurmalı kurutucudan çıkarılan jellerin kuru durumda olduğu anlaşılmıştır.

Jellerin gravimetrik ve volumetrik olarak 1 ile 3 gün arasında dengeye geldiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.2'de % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında elde edilen şişme dengesine gelmiş hidrojel ile kriyojellerin ağırlıkça (A) ve hacimca (B) bağlı şişme oranları verilmiştir. $m_{\text{şişmiş}} / m_0$ bağıntısı ile hesaplanan m_{relatif} değerlerinin, hidrojellerde yaklaşık 1, kriyojellerde ise yaklaşık 0,8 civarında olduğu görülmektedir. Şekil 4.2 B'de görüldüğü üzere volumetrik ölçüm sonuçlarında da benzer veriler elde edilmiştir. Kriyojelleşme tekniğinde reaksiyonun donmamış mikrobölgelerde ilerlemesinden dolayı sentez sırasında gözenek oluşmakta ve kriyojellerin şişme dengesine gelmesi bu

gözeneklerin suyla dolması sonucu gerçekleşmektedir. Hidrojellerde jel ağ yapısı üzerindeki yük yoğunluğunun dış çözültideki (saf su) yük yoğunluğundan fazla olması nedeniyle ortamdaki su molekülleri osmotik basınç etkisiyle jele akarak jelin şişmesini sağlamaktadır. Bu yüzden hidrojellerin kriyojellere göre daha fazla şiştiği görülmüştür.

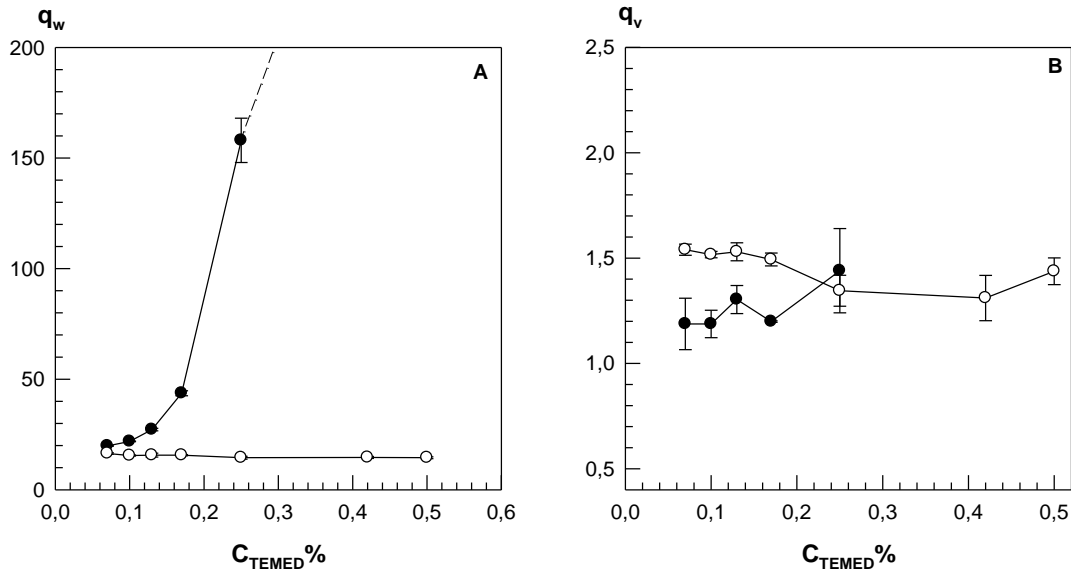


Şekil 4.1 : Şişmiş ve kuru durumdaki hidrojel ve kriyojel fotoğrafları

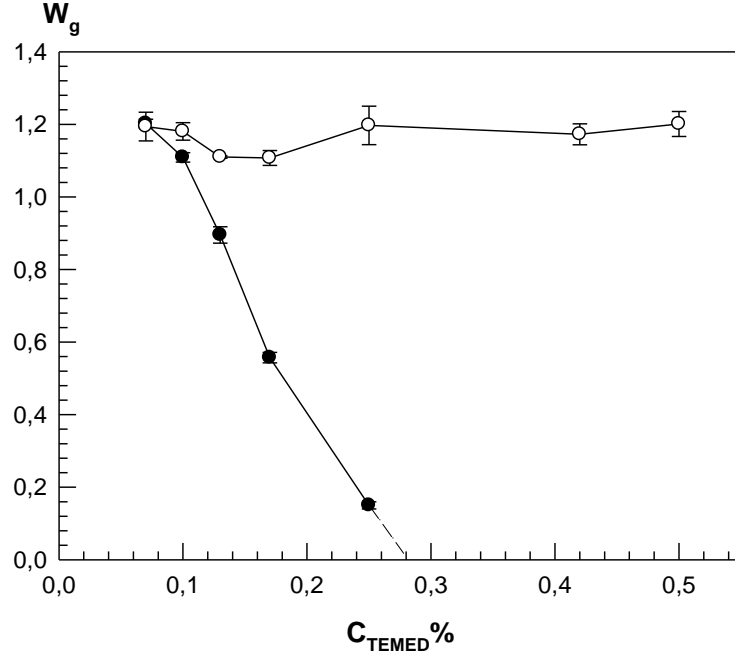


Şekil 4.2 : % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimce farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin m_{relatif} ve V_{relatif} değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir.

Şekil 4.3'te % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenmiş hidrojel ile kriyojellerin kuru duruma göre ağırlıkça (A) ve hacimca (B) şişme oranları verilmiştir. Kriyojellerde q_w ve q_v değerlerinin TEMED konsantrasyonundan etkilenmediği, hidrojellerde ise q_w değerinin TEMED konsantrasyonu arttıkça arttığı görülmektedir. Şekil 4.4'te % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenmiş hidrojel ile kriyojellerin jel kesri değerleri verilmiştir. Kriyojellerde jel kesrinin yaklaşık 1 ve TEMED konsantrasyonundan bağımsız olduğu görülürken hidrojellerde ise TEMED konsantrasyonu arttıkça jel kesrinin azaldığı ve % 0,25 TEMED üzerinde jel kesrinin sıfır olduğu, yani % 0,25 üzerindeki TEMED konsantrasyonlarında jel oluşmadığı görülmüştür. Artan TEMED konsantrasyonu ile birlikte jelin pH değeri artarken, fibroin yapısı üzerindeki karboksil gruplarının karşıt iyonlarının oluşturduğu ozmotik basınçta artmaktadır. Bu basınç molekülün suda şişmesini artırırken hidrofobik etkileşimleri zayıflattığı için jel oluşumunu engellemektedir. Şekil 4.3 A'da hidrojellerin artan TEMED konsantrasyonu ile q_w değerinin artması da bu yorumu desteklemektedir.



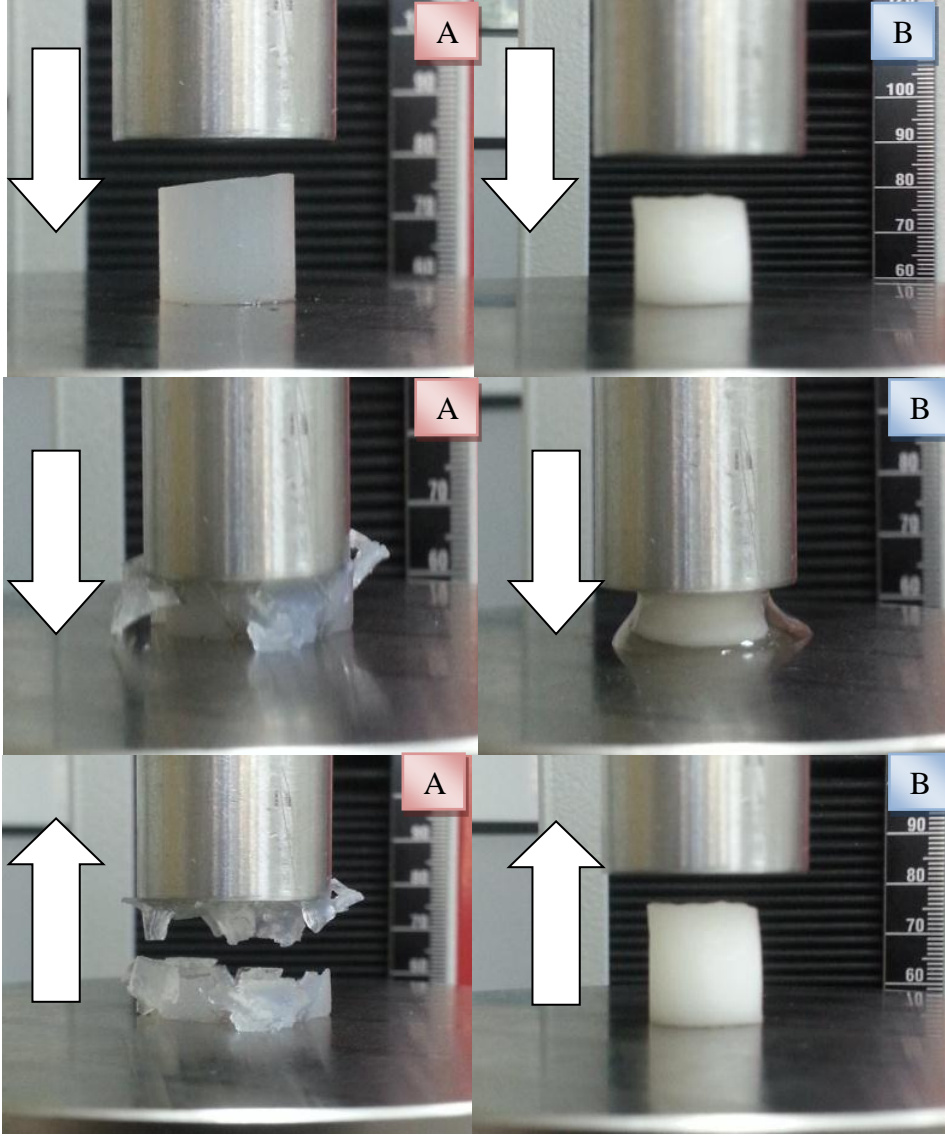
Şekil 4.3 : % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin q_w ve q_v değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4 : % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin W_g değerleri. Hidrojeller (●), kriyojeller (○) sembolü ile gösterilmiştir.

+50°C’de sentezlenen hidrojellerde artan TEMED konsantrasyonu ve buna bağlı olarak artan pH ile jel oluşumu engellenirken kriyojelleşme tekniğinde reaksiyon donmamış mikrobölgelerde ilerlediği ve buna bağlı olarak reaksiyon çözeltisindeki ipek fibroinden daha yüksek fibroin konsantrasyonunda hidrofobik etkileşmeler engellenemediği için kriyojellerin ağırlıkça ve hacimca şişme değerlerinin TEMED konsantrasyonundan bağımsız olduğu görülmüştür.

Şekil 4.5’te % 4,2 ipek fibroin ve % 0,10 TEMED konsantrasyonlarında +50 ve -18°C’de sentezlenen, şişmiş hidrojel ve kriyojellerin mekanik test cihazı ile tek eksenli sıkıştırma ve sıkıştırma gevşemesi sırasında çekilen fotoğrafları verilmiştir. Her iki sıcaklık değeri için sabit çapraz bağlayıcı (20 mmol epoksi / 1 g ipek fibroin), TEMED ve ipek fibroin kullanılmasına rağmen hidrojeller yaklaşık % 10 basma altında kolaylıkla parçalanırken tok bir malzeme olan kriyojeller % 100’e kadar herhangi bir parçalanma olmadan sıkıştırılabilmekte ve bu şekilde içerdiği çözücü dışarı alınabilmektedir. Uygulanan kuvvet kaldırılıp çözücü eklendiğinde ise anında başlangıç konumuna geri dönebilmektedir. Bu da kriyojelleşme tekniğinin üstünlüğünü göstermektedir.



Şekil 4.5 : +50 ve -18°C’de sentezlenen hidrojel (A) ve kriyojellerin (B) fotoğrafları görülmektedir. C_{IF} : % 4,2 (ağ/hac), BDDE; 20 mmol / g İF, C_{TEMED} : % 0,10 (hac/hac)

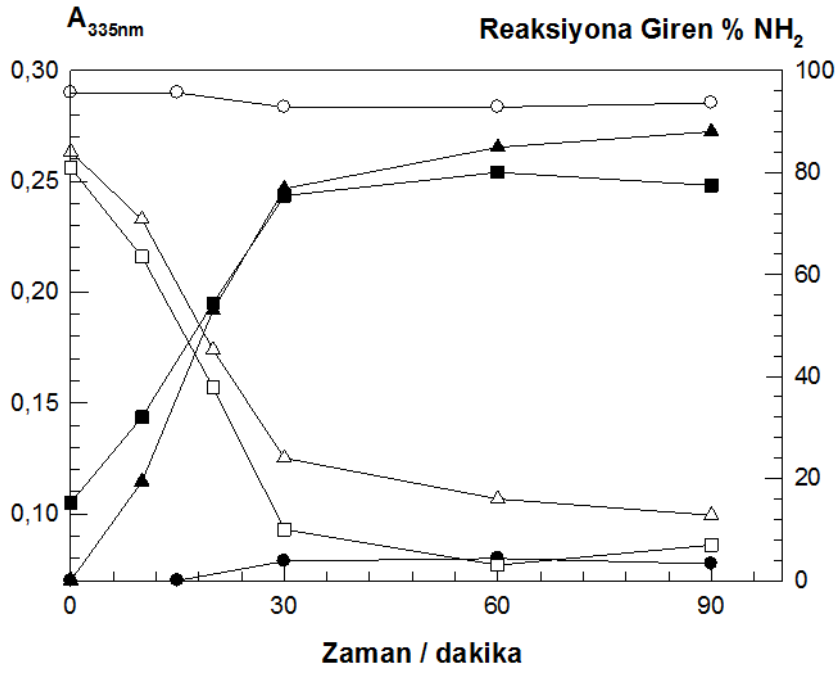
Kriyojelleşme tekniğinde çapraz bağlanma reaksiyonlarının donmamış mikrobölgelerde ilerlediği bilinmektedir. % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda, +50°C’de ipek fibroinin çapraz bağlanması sırasında ipek fibroin konsantrasyonunun % 4,2 olduğu, -18°C’de kriyojelleşme şartlarında çapraz bağlanması sırasında ipek fibroin konsantrasyonunun % 4,2’den yüksek olduğu öngörülmüştür. Bu yüzden ipek fibroin kriyojellerinde, reaksiyon sisteminde donmamış bölge hesabı için DSC cihazı yardımıyla ölçümler yapılmıştır. -18°C’de dondurulmadan önce şişmiş durumdaki jel örneklerinde fibroin konsantrasyonu yaklaşık % 6,5 (ağ/ağ) olarak hesaplanmıştır. Eşitlik 3.3 kullanılarak -18°C’de dondurulan jellerde donmamış bölge yaklaşık % 12, donmuş bölge ise % 88 olarak hesaplanmıştır. Yani çapraz

bağlanma reaksiyonu donmamış % 12'lik kısımda ilerlemekte ve % 4,2 olan başlangıçtaki ipek fibroin konsantrasyonunun çapraz bağlanma sırasında artacağı bilinmektedir ve eşitlik 3.5 ile artan ipek fibroin konsantrasyonu % 35 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde % 0,50 TEMED konsantrasyonundaki reaksiyon çözeltisinin pH değeri 11 olarak ölçülmüş ve çapraz bağlanma sırasında TEMED konsantrasyonu ipek fibroinin hesaplandığı gibi hesaplanmış ve % 4,2 (hac/hac) olarak bulunmuştur.

Çapraz bağlanma sırasında amin grubu tayini için TNBS yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda ve % 0,0, 0,10 ve 0,25 TEMED konsantrasyonlarındaki reaksiyon çözeltilerinde primer amin grubu tayini yapılmıştır. Bu yöntem ipek fibroin proteininde bulunan aminoasitler üzerindeki primer amin grupları ile 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asitin reaksiyona girerek yüksek kromojenik trinitrofenil türevleri oluşturmaya dayanır. İpek fibroin proteinindeki amin grupları ile epoksi grupları arasında reaksiyon meydana geldiği için zamanla TNBS ile reaksiyona giren amin grubu ve buna bağlı olarak absorbans (A_{335nm}) değeri azalmıştır. Şekil 4.6'da +50°C'deki reaksiyon çözeltisinden farklı zaman aralıklarında alınan örneklerin absorbans ölçümleri ve reaksiyona giren % NH_2 miktarı verilmiştir. Herhangi bir t anında reaksiyona giren serbest amino gruplarının hesabı için

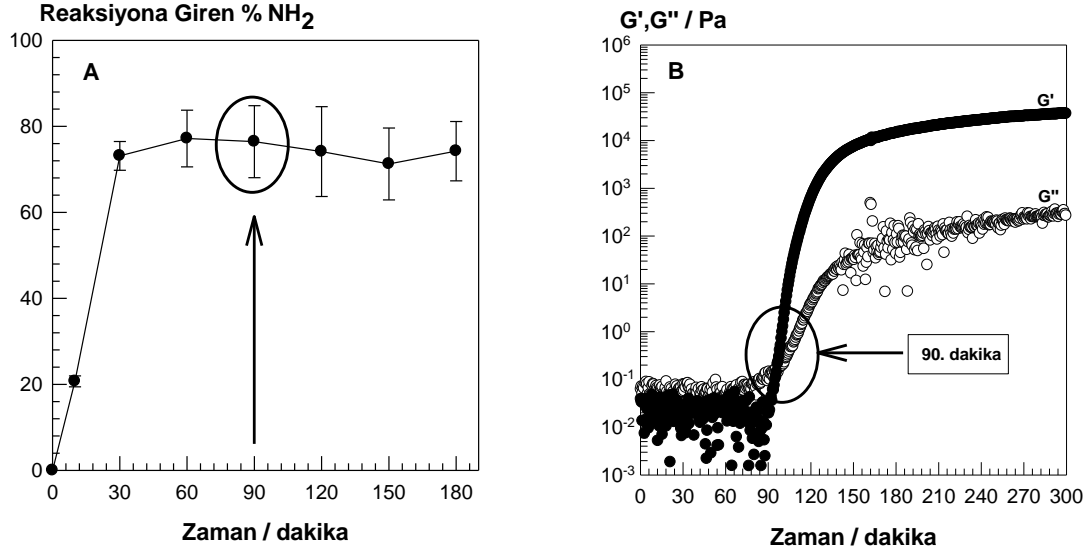
$$1 - C_{NH_2,t} / C_{NH_2,t=0} \quad (4.1)$$

bağıntısı kullanılmıştır. Bağıntıdaki $C_{NH_2,t}$ ve $C_{NH_2,t=0}$, sırasıyla t=0 ve t anındaki amin gruplarının konsantrasyonunu göstermektedir. Şekil 4.6'da % 0,10 ve 0,25 TEMED konsantrasyonlarındaki reaksiyon çözeltilerinde ilk yarım saat içerisinde absorbans değerinin azaldığı, reaksiyona giren NH_2 miktarının % 70-80 olduğu, % 0,0 TEMED konsantrasyonlarındaki reaksiyon çözeltisinde ise ilk yarım saat içerisinde absorbans değerinde çok fazla bir değişiklik olmadığı ve reaksiyona giren NH_2 miktarının % 5 olduğu görülmektedir. Böylece TEMED'in katalizör etkisi göstererek jelleşmenin daha kısa sürede gerçekleşmesini sağladığı belirlenmiştir.



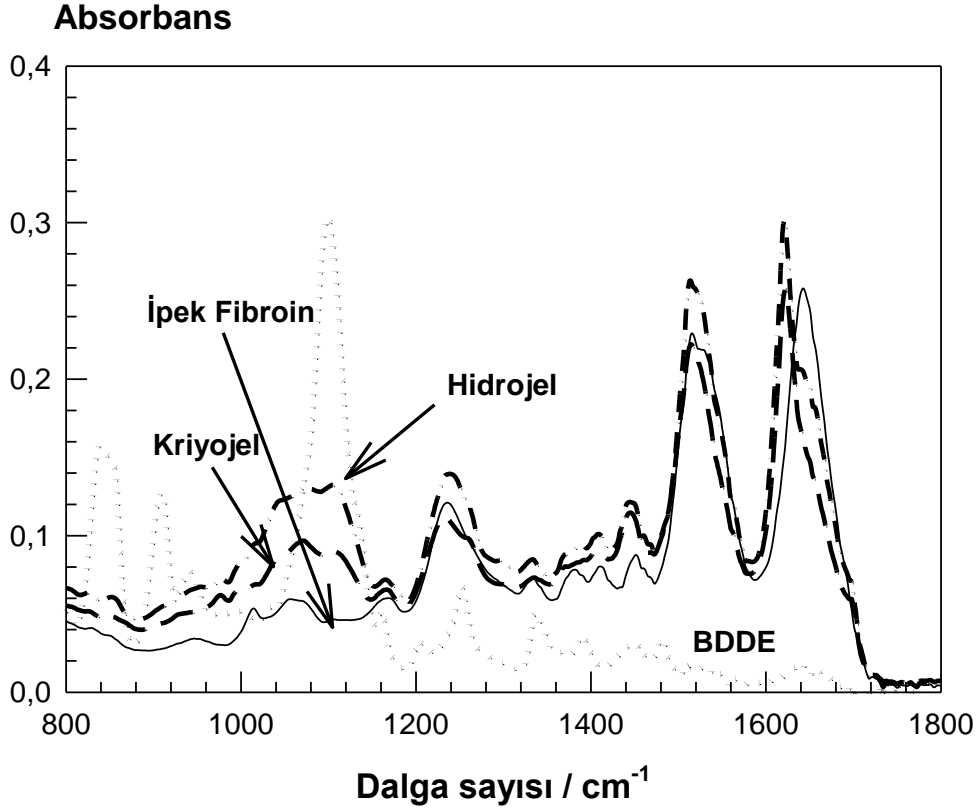
Şekil 4.6 : Çapraz bağlanma sırasında primer amin grubu tayini için 335 nm'de yapılan absorbans ölçüm değerleri ve reaksiyona giren % NH₂ miktarları. İçi boş semboller; % 0,0 (○), 0,10 ve (Δ), 0,25 (□) TEMED (hac/hac) konsantrasyonlarındaki reaksiyon çözeltilerinin absorbans ölçümlerinin zamana bağlı değişimini, içi dolu semboller % 0,0 (●), % 0,10 (▲) ve % 0,25 (■) TEMED (hac/hac) konsantrasyondaki reaksiyon çözeltilerinde reaksiyona giren % NH₂ miktarını göstermektedir.

Bir malzemenin enerjiyi elastik olarak depolayabilmesini temsil eden elastik modül (G') iken, malzemenin enerjiyi dağıtabilmesini viskoz modül (G'') temsil eder. Çapraz bağlanma reaksiyonlarının elastik modül değişimi üzerine etkisini araştırmak için TNBS metoduyla yapılan primer amin grubu tayini ile reometre cihazında elastik ve viskoz modül değişiminin incelenmesi birlikte yapılmıştır. Şekil 4.7 A'da reaksiyona giren % NH₂ miktarı, şekil 4.7 B'de ise elastik ve viskoz modüllerin zamana bağlı değişimleri görülmektedir. Şekil 4.7 A'da ilk 30 dakika içinde primer amin gruplarının yaklaşık % 75'inin reaksiyona girdiği görülürken Şekil 4.7 B 'de verilen reolojik ölçüm sonuçlarında ilk yarım saat içinde elastik modülde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu da çapraz bağlanma reaksiyonlarının elastik modül artışı üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermiştir.



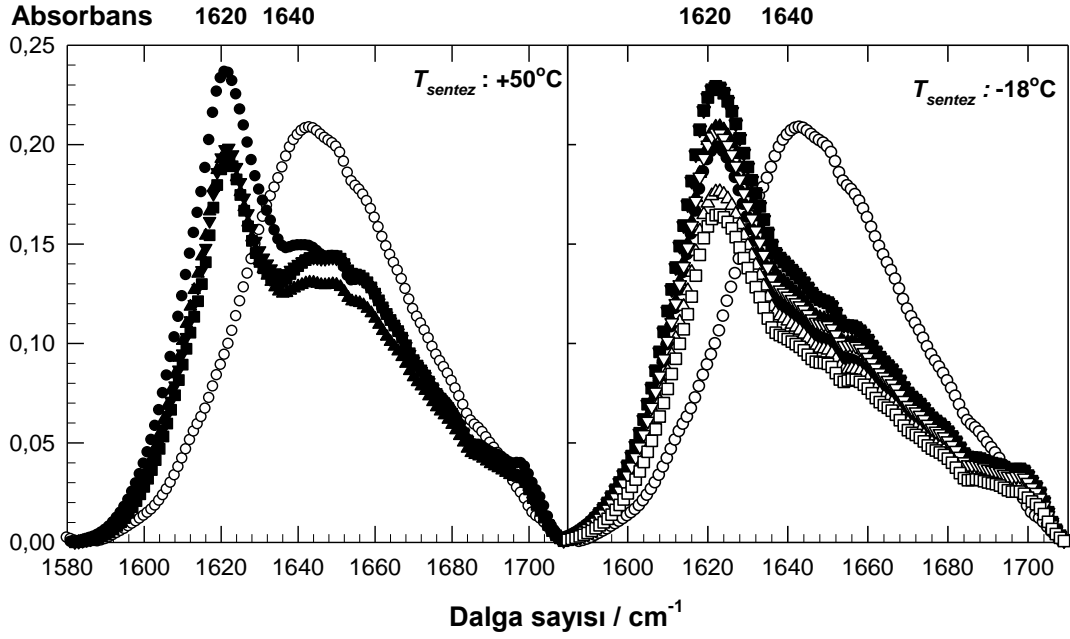
Şekil 4.7 : İlk 30 dakika içinde primer amin gruplarının % 70-80'in reaksiyona girdiği görülmektedir (A) Elastik modül (G') (●), ve Viskoz modülün (G'') (○) zamana bağlı değişimi görülmektedir.

Çapraz bağlayıcı üzerindeki epoksi grupları ile fibroin arasındaki reaksiyon ATR - FTIR ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.8'de çapraz bağlayıcının, reaksiyon çözeltisinin jelleşmesi ile oluşan polimerik ağıyapı içerisine katıldığını göstermek için alınan ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş % 5 konsantrasyondaki ipek fibroin, % 4,2 ipek fibroin ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda elde edilen kuru durumdaki hidrojel ve kriyojel ile saf BDDE'nin ATR - FTIR spektrumları görülmektedir. BDDE reaksiyon çözeltisine katılmadığı zaman 24 saatte jelleşme olmadığı, jelleşmenin BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında kısa sürede gerçekleştiği belirtilmiştir. Jelleşme sonrasında Amit I bölgesinde (1640 cm^{-1} , den 1620 cm^{-1} 'e) düşük dalga sayısına değişim olmak ile birlikte $1040 - 1100\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yeni bantlar gözükmemektedir. Çapraz bağlayıcının spektrumunda görülen eter geriliminden kaynaklanan bu bantların jelleşme sonrasında hidrojel ve kriyojellerin spektrumlarında gözükmesi ile çapraz bağlayıcının yapıya katıldığı ispatlanmıştır.



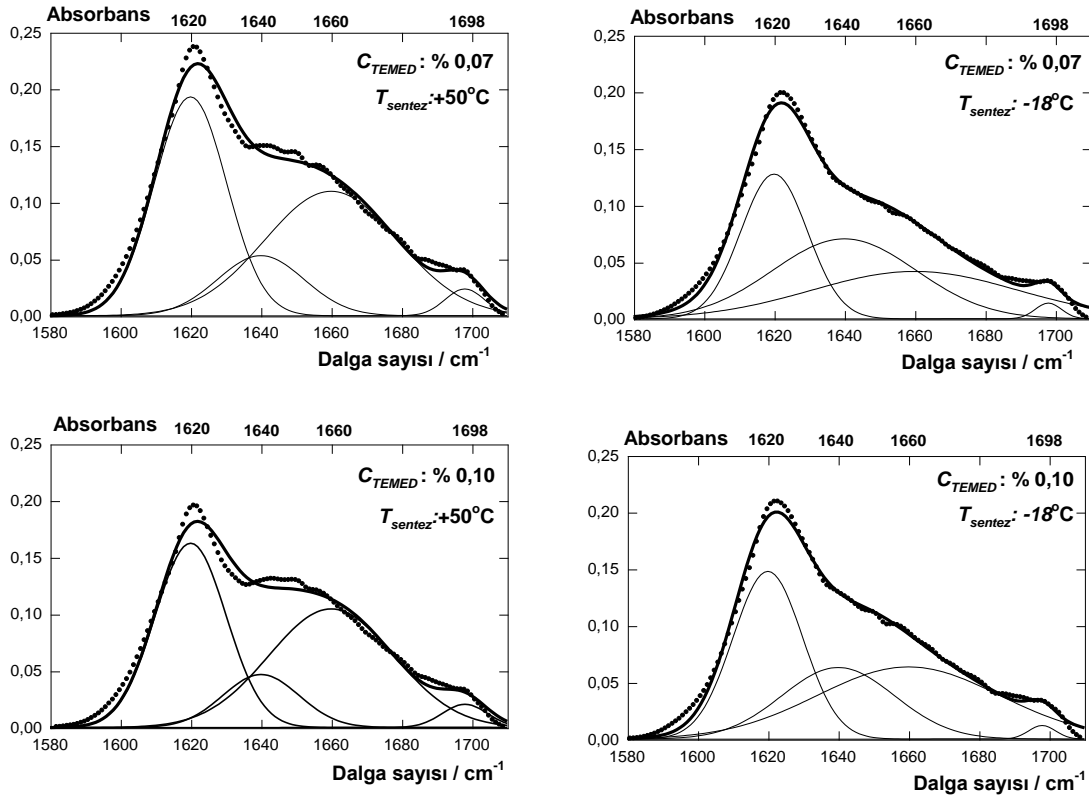
Şekil 4.8 : Çapraz bağlayıcının (nokta), dondurmalı kurutucuda kurutulmuş % 4,2 İF ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda elde edilen kuru durumdaki hidrojel (çizgi-nokta) ve kriyojelin (uzun çizgi), dondurmalı kurutucuda kurutulmuş % 5 konsantrasyondaki ipek fibroinin (ince çizgi) tipik ATR-FTIR spektrumları

İpek fibroinde jelleşmenin hidrofobik kısımların etkileşerek β -tabaka oluşturması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Şekil 4.9'da ipek fibroin üzerindeki amit gruplarının karbonil gerilme titreşiminden oluşan Amit I ($1580-1700 \text{ cm}^{-1}$) bant bölgesine yaklaşılarak bakılması ile elde edilen grafik verilmiştir. Jelleşme öncesinde ipek fibroin spektrumunda 1640 cm^{-1} de görülen pik rastgele yumak ve/veya α -heliks konformasyonunu, jelleşme sonrasında bütün jel örneklerinde 1620 cm^{-1} de görülen pik β -tabaka konformasyonunu göstermektedir [42,52]. Elde edilen bu spektrum ile ipek fibroinin jelleşmesi sırasında konformasyonel değişimin varlığı gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : % 4,2 ipek fibroin ve farklı TEMED konsantrasyonlarında kuru durumdaki hidrojel ($T_{sentez} : +50^{\circ}\text{C}$), kriyojel ($T_{sentez} : -18^{\circ}\text{C}$) ve ipek fibroinin ATR - FTIR spektrumları görülmektedir. İpek fibroin çözeltisi (○) % 0,07 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (●), % 0,10 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (▲), % 0,13 TEMED konsantrasyonunda hidrojel ve kriyojel (▼), % 0,25 TEMED konsantrasyonunda kriyojel (△), % 0,42 TEMED konsantrasyonunda kriyojel (▽), % 0,50 TEMED konsantrasyonunda kriyojel (□) sembolleri ile gösterilmiştir.

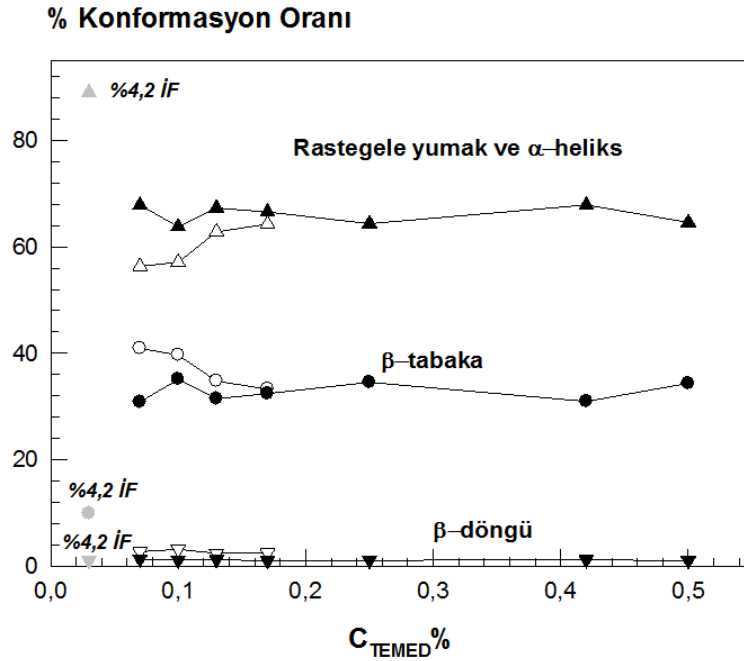
İpek fibroin ağyapı zincirlerinin konformasyonunu hesaplamak için dondurmali kurutucuda kurutulmuş ipek fibroin çözeltisi, hidrojel ve kriyojel spektrumları Peak Fit (Version 4.12 SeaSolve Software) yazılımı ile analiz edilmiştir. Şekil 4.10'da Peak Fit yazılımı ile analiz edilen hidrojel ve kriyojellerin ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Spektrumların Amit I bant ($1580-1720\text{ cm}^{-1}$) bölgesinde doğrusal düzeltme uygulandıktan sonra Gaus modeli ile uygun eğriler oluşturulmuştur. Peak Fit yazılımı ile pikler 1620 cm^{-1} (β -tabaka), 1640 cm^{-1} (rastgele yumak), 1660 cm^{-1} (α -heliks) ve 1698 cm^{-1} (β -döngü) dalga boyunda sabitlenmiştir. İpek fibroin, hidrojel ve kriyojellerdeki β -tabaka, rastgele yumak, α -heliks ve β -döngü alanlarının oranları hesaplanmıştır.



Şekil 4.10 : % 0,07 ve % 0,10 TEMED konsantrasyonunda elde edilen ipek fibroin hidrojel ve kriyojellerin ATR-FTIR spektrumlarına peak fit yazılımıyla Gaus modelinin uygulanması sonucu elde edilen eğriler. ATR-FTIR spektrumundan elde edilen orijinal spektrum (●), Peak fit yazılımı ile orijinal spektruma düzeltme uygulanmasıyla elde edilen spektrum (kalın çizgi) ve orijinal spektrumlardaki pikin altındaki saklı pikler (ince çizgiler) ile gösterilmiştir.

Şekil 4.11’de dondurmalı kurutucuda kurutulmuş ipek fibroin çözeltisinin, % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda ve hacimce farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerdeki konformasyon oranları görülmektedir. β -tabaka yüzdesi ipek fibroin çözeltisinde jelleşmeden önce % 12 ± 2 iken, kriyojellerde % 33 ± 2 olarak hesaplanmış ve TEMED konsantrasyonundan bağımsız olduğu görülmüştür. Hidrojellerde ise β -tabaka % 0,07 ile % 0,17 TEMED (hac/hac) konsantrasyonu arasında yaklaşık % 40 olarak hesaplanmış ve TEMED konsantrasyonu arttıkça pH değerinin de arttığı ve β -tabaka oranının azaldığı görülmüştür. pH değerinin artmasıyla fibroin üzerindeki karboksil gruplarının karşı-iyonlarının yarattığı ozmotik basınç nedeniyle molekülün suda genişmesi ve moleküller arası hidrofobik etkileşmelerin zayıflamasının bir sonucu olarak β -tabaka oranının azaldığı düşünülmüştür. -18°C ’de sentezlenen kriyojellerde β -tabaka

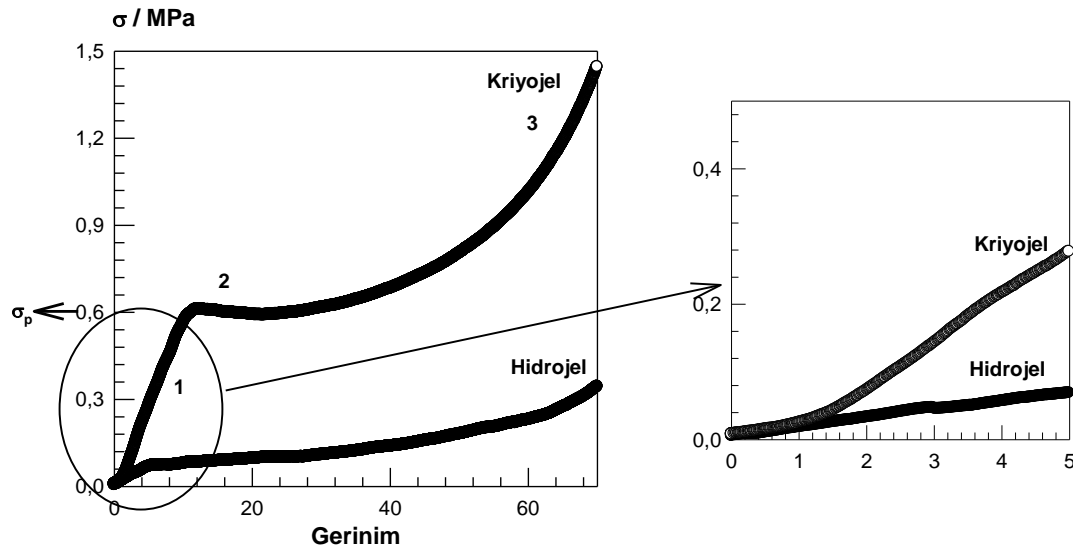
oranının TEMED miktarı veya donmadan önceki çözeltinin pH değerinden bağımsız olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11 : Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş ipek fibroin çözeltisinin, % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda ve hacimce farklı TEMED konsantrasyonlarında elde edilen hidrojel ve kriyojellerin konformasyon oranları. Gri semboller ipek fibroini, içi boş semboller hidrojelleri, içi dolu semboller kriyojelleri, göstermektedir. β-döngü (▼, ▽, ▼), β-tabaka (●, ○, ●), rastgele yumak ve α-heliks (▲, △, ▲) sembolleri ile gösterilmiştir.

İpek fibroin iskeletlerinin mekanik özelliklerinin incelenmesi için Zwick mekanik test cihazı ile kuru durumdaki hidrojel ve kriyojel örneklerine tek eksenli basma uygulanmıştır. Şekil 4.12’de % 4,2 ipek fibroin ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda, +50 ve -18°C’de sentezlenen ipek fibroin iskeletlerinin tipik gerilim-gerinim (stress-strain) eğrileri görülmektedir. Kriyojellerin tipik gerilim-gerinim eğrilerinde üç farklı bölge gözlenebilir. Birinci bölge gözeneklerin mekanik olarak dayanıklı olduğu tamamen doğrusal olan kısımdan oluşmaktadır. Bu doğrusal elastik bölgeden sonra, ağyapının gözeneklerinin kuvvet altında çökmesinden dolayı kolaylıkla deforme olduğu, plato bölgesi olarak isimlendirilen ikinci bölge gelmektedir. Plato bölgesine karşılık gelen σ_p ile ifade edilen kritik gerilim gözenek yapısının mekanik dayanıklılığının bir ölçüsüdür. % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen ipek fibroin iskeletlerinde kritik gerilim 0,6 MPa, elastik modül ise 8 MPa olarak ölçülmüş ve TEMED konsantrasyonundan bağımsız

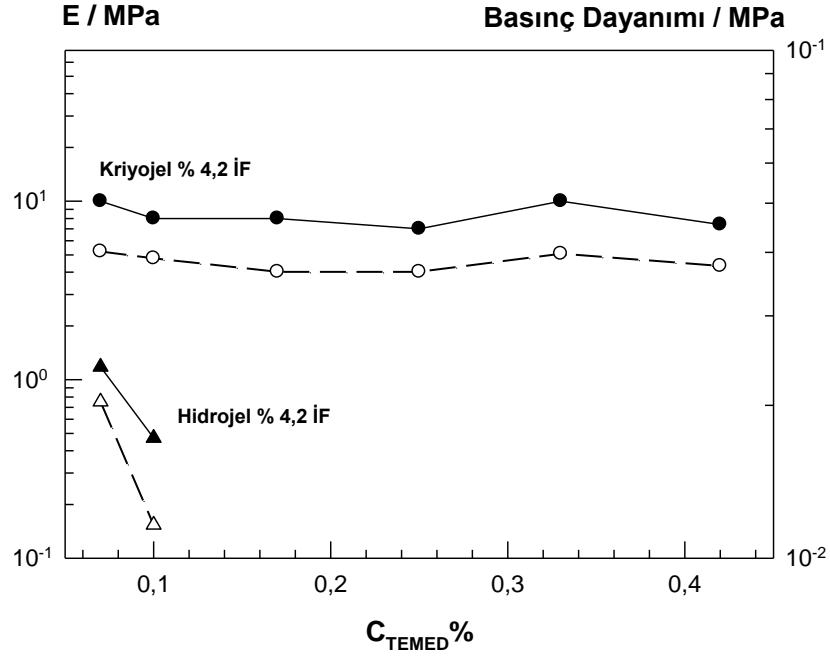
olduğu görülmüştür. Üçüncü bölgede ise eğrinin dik olarak artmasının nedeni olarak hemen hemen gözeneksiz ipek fibroin ağyapısının sıkıştırılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. +50°C’de sentezlenen, dondurmalı kurutucuda kurutulmuş hidrojel ve kriyojeller de gözeneklere sahip olmasına rağmen gerilim-gerinim eğrisinde belirgin bir plato bölgesi gözlenememiştir. Kriyojellerde gözenekler sentez sırasında, hidrojelde ise vakum altında kurutma işlemi sırasında oluştuğu için hidrojellerin gözenekleri kriyojellere göre düzensiz ve daha zayıftır. Bu yüzden hidrojel mekanik olarak daha dayanıksızdır ve kriyojellerde sağlam gözenek duvarlarından kaynaklanan belirgin plato bölgesi hidrojelde gözlenememiştir.



Şekil 4.12 : % 4,2 ipek fibroin ve % 0,07 TEMED konsantrasyonunda elde edilen, dondurmalı kurutucuda kurutulmuş hidrojel ve kriyojellerin gerilim-gerinim eğrisi

Şekil 4.13’te % 4,2 ipek fibroin ve hacimce farklı TEMED konsantrasyonlarında +50 ve -18°C’de sentezlenen ipek fibroin iskeletlerinin elastik modülleri ve basınç dayanımları verilmiştir. Basınç dayanımı % 3 sıkıştırmada ölçülen gerilim değeri olarak kaydedilmiştir. Laboratuvarımızda sentezlenen makrogözenekli ipek fibroin iskeletlerinin modül değerleri çizelge 2.4’te verilen malzemelerin modül değerleri ile karşılaştırılırsa, BDDE varlığında kriyojelleşme reaksiyonu sonucu elde edilen iskeletin literatürde rapor edilen malzemelerden çok daha üstün mekanik özelliklere sahip olduğu görülür. Kriyojelleşme reaksiyonlarının sadece donmamış mikrobölgelerde ilerlemesi, dolayısıyla gözenek duvarlarının çok yüksek konsantrasyonda fibroin çözeltilerinin çapraz bağlanması ile oluşması, malzemenin üstün mekanik özelliğe sahip olmasını sağlamıştır. Mukayese amaçlı +50°C’de

sentezlenen hidrojellerin elastik modüllerinin TEMED konsantrasyonu arttıkça yaklaşık 1 MPa'dan 0,5 MPa düştüğü görülmüştür. Bu da kriyojelleştirme tekniği ile mekanik olarak dayanıklı ipek fibroin iskeletlerinin sentezlenebildiğini göstermiştir.

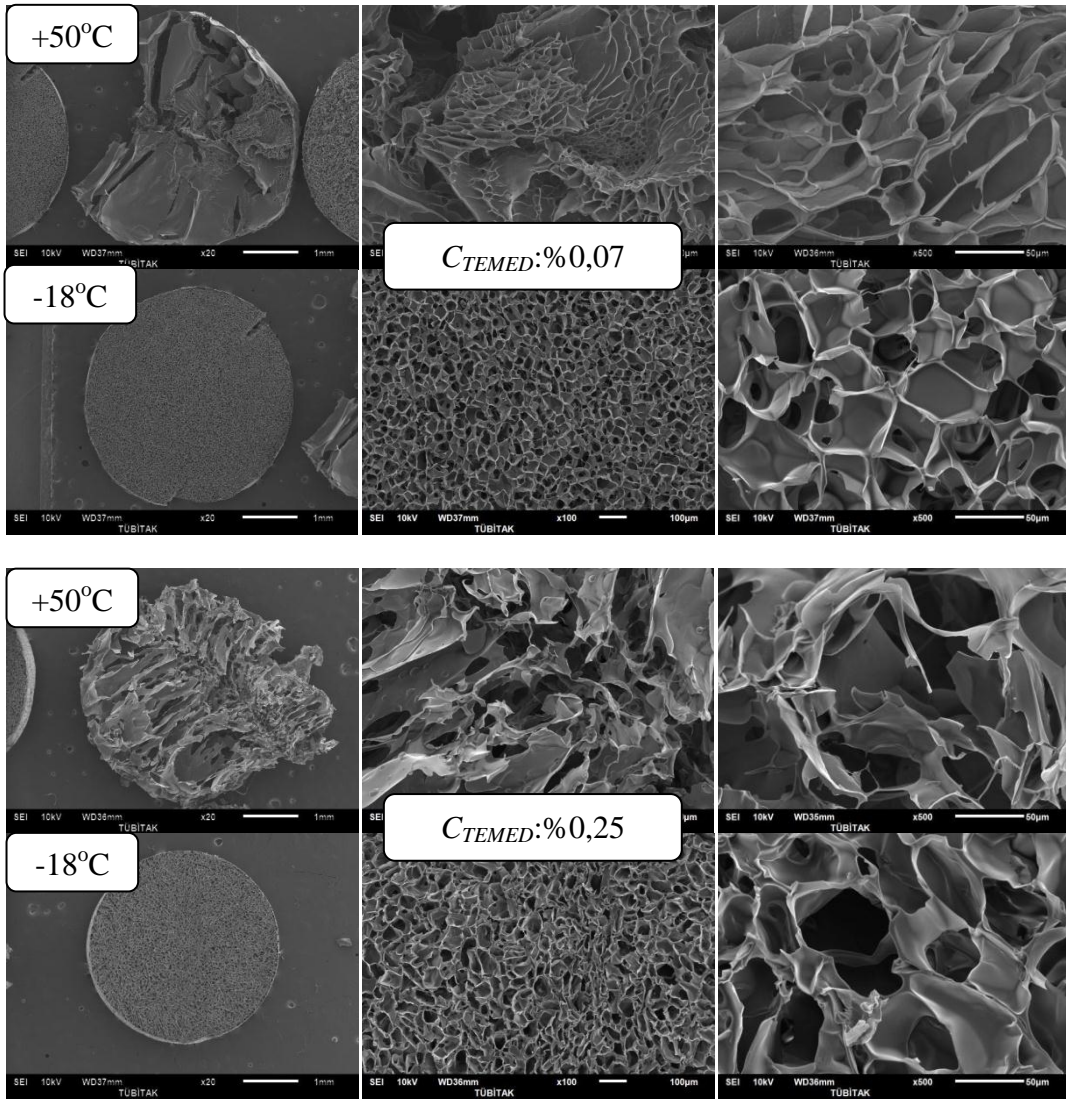


Şekil 4.13 : % 4,2 ipek fibroin ve hacimce farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen hidrojel ve kriyojellerin elastik modülleri ile basınç dayanımları. Koyu semboller elastik modül, açık semboller basınç dayanımı değerlerini göstermektedir. Kriyojeller (●) sembolü ile, hidrojeller (▲) sembolü ile gösterilmiştir.

% 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen ipek fibroin iskeletlerinin morfolojik özelliklerinin TEMED miktarı ve sıcaklık değişimi ile nasıl etkilendiğini incelemek için kuru durumdaki hidrojel ve kriyojeller taramalı elektron mikroskop yardımıyla 20 ile 500 kez aralığındaki büyütmelelerde görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.14'te verilmiştir.

Kriyojellerde gözenekler sentez sırasında donmamış mikrobölgelerde oluşurken, hidrojellerde gözenekler dondurmalı kurutucuda vakum altında kurutma sırasında oluştuğu için hidrojellerin gözeneklerinin kriyojellere göre daha düzensiz olduğu görülmüştür. Hidrojellerde TEMED konsantrasyonu arttıkça fibroin molekülünün suda genişmesi ve moleküller arası hidrofobik etkileşmelerin azalması nedeniyle gözenekleri dayanıksız jellerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Kriyojellerde ise reaksiyon donmamış mikro bölgelerde gerçekleştiği için TEMED miktarının artması ile fibroin molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşmeler etkilenmediği için

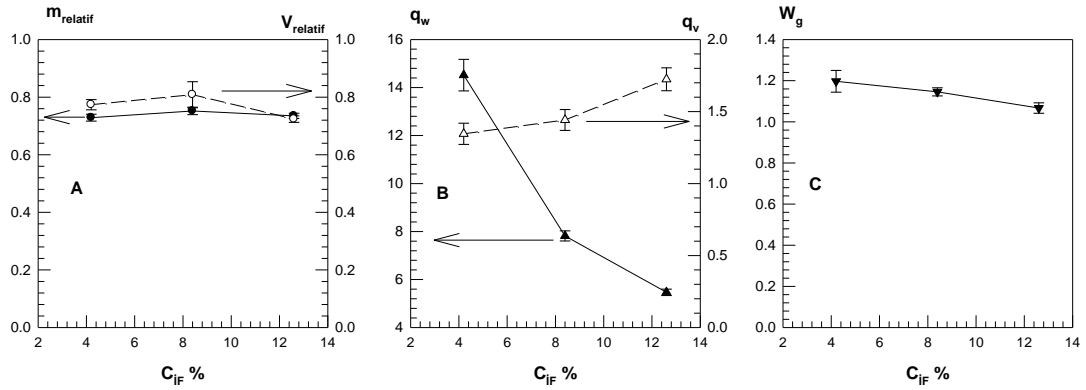
kriyojellerin gözenek yapısının TEMED miktarından bağımsız olduğu görülmüştür. SEM görüntülerinin Zwick mekanik test cihazı ile elde edilen elastik modül ölçüm sonuçları ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Kriyojellerin gözenek yapısının hidrojellere göre daha düzenli olması ve gözenek boyutunun TEMED miktarından bağımsız olması kriyojelleştirme tekniğinin üstünlüğünü göstermektedir. Sentezlenen kriyojellerde bütün TEMED miktarlarında gözenek boyutu yaklaşık 33 μm olarak ölçülmüştür. Şimdiye kadar sentezlenen ipek fibroin iskeletlerinden daha dayanıklı ve düzenli gözenek boyutuna sahip olduğu için kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.14 : % 0,07 ve 0,25 TEMED konsantrasyonlarında, +50 ve -18°C’de sentezlenen hidrojel ile kriyojellerin SEM görüntüleri. Skala çubuğu soldan sağa doğru 1 mm, 100 μm ve 50 μm iken SEM fotoğrafları soldan sağa doğru x20, x100 ve x500 büyütmelede çekilmiştir.

4.2 Farklı İpek Fibroin Konsantrasyonlarında Elde Edilen Kriyojeller

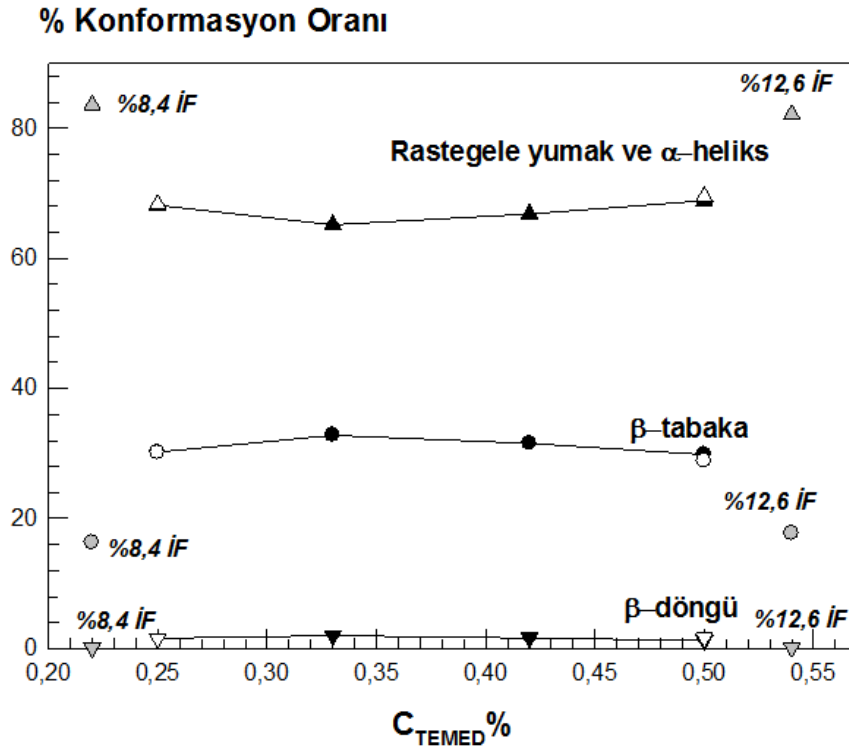
İpek fibroin kriyojellerinin fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak özelliklerinin nasıl değiştiğini araştırmak için çapraz bağlayıcı ve TEMED miktarları sabit, sadece fibroin konsantrasyonları farklı olacak şekilde kriyojeller sentezlenmiştir. Şekil 4.15'te % 4,2, 8,4 ve 12,6 ipek fibroin konsantrasyonlarında sentezlenmiş kriyojellerin şişme oranları ve jel kesirleri verilmiştir. Şekil 4.15 A'da jellerin gerek ağırlıkça ve gerekse hacımca bağıl şişme oranlarının (m_{relatif} ve V_{relatif}) fibroin konsantrasyonuna bağlı değişmediği görülmektedir. Kuru duruma göre hacımca şişme oranı da (q_v) fazla değişmemekle birlikte ağırlıkça şişme oranı q_w artan fibroin konsantrasyonu ile hızla azalmakta olup bu durum jel içinde artan fibroin miktarının bir sonucudur (Şekil 4.15 B). Şekil 4.15 C'de verilen jel kesri değerlerinin tüm fibroin konsantrasyonları için suda çözünen fibroin moleküllerinin tamamen kriyojel yapısına girdiği görülmektedir.



Şekil 4.15 : % 0,25 TEMED ve % 4,2, 8,4 ve 12 ipek fibroin konsantrasyonlarında -18°C 'de hazırlanan kriyojellerin m_{relatif} (●), V_{relatif} (○), (A) q_w (▲), q_v (△), (B) W_g (▼) (C) değerleri.

Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin ATR - FTIR spektrumları alınmış daha sonra Peak Fit yazılımı ile analiz edilmiştir. Peak fit yazılımı ile doğrusal düzeltme yapıp gaus modelinin uygulanması ile % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen hidrojel ve kriyojellerde olduğu gibi konformasyon oranları hesaplanmıştır. Şekil 4.16'da % 8,4 ve 12,6 (ağ/hac) ipek fibroin ve farklı TEMED konsantrasyonlarında sentezlenen kriyojellerin konformasyon oranları görülmektedir. İpek fibroin konsantrasyonu artmasına rağmen ipek fibroin çözeltisi ve kriyojellerin konformasyon oranlarında değişim olmadığı belirlenmiştir. İpek fibroin konsantrasyonu arttığı için fibroin zincirlerinin hareketi sınırlanmış, böylece β -tabaka oranlarında % 4,2 ipek fibroin

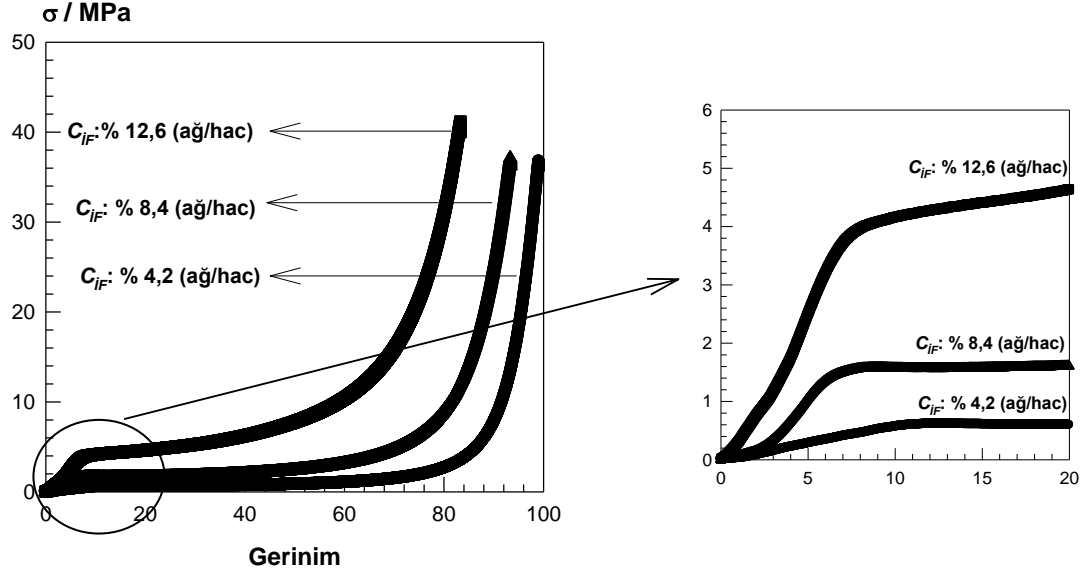
konsantrasyonunda elde edilen kriyojellere göre çok fazla değişiklik olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.16 : Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş % 8,4 ve 12,6 ipek fibroin ile aynı ipek fibroin konsantrasyonunda, hacimca farklı TEMED konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin konfarmasyon oranları. İpek fibroindeki; β-döngü (▼), β-tabaka (●), rastgele yumak ve α-heliks (▲), % 8,4 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojellerdeki; β-döngü (▼), β-tabaka (●), rastgele yumak ve α-heliks (▲), % 12,6 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojellerdeki β-döngü (▽), β-tabaka (○), rastgele yumak ve α-heliks (△) sembolleri ile gösterilmiştir.

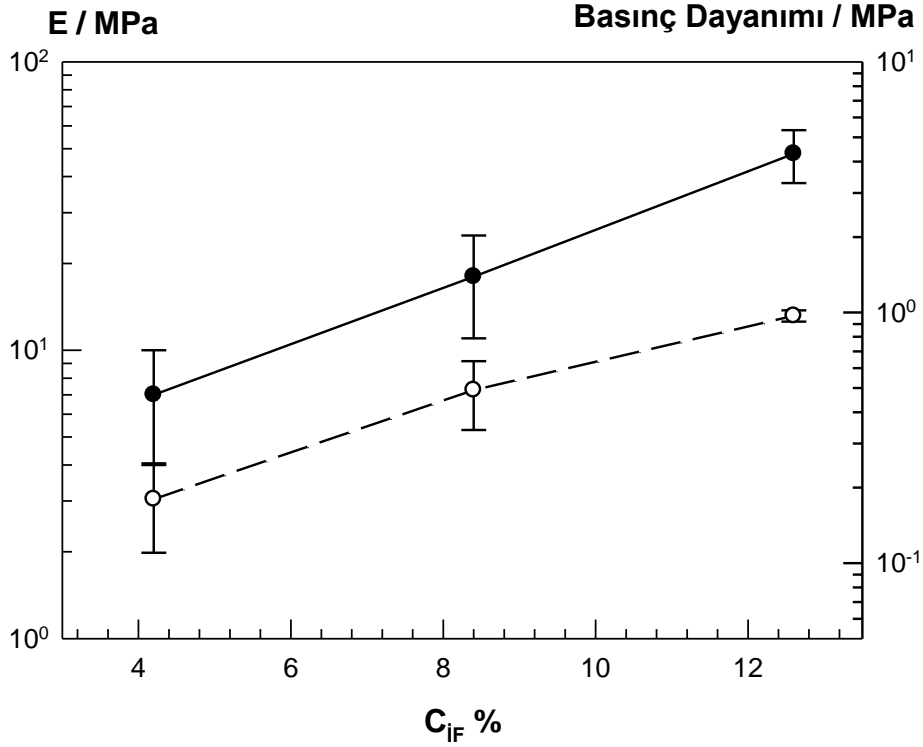
İpek fibroin konsantrasyonunun, ipek fibroin iskeletlerinin elastik modül değerlerine etkisini araştırmak için farklı ipek fibroin konsantrasyonunda -18°C’de kriyojelleşme tekniği ile ipek fibroin iskeletleri sentezlenmiştir. Şekil 4.17’de % 0,25 TEMED ve farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kuru durumdaki kriyojellere Zwick mekanik test cihazı ile tek eksenli basma uygulandığında elde edilen tipik gerilim-gerinim eğrisi görülmektedir. Kritik gerilim (σ_p) değerinin ipek fibroin iskeletlerinde, ipek fibroin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak arttığı görülmüştür. σ_p değeri % 4,2, 8,4 ve 12,6 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen ipek fibroin iskeletlerinde sırasıyla 0,6, 1,2 ve 4,2 MPa olarak ölçülmüştür.

Labaratuvarımızda sentezlenen % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen fibroin iskeletlerinin elastik modüllerinin, literatürde şimdiye kadar verilen en yüksek değerden (3 MPa) oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. İpek fibroin konsantrasyonu arttırıldığında ise fibroin iskeletlerinin elastik modüllerinin 50 MPa kadar çıktığı görülmüştür.



Şekil 4.17 : % 0,25 TEMED ve farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin tipik gerilim-gerinim eğrisi

İpek fibroin kriyojellerinde ipek fibroin konsantrasyonu arttıkça gözenek duvarlarının dayanıklılığı arttığı için elastik modül artışı gerçekleşmiştir. İpek fibroin konsantrasyonu arttırılarak elde edilen makrogözenekli ipek fibroin iskeletlerinin modül değerleri çizelge 2.4'te verilen malzemelerin modül değerleri ile karşılaştırıldığında literatürde rapor edilen ve labaratuvarımızda sentezlenen ipek fibroin iskeletlerinden çok daha üstün mekanik özelliklere sahip olduğu görülür. İpek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak ayarlanabilir farklı mekanik özelliklere sahip ipek fibroin iskeletlerinin kolaylıkla sentezlenebileceği ortaya konulmuştur.

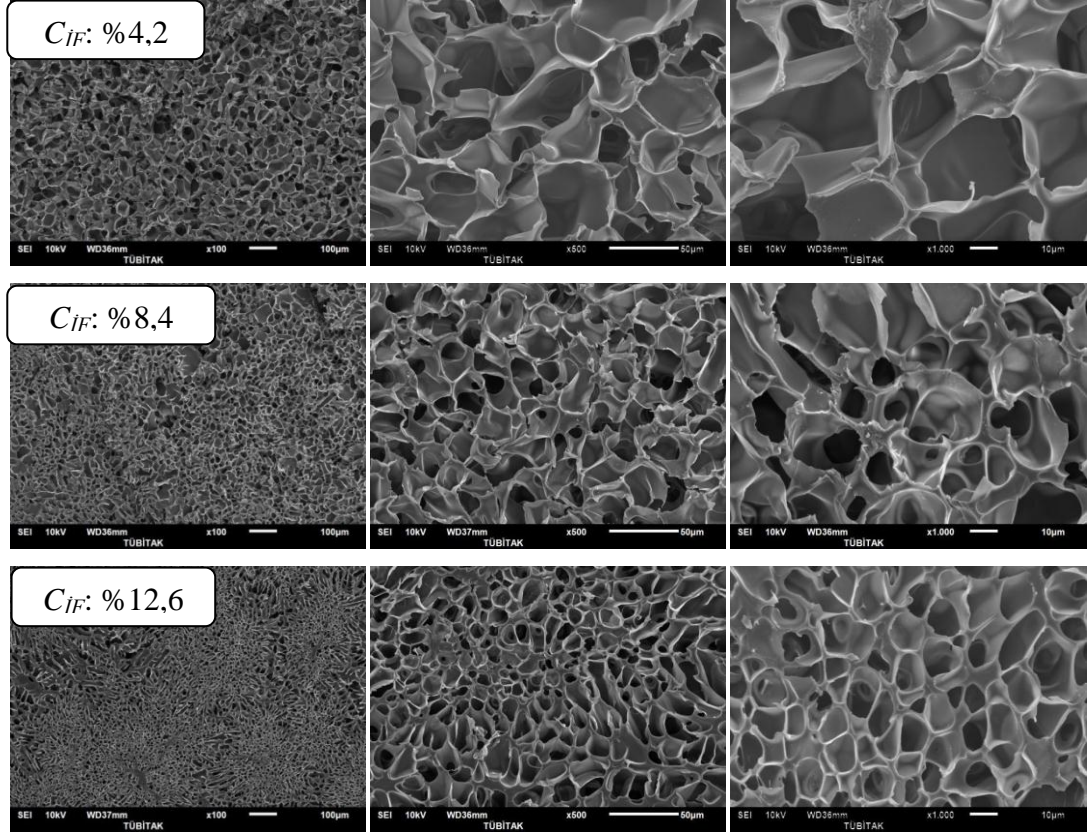


Şekil 4.18 : Dondurmalı kurutucuda kurutulmuş kriyojellerin ipek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak elastik modül değişimleri (●) ile basınç dayanımı değerleri (○).

Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında -18°C 'de kriyojelleşme tekniği ile sentezlenen ipek fibroin iskeletlerinin gözenek yapısı hakkında bilgi edinmek ve gözenek yapısı ile elastik modül arasındaki ilişkiyi incelemek için taramalı elektron mikroskop yardımıyla kuru durumdaki kriyojellerin 100, 500 ve 1000 kez büyütmelemlerde alınan görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntüler şekil 4.19'da verilmiştir.

Şekil 4.19'da % 0,25 TEMED konsantrasyonunda, % 4,2, 8,4 ve 12,6 (ağ/hac) ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen makrogözenekli ipek fibroin istkeletlerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Kriyojelleşme tekniğinde reaksiyon donmamış mikrobölgelerde ilerlediği için ipek fibroin konsantrasyonu arttıkça gözenek duvarlarının kalınlaştığı ve bununla birlikte gözenek çaplarının küçüldüğü görülmüştür. % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda yaklaşık $33\ \mu\text{m}$ olan gözenek boyutu artan ipek fibroin konsantrasyonu ile azalmış ve % 12,6 ipek fibroin konsantrasyonunda $10\ \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Gözenek duvarlarının kalınlığı arttığı ve gözenek boyutları küçüldüğü için mekanik olarak daha dayanıklı kriyojellerin

sentezi mümkün olmuştur. Gözenek boyutu küçüldükçe elastik modül artışı olduğu için gözenek boyutunun mekanik dayanıklılığın bir ölçüsü olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.19 : % 0,25 TEMED ve farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen makrogözenekli ipek fibroin iskeletlerinin SEM görüntüleri. Fibroin konsantrasyonu fotoğrafların üstünde verilmiştir. Skala çubuğu soldan sağa doğru 100 µm, 50 µm ve 10 µm'dir. SEM fotoğrafları soldan sağa doğru x100, x500 ve x1000 büyütmelerde çekilmiştir.

5 SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında ipek fibroindeki konformasyonel geçişlerin epoksi grupları içeren çapraz bağlayıcı (BDDE) ile uyarılarak kısa sürede gerçekleşmesi sağlanmış, % 4,2 konsantrasyondaki fibroinin sulu çözeltisinden -18°C 'de kriyojelleşme tekniği ile makrogözenekli ipek fibroin kriyojel iskeletleri ve mukayese amacıyla $+50^{\circ}\text{C}$ 'de ipek fibroin hidrojelleri sentezlenmiştir. İpek fibroinin ikincil yapısındaki rastgele yumak yapısından β -tabakasına olan konformasyonel geçişler ATR-FTIR spektrofotometre cihazı ile değerlendirilmiştir. BDDE çapraz bağlayıcısının katılması ile fibroin molekülündeki zincirlerin hareketliliği azaldığı için konformasyonel geçişler başlatılarak kısa sürede jelleşme gerçekleşmesi sağlanmıştır. Şişmiş durumdaki fibroin kriyojellerinin oldukça tok bir malzeme olmalarının yanı sıra herhangi bir parçalanma olmadan % 100'e kadar sıkıştırılabilmekte olduğu ve uygulanan kuvvetin kaldırılıp tekrar su içerisine konulduğu zaman eski haline geri dönebildiği görülmüştür. Kriyojelleşme tekniği ile elde edilen, % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen makrogözenekli fibroin iskeletlerinin modülünün yaklaşık 8 MPa ve TEMED konsantrasyonundan bağımsız olduğu görülmüştür. Bu değer literatürde verilen en yüksek değer (3 MPa) oldukça üzerinde olup kriyojelleşme tekniğinin üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Elde edilen bu jellerin düzenli gözenek yapısına sahip olduğu görülmüş ve gözenek çapı yaklaşık 33 μm olarak ölçülmüştür. İpek fibroin konsantrasyonu arttıkça gözeneklerin boyutunun 10 μm 'ye kadar azaldığı ve mekanik dayanıklılığının arttığı görülmüştür. Elde edilen ipek fibroin iskeletlerinin, üstün mekanik özellikler göstermesi nedeniyle kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Tanaka, T.**, (1981). Gels, *Sci. Am.*, 244-110-123.
- [2] **Shibayama M., Tanaka T.**, (1993) Phase transition and related phenomena of polymer gels. *Adv. Polym. Sci.* **109**, 1-62.
- [3] **Kopecek J., Yang J.**, Hydrogels as Smart Biomaterials 2007. *Polym. Int.* **56**, 1078-1098.
- [4] **Calvert P.**, 2008. Hydrogels for Soft Machines. *Adv. Mater.* **20**, 1-14.
- [5] **Lei M., Baldi A., Nuxoll E., Siegel R.A., Ziaie B.**, 2006. A Hydrogel-Based Implantable Micromachined Transponder for Wireless Glucose Measurement. *Diabetes Technol Ther* **8**, 112-122.
- [6] **Oh K.S., Oh J.S., Choi H.S., Bae Y.C.**, (1998). Effect of crosslinking density on the swelling behavior of NIPA gel particles. *Macromolecules* **31**,7328-7335.
- [7] **Yoshida R., Ushida K., Kaneko Y., Sakai K., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.** (1995). Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature changes. *Nature* **374**,240-242.
- [8] **Okay O.** 2000. Macroporous copolymer networks. *Prog. Polym. Sci.* **25**,711-779.
- [9] **Gong J. P., Katsuyama Y., Kurokawa T., Osada Y.** (2003). Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* **15**, 1155-1158.
- [10] **Okumura Y., Ito K.** (2001). The Polyrotaxane Gel: A Topological Gel by Figure-of-Eight Cross-links. *Adv. Mater.* **13**, 485-487.
- [11] **Haraguchi K., Takehisa T.**, (2002). Nanocomposite hydrogels: A unique organic-inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical and swelling/deswelling properties. *Adv. Mater.* **14**, 1120-1124.
- [12] **Lozinsky V.I., (2002a).** Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application. *Russ. Chem. Rev.* **71**, 489-511.
- [13] **Habeeb, A. F. S. A.**, (1996). Determination of free amino group in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **11**, 328-336.
- [14] **Lozinsky, V. I., Morozowa, S. A., Vainerman, E. S., Titova, E. F., Shtil'man, M. I., Belavtseva, E. M., Rogozhin, S. V.**, (1989). *Acta Polym.*, **40**, 8.
- [15] **Lozinsky, V. I.**, (2002). *Russ. Chem. Rev.*, **71**, 489.

- [16] **Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Yu., Bergenstahl, B., Mattiasson, B.,** (2006). *J. Mater. Chem.*, **16**, 4065.
- [17] **Kirsebom, H., Mattiasson, B., Galaev, I. Yu.,** (2009). *Langmuir*, **25**, 8426.
- [18] **Ceylan, D., Okay, O.,** (2007). Macroporous polyisobutylene gels: A novel tough organogel with superfast responsivit, *Macromolecules*, **40**, 8742.
- [19] **Tuncaboylu, D. C., Okay, O.,** (2009). Preparation and characterization of single-hole macroporous organogel particles of high toughness and superfast responsivity. *Eur. Polym. J.*, **45**, 2033.
- [20] **Tuncaboylu, D. C., Okay, O.,** (2010). Hierarchically macroporous cryogels of polyisobutylene and silica nanoparticles, *Langmuir*, **26**, 7574.
- [21] **Arvidsson, P., Plieva, F.M., Savina, I.N., Lozinsky, V.I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I.Y., Mattiasson, B.,** (2002). Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns, *J. Chromatogr. A.*, 977, 27.
- [22] **Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Savina, I.N., Junguid, H., Mattiasson, B.,** (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.*, **21**, 445.
- [23] **Saçak M.** (2005). Polimer Kimyasına Giriş
- [24] **Hermanson, G.,** (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, California, Sayfa: 112-113.
- [25] **Dusek K.,** (1982). Network formation in chain crosslinking (co)polymerization. İçinde: *Developments in Polymerization 3*, Haward, R.N., Ed., London, Applied Science,. Sayfa: 143.
- [26] **Okay O.,** (1994). Kinetic Modelling of Network Formation and Properties in Free-radical Copolymerization. *Polymer* **35**, 796-807.
- [27] **Okay O.,** (1999). Separation in Free-Radical Crosslinking Copolymerization: Formation of Heterogeneous Polymer Networks. *Polymer* **40**, 4117-4129.
- [28] **Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B.,** (2002b). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation* **10**, 163-174.
- [29] **Lozinsky, V. I., Galaev, I. Yu., Plieva, F. M., Savina, I. N., Junguid, H., Mattiasson, B.,** (2003). *Trends. Biotechnol.*, **21**, 445.
- [30] **Ozmen M. M., Okay O.,** (2005). Superfast responsive ionic hydrogels with contrallable pore size. *Polymer* **46**, 8119-8127.
- [32] **Dinu M.V., Ozmen M.M., Dragan E.S., Okay O.,** (2007). Freezing as a path to build macroporous structures: Superfast responsive polyacrylamide hydrogels. *Polymer* **48**, 195-204.
- [33] **Okay O.,** (2007a) Macroporous hydrogels from smart polymers, İçinde: B. Mattiason ve I. Galaev, Ed, *Smart Polymers: Application in Biotechnology and Biomedicine*, 2. Baskı, Sayfa 269-299, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.

- [34] **Tuncaboylu D.C., Okay O.**, (2012). Hierarchically macroporous cryogels of polyisobutylene and silica nanoparticles. *Langmuir* 26 (10), 7574-7581.
- [35] **Ivanov R.V., Babushkina T.A., Lozinskii V.I.**, (2005). Specifics of acrylamide cryopolymerization at temperatures above and below the eutectic point of the frozen reaction system. *Polymer Science Series A* 47, 791.
- [36] **Topuz F., Okay O.**, (2009a) Macroporous hydrogel beads of high toughness and superfast responsivity. *React. Funct. Polym.* 69, 273-280.
- [37] **John G. Hardy, Lin M. Römer, Thomas R. Scheibel.**, (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, 49, 4309-4327.
- [38] **Vepari C., Kaplan D.L.**, (2007). Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* 32, 991-1007.
- [39] **Kim U., Park J., Li C., Jin H. J., Valuzzi R., Kaplan D. L.**, (2004). Structure and Properties of Silk Hydrogels *Biomacromolecules*. 5, 786-792.
- [40] **Sashina E. S., Bocek A. M., Novoselov N. P., Kirichenko D. A.** (2006). Structure and solubility of natural Silk Fibroin. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 79, 869 -876.
- [41] **Mondal, M., Trivedy, K., Kumar S.N.** (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori*. *Caspian Journal of Environmental Sciences*. 5, 63-76.
- [42] **Mo C., Holland C., Porter D, Shao Z, Vollrath F.**, (2009). Concentration state dependence of the rheological and structural properties of reconstituted silk. *Biomacromolecules* 10, 2724-2728.
- [43] **Murray R. K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W.** (1993). Harper's Biochemistry.
- [44] **Zhou C. Z., Confalonieri F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R., Li Z.G.**, (2000). Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.* 28, 2413-2419.
- [45] **Sofia S., McCarthy M. B., Gronowicz G., Kaplan D. L.**, (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 54, 139-148.
- [46] **Jin H. J., Fridrikh S. V., Rutledge G. C., Kaplan D. L.**, (2002). Electrospinning *Bombyx mori* Silk with. Poly(ethylene oxide). *Macromolecules* 3, 1233-1239.
- [47] **Jin H. J., Kaplan D. L.**, (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 424, 1057-1061.
- [48] **Kim U. J., Park J., Li C., Jin H. J., Valluzzi R., Kaplan D. L.**, (2004). Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* 5, 786-792.
- [49] **Magoshi J., Magoshi Y., Nakamura S.**, (1994). Mechanism of fiber formation of silkworm. İçinde: Kaplan, D.; Adams, W. W.; Farmer, B.; Viney,

C., Ed. Silk polymers. Washington: American Chemical Society, Sayfa: 292-310.

- [50] **Magoshi J.**, (1996). Biospinning (silk fiber formation, multiple spinning mechanisms). İçinde: Salamone, J. C., Ed. Polymeric Materials Encyclopedia. New York: CRC Press, Sayfa: 667-679.
- [51] **Knight D. P., Vollrath F.**, (2001). Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* **88**, 179-182.
- [52] **Chen X, Knight D. P, Shao Z. Z, Vollrath F.**, (2002). Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila* spider silk films. *Biochemistry* **41**, 14944-14950.
- [53] **Chen X., Shao Z. Z., Knight D. P., Vollrath F.**, (2007). Conformation Transition Kinetics of *Bombyx mori* Silk Protein. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **68**, 223-231.
- [54] **Terry A. E., Knight D. P., Porter D., Vollrath F.**, 2004. pH induced changes in the rheology of silk fibroin. *Biomacromolecules* **5**, 768-772.
- [55] **Dicko C., Vollrath F., Kenney J. M.**, 2004. Spider silk-protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules* **5**, 704-710.
- [56] **Zong X. H., Zhou P., Shao Z. Z., Chen S. M., Chen X., Hu B. W., Deng F., Yao W. H.**, (2004). Effect of pH and Copper(II) on the Conformation Transitions of Silk Fibroin Based on EPR, NMR, and Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **43**, 11932-11941.
- [57] **Hossain K. S., Ochi A., Magoshi J. Nemoto N.**, (2003). Dynamic Light Scattering of Native Silk Fibroin Solution Extracted from Different Parts of the Middle Division of the Silk Gland of the *Bombyx mori* Silkworm. *Biomacromolecules* **4**, 350-359.
- [58] **Zhou L., Chen X., Shao Z. Z., Zhou P., Knight D. P., Vollrath F.**, (2003). Copper in the Silk Formation Process of *Bombyx mori* Silkworm. *FEBS Lett.* **554**, 337-341.
- [59] **Leisk G. G., Lo T. J., Yucel T., Lu Q., Kaplan D. L.**, (2010). Electrogelation for protein adhesives. *Adv. Mater.* **22**, 711-715.
- [60] **Winkler S., Kaplan D. L.**, (2000). Molecular biology of spider silk. *Rev. Mol. Biotechnol.* **74**, 85-93.
- [61] **Vepari C., Kaplan D. L.**, (2007). Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 991-1007.
- [62] **Hardy J. G., Romer L. M., Scheibel T. R.**, (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* **49**, 4309-4327.
- [63] **Vollrath F., Porter D.**, (2009). Silks as Ancient Models for Modern Polymers. *Polymer* **50**, 5623-5632.
- [64] **Matsumoto A., Chen J., Collette A. L., Kim U. J., Altman G. H., Cebe P., Kaplan D. L.**, (2006). Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. *J. Phys. Chem. B.* **110**, 21630-21638.

- [65] **Um I. C., Kweon H. Y., Lee K. G., Park Y. H.**, (2003). The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer. *Int. J. Biol. Macromol.* **33**, 203-213.
- [66] **Ayub Z. H., Arai M., Hirabayashi K.**, (1993). Mechanism of the gelation of fibroin solution. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1910-1912.
- [67] **Karakutuk I., Ak, F., Okay O.**, (2012) Diepoxide-induced conformational transition of silk fibroin: Formation of hydrogels and cryogels. *Biomacromolecules* **13**, 1122-1128.
- [68] **Lozinsky, V. I.**, (2002). *Russ. Chem. Rev.*, **71**, 489.
- [69] **Köse G. T., Kenar H., Hasırcı N., Hasırcı V.**, (2003). Macroporous Poly(3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 1949-1958.
- [70] **Kim, U. J. ; Park, J. ; Kim, H. J. ; Wada, M. ; Kaplan, D. L.**, (2005). *Biomaterials*, **26**, 2775.
- [71] **Arafat M. T., Lam C.X.F., Ekaputra A. K., Wong S. Y., He C., Hutmacher D. W., Li X., Gibson I.**, (2011) High performance additive manufactured scaffolds for bone tissue engineering application. *Soft Matter*, asap, DOI: 10.1039/C1SM05793F
- [72] **Ki C. S., Park S. Y., Kim H. J., Jung H. M., Woo K. M., Lee J. W., Park Y. H.**, (2008). Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration. *Biotechnol. Lett.* **30**, 405-410.
- [73] **Hutmacher D. W.**, (2000). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529-2543.
- [74] **Li M. Z., Lu S. Z., Wu Z. Y., Yan H. J.**, (2001a). Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* **79**, 2185-2191.
- [75] **Li M. Z., Wu Z. Y., Zhang C. S., Lu S. Z., Yan H. J., Huang D., Ye H. L.**, 2001b. Study on porous silk fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy porous silk fibroin materials. *J. Appl. Polym. Sci.* **79**, 2192-2199.
- [76] **Lv Q., Feng Q. L.**, (2006). Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1349-1356.
- [77] **Liu X., Ma P. X.**, (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 477-486.
- [78] **Shimura, K.; Kikuchi, A.; Katagata, Y.; Ohotomo, K. J.**, (1982). *Seric. Sci. Jpn.*, **51**, 20.
- [79] **Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. J.**, (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *Sep. Sci.*, **30**, 1657-1671.

- [80] **Ceylan, D., Okay, O.**, (2007). Macroporous polyisobutylene gels: A novel tough organogel with superfast responsivit, *Macromolecules*, **40**, 8742.
- [81] **Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y.**, (2005). *Soft Matter*, **1**, 303-309.
- [82] **Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J.** (2006). *Appl. Polym. Sci.* **100**, 1057-1066.
- [83] **Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J.** (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *Chromatogr. A.*, **986**, 275-290.
- Url-1** <<http://www.nku.edu/~russellk/tutorial/peptide/peptide.html>> alındığı tarih 02.12.2012

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Fatih AK
Doğum Yeri ve Tarihi: Eminönü 1988
Adres: İstanbul
E-Posta: fatihak88@hotmail.com
Lisans: Trakya Üniversitesi

Yayın Listesi:

Karakutuk I., **Ak, F.**, Okay O. Diepoxide-induced conformational transition of silk fibroin: Formation of hydrogels and cryogels.

Biomacromolecules 13 (4), 1122-1128 (2012)

Ödüller:

Polonya’da düzenlenen “Polymers for Advanced Technologies 2011” kongresinde “*Mechanical Properties of Silk Fibroin Cryogels and Hydrogels*” başlıklı çalışma ile poster birinciliği.

Tezden Türetilen Sunumlar

- **AK F.**, Karakütük İ., OKAY O., 2011: İpek Jellerinin Mekanik Özellikleri *Uluslararası Katılımlı 25. Ulusal Kimya Kongresi*, 27 Haziran-2 Temmuz 2011 Erzurum, Türkiye
- **AK F.**, Karakütük İ., OKAY O., 2011 : Mechanical Properties of Silk Fibroin Cryogels and Hydrogels. *Polymer for Advanced Technologies*, 2-5 Ekim, 2011 Lodz, Poland
- **AK F.**, Karakütük İ., OKAY O., 2011 : İpek Fibroin Jellerinin Mekanik Özellikleri. *26. Ulusal Kimya Kongresi*, 1-6 Ekim, 2012 Muğla, Türkiye.