

**BİYOBOZUNUR KOMPOZİT KEMİK DOKU İSKELELERİ:
POLİMERİK FİBER/MALZEME DESTEKLİ KRİYOJELLER**

**BIODEGRADABLE COMPOSITES AS BONE TISSUE
ENGINEERING SCAFFOLDS: CRYOGELS REINFORCED
WITH POLYMERIC FIBERS/MATERIALS**

LÜTFİYE TUTKUN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda**
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye (Danışman) :

Prof. Dr. Erhan Bişkin

Üye :

Doç. Dr. İbrahim Vargel

Üye :

Yrd. Doç. Dr. Kadriye Tuzlakoğlu

Üye :

Yrd. Doç. Dr. Sevil Dinçer

ONAY

Bu tez / / tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BIYOBOZUNUR KOMPOZİT KEMİK DOKU İSKELELERİ: POLİMERİK FİBER/MALZEME DESTEKLİ KRİYOJELLER

Lütfiye Tutkun

ÖZ

Sunulan tez çalışmasının amacı; doku mühendisliği yaklaşımı ile daha hızlı ve kaliteli kemik dokusu oluşumu sağlamak amacıyla, kriyojel esaslı biyobozunur fiberler ile desteklenmiş doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyonudur. Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskelelerinin başarısı, doku iskelesi materyallerinin özellikleri ile belirlenir. Doku iskelesinin mekanik, kimyasal ve geometrik özellikleri doku iskelesinin işlevselliği açısından bu kapsam içerisinde yerini alır. Yeni doku oluşumu gerçekleşirken doku iskelesi mekanik kararlılığını sürdürebilmelidir. İdeale yakın gözenek yapısı oluşturan kriyojel hazırlama tekniği ile elde edilen doku iskelelerinin en önemli dezavantajı, mekanik olarak zayıf olmalarıdır. Doku iskelelerinin çeşitli biyobozunur fiberler ile desteklenerek mekanik özelliklerinin geliştirilmesi, gerçekleştirilen tez çalışmasının ana hedefini oluşturmaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde; PLA-PEG [poli(laktat)-poli(etilen glikol)] blok kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Blok kopolimerler; katalizör olarak kalay oktoat kullanılarak, daha önce grubumuzun çalışmalarında belirlenen koşullarda sentezlenmiştir. Kopolimerlerin karakterizasyonu GPC, FTIR, NMR, DSC gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kopolimerizasyon konfirme edilmiştir.

İkinci bölüm; fiberlerin hazırlanması ve üretilmesi aşamasından oluşmuştur. Üç tür hazır sentetik fiber kullanılmıştır. Bu fiberlerden birincisi “vikril” ya da “polyglactin 910” ticari isimleri ile satılan, ameliyat ipliği olarak kullanılan polilaktat/glikolat çok flamanlı ipliklerdir. Satın alınma yolu ile temin edilmiştir. Vikril; deneysel çalışmalarda PLA-PEG blok kopolimerine ilave edilmek üzere; 3 farklı çapta, üç farklı boyda ve üç farklı matriks/fiber oranı’nda hazırlanmıştır. İkinci fiber türü, “katgut” ticari adı ile satılan doğal kolojen esaslı fiberlerden oluşan yine ameliyat ipliği olarak kullanılan fiberlerdir. Satın alınma yolu ile temin edilmiştir. Katgut; jelatin esaslı doku iskelesi yapısına ilave edilmek üzere yine 3 farklı boyda, üç farklı çapta ve üç farklı matriks/fiber oranında hazırlanmıştır. Üçüncü fiber türü ise kitosandır. Kitosan, amin grupları nedeniyle

pozitif yük taşıyan kitin türevi bir biyosentetik polisakkarittir. Kitosan fiberleri ıslak eğirme yöntemi ile üretilmiştir. PLA-PEG blok kopolimerinin yapısına ilave edilmek üzere, 3 farklı çapta ve 3 farklı matriks/fiber oranında hazırlanmıştır.

Çalışmanın üçüncü bölümünde, kriyojel hazırlama tekniği ile doku iskeleleri hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında; 2 farklı yapıda polimere 3 farklı fiber ilavesi ile 3 farklı türde doku iskelesi hazırlanmıştır: Jelatin/katgut, PLA-PEG/vikril ve PLA-PEG/kitosan. Doku iskelelerinin gözenek yapıları (boyut, şekil, birbirleri ile bağlantılı olma gibi), bozunma davranışları, şişme dereceleri ve mekanik özellikleri incelenmiş ve bu özellikleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Fiber katkılı PLLA-PEG ve jelatin esaslı doku iskelelerinin SEM görüntülerinden; fiber çapı, boyu ve ağırlıkça matriks/fiber oranına bağlı olarak değişen, çok çeşitli gözenek yapılarına sahip kriyojeller elde edildiği görülmüştür. Jelatin esaslı kriyojelin, PLLA-PEG esaslı kriyojele göre çok daha büyük gözeneklere sahip olduğu görülmüştür. Fiber katkısız PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin, fiber katkılı olanlara göre şişme değerleri daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, fiber katkısız kriyojellerin mekanik özelliklerinin daha zayıf olduğu görülmüştür. Bozunma davranışları; fiber katkısının doku iskelelerinin bozunma hızını yavaşlattığını göstermiştir. Ve son olarak sitotoksitesite testleri gerçekleştirilerek tez tamamlanmıştır. Testler, kriyojellerin hücre canlılığı açısından verimli olduklarını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, biyobozunur kompozit doku iskeleleri, biyobozunur polimerler, PLLA, PEG, jelatin, katgut, vikril, kitosan, ıslak eğirme, kriyojel, mekanik dayanım.

Danışman: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Ortak Danışman: Prof. Dr. Tülin Kutsal, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

BIODEGRADABLE COMPOSITES AS BONE TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS: CRYOGELS REINFORCED WITH POLYMERIC FIBERS/MATERIALS

Lütfiye Tutkun

ABSTRACT

The goal of the thesis is to prepare composite polymeric tissue engineering scaffolds reinforced with biodegradable fibers based on cryogellation method. The success of scaffolds used for tissue engineering is determined by the material properties of the scaffold. These include optimized mechanical, chemical and geometrical properties of the scaffold for effective functioning. The scaffold must be able to provide mechanical stability to the tissue as it forms. The most important disadvantage of the scaffold prepared by the cryogellation technique which provides almost ideal pore structure is to yield mechanically weak structures as a consequence of the resulting small amount of polymer supporting to the whole structure. Improvement of the mechanical properties of scaffolds by reinforced with several biodegradable fibers is the main object of this thesis.

The thesis consists of three main studies. PLLA-PEG [poly(lactat)-poli(ethylene glycole)] block copolymers were synthesized and characterized in the initial part of studies. Block copolymers were synthesized in the presence of stannous octoate as a catalyst under the conditions which were determined in our group studies in the past. The characterization of the copolymers was conducted by using GPC, FTIR, NMR, DSC and copolymerization was confirmed.

Fibers were prepared and produced in the second part of the study. Three types of commercially available synthetic fibers were used. First one is a polylactate/glycolate multifilament surgical suture material marketed under the trade names "Vicryl" and "Polyglactin 910". Vicryl was obtained from the trade company. In order to reinforce PLLA-PEG copolymers, vicryl fibers were prepared in three different length, diameter and matrix/fiber ratio in terms of weight. Second fiber type is composed of natural collagen based fibers which is used as a surgical suture material and marketed under the trade name "catgut". Catgut was obtained from the trade company too. In order to be added into gelatin based scaffolds, catgut fibers were also prepared in three different length, diameter and matrix/fiber ratio in terms of weight. The third and the

last fiber type is chitosan. Chitosan is a biosynthetic polysaccharide that is the derivative of chitin and carries a positive charge from amine groups. Chitosan fibers were produced by wet spinning method. These fibers were prepared in three different diameters and matrix/fiber ratio in terms of weight so as to add PLLA-PEG based scaffolds.

Scaffolds were prepared by the cryogelation technique (or gelation at subzero temperatures) and characterized in the third part of the study. Within the context of the thesis, 3 different types of fibers were used to reinforce two different types of polymer-based scaffolds: Gelatin/catgut, PLLA-PEG/vicryl and PLLA-PEG/chitosan. Scaffolds are characterized in terms of their structure, pore morphology (size, shape, interconnected etc.), degradation kinetics as well as their swelling kinetics and mechanical properties. Characterization studies were aimed at making a comparison between scaffolds. Various pore morphologies were obtained depending on the fiber diameter, length and matrix/fiber ratio in terms of weight from the SEM images of fiber-added PLLA-PEG and gelatin-based scaffolds. In comparison, gelatin-based cryogel has much more large pores than PLLA-PEG cryogel. The non-fiber-added PLLA-PEG and gelatin-based cryogels had a higher swelling rate as compared to fiber-added ones. As a consequence, non-fiber-added cryogels had weak mechanical properties. Degradation kinetics revealed that fiber addition to the scaffolds slows down their degradation rate. In vitro cytotoxicity tests were performed as the last part of the thesis. All scaffolds had minimal cytotoxicity and demonstrated a good efficiency in cell viability.

Keywords: Bone tissue engineering, biodegradable composite scaffolds, biodegradable polymers, PLLA, PEG, gelatin, catgut, vicryl, chitosan, wet spinning, cryogel, mechanical properties.

Advisor: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimi'm boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve her konuda desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Erhan Pişkin'e;

Bilimsel birikimlerini bizlerle paylaşan ve her zaman yakınlıklarını hissettiğim çok değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin Kutsal, Doç. Dr. İbrahim Vargel, Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Prof. Dr. Adil Denizli, Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş, Prof. Dr. Ayşe Kevser Özden Pişkin, Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel, Yrd. Doç. Dr. Kadriye Tuzlakoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Sevil Dinçer'e;

Yüksek Lisans Eğitimi'me başlamama vesile olan arkadaşım Dr. Halil Murat Aydın'a;

Deneyisel çalışmalarımda hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve bilgi birikimlerini benimle sonuna kadar paylaşan değerli arkadaşlarım Dr. Sinan Eğri ve İlyas İnci'ye, Asya Özkızıllık, Sedat Odabaş ve Zeynep Atik'e;

Arkadaşlıkları ile yanımda olan Biyomühendislik'teki tüm arkadaşlarıma;

Hayatımdaki yeri doldurulamaz Gazi Amca'ya;

Yaşama zevkime aracı olan çok sevgili aileme;

Hayatıma mutluluk ve anlam katan, herşeyim, çok sevgili eşim Engin'e teşekkür ederim.

Lütfiye Tutkun

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ

ABSTRACT	İİİ
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	Vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	İx
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	Xİİ
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	Xİİİ
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doku Mühendisliği.....	3
2.2. Doku Mühendisliği'nde Hücre Kavramı	5
2.3. Kemik Dokusu	6
2.3.1. Kemiğin yapısı ve hücre bileşenleri	6
2.3.2. Kemiğin yenilenmesi	8
2.3.3. Kemik doku mühendisliği	8
2.3.4. Kemik doku mühendisliğinde doku iskelesi uygulamaları	9
2.4. Doku İskeleleri.....	10
2.4.1. Doku iskelesi hazırlama teknikleri.....	12
2.5. Kriyojeller.....	14
2.5.1. Kriyojel uygulamaları	16
2.5.1.1. Biyoayırmada kriyojeller	16
2.5.1.2. Biyopolimerlerin immobilizasyonu için kriyojel matrisler	16
2.5.1.3. Hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kriyojeller	17
2.5.2. Kriyojel hazırlanması	17
2.6. Biyomalzemeler.....	18
2.6.1. Biyomalzeme çeşitleri	20
2.6.1.1. Metaller	20
2.6.1.2. Seramikler	21
2.6.1.3. Kompozitler	22
2.6.1.4. Biyobozunur polimerler.....	23
2.7. Biyomalzeme Olarak Kolojen, Jelatin ve Katgut.....	38
2.7.1. Kolojen.....	38
2.7.2. Jelatin	39
2.7.3. Doku iskelesi olarak jelatin ve kolojenin karşılaştırılması.....	40

2.7.4. Katgut	40
2.8. Biyomalzeme Olarak Kitosan	41
2.9. Polimerik Fiberler	43
2.9.1. Polimerik fiber üretim teknikleri	44
2.9.1.1. Eriterek eğirme	44
2.9.1.2. Kuru eğirme.....	44
2.9.1.3. Islak eğirme	44
2.9.2. Fiberle güçlendirilmiş kompozitler.....	45
2.9.2.1. Güçlendirme malzemeleri.....	45
2.10. Sitotoksosite	46
2.10.1. MTT testi.....	47
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	48
3.1. Polilaktat-PEG Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	48
3.1.1. PLLA-PEG blok kopolimerinin sentezi	48
3.1.2. PLLA-PEG Blok kopolimerinin karakterizasyonu	49
3.2. Fiberlerin Hazırlanması ve Üretilmesi.....	50
3.2.1. Katgut fiberlerinin hazırlanması	50
3.2.2. Vikril fiberlerinin hazırlanması	50
3.2.3. Kitosan fiberlerinin ıslak eğirme yöntemi ile üretilmesi.....	51
3.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	52
3.3.1. Jelatin esaslı doku iskelelerinin hazırlanması	53
3.3.1.1. Dekstran oksidasyonu	53
3.3.1.2. Hidroksiapatit yüklü jelatin kriyojellerin hazırlanması	54
3.3.2. PLLA-PEG doku iskelelerinin hazırlanması	55
3.3.3. Doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	56
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	60
4.1. PLLA-PEG Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	62
4.2. Fiberlerin Hazırlanması/Üretilmesi	65
4.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	71
4.3.1. Doku iskelelerinin gözenek yapıları	71
4.3.2. Doku iskelelerinin şişme davranışları.....	77
4.3.3. Doku iskelelerinin mekanik özellikleri.....	84
4.3.4. Doku iskelelerinin bozunurlukları	94
4.3.5. Doku iskelelerinin sitotoksisiteleri	99

5. SONUÇLAR.....	102
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Cao ve arkadaşlarının uygulaması olan bir doku mühendisliği örneği	4
Şekil 2.2.	Poli(L-laktik asit)'in yapısı	26
Şekil 2.3.	Polietilen glikol'in yapısı.....	33
Şekil 2.4.	Kolojenin yapısı	38
Şekil 2.5.	Jelatinin yapısı.....	39
Şekil 2.6.	Kitin ve kitosanın yapısı	41
Şekil 2.7.	Vikril ve kitosanın oluşturduğu doku reaksiyonunun mikroskopik görünümü	42
Şekil 3.1.	Isı ve katalizör varlığında PLLA-PEG kopolimerizasyonu.....	49
Şekil 3.2.	“Islak eğirme” yöntemi ile kitosan fiber üretimi.....	52
Şekil 3.3.	Doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan soğutma (kriyostat) sistemi..	53
Şekil 3.4.	Dekstranın sodyum periodat ile oksidasyonunun şematik görünümü	54
Şekil 3.5.	Jelatinin oksidekstran ile çapraz bağlanması.....	55
Şekil 3.6.	Sıkıştırma testlerinde kullanılan mekanik test cihazı (Llyod Instruments LK-5K, İngiltere).....	58
Şekil 3.7.	Biyobozunma test sistemi	58
Şekil 4.1.	PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir FTIR spektrumu	63
Şekil 4.2.	PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir ¹ H-NMR spektrumu.....	64
Şekil 4.3.	PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir DSC termogramı	64

Şekil 4.4.	Kriyojellerin güçlendirilmesinde kullanılan fiberlerin SEM fotoğraflarına örnekler: (A) vikril esaslı (çapları sırası ile 2/0, 3/0, 4/0); (B) kitosan esaslı (şırınga iğnesi çapları sırası ile 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm); ve (C) katgut esaslı (çapları sırası ile 2/0, 4/0, 6/0).....	70
Şekil 4.5.	PLLA-PEG esaslı kriyojellerin örnek kesit SEM fotoğrafları: (A) fiber katkısız; (B) vikril katkılı ve (C) kitosan katkılı	72
Şekil 4.6.	Fiber yüklemelerin homojen dağılımı bozduğu yapılara birer örnek	74
Şekil 4.7.	Jelatin esaslı kriyojellerin örnek kesit SEM fotoğrafları: (A) fiber katkısız; (B) katgut katkılı.....	76
Şekil 4.8.	Kriyojellerin sulu ortamda şişme hızlarını gösteren grafikler: (A) PLLA-PEG esaslı ve fiber katkılı PLLA-PEG kriyojel ve (B) jelatin esaslı ve fiber katkılı jelatin kriyojel.....	79
Şekil 4.9.	Kriyojellerin suyu alınmış ve suda yeniden şişmiş hallerini gösterir optik fotoğraf örnekleri: (A) PLLA-PEG esaslı ve (B) jelatin esaslı	80
Şekil 4.10.	Kriyojeller için tipik bir sıkıştırma grafiği	85
Şekil 4.11.	PLLA-PEG kriyojeller için örnek sıkıştırma grafikleri: (A) katkısız; (B) farklı uzunluklarda vikril katkılı; (C) farklı yükleme oranlarında vikril katkılı; (D) farklı çapta kitosan katkılı; (E) farklı yükleme oranlarında kitosan katkılı.	87
Şekil 4.12.	Jelatin esaslı kriyojeller için örnek sıkıştırma grafikleri: (A) katkısız; (B) farklı çaplarda katgut katkılı; (C) farklı uzunluklarda katgut katkılı; ve (D) farklı yükleme oranlarında katgut katkılı	89
Şekil 4.13.	Vikril katkısız ve vikril katkılı PLLA-PEG kriyojellerinin sıkıştırma grafikleri	92
Şekil 4.14.	Kitosan fiber katkısız ve kitosan fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellerinin sıkıştırma grafikleri.....	93
Şekil 4.15.	Katgut katkısız ve katgut katkılı jelatin kriyojellerin çap, boy ve yükleme miktarına göre karşılaştırmalarını gösteren sıkıştırma grafikleri	94

Şekil 4.16. Fiber katkısız ve fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellerin 8 hafta sonundaki yüzde ağırlık kaybı'nın şematik görünümü.....	99
Şekil 4.17. Fiber katkısız ve fiber katkılı jelatin kriyojellerin 8 hafta sonundaki yüzde ağırlık kaybı'nın şematik görünümü	99
Şekil 4.18. PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin sitotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan MTT testi sonucu	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	PLLA-PEG blok kopolimerinin sentez koşulları	62
Çizelge 4.2.	Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin “denge yüzde şişme değerleri”	81
Çizelge 4.3.	Fiber katkısız ve katkılı Jelatin esaslı kriyojellerin “denge yüzde şişme değerleri”	82
Çizelge 4.4.	Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin son yüzde uzama ve sıkıştırma gerilim değerleri	90
Çizelge 4.5.	Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin son yüzde uzama ve sıkıştırma gerilim değerleri	91
Çizelge 4.6.	Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin 8 hafta yüzde ağırlık kayıpları.....	95
Çizelge 4.7.	Fiber katkısız ve katkılı jelatin kriyojellerin 8 hafta yüzde ağırlık kayıpları.....	96
Çizelge 4.8.	Kriyojellerin sitotoksisiteleri	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FTIR	: Fourier Transform Enfraruj Spektroskopisi
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HA	: Hidroksiapatit
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
Ox-Dex	: Oksidekstran
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	: Polikaprolakton
PDS	: Polidioksanon
PEG	: Poli(etilen glikol)
PGA	: Poliglikolid
PHB	: Poli(3-hidroksibütirat)
PLA	: Poli(laktat)
PLGA	: poli(laktik-ko-glikolid)
PLLA	: Poli(L-laktat)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik Analiz

1. GİRİŞ

Yumuşak ve sert doku onarımında uygulanan en önemli yaklaşımlardan biri de “Doku Mühendisliği” dir. Doku mühendisliği; günümüzde, kemik hasarlarının giderilmesinde kullanılması önerilen en önemli yaklaşımlardan birisidir (Drosse et al., 2008; Bran et al., 2008). Başlıca iki yaklaşım uygulanır. Birinci yaklaşımda; primer kemik hücreleri (genellikle osteoblastlar) veya kök hücreler (genellikle mezenkimal) doku iskelelerine eklenir (“seed” edilir), daha sonra doğrudan hasarlı bölgeye yerleştirilir ve burada (in vivo olarak) bir yandan biyobozunur polimer bozunarak yok olurken, doku iyileşmesi-yeni doku oluşumu sağlanır. İkinci yaklaşımda hücre kültür ortamlarında (statik koşullarda veya biyoreaktörlerde) doku iskeleleri içinde (gözeneklerinde) hücrelerin üç boyutlu büyümesi ve doku benzeri yapılar oluşturması sağlanır ve bu hibrid yapılar hasarlı kemik dokusuna yerleştirilir ve iyileşme beklenir. Her iki yaklaşımda da, doku iskelesinin doku iyileşme hızına benzer bir hızda bozunarak yok olması beklenir. Tabi ki; hem polimerik doku iskelesinin, hem de parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, daha genel bir ifadeyle biyoyumlu olması gerekir. Doku iskeleleri üç boyutlu hücre büyümesine olanak verecek şekilde birbirine bağlı (“interconnected”), geniş gözenekli ve yüksek gözeneklilikte olacak şekilde üretilmelidir. Burada seçilecek üretim tekniği son derece önemlidir (Hutmacher et al., 2008; Murphy et al., 2007). Doku iskelesinin gözenek yapısı, aynı zamanda biyobozunma hızını çok önemli ölçüde etkilemektedir. Yalnızca gözenek yapısı değil, şüphesiz kullanılan polimerin türü de biyobozunma hızını etkiler. Yük altında kalmayan kemik dokusu onarımında, kullanılacak malzemenin mekanik dayanıklılığı birincil öneme sahip bir parametre değildir. Ancak, pratik uygulamada fiziksel dayanıklılıkta olması beklenir.

Sunulan çalışmada; grubumuzun önceki çalışmalarında elde edilen bulgular ışığında kemik dokusu iyileşmesinde kullanılmak üzere yeni doku iskelerinin üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada sentetik biyobozunur polimerlerin kullanılması öngörülmektedir. Uygulanan en başarılı tekniklerden birisi de kriyojelasyondur (Bolgen et al., 2007). Özellikle ideale yakın gözenek yapısı oluşturan kriyojelasyonda elde edilen doku iskelelerinin en önemli dezavantajı, mekanik olarak zayıf olmalarıdır. Doku mühendisliğinde kullanılması planlanan biyobozunur kompozitler, *in vivo* olarak hücre bağlanmasını ve çoğalmasını destekleyecek şekilde mekanik güçlülük ve elastikiyet sergilemelidirler. İlk kez bu çalışmada, kriyojellerin yine polimerik

biyobozunur fiberler ile güçlendirilerek, mekanik güçlerinin de artırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında; PLLA-PEG blok kopolimerleri, jelatin ve üç farklı sentetik fiber kullanılmıştır. İlk bölümde PLLA-PEG blok kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İkinci bölüm fiberlerin hazırlanması ve üretimi aşamasından oluşmuştur. “Vikril” ve “katgut” ticari isimleri ile piyasada mevcut olan fiberler satın alınma yolu ile temin edilmiştir. Kitosan fiberleri ise ıslak eğirme yöntemi ile üretilmiştir. Fiberler; boy, çap ve ağırlıkça matris/fiber oranları değiştirilerek üç farklı oranda hazırlanmışlardır. Çalışmanın üçüncü aşamasında ise; kriyojel hazırlama tekniği kullanılarak, fiber katkılı polimerik biyobozunur doku iskeleleri hazırlanmıştır. PLLA-PEG kopolimerlerine vikril ve kitosan fiberleri ilave edilerek, jelatin esaslı kriyojeler ise katgut ilave edilerek doku iskeleleri hazırlanmıştır. PLLA-PEG polimerlerine ilave edilen kitosan fiberleri ıslak eğirme yöntemi ile üretilmiştir (Tuzlakoglu et al., 2005). Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri, şişme dereceleri, gözenek yapıları, bozunma davranışları incelenerek karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış ve hazırlanan her bir doku iskelesi elde edilen veriler doğrultusunda birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Son olarak da sitotoksikite testleri ile kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanımlarında biyouyumlu olup olmadıkları belirlenerek tez tamamlanmıştır.

Çalışmanın sonunda; kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere, polimerik fiber katkısı ile mekanik özellikleri geliştirilmiş, biyobozunur kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği

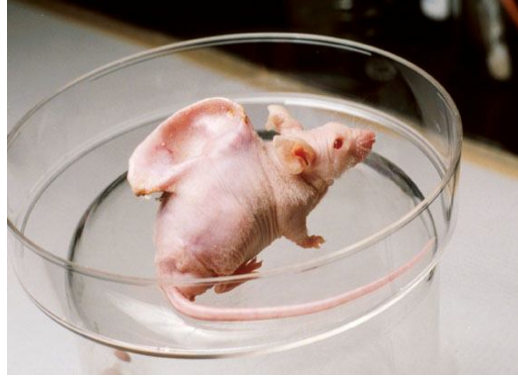
Doku mühendisliği; işlevsel hücreleri ve biyomühendislik ürünü olan biyobozunur hücre iskelelerini kullanarak, hastalanmış ya da hasarlanmış dokunun işlevini tamir etmek üzerine odaklanmıştır (Hench et al., 2002). Bu kavram içerisinde; hücreler, hücreler arası etkileşimler ve iletişim, büyüme faktörleri, doku yapısı, farklı doku tipleri, doku iskeleleri, biyomalzemeler gibi birçok kavram yer almaktadır.

Doku mühendisliğinin ana triadı; doku oluşumu için sinyal üretimi, bu sinyale yanıt veren kök hücre varlığı ve ekstraselüler matriks olarak doku iskelesinin tam olarak oluşturulmasıdır. Doku mühendisliğinde elde edilecek başarı, gelişimsel biyoloji ve morfogenezin temel prensiplerinin taklit derecesi ile paraleldir. Yapay doku da doğal dokular gibi birçok değişik hücresel element ve onların ilgili ekstraselüler matrikslerinden oluşur. Hücreler arası ağ bağlantıları ve sinyal molekülleri aracılığıyla herhangi bir hücre tipi, ekstraselüler matriksi ile kesintisiz olarak iletişim ve bağlantı halindedir. Canlı hücrenin ve onun oluşturduğu dokunun, dolayısıyla da yapay dokunun temel özelliği, uyarılara yanıt verebilmesi ve üreyebilmesidir.

Doku mühendisliğinin işlevsel hedefleri açısından bakıldığında 3 ana yaklaşımın söz konusu olduğu dikkat çeker: Hastalanmış ya da hasarlanmış dokuların tamiri ya da yenilenmesi amacıyla in vitro olarak insan dokularının tasarlanması ve geliştirilmesi; işlevsel insan dokularının yenilenmesine olanak verecek, hücre içeren ya da içermeyen cihazların geliştirilmesi; hastalanmış iç doku ya da organların işlevlerini yerine getirecek, insan dokusu içeren harici cihazların geliştirilmesi.

Doku mühendisliğinin klinik uygulamalardaki en iyi bilinen örneği “insan kulaklı fare” örneğidir. Bu çalışmada, sığırın eklem kıkırdagından elde edilen kondrositlerin polimere (poliglikolik asit-polilaktik asit) ekimi, sonrasında da bunun bir fareye implantasyonu gerçekleştirilmiştir. Doku iskelesi insan kulağı şeklinde olmakla birlikte insana ait hiçbir doku kullanılmamıştır. Bu çalışma, plastik ya da rekonstrüktif cerrahide kullanılmak üzere yeni bir kıkırdak oluşturulmasını hedeflemiştir ve yeni kıkırdak implantasyondan 12 hafta sonra oluşmuştur (Cao et

al.,1997). Şekil 2.1’de Cao ve arkadaşlarının uygulaması olan bir doku mühendisliği örneği görülmektedir.



Şekil 2.1. Cao ve arkadaşlarının uygulaması olan bir doku mühendisliği örneği

Literatürde doku mühendisliğinin başarılı klinik uygulamaları konusunda pek çok makale bulunmaktadır. Bunlardan biri; Matsumura ve arkadaşlarının, ağır kalp hastalığı olan bebeklerde, kalp-damar cerrahi teknikleri ile doku mühendisliği ürünü otografları uygulamasıdır (Matsumura et al., 2003). Doku mühendisliği teknikleri ile, hastanın kendine ait hücreler ayrıştırılmış, kültürle çoğaltılmış ve poliglikolik asit ve polilaktik asit- ϵ -kaprolakton’dan oluşan biyobozunur polimer bir doku iskelesine ekimi yapılmıştır. İlk cerrahi girişim 1999 yılında gerçekleştirilmiş ve 40’ın üzerinde hastada 10 yıl süren gözlemler sonucunda doku mühendisliği otograflarıyla ilişkili herhangi bir sorun saptanmamıştır. Diğer bir örnek, doku mühendisliği ürünü solunum yolunun tasarım ve implantasyonudur. Bu çalışmada araştırmacılar, otojenik hücreleri matriks içerisinde kültüre ettikten sonra, bu doku iskelesini hastanın ana bronşuna implante etmişlerdir. Bir doku mühendisliği ürünü olan bu trakeanın hemen işlevsel hale geldiği ve iyi mekanik özellikler sergilediği gözlenmiştir (Macchiarini et al., 2008).

Buna benzer birçok biyomühendislik uygulamasının halen klinik çalışmaları devam etmektedir. Bu yönden bakıldığında doku mühendisliği uygulamaları, organ ya da doku hasar ve kayıplarının hastalandırıcı etkisinin ortadan kaldırılmasında tek umut ışığı olarak karşımızda durmaktadır.

2.2. Doku Mühendisliği'nde Hücre Kavramı

Bütün hücrelerin kökenini oluşturan, farklılaşma basamaklarından geçtikten sonra vücuttaki tüm hücre çeşitlerini oluşturma potansiyeli taşıyan ana hücreye “kök hücre” adı verilir. Kök hücreler uygun koşullar sağlandığında da birçok farklı hücre tipine dönüşebilirler. Yaklaşık 400 döngü boyunca çoğalabilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneklerinin olduğu da gösterilmiştir.

Bu hücrelerden “totipotent” olanlar sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip olup; embriyo, embriyo sonrası tüm organ ve dokular ile embriyo dışı membranların kökenini oluşturan hücreler olarak bilinmektedirler ve erken embriyonik dönemdeki döllenmiş yumurta hücreleridir. “Pluripotent hücreler” ise, embriyonik dönemde üç germ tabakasından köken alan ve yaklaşık 200 farklı hücre tipine dönüşme gücüne sahip olan hücrelerdir. “Multipotent kök hücreler” ise, pluripotent kök hücrelerinin dönüşümü ile oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir ve genelde sistemlere ait hücreleri oluştururlar.

Kök hücreler 2 çeşit bölünme davranışı sergileyebilirler. Bunlardan birincisi “asimetrik” bölünme olup, bir kök hücrenin kök hücre + progenitör hücreye bölünmesi şeklinde gerçekleşir. Progenitör hücreler de ileride bölünerek farklılaşmış hücrelere dönüşebilirler. Simetrik bölünmede ise kök hücre ya kök hücre + kök hücre ya da progenitör hücre + progenitör hücreye bölünür. Dokularda genellikle popülasyon asimetrisi gerçekleşir ve progenitör hücrelerin daha fazla olduğu gözlenir. Memelilerde kendini yenileyebilen hücre ve organlarda ikinci tip bölünmenin daha ön planda olduğu görülür.

Kullanım alanları açısından bakıldığında yenilenmeleri mümkün olmayan beyin, karaciğer, kalp gibi organların fonksiyon bozukluğu ya da yokluğunda umut veren tedavi yöntemlerine olanak sağlamaları ve kalp kasının yenilenmesi, Parkinson ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda işlevi bozuk bölümün dokusunun yenilenmesi, karaciğer yetmezliği ve hasarları, sinir sistemi ve omurilik yaralanmaları gibi patolojik durumlarda kullanılmaları, çok sevindirici gelişmeler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Doku mühendisliğinde anahtar noktalar; morfojenik sinyal üretimi, buna yanıt veren kök hücre varlığı ve ekstraselüler matriks doku iskelesidir. Ana hedefin *in*

vitro olarak dokuyu üretip, implante edildikten sonra *in vivo* olarak tamir, yenilenme ve işlev görme olduğu düşünüldüğünde, kök hücre kavramının doku mühendisliğinde ne kadar önemli olduğu bir kez daha anlaşılmaktadır. Vücut dokularına bakıldığında kemik dokusunun kendini yenileme yetisinden yola çıkılarak, bu dokunun doku mühendisliği uygulamalarında prototip olmasına şaşkırmamak gerekir. Kemik morfojenik proteinlerinin ürettiği sinyaller doğrultusunda demineralize kemik matriksinde kondrogenez ve osteogenezin gerçekleşmesi, doku mühendisliğinin çıkış noktasını oluşturan fizyolojik modeldir.

2.3. Kemik Dokusu

Kemik doku mühendisliğini anlayabilmek için öncelikle bu dokuların değişik hiyerarşik düzeylerde yapı ve işlevlerini anlamak gereklidir. İskelet sistemi, üstün özelliklere sahip bir bağ dokusudur. Kıkırdak ve kemikten oluşmuş bu bağ dokusu, vücudun mekanik dayanıklılığını ve korumasını sağlar. Bu iki yapı bağımsız birimler olmakla birlikte, kemik oluşumunun bir çeşidi olan endokondral kemikleşme ile kıkırdak doku kemik dokuya dönüşebilmektedir. Intramembranöz kemikleşme ile de yassı kemikler oluşmaktadır.

2.3.1. Kemiğin yapısı ve hücre bileşenleri

Kemik, birçok hücre tipi ve çoğunluğunu kalsiyum minerallerinin oluşturduğu bir matriks (hidroksiapatit kristalleri halinde kalsiyum ve fosfat)'ten oluşmaktadır. Organik matriksin çoğunluğunu kolojen (%95), geri kalanını ise proteoglikanlar ve sayısız kolojen olmayan proteinler oluşturmaktadır. Morfolojik olarak, farklı yapısal ve işlevsel özellikler sergileyen 2 tür kemik bulunmaktadır: Kortikal ve kanselöz kemik. Kortikal kemik daha sert ve sıkı bir yapı sergilerken, kanselöz kemik daha gözenekli ve gevşek bir yapı sergiler. Kortikal ve kanselöz kemik yapı arasındaki farklılıklar sadece yapısal değildir. Histolojik ve yapısal görünümleri arasındaki farklılıklar esas olarak işlevlerindeki farklılıklara bağlıdır: Kortikal kemik daha çok mekanik ve koruyucu işlevler sergilerken, kanselöz kemikte metabolik işlevler (kalsiyum dengesi gibi) daha ön plandadır. Kemik benzeri bir dokuyu tamamen doğal yapısına uygun bir şekilde, doku mühendisliği uygulamaları çerçevesinde *in vitro* olarak üretebilmek için her şeyden önce kemikteki sert doku oluşum ve mineralizasyon aşamalarını eksiksiz anlayabilmek çok önemlidir. Kemik tamiri ve

yeniden oluşumu sürecinde en hassas aşama dokunun mineralizasyonudur ve bu mineralizasyon doğrudan kemik ve kıkırdığın ekstraselüler matriks özelliklerine bağlıdır. Kolojenler, ekstraselüler matriks ağının ana bileşenleri olup, mineralize, dolayısıyla mekanik olarak dayanıklı matriksin oluşumunda çok büyük öneme sahiptirler. Tip I kolojen kemiğin ana matriks proteini olmakla birlikte, kemik ya da kalsifiye kıkırdak gibi farklı tip dokularda farklı tip kolojenler bulunabilmektedir. Kolojenler dışında kemiğin kolojen olmayan matriks proteinleri (glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi) de söz konusudur ve bunlar da kemiğin yapısal özelliklerinin sağlanmasında ve devamlılığında önemlidirler.

Osteoblast kemik dokusu oluşumunda önemli bir hücre tipidir. Erişkin osteoblastı, daha sonra mineralize olacak olan kemik matriksinin sentezlenmesi ile görevlidir. Osteoblastlar, alkalin fosfataz gibi fenotipik belirteçlere sahiptir. Bunun yanı sıra, kolojenöz ve osteokalsin gibi kolojen olmayan proteinlerin sentezini gerçekleştirirler. Osteoblast farklılaşmasında paratiroid hormon, 1,25-dihidroksikolekalsiferol, östrojen ve glikokortikoidler gibi hormonların yanı sıra bölgesel faktörler de etkili olabilmektedirler.

Osteositler kemik dokusunda en fazla bulunan hücrelerdir. Erişkin kemiğinde osteoblastların yaklaşık 10 katı osteosit bulunmaktadır. Osteoblastlardan olgun osteositlere dönüşüm sırasında hücreler osteoblastik özelliklerini kaybederler. Osteositler birbirleriyle ve osteoblastlarla ara bağlantılar aracılığıyla doğrudan hücresel temas içerisinde dirler. Kan kalsiyum dengesinin sağlanmasında ve kemiğin işlevsel adaptasyonunda çok önemli role sahiptirler.

Osteoblastların tersine osteoklastlar, hematopoetik sistem kök hücrelerinden köken alan çok çekirdekli hücrelerdir (Suda et al., 1992). Osteoklastı oluşturan promiyeloid öncül hücre, makrofaj ya da dendritik hücreye de farklılaşabilir. Osteoklastlar minerali çözme ve organik kemik matriksi biyobozunuma uğratma yeteneğine sahiptirler. Aynı zamanda yabancı maddelerin de yıkılım süreçlerinde yer alırlar (Vaananen et al., 2000).

2.3.2. Kemiğin yenilenmesi

Kemik dokusu, ilk gelişimsel süreçlerini yeniden oluşturabilme yeteneği olan ve bu nedenle herhangi bir evrede yenilenme ve tamire gidebilen bir dokudur. Kemik defektlerinin tamiri böyle bir süreçtir. Yeni kemik doku oluşumunda 3 ana faktör önemlidir: Kemik oluşturunca öncül hücreler, kemik oluşumunu artırıcı büyüme faktörleri ve iletken matriksler (Orban et al., 2002). Kemik tamiri ve yenilenmesi ile başlayan süreçteki yapıcı etkileşimler; yeni oluşan kemik, defekt bölgesini çevreleyen yumuşak doku, komşu kortikal kemik ve kemik iliği arasındadır. Bu tamir bölgesinde topluca yer alan periostal hücre, kortikal hücre, çevre yumuşak dokulardan kaynaklanan hücreler ve kemik iliği hücreleri gibi hücreler ve bölgeden kalkan sinyaller tamir dokusunun ana yapıları ve süreçlerinden sorumludurlar. Tamir dokusunun ilk hücre kaynağının periost olduğuna inanılmaktadır. Periosta yakın hücreler, morfojen adı verilen sinyal molekülleri üretirler, ki bu moleküller çoğalarak ve farklılaşarak yeni kemik oluşumunu sağlarlar. Kemik dokusunun tamir sürecini başlatan sinyaller, kemiğin en dış tabakası olan periosttan ve hasarlanan kemik matriksinden kaynaklanmakta olup, bu sinyallerin birçoğunun inflamatuvar süreçteki sinyallerle aynı olduğu dikkati çekmektedir.

2.3.3. Kemik doku mühendisliği

Kemik doku mühendisliği; dejeneratif, cerrahi ya da travmatik süreçlere bağlı olarak oluşan kemik doku kaybında dokunun yenilenmesini hedefleyen bir bilim dalıdır. Aynı zamanda kemik kırıklarında iyileşmesinin hızlandırılması da ilgi alanı içerisinde. Doku iskelesi bazlı doku mühendisliği uygulamalarında, esas amaç oluşturulan doku iskelesinin, hücre etkileşimleri için gerekli koşulları sağlaması ve yeni oluşan dokunun ekstraselüler matriks oluşumuna destek sağlamasıdır. Ekstraselüler matriksin fizyolojik işlevlerini taklit eden 3 boyutlu bir doku iskelesinin, hücrelerin doğal yapılarına kavuşmaları sürecindeki dönüşümde destekleyici ve koruyucu olması ve doku lezyonunu kapatıcı özelliklere sahip olması gereklidir. Doku iskelesi bağışıklık sistemini tetiklememeli, toksik olmamalı, biyouyumlu ve biyobozunur olmalı ve kolayca üretilebilmelidir (Karageorgiou et al., 2005). Doku iskelesi; birbirleriyle bağlantılı ve dokunun tümüne yayılan (genellikle %90'ı aşkın) iç gözenekliliğe ve yüksek gözenekli bir yüzeye sahip olmalıdır. Bu durum; hücre yapışmasına, büyümesine, yeniden düzenlenmesine,

dolayısıyla da *in vivo* yeni damar oluşumu için gerekli hacimsel boşluğun sağlanmasına zemin hazırlayacaktır. Gözeneklerin kendi içlerindeki bağlantıları; besleyici maddelerin ve gazların hücre içerisinde yayılmasında ve hücrelerden metabolik artıkların ya da yan ürünlerin uzaklaştırılmasında yararlıdır (Vacanti et al., 1998). Gözenek büyüklüğü, gerek doku iskelesinin sağlamlığı, gerekse işlevi açısından önem taşır. Her ne kadar gözenek büyüklüğü arttığında doku iskelesinin sağlamlığı azalsa da, gözenek büyüklüğü az olan doku iskelelerinde de tıkanma sonucu sıvı akışkanlığının durarak beslenme bozukluğu gibi sorunlara yol açması da istenmeyen bir durumdur (Rout et al., 1998). Doku iskelesinin morfoloji, hidrofiliklik, yüzey yükleri gibi özellikleri; *in vitro* hücre yapışması, hücre göçü, fenotip devamlılığı gibi özelliklerin belirleyicisidir.

2.3.4. Kemik doku mühendisliğinde doku iskelesi uygulamaları

Dinamik, çok başarılı bir damarlanmaya sahip, metabolik gereksinim durumunda mineral depolarını hızla harekete geçirme kapasitesine sahip bir doku olarak kemik dokusu benzersiz bir akıllı biyomalzemedir. Bu nedenlerle, *in vivo* ya da *in vitro* kemik dokusu sentezi her zaman ilgi odağı olmakla birlikte ve her ne kadar biyomalzeme teknolojisi inanılmaz bir ilerleme göstermiş olsa da, şu ana kadar bu özelliklerin tamamını karşılayabilecek bir yapay doku henüz sentezlenememiştir.

Kemik doku tamirinde kullanılacak bir doku iskelesinin taşınması gereken özellikler bulunmaktadır. İstenen gözenek büyüklüğü 200-900 μm 'dir (Schieker et al., 2006). Hem kimyasal, hem de topografik yüzey özelliklerinin, hücre yapışmasına ve göçüne uygun olması ve osteoblastların büyüyebileceği şekilde kemik iletkenliği özelliğine sahip olması zorunlu olan doku iskelesi, eğer, fibrin matriks tutabilecek nitelikte pürüzlü bir yüzeye sahip olursa, kemik oluşturucu hücrelerin biyomalzemeye göçü hızlanacak ve kolaylaşacaktır. *In vitro* olarak doku iskelesi yeterli mekanik güçlülüğe sahip olmalıdır. *In vivo* olarak kullanılacak bir doku iskelesinin ise yerine konduğu orijinal dokunun özelliklerine çok yakın özelliklere sahip olması koşulu vardır.

Bu özellikleri taşıyabilecek ve bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek, metalden seramiğe ve yumuşak, biyobozunur doku iskelelerine kadar birçok biyomalzeme bulunmaktadır. Seramiklerde,

hidroksiapatit ya da β -trikalsiyum fosfattan oluşan doku iskeleleri araştırılmıştır. Hidroksiapatit ve β -trikalsiyum fosfat; tek başlarına iletken olmama, yavaş biyobozunuma uğrama, sert olmalarına rağmen düşük mekanik dayanıklılığa sahip olma gibi özellikleri, büyük defektlerin tamiri noktasında istenmeyen özellikleridir (Salgado et al., 2004). Ekstraselüler matriksin bir bileşkesi olan kolojen, kemik doku iskeleleri üretiminde bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Katı sıvı faz ayrımı yöntemiyle elde edilmiş olan kolojen/hidroksiapatit kompozit doku iskelesinin, *in vitro* olarak, kemik doku oluşumunda potansiyel bir malzeme olduğu gösterilmiştir (Liu et al., 2003). Kitosan fiberleriyle güçlendirilmiş kolojen bazlı gözenekli doku iskelelerinin, daha yüksek mekanik dayanıklılık sergilediği ve daha hızlı osteoblast gelişimini sağladığı gösterilmiştir (Li et al., 2005). Yeni yapılan bir çalışmada kolojen matrikste, mezenşimal kök hücreleri ve endotelial progenitör hücrelerin birlikte kültürünün *in vivo* olarak kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Usami et al., 2008). Kitosanın katyonik yapısı nedeniyle kompozit bileşiminde kullanılması, kemik iyileşmesinde birçok büyüme faktörünün de taşınmasını olanaklı kılmıştır (Park et al., 2000). İmidazol eklenmiş (modified) kitosan yüzeylerinin; kemiğin mineralizasyonunu, yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı ve mevcut kemik defektinin trabeküler kemikle doldurulup tamirini sağladığı saptanmıştır (Muzarelli et al., 1994).

2.4. Doku İskeleleri

Bir doku iskelesi; hücrelerin üç boyutlu yapısının ve işlevlerinin devamlılığını sağlamalı ve iletişim ve transporta olanak sağlayacak altyapıda olmalıdır. Doku iskelesi bazlı doku mühendisliği kavramı; canlı hücreleri, biyomolekülleri ve dokunun tamir ya da yenilenmesini sağlayacak uygun bir üç boyutlu yapı, yani doku iskelesi bileşenlerini içerir. Doku iskelesi; hücrenin göçüne, büyümesine ve farklılaşmasına altyapı sağlamasının yanı sıra, oluşturulacak dokunun olgunlaşması ve sağlıklı kalması gerekliliklerini de karşılamalıdır. Tüm bu kavramlar çok zor ve karmaşıktır; çünkü mekanik özellikler, yüzey özellikleri, biyobozunum ürünleri ve tüm bunların zamana bağlı *in vitro* ve *in vivo* farklılıkları gibi faktörleri de göz önünde bulundurma zorunluluğu vardır (Hollister et al., 2005; Woodfield et al., 2004). Doku iskeleleri; sadece biyokimyasal değil, aynı zamanda belli kimyasal ve fiziksel gereklilikleri de karşılamalıdır. Herhangi bir doku iskelesi;

hasarlanan dokunun, birebir özelliklerine sahip olamasa da, mekanik fonksiyonlarını yerine getirecek sağlamlık ve sertliğe sahip olmalıdır. Örneğin, deriye yönelik hasarda kullanılacak bir doku iskelesi, yara kontraksiyon kuvvetleri karşısında sağlam kalabilmelidir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak bir fiksasyon sistemine ait bir doku iskelesinin, asıl doku olgunlaşana kadar oluşacak yük bindirici kuvvetlere dayanma zorunluluğu bulunmaktadır (Hutmacher et al., 2000).

Üç boyutlu doku iskelesi; *in vitro* ya da *in vivo* hücre büyümesi sürecinde, biyomekanik yapısını devam ettirebilmeli ve implantasyon bölgesinde yeniden damarlanmaya zemin hazırlamalıdır. Hücre yapışması, hücre göçü ve tüm dokunun gelişim ve yapılanmasını karşılayabilecek altyapıya sahip olmalıdır. Bu nedenle, doku iskelesinin hangi doku için kullanılması planlanıyorsa o dokuya ait mekanik ve fizikokimyasal özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekir. Kişiye özel planlanan doku iskelelerinde tüm bu özelliklerin yanı sıra boyut ve şekil ön plana çıkabilir (Hutmacher et al., 2000). Klinik uygulama ve ticarileşme noktasında; yeniden üretilebilirlik, yüksek kalite, üretim maliyeti ve hızı gibi bileşenler de işin içine girmektedirler. Belli bir dokuyu hedeflese bile, ideal bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikleri tam olarak tanımlamak çok güçtür. Bu çerçeveden bakıldığında da doku mühendisliğindeki doku iskelesi uygulamalarının henüz emekleme aşamasında olduğunu söylemek ve üzerinde daha birçok çalışma yapılması gerekliliğini vurgulamak çok yanlış olmaz.

Doku iskelesinde dikkat edilmesi gereken ilk kavram gözeneklilik yapısıdır. Gözenek boyutu ve gözeneklilik derecesi önemli doku iskelesi parametreleridir. Makrogözenekler (örneğin 50 μm üzerindeki), doku işlevlerinin geliştirilmesi için planlanan doku iskelelerinde tercih edilirler. Örneğin boyut olarak 300 μm üzerindeki gözeneklilik, dokunun damarlanması ile ilişkili olarak daha çok kemik doku mühendisliğinde istenen bir durumdur. Mikrogözenekler (50 μm ve altındakiler) ise; memeli hücrelerinin 10-20 μm olduğu düşünülürse, hücre işlevlerinin iyileştirilmesini hedefleyen doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilirler. Gözeneklilik ve doku iskelesinin mekanik özellikleri arasında yakın bir ilişki söz konusudur. Yüksek miktardaki gözeneklilik (örneğin %90'nın üzerinde), hücre infiltrasyonu ve ekstraselüler matriks oluşumunu destekleyecek biçimde

daha fazla toplam gözenek hacmi sunarken, mekanik dayanıklılıkta azalma gibi bir sorun ortaya çıkarabilir. Gözenekler arası bağlantı çok önemli bir faktördür ve doku iskelesinin tasarımında mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Bir doku iskelesinin geçirgenliği, bağlantılı gözenekler arasından geçen sıvının, sıvının yoğunluğu da dikkate alınarak, akım hızının saptanması ile belirlenebilir. Ancak çok büyük gözenekli ve %100 bağlantılı doku iskelelerinde, sıvı hiçbir zaman akım direnci ile karşılaşmayacağından bu kural geçerli değildir. Bu noktada alternatif yaklaşım, mikro bilgisayarlı tomografi (μ -CT) aracılığıyla görüntü analizidir ve gözeneklilik oranı, gözenek boyut dağılımı ve doku iskelesi yüzey-hacim oranı saptanmasıdır. Üç boyutlu mikro-CT uygulaması ile 6- 1500 μ m boyutundaki gözenekleri incelemek olasıdır (Miot et al., 2005).

2.4.1. Doku iskelesi hazırlama teknikleri

Doku iskelesi hazırlamada kullanılan birçok teknik uygulama mevcuttur. Tüm bu tekniklerin kendilerine özel avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Çözücü uzaklaştırma/parçacık özütleme yöntemi, sıklıkla kullanılan ve birçok bilimsel araştırmada denenmiş bir tekniktir. Özellikle kemik ve kırıldak doku mühendisliği uygulamalarında iyi sonuçlar elde edilen bir tekniktir. Bu metod ilk kez Mikos ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır ve bir polimer çözeltisi içerisinde mineraller (sodyum klorid, sodyum tartarat ve sodyum sitrat gibi) ya da organik (sakkaroz gibi) parçacıklarının dağılması prensibine dayanmaktadır (Mikos et al., 1994). Bu yöntem özellikle, poli (L-laktik asit)(PLLA) ya da poli (laktit-koglikolid)(PLGA) doku iskelelerinde kullanılmaktadır (Gomez et al., 2002a). Bu yöntemin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Toksik çözücülerin kullanılması, sadece ince doku iskelelerinin oluşturulabilmesi ve mekanik özelliklerinin kontrolsüzce bozulabilmesi bu yöntemin dezavantajları arasında sayılabilir (Yang et al., 2001; Gomez et al., 2002b).

Faz ayırma, çözücü uzaklaştırma tekniğine yakın bir yöntemdir. Bu yöntemde; çözücünün uzaklaştırılması yerine, çözücü film suya konur ve bir sonraki faz inversiyonu aşaması polimerin çökmesine neden olur. Çözücü uzaklaştırmanın kullanıldığı ana metodla karşılaştırıldığında, kristal depolanmasının önlendiği ve bu nedenle daha kalın doku iskelelerinin üretiminin olanaklı hale geldiği dikkat çeker. Teknik açıdan bakıldığında, faz inversiyonu kullanıldığında, trabeküler kemiğe çok

benzeyen yapıda ve gözenekler arası bağlantıların çok güçlü olduğu bir doku iskelesi üretiminin olanaklı hale geldiği gözlenmektedir (Holy et al., 2000). Deneysel biyolojik çalışmalar temel alındığında, bu teknikle üretilen doku iskelelerinin, osteoblast benzeri hücrelerin büyümesini desteklediği, dolayısıyla kemik matriks oluşumunu hızlandırdığı görülmektedir (Karp et al., 2003).

Fiber örme/bağlama tekniği, fiber benzeri polimerik yapıların varlığında uygulanabilirler. Bu işlemde farklı fiberler, üç boyutlu doku iskelesinin içerisine, farklı boyutta gözenekler oluşturacak şekilde yerleştirilirler. Değişik boyutlarda fiberler kullanarak ve değişik şekillerde birleştirerek, doku iskelesi yapısında önemli değişiklikler oluşturmak mümkün hale gelmektedir. Gözenek büyüklüğünün çok fazla olması sonucunda besleyici maddelerin kaybının yanısıra, istenen oranda gözeneklilik ve gözenek boyutunun elde edilmesindeki teknik engeller, bu yöntemin dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır (Mikos et al., 1993; Kim et al., 1998). Ayrıca doku iskelesi gözenekleri içerisinde çözücü kalıntılarının kalabilmesi ve bu kalıntıların hücrelere zarar verebilme olasılığı da istenmeyen bir başka özellik olarak karşımıza çıkabilmektedir (Leong et al., 2003).

Erime bazlı teknolojiler, sıklıkla gözenekli doku iskelelerine gereksinim duyulduğunda tercih edilirler. Eriyik kalıplama/parçacık özütleme, bu teknikler içerisinde en çok kullanılanıdır. Bu teknikle bir polimer, gözenek oluşturucu bir madde ile karıştırılıp uygun bir kalıp içerisine konur (Thomson et al., 1995). Daha sonra bu kalıp belli bir dereceye kadar ısıtılır; oluşan kompozit malzeme, içerisindeki gözenek oluşturucu maddenin çözünmesi amacıyla, seçici bir çözücü içerisine konur. Bu teknik, yüksek gözenekliliğe sahip ve istenen şekilde doku iskelesi oluşturulmasına olanak sağladığı için oldukça ilgi çekmektedir. Bu teknikle, gözenek büyüklüğü ve miktarını da ayarlamak mümkün olmaktadır (Lu et al., 1996).

Gaz ile köpürtme yöntemi, yüksek basınçlı CO₂ uygulamasını takiben, polimer disklerinde CO₂ çökmesi prensibine dayanmaktadır (Mooney et al., 1996). Bu yöntemin avantajı, yüksek gözeneklilik derecesine ve aynı zamanda boyutu 100 µm'ye ulaşabilen gözeneklere sahip doku iskeleleri üretebilmektir. Ancak mekanik dayanıklılığın düşük olması ve gözeneklerin yapısal özelliklerinin kontrol

edilememesi bu tekniğin dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır (Shea et al., 2000).

Isıyla faz ayrımının sağlandığı diğer bir metod, dondurarak kurutma olup, daha önceden kalıba konmuş homojen polimer çözeltisinin ısısının düşürülmesi yoluyla gerçekleştirilir. Faz ayrıştırıcı sistem dengelendikten sonra, çözücünden zengin faz uzaklaştırılır ve geriye polimerik köpük kalır. Bu teknikle doğal ve sentetik polimerler içeren doku iskeleleri sentezlemek mümkün olmaktadır (Mao et al., 2003). Elde edilen doku iskelelerinin zayıf mekanik özelliklere sahip olmaları nedeniyle çok tercih edilen bir yöntem değildir.

Üretim tekniklerinin ilerlemesiyle birlikte, son yıllarda daha ileri yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Hızlı prototipleme, bunlar arasında en yaygın kullanım alanına sahip olmaktadır. Hızlı prototipleme, bilgisayara dayalı bir tasarım ve üretim tekniği olup, iç ve dış doku iskelesi yapılarının hızlı üretimine olanak sağlar. Bu yöntemin konvansiyonel tekniklere göre avantajları; tanımlanan ve gereksinim duyulan iç ve dış doku iskelesi mimari yapısının tam olarak elde edilmesi, bilgisayar kontrollü bir üretim süreci olması, hızlı üretim sağlaması, hücrelerin doku iskelesiyle daha uyumlu birleşmesi şeklinde sıralabilir (Leong et al., 2003). Bu yöntem, işlemin bütün evrelerinin otomasyon ve standardizasyonunu da olanaklı kılar (Hutmacher et al., 2001).

2.5. Kriyojeller

Doku Mühendisliği'nde; üç boyutlu hücre büyümesi ve dolayısı ile matris içerisinde yeni dokunun oluşumuna olanak sağlaması için, doku iskelelerinin yüksek gözeneklilikte ve kabul edilebilir boyutlarda birbirleri ile bağlantılı gözenek yapısına sahip olması beklenir. Kriyojelleşme (ya da eksi derecelerde jelleşme) teknolojisi; herhangi bir jel oluşturucu sistemden, değişik büyüklükte gözenekli yapıya sahip makrogözenekli jeller üretmeyi olası kılar. Kriyojelasyon esnasında çözücülerin çoğu eksi derecelerde donarlar ve donmuş çözücünün kristalleri porojen gibi davranır. Çözülmemiş maddeler (monomerler ve başlatıcılar), polimerizasyon/çapraz bağlanma reaksiyonlarının devam ettiği donmamış küçük bölgelerde yoğunlaşırken; reaktif içermeyen çözücü kristalleri donma esnasında büyür, birbirleri ile bağlantılı donmuş ağ sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşirler.

Polimerizasyon/ apraz bağlanma reaksiyonları tamamlandıktan sonra; sistem oda sıcaklığına alınır ve birbirleri ile bağlantılı, içi sıvı haldeki çözücü ile dolu büyük gözenekli kanallardan olu mu  matris elde edilir. Polimerin cinsi ve özellikleri (molekül ağırlığı, hidrofilik olup olmadığı vb.), çözücünün özellikleri ve kriyojelasyon koşulları (sıcaklık, soğutma hızı vb.); gözenek boyutu ve dağılımı, toplam gözeneklilik, gözenek duvarlarının yapısı gibi kriyojel özelliklerini önemli derecede etkiler.

Kriyojellerin en çekici özelliklerinden biri olan makrog zeneklilik; virüs, hücre çökeltisi, kirli su ve benzeri parçacık içeren sıvıların incelenmesini mümkün kılmaktadır (Deraz et al., 2007; Noir et al., 2007). Makrog zenekli kriyojellerin büyük bir kısmı, vinil ve divinil monomerlerinin, akışkan çözeltelerde serbest radikal aracılı ko-polimerle meleri yoluyla üretilir. Monomerler tipik olarak; akrilamid, dimetilakrilamid, N-izopropilakrilamid gibi akrilik asit türevleri ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) gibi metakrilik asit t revleridirler (Ivanov et al., 2007; Perez et al., 2008; Chen et al., 2008). Polimerle ebilen  ift bağ içeren polimerik jel öncüllerinin (makromerler) yanı sıra, özellikle doku mühendisliğinde yararlanılacak olan makrogözenekli kriyojel sistemlerinin hazırlanmasında, dekstran metakrilat ve HEMA-L-laktit- dekstran makromerleri kullanılabilir (Petrov et al., 2006). Serbest radikal aracılı, çapraz bağlı polimerleşme ile hazırlanan makrogözenekli kriyojellerin temel özelliklerinin; hem reaksiyon karışımlarının yapısı, hem de kriyojelle me koşulları gibi parametrelere bağlı  ekillendikleri gösterilmiştir. Makrog zenekli kriyojel hazırlanmasının 2 yolu bulunmaktadır: Birincisi hali hazırda bulunan kriyojelin modifikasyonu ile kriyojele işlevsel gruplar eklenebilir ( rneėin polimerleşme sonrasında modifikasyon) ya da kriyojelin sentezi sırasında, beklenen işlevi gerçekleştirebilecek uygun monomerlerin diğer monomerlerle ko-polimerle mesi sağlanabilir.

1940'lı yıllara uzanan çalışmalara rağmen, biyomühendislik alanındaki kullanımı çok eskilere dayanmamaktadır. Kriyojeller tipik olarak, daha büyük moleküllü katı parçacıkların kısmi geçişinin yanı sıra nano düzeydeki parçacıkların da tamamının geçişine izin veren, birbirleri ile bağlantılı makrog zeneklere sahiptirler. Benzersiz yapıları ve ozmotik, kimyasal ve mekanik özellikleri, kriyojelleri; kromatografik malzeme olarak, moleküllerin ve hücrelerin taşınmasında kullanılan taşıyıcılar

olarak, elektroforez ve immünodiffüzyon tekniklerinde matriks olarak, katı kültür vasatlarında jel altyapısı olarak, biyomühendislik ve biyoteknoloji alanında benzersiz biyomalzemeler haline getirmiştir. Biyolojik nanoparçacıkların (plazmidler, virüsler, hücre organelleri gibi) kromatografisinde de matriks olarak kullanımları söz konusudur.

2.5.1. Kriyojel uygulamaları

Kriyojellerin uygulama alanlarına bakıldığında; küçük parçacık içeren sıvıların kromatografilerinde (akrilamid ve dimetil akrilamid), hücrenin ve enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonunda (polivinilalkol), hücre kültürü için taşıyıcı kalıp oluşturulmasında (hidroksietilmetakrilat, dekstran metakrilat, LL-asetat-Dekstran, Dekstran agaroz, polietilenglikol, N-izopropil akrilamid) (Plieva et al., 2007), medikal amaçlı matriks olarak (kolojen), kemik doku implantlarında taşıyıcı polimerik matriks olarak (kitosan ve â-trikalsiyum fosfat), hayvan hücrelerinin kültürü için jel matriks olarak (oligoetilen glikol monometakrilat ve dimetakrilat) ve kontrollü ilaç salımında (PVA) kullanıldıkları göze çarpmaktadır (Lozinsky et al., 2002).

2.5.1.1. Biyoayırmada kriyojeller

Modern biyoteknolojinin en önemli işlevlerinden biri; hedef ürünün, bir fermentasyon ürününden ya da hücre süpernatantından ayrıştırılması ve saflaştırılmasıdır. Kromatografi, bu akım ayrıştırma teknolojisinde önde gelen ve en çok kullanılan cihazdır. Hassaslığı ve yüksek ayrıştırma gücüne rağmen klasik kromatografiler uygulamada parçacık içeren sıvıların analizinde kısıtlı yeterliliğe sahiptirler. Bu parçacıklar, kromatografik taşıyıcıyı olumsuz etkileyerek kolondaki akımın ya azalmasına ya da tamamen durmasına neden olurlar. Bu nedenle, hücrenin kolayca taşınabileceği gözeneklilikte bir kromatografik taşıyıcı büyük avantaj sağlamaktadır. Kriyojellerin gözenekliliği ise bu noktada, süpermakro gözenekli kromatografik malzemelerin tasarımında ön plana çıkmaktadır.

2.5.1.2. Biyopolimerlerin immobilizasyonu için kriyojel matriksler

Geleneksel jel taşıyıcılarından daha iyi sonuçlar verdiği için bazı biyopolimerlerin (enzimler, polisakkaridler, nükleik asitler gibi) matriksi olarak kriyojellerin kullanımı

tercih edilmektedir. Biyoparçacıkların ayrıştırılması için tasarlanan kriyojel kromatografik kolonlarının, devamlılık sergileyen süpermakro gözenekli yatakların varlığı nedeniyle, biyoreaktör yapımı için çok uygun oldukları saptanmıştır. Kuvvetli su tutucu yeteneği olan PVA kriyojellerin, akışkan olmayan vasatta biyokatalizörlerin taşınmasında son derece etkili olduğu belirlenmiştir. Kriyojel matriks, organik vasatta enzimin reaksiyonu katalizlemesi için gerekli olan suyu sağlamaktadır (Filippova et al., 2001).

2.5.1.3. Hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kriyojeller

Değişik kriyojellerin uygun fizikokimyasal özellikleri ve özel gözeneklilikleri, onların hücre taşıyıcısı olarak kullanmalarına olanak sağlamıştır. Örneğin, E.coli hücrelerinin kriyo-PAAG'nin aldehit türevleri ile taşınmasında süpermakrogözenekli matriksler kullanılmıştır (Lusta et al., 1988). PVA kriyojelleriyle hücre tutulması, çok etkili bir hücre taşıma sistemidir; çünkü hücre, substrat ve metabolitlerin difüzyonu açısından hiçbir engeli olmayan bir mikroçevre içerisinde bulunmaktadır (Gordon et al., 1999). PVA'nın biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan ve düşük maliyetli yapısı da diğer olumlu yanlarıdır.

2.5.2. Kriyojel hazırlanması

Kriyojellerin hazırlanmasında kontrol edilebilme zorunluluğu olan parametreler, çözücünün kristal oluşturabilme hızı ve oluşan kimyasal reaksiyon sonucu ortaya çıkan kriyojelleşme hızıdır. Kriyojelasyon, temelinde bir polimerizasyon reaksiyonudur ve donma sıcaklığının altında büyüyen buz kristallerinin birbirine bağlı gözenekler oluşturacak şekilde erimesi prensibine dayanır. Oluşumu için gerekli ana koşullar; -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklık ve sulu ortamın varlığıdır. Kriyojelleşme sırasında birinci önemli aşama, kriyojel öncüllerinin, kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği donmamış sıvı faz içerisinde yoğunlaşmasıdır. Bu durum polimer zincirlerinin, gözenekler içerisinde gözenek duvarlarına taşınarak kriyojel oluşmasını sağlarken; reaktif içermeyen çözücünün kristallerinin donma sırasında büyümesi ve diğer kristallerle birleşerek gözenek çerçevesini oluşturması da mikroyapının oluşmasında önemli bir faktördür. Kriyojeldeki gözeneklerin duvarlarında mevcut olan polimer konsantrasyonunun yüksek olması, kriyojeli diğer jellerden ayıran bir özellik olup, aynı zamanda mekanik

sertliğinin ve dayanıklılığının yeterli olmasını sağlayan bir unsurdur (Arvidsson et al., 2003).

Kriyojeller eksi derecelerde çözücünün çoğunlukla donduğu bir jelleşme aşaması ile üretilirler. Bu esnada çözünen maddeler (monomerler ya da makromerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcı sistem) donmamış bölgelerde yer alırlarken, bir yandan da kimyasal reaksiyon ve jel oluşumu yürür. Çözücü kristallerinin erimesinden sonra, birleşik gözenekli büyük bir sürekli sistem oluşmuş olur. İşlem sırasında oluşturulan kristallerin şekli ve boyutu, örnek çözündükten sonra oluşacak olan gözeneklerin şeklinin ve boyutunun belirleyicisidir. Gözenek büyüklüğü; donma hızı, donma ısısı, solüsyondaki monomer/makromerlerin başlangıç konsantrasyonu, çapraz bağlayıcının içeriği, reaksiyon sıvısının ön ısısı, örnek boyutları gibi faktörlere bağlıdır (Plieva et al., 2005). Yeniden üretilebilirlik ve ticarileşme noktasında bütün bu faktörlerin standardize edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır.

Donma hızı, kriyojellerin hazırlanması sırasında belirleyici bir parametredir. Donma hızının yavaş ya da donma ısısının yüksek olması, oluşan buz kristallerinin daha büyük olması ile sonuçlanır ki, sonuçta daha büyük gözenekli kriyojeller ortaya çıkar (Plieva et al., 2006) .

Başlangıç ko-monomer konsantrasyonundaki artış (diğer koşullar sabitken); hem gözenek duvarlarındaki polimer konsantrasyonunun artışına, hem de gözenek boyutlarında ve makrogözeneklerdeki ara bağlantılarda azalmaya neden olur. Kriyojellerdeki gözenek duvarlarının kalınlığı ve gözenek boyutları, kullanılan çapraz bağlayıcıdaki monomer/makromer konsantrasyonunun değiştirilmesiyle kolayca değişir (Andac et al., 2008; Perez et al., 2008).

2.6. Biyomalzemeler

Bir biyomalzeme; herhangi bir biyolojik sisteme yerleştirilerek, mevcut işlev bozukluğunu düzeltmeyi hedefleyen, inert malzeme olarak tanımlanabilir (Williams, 1999). Bir biyomalzemeyi, diğer malzemelerden ayıran en önemli özellik, vücuda yerleştirildiğinde ve dokularla temasa geçtiğinde hasar oluşturucu etkisinin olmamasıdır. Son 30 yılda, tıp ve ilişkili uygulamalarda biyolojik olarak bozunmayan malzemelerden, biyobozunur malzemelere geçişteki hızlı ivmenin

karmaşası yaşanmaktadır. Bu eğilimin giderek artması, önümüzdeki yıllarda, birçok kalıcı protez malzemesinin, yerini, doku tamiri ve yenilenmesinde daha etkin olan biyobozunur malzemelere bırakacağını göstergesidir.

Bir biyomalzemede mutlaka bulunması gereken özellikler şunlardır: Malzeme, vücuda implante edildiğinde inflamatuvar ya da toksik yanıt oluşturmamalıdır; kabul edilebilir bir raf ömrü olmalıdır; biyobozunur bir malzeme ise, bozunma süresi, dokunun iyileşme ya da yeniden oluşma sürecinden daha kısa olmamalıdır; planlanan uygulamaya uygun mekanik özelliklere sahip olmalı ve bozunma ile oluşan mekanik özellik değişiklikleri iyileşme ya da yeniden oluşma süreciyle uyumlu olmalıdır; biyobozunur bir malzeme ise, bozunma ürünlerinin toksik olmaması ve vücuttan kolayca uzaklaştırılabilir olması gereklidir; malzemenin istenen uygulama için uygun geçirgenliğe sahip olması gereklidir; normal doku ve organlarınkine yakın mekanik özelliklere sahip olmalıdır; dokunun yeniden oluşumunu ya da iyileşmesini hızlandıracak bir biyoaktif yüzeye sahip olmalıdır.

Biyomalzeme kavramı içerisinde üzerinde durulması gereken önemli bir nokta da, kompozit malzeme kavramıdır. Bir kompozit materyal; birbirinden arayüzle ayrılan, kimyasal olarak farklı (metalik, seramik ya da polimerik) iki ya da daha fazla faz içermektedir (Matthews, F.L., 1994). Doku mühendisliğinde kullanılması planlanan biyobozunur kompozitler, in vivo olarak hücre bağlanmasını ve çoğalmasını destekleyecek şekilde mekanik güçlülük ve elastikiyet sergilemelidirler. Polimerler, genelde esnek ve daha yumuşak bir yapı sergilerlerken, seramik ve cam gibi inorganik materyaller daha sert ve dayanıklıdır. Polimerler genel olarak esnek olmaları ve mekanik güçlerinin az olması nedeniyle fizyolojik koşullarda daha az dayanıklılık sergilerler. Doku mühendisliğinde, kompozit geliştirilmesinde biyobozunur polimerlerle biyoaktif seramik ve camların uygun kombinasyonu her zaman üzerinde tartışılan bir konu olmuştur. Bu tartışmaların temelinde, organik materyalin güçlülüğünü ve sertliğini kullanarak, geliştirilecek materyalde daha dayanıklı mekanik özellikler elde etme olasılığı yatmaktadır.

2.6.1. Biyomalzeme çeşitleri

Biyomalzemeler genel olarak 4 ana sınıfa ayrılabilirler: metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler.

2.6.1.1. Metaller

Metaller, genelde implantlarda, tıbbi araç üretiminde ve ilişkili alanlarda kullanılmaktadırlar. Çok yüksek mekanik dayanıklılıkları nedeniyle, özellikle destek materyal olarak seramik ve polimerlerden çok daha üstündürler.

Kemik kırıklarında plaka ve vida olmak üzere ilk geliştirilen metal “Sherman Vanadyum çeliği” olup 1938 yılında üretilmiştir ve %0.7-1.4 krom ve %1.5-2.5 vanadyum içermektedir. Ancak 1960’lı yıllarda vücut içerisinde aşınmaya uğrayarak sağlık açısından sakıncalar oluşturduğunun saptanması üzerine kullanımı bırakılmıştır. Protez yapımında kullanılan demir, krom, kobalt, nikel, tantal, molibden, niyobyum ve tungsten gibi çok sayıda metal az miktarda kullanılmak koşuluyla insan vücuduna biyo-uyumluluk göstermektedir. Metal protezlerinin biyo-uyumluluğu aşınma ile doğrudan ilişkili bir olgudur.

Titanyum, 1930’lardan beri biyomalzeme olarak kullanılan bir metal olup, çok hafif olmasına rağmen çok az miktarda aşınmaya uğraması, yerleştirildiği biyolojik bölgede çok az aşınmaya yol açması (biyo-uyumluluğu artıran bir özelliktir) ve dayanıklılığı nedeniyle, özellikle ortopedik cerrahide tercih edilen bir metaldir (Chen et al., 2000; Breme et al., 1998). Hafif olması, kimyasallar ve asitlerden etkilenmemesi, dokuda alerjik reaksiyona neden olmaması, renk değiştirmemesi de diğer avantajlı özellikleridir. Paslanmaz çelik de biyomateryaller arasında yer alan bir biyomalzemedir. Oksidasyonu engelleyen ince bir oksid film tabaka oluşturması nedeniyle içeriğinde en az %12 krom bulundurma zorunluluğu vardır. Çok güçlü olması ve vücut sıvıları, enzimler ve pH değişikliklerine çok dayanıklı olması nedeniyle FDA tarafından onaylanmış bir biyomalzemedir. Altın, bakteriyel kolonizasyona yüksek dirençliliği nedeniyle tıpta kullanım alanı bulmuş bir metaldir. Altın alaşımları, saf altına göre daha iyi mekanik özelliklere sahiptir. Diş hekimliği alanında ve yüksek elektrik iletkenliği nedeniyle kalp pillerinde tercih edilmektedir. Platinyum; aşınmaya karşı dayanıklılığı, biyo-uyumlu olması ve stabil

elektiriksel özelliklere sahip olması nedeniyle tercih edilir. G m  , özellikle cerrahi implantlarda ve mesane kataterlerinde tercih edilir.

2.6.1.2. Seramikler

Seramikler, biyomateryal olarak tercih edilen maddelerden biridir. Seramik s zc  , Yunanca “keramikos” tan gelmekte olup yanmış madde anlamına gelir. Kemiklerde, eklemlerde ve dişlerde, yüksek biyo-uyumluluk özellikleri nedeniyle özellikle kaplama olarak tercih edilen biyomalzemelerdir. Sterilizasyonlarının kolay olması ve biyoinert olmaları da biyomalzeme olarak kullanımlarına avantaj katmaktadır.

Seramiklerin ana özellikleri; sertlikleri, b k lmezlikleri, elektrik ve ısı yalıtkanlı ı ve aşınmaya karşı dirençleridir. Kimyasal olarak inert olmaları, vücutta yabancı cisim reaksiyonu olu turmamalarını sağladığından avantaj sağlayan bir özelliktir.

Atomlar arasındaki ba ların farklılığı, bir maddenin özelliğini belirleyen bir faktördür; 3 çeşittir: metalik, iyonik ve kovalent. İkincil ba lar ise, van der Waals kuvvetleri ve hidrojen ba larıdır. Seramiklerdeki atomik bağlanma ise iyonik, kovalent ya da ikisinin karışımıdır. Seramikler, biyolojik aktiviteleri açısından “biyoaktif” ve “biyoinert” olmak üzere 2 sınıfa ayrılabilirler. Biyoaktif olanlar, doku ve implant arasında kimyasal ba  oluşumuna izin veren bir yapıya sahipken biyoinert olanlarda bu reaksiyon gözlenmez. Yapısal işlevlerine göre biyoseramikler; oksit seramikler, kalsiyum-fosfat seramikleri ve cam seramikleri olarak sınıflandırılabilirler.

Oksit seramikler; inert yapıda, oksijen iyonlarının oluşturduğu düzlemde metal iyonlarının dağılmasıyla oluşan polikristalin seramikler olup, alumina (Al_2O_3) ve zirkonya (ZrO_2) bu gruptandır. Yüksek yoğunluk ve sa lı a sahip alumina; aşınmaya karşı olan aşırı direnci, yüksek dayanıklılığı ve biyo-uyumluluğu nedeniyle özellikle ortopedik uygulamalarda tercih edilen bir biyomalzemedir. Zirkonya (ZrO_2), beyaz amorf bir toz olup zirkonyumun dioksitidir. Biyoinert özelliği nedeniyle vücutla etkileşime girmez. Düşük termal iletkenliği, aşınmaya karşı dirençliliği, yüksek biyo-uyumluluğu nedeniyle, özellikle protezlerde çok tercih edilir. B k lmeye karşı çok dirençli olması, *in vivo* olarak çok daha az bakteri

kolonizasyonuna yol açması ve çok düşük oranda inflamasyon oluşturmaması da tercih nedenleri arasındadır (Yıldırım et al., 2003; Rimondini et al., 2002).

Kalsiyum-fosfat seramikleri ise kalsiyum ve fosfat atomlarının çoklu oksitleri şeklinde olup; hidroksiapatit $[Ca_5(PO_4)_3OH]$, trikalsiyum fosfat $[Ca_3(PO_4)_2]$ ve oktakalsiyum fosfat $[Ca_8(PO_4)_6(OH)_2]$ bu grupta yer almaktadırlar. Hidroksiapatit, çok sert yapılı, seramik bazlı kalsiyum fosfattır. Hidroksiapatit seramik biyomalzemeler, kemiğe benzer şekilde gözenekli olarak da üretilibildiklerinden, doku mühendisliğinde doku iskelesi yapımında yaygın olarak tercih edilebilmektedirler. Sentetik hidroksiapatit $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, kemik ve diş kadar dayanıklılık sağlayan bir kimyasal yapıya sahiptir. Hidroksiapatit seramikler, vücuda yerleştirildiklerinde doku büyümesini ve kemik kaynaşmasını artıracak biyoaktifliğe sahiptirler. Kemik kırıklarının doldurulmasında sentetik gözenekli kalsiyum fosfat seramikler kullanılırken, diş implantlarında kaplama malzemesi olarak hidroksiapatit malzeme kullanılması dikkat çekicidir. Trikalsiyum fosfat seramikleri, gözenekli ve emilebilir malzemeler olup, çene gibi nispeten düşük dayanıklılık gerektiren uygulamalarda sert dokunun yerini alma işlevini yerine getirirler.

Cam ve cam-seramikler; lityum/aluminyum ya da magnezyum/aluminyum kristalleri içeren camlar olup, iskeletteki sert bağ dokusunun tamiri ve yenilenmesinde kullanılırlar. Emilebilen biyoaktif camlarda ise, silika gruplarının bazıları kalsiyum, fosfor ya da sodyum ile yer değiştirmişlerdir ve kemiğin yeniden üretilmesinde artan biçimde kullanılmaktadırlar.

2.6.1.3. Kompozitler

Kompozit, iki ya da daha fazla sayıda biyomalzemenin birleşmesi ile oluşan, yapıyı oluşturan bağımsız biyomalzemelerin orijinal özelliklerinden farklı özellik taşıyan çok fazlı bir malzemedir. Matriks olarak tanımlanan taşıyıcı bileşkeye, çeşitli güçlendirici malzemeler katılarak yüksek dayanıklılığa ve düşük elastik modüle sahip olmaları hedeflenir. Kullanılan matriks genelde polimerlerden, güçlendirici madde ise çoğunlukla cam, karbon ya da polimer lifler, bazen de toz seramiklerden oluşur.

Kompozitlerin yapısal içeriklerinde yapılan değişikliklerle aşınmaya direnç, kırılma direncinin azaltılması ve metal iyonlarının organizmaya yayılması önlenabilir ya da azaltılabilir. Bütün bu yapısal sağlımlıklarına rağmen hafif olmaları da önemli bir avantajdır.

2.6.1.4. Biyobozunur polimerler

2.6.1.4.1. Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, doku mühendisliğinde önemli yer tutmaktadırlar. Polimer kimyasının gelişmesiyle; biyobozunurluğun hızı ve mekanizması, hidrofiliklik ya da hidrofobiklik, şişme ve mekanik güçlülük gibi özelliklerde de değişiklikler yapılabilmektedir. Bu değişiklikler; polimer ana ya da yan grup kimyasal yapısının değiştirilmesi, polimer molekül ağırlığı ya da por büyüklüğü gibi özelliklerin farklılaştırılması ile gerçekleştirilebilir. Birçok doku mühendisliği uygulaması için, tek bir polimer yeterli fiziksel ya da biyolojik özelliği sunamayabilir. Bu nedenle; değişik kimyasal ve biyolojik özelliğe sahip çoklu monomerler sentezlenebilir ya da bir doku iskelesi yapımında birden çok monomerin karışımı ya da katkısı gerekebilir. Örneğin polietilen ve ultra yüksek molekül ağırlıklı polietilen, diz ve omuz eklemi protezlerinde kullanıldıklarında birbirlerinden çok farklı davranışlar sergileyebilirler. Ultra yüksek molekül ağırlıklı polietilen, polietilenle karşılaştırıldığında daha az iltihabi doku oluşumuna neden olmaktadır. Moleküler ağırlık artırılarak polimer zinciri daha uzun ve daha sert bir materyal haline getirilebilir. Kopolimerler ve polimer karışımları; hem biyomateryal yapımında, hem de doku iskelesi sentezinde sonsuz olasılık sunabilir.

2.6.1.4.1.1. Lineer alifatik poliestерler

Lineer alifatik poliestерler, hem tıp, hem de biyomühendislik alanında yaygın kullanım alanı bulan sentetik biyo-bozunur polimerlerdir (Dunn et al., 1995; Behravesh et al., 1999). Lineer alifatik poliestерler arasında poliglikolid (PGA), polilaktit (PLA), polikaprolakton (PCL), polihidroksibütirat ve bunların kopolimerleri (ör, polilaktit-co-glikolid) sayılabilir. Hem PGA, hem de PLA, tıpta sıkça kullanılan (ör, yara kapama) polimerlerdir (Tablo 1) (Sodian et al., 2000; Saxena et al., 1999; Oberpenning et al., 1999; Suggs et al., 1998; Bryant et al., 1999).

Hücre çoğalmasını arttırmaları ve değişik hücre ve doku tiplerine farklılaşabilmeleri özellikleri de tercih edilmelerini sağlamaktadır.

PGA ve PLA biyobozunum özelliklerine bakıldığında, ya pasif hidrolizle ya da daha farklı yıkılım mekanizmaları ile bozunduğu göze çarpar. Kütle halindeki bozunuma odaklandığımızda, kütle boyutu değişiklik sergilemezken polimer moleküler ağırlığında azalma olduğu göze çarpar. Kütle değişikliğinin olmaması, belli kütle şekillerini gerektiren doku mühendisliği uygulamaları için bir avantaj sağlamaktadır, ancak moleküler ağırlıktaki kayıp mekanik özelliklerde belirgin derecede azalmaya yol açmaktadır. Bu nedenle poliestерler ilk başta mekanik dayanıklılık sergilemekle birlikte, zaman geçtikçe dayanıklılık kaybedeceklerinden ortopedik uygulamalarda kullanıldıklarında olumsuzluklarla karşılaşılabilir (Muggli et al., 1999). Biyo-bozunurluk; su alımına, pH'ya, kristalleşme özelliğine, moleküler ağırlığa, ısıya maruziyete ve gözenekliliğe göre değişir. PLA ve PGA'nın yıkım ürünleri laktik asit ve glikolik asidir. Bu iki ürün çevre dokularda pH azalmasına neden olarak inflamasyona ve zayıf doku gelişimine yol açar.

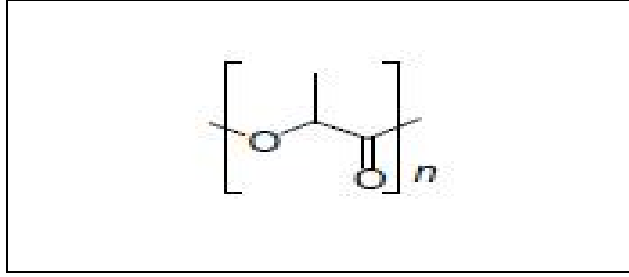
2.6.1.4.1.2. Poliglikolidler

Poliglikolid, biyotıp uygulamalarında ilk kullanılan biyobozunur polimerlerden biridir. Yüksek derecede kristallik sergileyen bir polimerdir (%45-55) ve bu yüzden organik çözücülerde çok düşük çözünürlük ve yüksek tensil modül sergiler. Camısı geçiş sıcaklığı 35-45 °C arasında değişir ve erime sıcaklığı da 200 °C'nin üzerindedir. Düşük çözünürlüğüne rağmen birçok doku mühendisliği uygulamasında yer almıştır (Gunatillake et al., 2006). Yüksek düzeyde fiber oluşturucu yeteneği nedeniyle, emilebilen suture yapımı açısından ilk olarak araştırılmıştır. 1969 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Yüksek kristalleşme yeteneğine bağlı olarak çok başarılı mekanik özelliklere sahiptir. Bu nedenle kemik fiksasyonunda da kullanılmaktadır. Vücutta glisine çevrilerek idrarla atılır ya da karbondioksit ya da suya çevrilerek sitrik asit döngüsüne katılır (Maurus et al., 2004). Bu nedenle, poliglikolidin dezavantajlarının üstesinden gelmek için glikolid birimleri içeren birçok kopolimer üzerine çalışılmaktadır.

2.6.1.4.1.3. Polilaktitler

Optik olarak aktif, D- ve L-laktit olmak üzere 2 şekli bulunmaktadır. Bu monomerlerin polimerleşmesi, yarı-kristalleşmiş polimer oluşumunu sağlamaktadır. Rasemik (D,L)-laktit ve mezolaktitin polimerleşmesi, amorf polimerlerin oluşması ile sonuçlanır. Poliglikolide benzer şekilde, poli(L-laktit)(PLLA) da yüksek kristalleşme özelliğine sahiptir (%37) ve kristalleşmenin derecesi moleküler ağırlığa ve polimerleşme işlemi sırasındaki parametrelere bağlıdır (Middleton et al., 2000). Camısı geçiş sıcaklığı 60-65 °C arasında değişir ve erime sıcaklığı da yaklaşık 175 °C'dir. Poli(L-laktit), poliglikolidle karşılaştırıldığında yavaş çözünen bir polimerdir ve yüksek tensil modülü (yaklaşık 4.8 Gpa) nedeniyle yük taşıyıcı uygulamalarda başarıyla uygulanan bir biyomalzemedir. Özellikle ortopedik uygulamalarda tercih edilir. Tendon ve bağların tamirinde de kullanılabilmektedir (Cooper et al., 2005). Poliglikolidden daha hidrofobik olması nedeniyle biyobozunurluğu daha yavaştır. Vücutta toplam erime süresi 2-5.6 yıl arasında değişebilmektedir (Bergsma et al., 1995). Biyobozunumun hızı, martiksin gözenekliliği kadar polimerlerin kristalleşme derecesine de bağlıdır. Polimerin 6 ay içerisinde gücünü kaybettiği bilinse de, çok uzun süreler kütlesinde belirgin bir değişiklik olmamaktadır. Bu nedenle, L-laktitin glikolidle ya da DL-laktitle birçok polimeri üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Poli(DL-laktit), L- ve D-laktit birimlerinin gelişigüzel dağılımına bağlı olarak oluşan amorf bir polimerdir ve 55-60 °C arasında bir camısı geçiş sıcaklığına sahiptir. Hidrolize olduğunda bu polimer 1-2 ay içerisinde gücünü, 12-16 ay içerisinde de kütlesini kaybeder. Güçsüz, dolayısıyla hızlı biyobozunuma sahip olan bir polimer olarak poli(L-laktit), ilaç taşıma sistemlerinde ve dokunun yeniden oluşumunu hedefleyen doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak tercih edilir (Maurus et al., 2004).

Vücutta normal bir metabolik yan ürün olarak önce laktik aside, sonrasında da su ve karbondioksit dönüştürülerek sitrik asit döngüsüne katılır. L-laktik asitin yapısı şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. Poli (L-laktik asit)'in yapısı

Biyomühendislikte PLA kullanımının avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Avantajları: Ekolojik olarak zararlı değildir. Mısır, buğday, pirinç gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen PLA; biyobozunur, geri dönüşümlü ve yapısal olarak sabittir. Üretimi sırasında karbon dioksit tüketilir. Bu sürdürülebilirliği ve ekolojiye dost özellikleri nedeniyle tercih edilen bir polimerdir (Dorgan et al., 2001). Biyotıp uygulamalarında, PLA'nın en dikkat çekici özelliği biyouyumluluğudur. Biyouyumlu bir malzeme, dokular üzerinde toksik ya da karsinojenik etki göstermemelidir. Aynı zamanda yıkılım ürünleri de doku iyileşmesini olumsuz etkilemez (Athanasίου et al., 1996). PLA; diğer polimerler olan poli(hidroksi alkanoatlar), poli(etilen glikol) ve poli(kaprolakton) ile karşılaştırıldığında daha iyi üretilebilirlik özelliklerine sahiptir. Birçok yöntemle kolayca üretilebilir. PLA üretimi sırasında, diğer petrol bazlı polimerlerle karşılaştırıldığında yaklaşık %25-55 düzeyinde az enerji harcanır. Gelecekte bu oranın %10 daha düşürüleceği tahmin edilmektedir. Maliyetler düşünüldüğünde bu oran çok önemli bir avantaj sağlamaktadır (Vink et al., 2003).

Dezavantajları: Düşük uzama kapasitesine sahip, kırılgan bir madde olması bir olumsuzluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden sağlamlık gerektiren doku mühendisliği uygulamalarında kullanılamamaktadır. Ana iskeletindeki ester gruplarının hidrolizi ile biyobozunuma uğrar ve biyobozunum hızı; kristallik derecesi, moleküler ağırlık, moleküler ağırlık dağılımı, morfoloji, suyun polimer içerisine yayılma hızı gibi etkenlere bağlıdır (Tokiwa et al., 2006). Biyobozunum hızı, biyomedikal uygulamalarda dikkate alınması gereken bir özelliktir. Bu noktada düşük biyobozunum hızı, biyotıp uygulamalarında, PLA'nın olumsuz bir özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında hidrofobik özellik çok ön plana çıkmaktadır (Dorgan et al., 2000). Reaktif yan zincirlerin yokluğu nedeniyle yüzey özelliklerinin geliştirilmesi zorunluluğu bazı uygulamalarda olumsuzluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.6.1.4.1.4. Polilaktit-ko-glikolid

Üzerinde araştırma yapılmış diğer ko-poliesterlerle karşılaştırıldığında, poli(laktit-ko-glikolid) polimerleri üzerine çok fazla yoğunlaştığı göze çarpmaktadır. Ko-polimerleşmede hem L-, hem de D- laktitler kullanılmışlardır. Oluşumlarına bakıldığında %50-75'in amorf polimerler olduğu görülmektedir (Gunatillake et al, 2006). Miller ve arkadaşları, 50/50 poli(laktit-ko-glikolid)'in çok hızlı hidroliz olması nedeniyle hidrolitik biyobozunumunun son derece hızlı olduğunu göstermişlerdir (Miller et al., 1977). Ara ko-polimerlerin, homopolimerlerle karşılaştırıldığında daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. 50/50 poli(DL-laktit-ko-glikolid)'in yaklaşık 1-2 ay içerisinde biyobozunuma uğrarken, 75/25'in 4-5 ay, 85/15'in 5-6 ay içerisinde biyobozunuma uğraması buna bir örnektir (Middleton et al., 1998). Poli(laktit-ko-glikolid)'lerin değişik oranlardaki ürünleri ticari olarak geliştirilmiş ve biyotıp uygulamalarında denenmişlerdir. %90 glikolik asit (GA) ve %10 L-laktik asid (LA) içeren bir ko-polimer olan Vicryl® de çok filamanlı bir suture malzemesi olarak ticari kullanıma sunulmuştur. Panacryl® de ticari olarak geliştirilmiş ve biyobozunumun yavaşlatılması için LA/GA oranları değiştirilmiş bir ko-polimerdir. Tek filamanlı sutureların geliştirilmesi amacıyla birçok ko-polimer sentezlenmiştir. Bunlar arasında poli(glikolid-ko-trimetilen karbonat) ve poli(glikolid-ko-kaprolakton) sayılabilir. PLGA'nın diğer bir uygulaması da doku birleştirici meş, suture güçlendirici, deri tamir malzemesi ve duramater yaması şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Doku mühendisliği uygulaması sonucu elde edilmiş olan deri grefti Dermagraft® da Vicryl Mesh'lerinin doku iskelesi olarak kullanıldığı bir teknikte üretilmiştir. PLGA'nın ester bağlarının hidrolizi aracılığıyla yığın erozyonu ile yıkıldığı ve biyobozunmanın; LA/GA oranı, molekül ağırlığı ve matriksin şekli ve yapısı gibi birçok parametreye bağlı olduğu gösterilmiştir.

Biyouyumlu bu ko-polimerlerin bu kadar tercih edilmesinin ana nedenleri; FDA'nın bunların insanlarda kullanımına izin vermiş olması, değişik yapı ve içeriklerde ticari seri üretime uygun olmaları, kontrol edilebilen biyobozunum hızlarına sahip olmaları ve daha önceki biyobozunur suture malzemeleri ile karşılaştırıldığında klinik açıdan daha başarılı olmalarıdır. Tüm bu nedenlerden ötürü, bunların, kontrollü ilaç/protein taşıma sistemleri olarak geçici tıp uygulamalarında ve doku iskelesi olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımları üzerine birçok

çalışma yapılmaktadır. Hücre adezyonunda ve çoğalmasında başarılı sonuçlar vermesi üzerine PLGA doku mühendisliği uygulamaları için de potansiyel bir aday haline gelmiştir. PLGA'ya dayalı olarak üç boyutlu doku iskelelerinin geliştirilmesinin planlandığı mikro ve nanoüretim üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Kim et al., 2006; Lu et al., 2004; Katti et al., 2004).

PLGA-kolojen matriks ise hali hazırda, doku yenilenmesi için hazırlanmış bir membran olarak (Cytoplast Resorb®) ticari formlarda kullanılmaktadır. Lupron Depot®; prostat kanserinde ve endometrioziste, gonadotropin salgılatıcı hormon analoglarının salınımı için PLGA'dan oluşturulmuş bir ilaç taşıyıcı sistemidir. Kullanılan PLGA'nın yapısına ve polimerin ilaç ya da proteinle etkileşimine bağlı olarak hızlı ya da yavaş salınım profilleri gözlenebilmektedir (Ueda et al., 2003).

2.6.1.4.1.5. Polidioksanon

Biyobozunur polilaktitler ve glikolidler biyotıp uygulamaları için çok filamanlı süturların geliştirilmesine zemin hazırlamış olsalar da, tek filamanlı süturların geliştirilmesi için de birçok araştırma yürütülmektedir. Çok filamalı süturlar, hem kullanımları sırasında artmış enfeksiyon riski taşırlar, hem de cildin delinmesi sırasında daha hasar verici bir yapıya sahiptirler. PDS, 1980'lerde PDS_s adı altında üretilen tek filamanlı ilk suture malzemesidir. PDS aynı zamanda küçük kemiklerin fiksasyonunda kullanılan vida olarak da kullanım alanı bulmuştur. PDS; renksiz, yarı-kristalleşmiş bir polimer olup p-dioksanondan üretilir. Polimerin, -10 – 0 °C arasında değişen çok düşük bir camsı geçiş sıcaklığı mevcuttur. Yüksek kristalize yapısı ve hidrofobikliği nedeniyle yavaş bozunan bir polimer olarak kabul edilir. PDS, glikoksilata yıkılır ve idrarla atılır ya da poliglikolidler gibi önce glisin, sonra da karbon dioksit ve suya dönüşür (Maurus et al., 2004). PDS'in modülü (yaklaşık 1.5 GPa), poliglikolidlerle karşılaştırıldığında çok düşüktür. Polimerin, hidrolitik bozunumla 1-2 ay içerisinde gücünü, 6-12 ay içerisinde de kütlesini kaybettiği bilinmektedir.

2.6.1.4.1.6. Polikaprolakton

Polikaprolakton yarı-kristalleşmiş bir poliesterdir ve nispeten daha ucuz monomerik birim olan ϵ -kaprolaktonun, halka açılma polimerleşmesi ile elde edildiği için de ilgi odağı olmuş bir polimerdir. Birçok organik çözücü içerisinde

çözünebilmesi, düşük bir erime (55-60 °C) ve camsı geçiş sıcaklığına (-60 °C) sahip olması gibi özellikleri nedeniyle çok fazla miktarda polimerle karışımlar oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Polimer, hidrolize olabilen alifatik ester halkalarına sahip olduğu için hidrolitik yıkılıma uğrar, ancak biyobozunum hızı nispeten daha yavaştır (2-3 yıl). Düşük biyobozunum hızı, yüksek geçirgenliği ve toksik olmaması nedeniyle PCL, ilk olarak ilaç-aşı taşıma sistemleri için düşünülmüştür. Uzun süreli gebelik önleyici bir malzeme olan Capronor bu polimerden yapılmıştır ve levonogestrel taşınmasında kullanılmıştır (Nair et al., 2006). PCL'ye dayanan mikro- ve nano- düzeyde ilaç taşıma sistemleri üzerine çalışmalar sürmektedir. PCL'ler biyouyumluluğu nedeniyle doku mühendisliğinde doku iskeleleri oluşturulmasında da yaygın olarak denenmektedirler. PCL'nin kalsiyum fosfatla oluşturduğu kompozitler, doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanılmaktadırlar.

2.6.1.4.1.7. Politrimetilen karbonat

Yüksek molekül ağırlıklı politrimetilen karbonat (PTMC), trimetilen karbonattan elde edilir. Yüksek miktardaki bükülebilirliği ve zayıf mekanik gücü nedeniyle, bir elastomerik alifatik poliester olan PTMC, yumuşak dokunun yeniden yapılanmasında kullanılacak implantlarda denenmiştir. Düşük molekül ağırlığı nedeniyle de ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde biyomalzeme olarak denenmiştir. Yukarıda tanımlanan poliesterlerden farklı olarak, yüzey biyobozunumuna uğrar ve *in vivo* yıkılımı, *in vitro* yıkılımından çok daha hızlıdır. Bu durum büyük olasılıkla enzimatik yıkılıma bağlıdır (Zhang et al., 2006). Mekanik özelliklerinin zayıf olması nedeniyle, diğer siklik laktonlarla birçok ko-polimeri denenmiştir.

2.6.1.4.1.8. Bakteriyel poliesterler

Bakteriyel poliesterler, doğal olarak oluşabilen ve bakteriler tarafından enerji kaynağı olarak oluşturulabilen biyobozunur maddelerdir. Bu sınıfın en çok bilinen üyesi, poli(3-hidroksibütirat) olup, ilk olarak 1920'de "Bacillus mageterium" bakterisi tarafından üretildiği saptanmıştır. PHB, ester bağlarının hidrolitik yıkılımı ile yüzey aşınmasına uğrar ve 160-180 °C düzeyinde bir erime ısısına sahiptir. Bakteriyel sentez yolunun yanısıra birçok kimyasal sentez yolu da tanımlanmıştır.

Bu madde, birçok çözücü içerisinde çözünemesinin yanısıra film, kürecik, fiber gibi birçok şekil ve yapıda sentezlenebilir. PHB'nin hidrolitik yıkılımı, kanın normal bir bileşeni olan (kan konsantrasyonları 0.3-1.3 mM), D-3-hidroksibütirik asit ile sonuçlanır. Ancak, sentetik poliestерlerle karşılaştırıldığında, yüksek kristalliğine bağlı olarak çok daha düşük bir biyobozunum hızına sahiptir.

2.6.1.4.1.9. Poliüretanlar

Biyobozunur olmayan poliüretanlar ve poli(eter üretanlar); biyouyumluluklarının yüksek olması ve mekanik özellikleri nedeniyle, kalp pili ve damar grefti gibi tıbbi implantlar olarak uzun süredir kullanılmaktadırlar. Biyobozunur olmayan poliüretanların biyolojik uyumlarının çok iyi olması ve üretimlerinin çok kolay olması nedeniyle biyobozunur poliüretan sentezi konusunda da çok çaba sarfedilmiştir.

Poliüretanlar, genellikle diizosiyanatların, alkol ve/veya aminlerle polikondensasyon reaksiyonu sonucu oluşurlar (Scyher et al., 1999). Ancak kullanılan 4,4o-metilendifenildizosiyanat ve toluen diizosiyanat gibi diizosiyanatların çok toksik olmaları nedeniyle, poliüretanların sentezinde diğer biyouyumlu diizosiyanatlar araştırılmıştır. Lizin diizosiyanat (LDI) ve 1,4-diizosiyanobütan bunlardan bazılarıdır. LDI'nin poliester diol ya da trioller ile reaksiyonu sonucunda da biyobozunur poli(ester üretan)lar sentezlenmiştir (Storey et al. ,1994). Bu biyobozunur poliüretanlarda, laktit/glikolid ko-polimerleri gibi alifatik poliestерler ya da polikaprolaktonlar yumuşak bölümlerin, polipeptitler de sert bölümlerin oluşumunda kullanılmışlardır (Zang et al., 2000). Biyobozunur elastik poli(ester üretan) olan Degrapol de, doku mühendisliği uygulamalarında yüksek gözeneklilikli doku iskelelerinin üretiminde kullanılmıştır (Saad et al., 1997). Bu malzemelerin aynı zamanda hücre yapışması ve çoğalmasını da hızlandırdıkları gösterilmiştir (Bonzani et al., 2007).

2.6.1.4.1.10. Poliester amidler

Amid bağlarının hidrojen bağlama yeteneği ve ester bağlarından kaynaklanan yüksek biyouyumluluğa bağlı olarak, bu polimerler çok iyi mekanik ve ısısal özelliklere sahiptirler. Poli(ester amid)lerin biyobozunumu ester bağlarının hidrolitik yıkılımı ile gerçekleşmektedir. Poli(ester amid)lerin, simetrik bisamid diol ve

süksinil kloridden kaynaklanan mekanik güçlölükleri, bu biyomalzemelerin biyoemilir sütün malzemesi olarak denenmelerine neden olmuştur (Pricilla et al., 2006). Lössin ya da fenil alaninin yer aldığı poliestester karışımları da bazı küçük molekülölü ilaçlar ve peptitlerin taşınmasında da ticari olarak kullanılmışlardır.

2.6.1.4.1.11. Poli(orto esterler)

İlaç taşıma sistemi oluşumunda kullanılan bazı biyobozunur polimerlerin aşınma dezavantajlarının çok fazla olması nedeniyle, daha hidrofobik polimerler sentezlenmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. Alza şirketi, ilaç salınım uygulamalarında kullanılmak üzere daha hidrofobik, ancak yüzey aşınma özelliği ön planda olan poli(orto ester)leri (Alzamer) geliştirmiştir. Orto ester bağları hidrolize yatkın olmakla birlikte, oluşturulan polimerin, sıvı vasatta aşınma derecesi çok düşüktür. Ayrıca bu polimerlerin biyobozunum hızı, pH duyarlılıkları ve camsı geçiş ısıları diyollerin eklenmesi ile kolayca ayarlanabilmektedir. Şu ana kadar 4 farklı sınıf poli(orto ester) geliştirilmiştir (Heller et al., 2002). Bunlardan poli(orto ester) III, polimer zincirlerinin bükülebilirliğinin yüksek olması nedeniyle oda ısısında jel kıvamına gelebilmektedir. Bu polimerden 5-florourasilin salımının çok iyi olması nedeniyle özellikle gözle ilgili tıbbi uygulamalarda çalışmalar yapılmıştır (Heller et al., 2005).

2.6.1.4.1.12. Polianhidridler

Yüzey aşınma özelliklerinin çok iyi olması nedeniyle bu biyobozunur polimerler, özellikle ilaç taşıma sistemlerinde üzerinde en fazla araştırma yapılmış polimerlerdir. 1932'de geliştirilmişler ve ilk kez fiber oluşturucu polimer olarak tekstil endüstrisinde kullanılmışlardır Hill et al., 1932). İn vitro ve in vivo ilaç salımı ve biyoyuymululuk testlerini takiben bu polimerler 1996'da FDA tarafından da onaylanmışlardır.

2.6.1.4.1.13. Poli(anhidrid-ko-imid)

Polianhidridlerin mekanik performanslarının iyi olmaması, daha kuvvetli polianhidlerin sentezlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Bunun üzerine, polimere imid bağlanması ile elde edilen poli(anhidrid-ko-imid)lerin çok daha başarılı yüzey aşınma özelliklerine sahip olduğu anlaşılmıştır. Araştırmalarda poli(anhidrid-ko-

imid)'in bazı türlerinin, özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında çok başarılı mekanik dayanıklılık sergiledikleri ortaya konmuştur (Attawia et al., 1996). Fare tibia modelinde bu polimerlerin kemiğe uyumlulukları araştırılmış ve tedavi edilmemiş kemik defektlerinin 12 gün içerisinde iyileştiği saptanmıştır (Ibim et al., 1998)

2.6.1.4.1.14. Polipropilen fumarat

Ortopedi uygulamalarında kullanılmak üzere mekanik güçlülüğe sahip, biyobozunur ve enjekte edilebilen bir biyomalzeme olarak üretilmiştir (Peter et al., 1997). Biyobozunur ürünleri, trikarboksilik asit döngüsünde doğal olarak bulunan fumarik asit ve ilaç formülasyonlarında seyreltici olarak kullanılan 1,2-propan dioldür. Birçok çalışmada çapraz bağlama ya da seramik malzemelerle oluşturulan kompozitleri aracılığıyla, ortopedik uygulamalara uygun mekanik özelliklere sahip türevleri denenmiştir (Temenoff et al., 2000).

2.6.1.4.1.15. Polialkil siyanoakrilat

Biyobozunur akrilat polimerleri içerisinde en fazla kullanılan gruptur. Aynı zamanda ilaç taşıma sistemleri için nanoparçacık geliştirilmesinde ilk kullanılan biyobozunur polimerlerdir. En hızlı biyobozunuma uğrayan polimerlerden biridir ve biyobozunur hızı, alkil yan gruplarının uzunluğuna bağlıdır. Poli(metil siyanoakrilat) gibi daha kısa alkil türevleri sıvı ortamda birkaç saat içerisinde biyobozunuma uğramaktadır, ancak siyanoasetik asit ve formaldehid gibi toksik yıkılım ürünlerinin oluşumuna neden olurlar. Bu nedenle araştırmaların çoğu, oktil ve izobutil siyanoakrilat gibi uzun zincirli türevler üzerine yoğunlaşmıştır. Yüksek polimerleşme hızlarına bağlı olarak bu monomerler doku yapıştırıcısı olarak denenmişlerdir. Dermabond (2-oktil siyanoakrilat), bölgesel cilt uygulamalarında FDA tarafından onaylanmış bir doku yapıştırıcısıdır.

2.6.1.4.1.16. Polifosfazenler

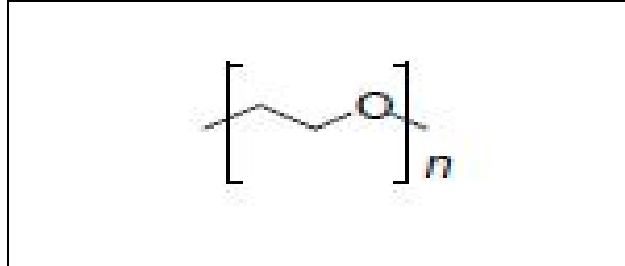
Nitrojen ve fosfor atomu içeren bir polimer grubudur. Yan gruplarının kimyasal özellikleri hidrofobik elastomerler ya da hidrofilik hidrojellerin sentezine zemin hazırlar. Kemik doku mühendisliğinde uygulamaları bulunmakla birlikte kullanımı çok yaygın değildir (Nair et al., 2006, b).

2.6.1.4.1.17. Polifosfoesterler

Polifosfoesterler, 1970'lerde biyomalzeme olarak geliştirilmiş bir başka fosfor içeren polimer grubudur (Penczek et al., 2005). En önemli özellikleri, yüksek biyoyumlulukları ve nükleik asit gibi biyomakromoleküllere olan benzerlikleridir. Polifosfoester, fizyolojik koşullarda hidrolitik ve enzimatik olarak biyobozunuma uğrarlar. Polifosfat içeren ve suda çözünen polifosfoesterler, gen taşıyıcısı olarak denenmişlerdir (Wang et al., 2002).

2.6.1.4.1.18. Polietilen glikol

Polietilen glikol (şekil 2.3), biyotıp uygulamalarında uzun zamandır kullanılmaktadır. Sınırlı protein ve hücre yapışması sergilediğinden ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi düşük olup, düşük antijenlik sergilediğinden, protein ve hücre yapışmasını engellemek üzere tıbbi cihazların kaplaması amacıyla kullanılmaktadır (Alcantar et al., 2000). Geçmişte PEG biyomalzemeleri, ameliyat sonrası seroma oluşumu ve doku yapışıklıklarının engellenmesinde de kullanılmıştır (Hill-West et al., 1994).



Şekil 2.3. Poli (etilen glikol)'in yapısı

PEG'in kendine has özellikleri, hem doku, hem de hücre mühendisliği uygulamalarında bu biyomalzemeyi ön plana çıkarmıştır. Adezyon peptitlerinin hücre işlevleri üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda PEG, hücreye biyoyumluluğu ve inert oluşu nedeniyle kullanılmıştır (Maheshwari et al., 2000). Yüksek molekül ağırlıklı PEG, doku mühendisliği yöntemleriyle in vivo kıkırdak doku oluşturmak üzere kullanılmıştır (West et al., 1999). Primer kondrositler, 100.000 molekül ağırlıklı PEG ile karıştırılarak çıplak fareye subkutan olarak enjekte edilmiş, implantasyondan sonraki 2 hafta içerisinde farede yeni kıkırdak dokusu oluşmuştur (Elisseff et al., 2000).

2.6.1.4.2. Doğal polimerler

2.6.1.4.2.1. Proteinler ve poli(amino asit)ler

Proteinler, birçok dokunun ana yapısal bileşkesini oluşturan, üç boyutlu katlantılı yapı sergileyen, doğal yapının ana elemanlarından biri olmaları nedeniyle süturlarda, kan durdurucu ajan olarak, doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak ve ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak denenmiş ve kullanılmış amino asit polimerleridirler. Protein bazlı biyomalzemeler, doğal kontrollü yıkılım süreçleri ile biyobozunuma uğrarlar (Altman et al., 2003). Vücudun proteinleri sentezlemesi başlıca dört basamaktan oluşur. İlk basamak, değişik amino asitlerin peptit bağlarıyla bir arada tutulduğu lineer yapı olan primer yapıdır. Bu lineer yapılar, hidrojen bağları aracılığıyla sekonder yapıları oluştururlar. Sekonder bağların üç boyutlu yapı oluşturacak şekilde bir araya gelmesiyle tersiyer yapılar, diğer proteinlerle etkileşecek şekilde organize olmalarıyla da kuaterner yapılar oluşur (Haarer et al., 2006).

2.6.1.4.2.2. Kolojen

Kolojen, vücutta en fazla bulunan protein olup, derinin ve kas-iskelet sistemi dokularının ana bileşkesidir. 300.000 molekül ağırlığında olup, 300 nm. uzunluğunda çubuk tipi polimerlerden oluşmaktadır. 22'den fazla tanımlanmış tipi olup, vücutta en sık raslananlar Tip I-IV arasındakilerdir. Tip I kolojen vücutta en çok bulunan kolojendir. Herbiri; %33'ünü glisin, %25'ini prolin ve %25'ini hidroksiprolinin oluşturduğu, her polipeptitin yaklaşık 1050 aminoasitten oluştuğu üç polipeptit alt ünitesinden meydana gelir. Kolojenin alt üniteleri, vücuttaki serbest aminoasitlerden sentezlenir ve fibroblast, osteoblast başta olmak üzere uygun hücrelerde transkripsiyon, translasyon ve post-translasyonel modifikasyona uğrarlar. Kolojenin glisin içeriği kolojen zincirinin bükülebilirliğini sağlar. Kolojen vücuttaki, kolojenaz ve metalloproteinazlar aracılığıyla enzimatik yıkılıma uğrar. Birçok yönden biyotıp uygulamaları açısından araştırılmıştır. Tabaka, tüp, sünger, köpük, nanofibröz matriks, pudra, enjekte edilebilir akışkan solüsyon gibi birçok formu sentezlenmiş ve ticarileştirilmiştir. Çalışmalar göstermiştir ki, biyotıp uygulamalarında kolojenin biyobozunum hızı, enzimatik ön muamele ya da çapraz bağlanma gibi yöntemlerle değiştirilebilmektedir. Pıhtılaşma mekanizmasının

başlatıcısı olması özelliği ile kan durdurucu olarak birçok uygulamada yer almıştır. Piyasada birçok kolojen esaslı kan durdurucu malzeme, cerrahi uygulamalarda kullanılmakta ya da denenmektedir.

Ekstraselüler matriksin ana elemanlarından biri olması nedeniyle, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşması hedeflenen birçok doku mühendisliği uygulamasında ve yara iyileşme uygulamalarında yerini almıştır. Ticarileştirilen birçok malzeme, FDA tarafından da onaylanmıştır (Purna et al., 2000). Antibiyotikler gibi düşük molekül ağırlıklı ilaçların bölgesel taşınması üzerine de birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Birçok kolojen bazlı gentamisin preparatı piyasada kullanılmaktadır (Gruessner et al., 2001). Protein ve ilaç taşıma işlevinin yanı sıra, gen ve plazmid DNA'nın taşınmasında da kolojenin kullanılabilirliği araştırılmaktadır (Sano et al., 2003). Omurilik cerrahisi uygulamalarında kullanılan üç boyutlu kolojen matriksler üzerine yapılan çalışmalar da göze çarpmaktadır (Narotham et al., 2004). Benzer şekilde fibriler kolojen, hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfattan oluşan sentetik kemik grefti Collagraft da FDA onayı almıştır. Kolojenin birçok formu; kalp-damar cerrahi, kas-iskelet sistemi ve sinir dokusu mühendislik uygulamalarında doku iskelesi olarak, birçok biyomühendislik uygulamasında araştırılmaktadır (Duan et al., 2007)

2.6.1.4.2.3. Elastin

Elastin, damarsal yapıların ve akciğer dokusunun ana proteindir ve tropoelastin moleküllerinin kovalent bağlanmasından oluşan çapraz bağlı polimer yapısındadır. Tropoelastin molekülleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından yapılır. Trombositlerle çok az etkileşime girdiğinden sentetik vasküler greftlerin biyolojik kaplaması olarak kullanılmıştır (Woodhouse et al., 2004).

2.6.1.4.2.4. Elastin benzeri peptitler

Elastin benzeri peptitler, dört amino asit dışında, insan tropoelastininin tekrarlayan pentapeptitlerinden oluşturulmuş yapay polipeptitlerdir. ELP'ler çok üst düzey bir biyoyumluluğa sahip olup bağışıklık sistemini hiçbir şekilde uyarmazlar ve yıkılım ürünleri tamamen doğal olup toksik değildirler. Özellikle kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzeme olarak denenmektedirler (Liu et al., 2004).

2.6.1.4.2.5. Albumin

Kan proteinlerinin %50'sinden fazlasını oluşturan, 66 kDa ağırlığında, suda çözünen bir proteindir. Esas işlevi, kan akımındaki hidrofobik yağ asitlerini taşımak ve kan pH'ını devam ettirmektir. Prealbuminler, karaciğerde sentezlenirler ve kan akımına verilmeden önce birçok işlemde geçerler. İleri düzeydeki kan biyoyumluluğu nedeniyle albumin gen taşınması amacıyla kullanılmıştır (Chuang et al. ,2002). Kalp-damar cerrahi araçlarında kaplama biyomalzemesi olarak ve cerrahi yapıştırıcı olarak kullanımları mevcuttur.

2.6.1.4.2.6. Fibrin

Kolojene çok benzeyen, kanın pıhtılaşması sürecinde işlev gören bir biyopolimerdir. Fibrinojenden oluşur. Fibrin biyomalzeme olarak ilk kullanılan biyopolimerlerden birisidir. Enjekte edilebilmesi, biyoyumluluğu, biyobozunur olması birçok ekstraselüler matriks proteinine sahip olması en önde gelen avantajlarıdır. Fibrin matriksleri, çok başarılı hücre taşıyıcıdırlar. Bioseed®, kronik yaraların tedavisinde kullanılan fibrin ve keratinositlerin birleştirildiği ticari bir preparattır. Fibrin-bazlı hücre taşıyıcılarının en önemli özelliği, taşınacak hücre çeşidine göre matriks özelliklerinin değiştirilebilmesidir (Wong et al., 2003).

2.6.1.4.2.7. Hyaluronik asit

Hyaluronik asit, ilk kez 1934'de gözün vitröz sıvısından elde edilmiştir ve keşfinden bu yana, biyomalzeme olarak ilgi odağı olmaktadır. Glikozaminoglikan ailesinin bir üyesi olup, ailenin diğer üyeleri kondroitin sülfat, keratan sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfattır. Proteinlere kovalent olarak bağlanmaz, suda çözünür ve akışkan sıvılar oluşturur. Vücuttaki toplam miktarının yarısı ciltte bulunur ve bu polimerin yarıömrü dakikalarla haftalar arasında değişir. İlk zamanlarda yapılan çalışmalarda hyaluronik asidin bağ dokuda pasif bir yapısal bileşke olduğu düşünülse de, daha sonraki çalışmalarda, embriyojenez sırasında hücrenin göçüne, farklılaşmasına, ekstraselüler matriks yapısının organizasyonuna doğrudan etki eden, metastazda önemli rol oynayan, yara iyileşmesinde ve inflamasyonda aktif görev alan bir polisakkarid olduğu anlaşılmıştır (Weigel et al., 1997). Mezenşimal ve epitelyal hücre göçünü ve farklılaşmasını uyararak, yeni damar yapımını hızlandırarak doku tamirinde de önemli rol oynar. Hyaluronik asidin visküz formülasyonu olan

Ossigel[®], kemik kırıklarının iyileşmesinin hızlandırılmasında kullanılan sentetik kemik grefti olarak kullanılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı akışkan hyaluronik asit solüsyonu (Amvisc[®]) da katarakt ameliyatlarında, kornea naklinde ve glokom cerrahisinde duyarlı gözler için kullanılan ticari preparatlardır. Aynı şekilde osteoartritli hastalarda kullanılan ve eklem aralığına enjekte edilen (Synvisc[®], Orthovisc[®]) hyaluronik asit preparatları da bulunmaktadır.

2.6.1.4.2.8. Kondroitin sülfat

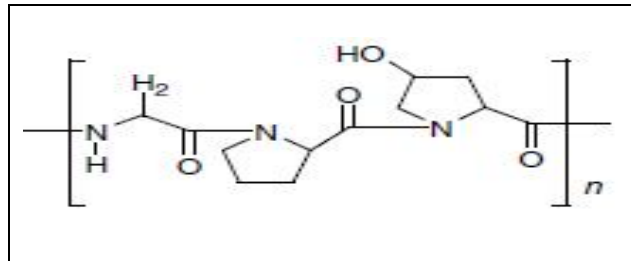
Çalışmalar göstermiştir ki, yara iyileşmesinin en önemli fazı, fibroblast hücreleri tarafından salgılanan glikozaminoglikanların hidrofilik bir matriks oluşturarak iyileşme için uygun bir ortam oluşturmalarıdır. Farelerin embriyonik fibroblast hücrelerinde yapılan bir çalışmada, sentezlenen glikozaminoglikan zincirlerinin çoğunluğunun kondroitin sülfattan oluştuğu saptanmış ve biyotıp uygulamalarında bu maddenin kullanıma çok uygun bir biyomalzeme olduğu vurgulanmıştır (Kosir et al., 2009). Kondroitin sülfat, özellikle eklem kıkırdığında en çok bulunan glikozaminoglikandır. Çalışmalarda gösterilmiştir ki, kondroitin sülfat, kıkırdak dokusunun metabolik yanıtlarını uyarır ve inflamasyon engelleyici etkiler gösterir. Aynı zamanda hücre içi sinyal oluşumu, hücre tanıma ve ekstraselüler matriks bileşkelerinin hücre-yüzey glikoproteinleri ile birleşmesi gibi işlevleri de bulunmaktadır (Chan et al., 2005). Biyouyumluluğu, immunojenik olmamaları gibi özellikleri nedeniyle kondroitin sülfat hirojelleri, yara kapama uygulamalarında yaygın olarak denenmişlerdir (Gilbert et al., 2004; Kirker et al., 2002). Kondroitin sülfat, kondrosit fenotipinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı için kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak da incelenmiştir. Kondroitin sülfat ve kolojen gibi doğal ya da sentetik polimerlerin birleşmesinden oluşan kompozit uygulamaları da araştırmaların konuları içerisinde yer almıştır. Bu çalışmalarda gösterilmiştir ki, kondroitin sülfat kullanımı ile ekimi yapılan kondrositlerin biyoaktiviteleri arasında çok sıkı, olumlu bir ilişki söz konusudur (Van Susante et al., 2001).

Biyotıp uygulamalarında potansiyel biyomalzemeler olarak üzerinde araştırma yapılan diğer biyoaktif polisakkaridler ise heparan sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfattır.

2.7. Biyomalzeme Olarak Kolojen, Jelatin ve Katgut

2.7.1. Kolojen

Kolojen, doku ve organ oluşumunda ve hücrelerin birçok biyolojik işlevinde çok önemli rol oynayan bir proteindir. Birçok doğal polimer ya da sentetik analogları biyotıp alanında ve biyomalzeme olarak kullanılmıştır, ancak kolojenin özellikleri onu biyomalzeme olarak daha ön plana çıkarmaktadır. Kolojen çok iyi bir yüzey-aktif özelliğe sahiptir. Bu nedenle lipidden yoksun yapılara çok daha kolay girebilmektedir. Şekil 2.4'de kolojenin yapısı görülmektedir. Kolojen başarılı biyobozunum özelliğinin yanı sıra düşük antijenikliğe ve albumin gibi diğer doğal polimerlerle karşılaştırıldığında daha üstün biyouyumluluk özelliklerine sahiptir. Biyotıp uygulamalarında kolojenin avantajlı kullanımının esas nedeni, fiberler oluşturarak ekstra sağlamlık ve stabilite sergilemesidir. Kolojenden oluşan birçok ilaç taşıma sistemlerinde *in vivo* emilim; glutaraldehit, formaldehit, açıl azid, hegzametilen diizosiyanat gibi maddelerin çapraz bağlanması yoluyla kontrol edilebilmektedir. Kolojenin biyotıp alanında uygulamaları çok yaygındır. Oftalmolojide koruyucu malzeme olarak, yanık ve yaralarda sünger şeklinde, protein taşınmasında tablet şeklinde kullanımlarının yanı sıra transdermal uygulamaları ve gen taşıma sistemlerinde kullanımı da söz konusudur. Doku mühendisliğinde hücre kültürü matriksi olarak, kalp-damar cerrahide de yapay kan damarı ve kapakçık olarak da kullanılmıştır (Kemp et al., 2000).



Şekil 2.4. Kolojenin yapısı

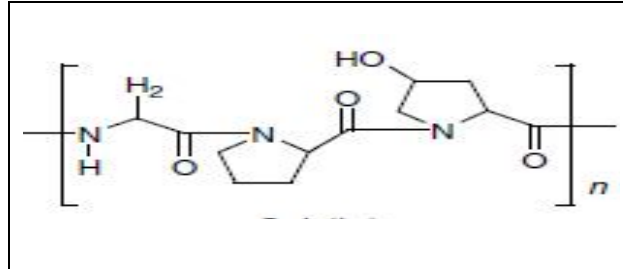
Kolojen kullanımının avantajları şunlardır: Kolaylıkla elde edilebilir ve yaşayan organizmalardan saflaştırılabilir. Antijenik değildir. Biyobozunur ve biyoemilebilirdir. Biyotıp uygulamaları için yeterli mekanik dayanıklılığa ve güçlülüğe sahiptir. Kan pıhtılaşmasını uyararak kan durdurucu özelliğe sahiptir. Birçok değişik formda sentezlenebilir. Çapraz bağlanma üzerinde yapılan değişikliklerle biyobozunurluğu

değiştirilebilir. İşlevsel farklı gruplar eklenerek kolaylık değişik nitelikte biyomalzemeler elde edilebilir. Sentetik polimerlerle uyumludur.

Kolojen kullanımının dezavantajları şunlardır: Saf tip I kolojen elde edilmesi son derece maliyetli bir işlemdir. İzole edilen kolojende farklılıklar bulunabilir (çapraz bağlanma yoğunluğu, fiber boyutları farklılıkları gibi). Hidrofilik özelliği nedeniyle kolaylıkla şişmesi ve daha hızlı salınım sergilemesi bir olumsuzluk olarak karşımıza çıkabilir. Hidrolitik yıkılımla karşılaştırıldığında enzimatik biyobozunum hızında farklılıklar görülebilir. Deli Dana Hastalığı ve mineralleşme gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkabilir.

2.7.2. Jelatin

Kolojenin kontrollü kısmi hidrolizi ile elde edilen bir proteindir. Şekil 2.5’de jelatinin yapısı görülmektedir. Jel-sıvı dönüşüm kolaylığı, sıcak akışkan solüsyonlarının viskozitesi, koruyucu kolloid gibi hareket edebilme yeteneği, su geçirgenliği, soğuk suda çözünmezken sıcak suda çözünebilme özelliği jelatine ayrıcalık sağlayan özelliklerdir. Aynı zamanda besleyici özelliği vardır. Bu özellikleri jelatine gıda sanayide ve farmakoloji alanında kullanım alanları yaratmıştır.



Şekil 2.5. Jelatinin yapısı

Jelatinle; güçlü, orta derecede bükülebilir özellikte, suyu emebilen kaplamalar üretmek mümkündür ve bu yönüyle fotoğraf filmlerinin ve ilaç kapsüllerinin üretiminde ideal bir biyomalzemedir. Kimyasal yapısı yönünden değerlendirildiğinde, jelatinin tek bir kimyasal madde olmadığı görülür. Analizlerde; glisin (%26.4-30.5), prolin (%14.8-18.0), hidroksiprolin (% 13.3-14.5), glutamik asit (%11.1-11.7) ve alanin (%8.6-11.3) en fazla olmak üzere arjinin, aspartik asit, lizin, serin, lözin, valin, fenil alanin, treonin, izolösin, hidroksilizin, hitidin, metyonin ve tirozin aminoasitlerini yapısında bulundurduğu saptanmıştır (Eastoe et al., 1955).

2.7.3. Doku iskelesi olarak jelatin ve kolojenin karşılaştırılması

Jelatin; denatüre bir polimer olduğundan, jelatinin doku iskelesi materyali olarak seçilmesi, kolojene bağlı olabilecek immünojenite ve patojen geçişini engeller. Kolojen-bazlı jelatinin biyolojik fonksiyonel grupları daha fazladır ve doku iskeleleri uygulamaları için daha uygundur. Bir doku iskelesinin en önemli özelliklerinden birisi mekanik dayanıklılığıdır. Kolojenin heliks yapısı ve çapraz bağların fazlalığının daha fazla mekanik güçlülük sağladığı saptanmıştır. Şişme kapasitesi, özellikle hücre kültürlerinde, oluşturduğu üç boyutlu yapı nedeniyle, hücrelerin rahat hareketine ve birbirleriyle ve matriksle tam iletişimine alt yapı sağladığı için önemli bir özelliktir. Kolojen ve jelatinden sentezlenmiş doku iskeleleri bu özellikleri yönüyle karşılaştırıldığında aralarında önemli bir fark saptanmamıştır. Biyobozunumları açısından değerlendirildiğinde jelatinin, kolojene göre çok daha hızlı biyobozunuma uğradığı görülmektedir. Aynı bulgulara, lizozimle yapılan *in vivo* biyobozunum incelemesinde de ulaşılmıştır. Ancak biyobozunum hızının fazla olmasının, ilaç kapsüllerinin yapımı gibi bazı biyotıp uygulamalarında bir avantaj olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

Doku iskelelerine yapışan fibroblast hücrelerinin sayısı (5 saat süresince) ve, 24 ve 48 saat içerisinde üreme gösteren fibroblast hücre sayısını baz alarak, hücre yapışması ve çoğalması açısından kolojen ve jelatini karşılaştıran bir çalışmada ise her iki biyomalzemenin bu bağlamda birbirinden çok farklı bir işlevsellik sergilemedikleri saptanmıştır (Ratanavoraporn et al., 2006). Ancak jelatinin kolojene göre çok daha kolay sentezlenebilmesi ve çok daha ucuz olması önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

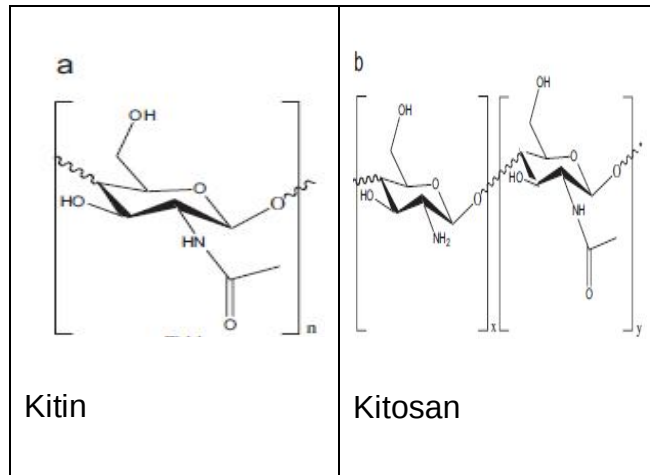
2.7.4. Katgut

Ameliyat iplikleri, herhangi bir nedenle birbirinden uzaklaşan yara dudaklarını birbirine yaklaştırmak, kanamayı önlemek amacıyla damarların bağlanmasını sağlamak gibi işlevleri gören doğal ya da sentetik, steril malzemelerdir. Katgut doğal ameliyat iplikleri sınıfında yer alan, koyun barsağının mukoza altı gözenekli dokusundan ya da sığır serozasından (barsağın en dış katmanı) üretilen, yapısının çoğunluğunu kolojenin oluşturduğu bir biyomalzemedir. Temizlenen ve yağ dokusu alınan parçalar, birleştirilir, bükülür ve kurutulur. Kullanımının 1800 yıl öncesine

dayandığı rivayet edilse de ilk sistemli kullanımı 1840'lı yıllarda başlamış ve 1930'lara kadar ipekle birlikte alternatifsiz bir ameliyat ipliği olarak kullanımları devam etmiştir. Gerilme direncinin zayıf olması, doğal yapısı nedeniyle çabuk biyobozunuma uğraması ve yüksek doku reaktivitesi yüzünden kullanılması bırakılmak üzeredir. Dokudaki direncini yalnızca 4-5 gün korur, yaklaşık 2 hafta içinde doku güvenliği tamamen kaybolur. Doku içinde tamamen yok olması ise 70 günü bulur. Bu zayıflığın ortadan kaldırılabilmesi için; katgüt krome asit tuzları ile kromizasyon işlemine maruz bırakılıp, biyoemilirliliği geciktirilmiş ve krome katgütler üretilmiştir (Moy et al., 1992).

2.8. Biyomalzeme Olarak Kitosan

Yapısal olarak kitosan; D-glikozaminin gelişigüzel bir şekilde *N*-asetilglikozaminle $\beta(1,4)$ -bağları sonucu oluşan lineer bir polisakkariddir. Şekil 2.6'da kitin ve kitosanın yapısı görülmektedir. Kitosan, artropod iskeletinden elde edilen ve tamamen asetilenmiş bir polimer olan kitinden elde edilir.



Şekil 2.6. Kitin ve kitosanın yapısı

Kitosanın insanlarda ağızdan uygulamalarda toksik olmadığı saptanmış ve FDA tarafından gıda katkısı olarak onay almışlardır. Kitosanaz, lizozim ve papain gibi enzimlerin kitosanı *in vitro* olarak yıkılıma uğrattıkları bilinmektedir (Nordtveit et al., 1996). Kitosanın *in vivo* yıkılımı ise asetillenmiş kalıntıların hidrolizi ile lizozomlarca gerçekleştirilir. Kitosanın biyobozunumu ile asetilasyon derecesi ve polimerin kristalliliği arasında ters bağlantı söz konusudur (Shi et al., 2006). Bu nedenle

kitosanın kimyasal yapısı üzerindeki oynamalar, çözünürlüğünü ve biyobozunum hızını doğrudan etkiler. Hızlı biyobozunum, kitosanda mevcut olan hidrojen bağlarının bozulması ile ilişkilendirilmiştir. Bir çalışmada, değişik yoğunlukta çapraz bağlar içeren jel oluşturmak için değişik konsantrasyonlarda gluteraldehid kullanılmış ve farelerde ciltaltı ve periton içine yerleştirilen implantların biyobozunum hızları incelenmiştir. Düşük yoğunlukta çapraz bağlara sahip olan jellerin 14 gün içerisinde ciltaltında %80, peritonda %91 oranında biyobozunum sergiledikleri saptanmıştır. Yüksek yoğunlukta çapraz bağ içeren jellerin ise 14 günlük süre sonunda ağırlıkça belirgin bir azalma sergilemedikleri gözlenmiştir (Azab et al., 2006). In vivo olarak kitosan, implant bölgesinde çok az yabancı cisim reaksiyonu oluşturur. Şekil 2.7'de cerrahi suture Vicryl®'le karşılaştırıldığında kitosanın doku reaksiyonu mikroskopik olarak görülmektedir. Vicryl®'le karşılaştırıldığında kitosanın göz ardı edilebilir bir doku reaksiyonu oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 2.7. Vicryl® ve kitosanın oluşturduğu doku reaksiyonunun mikroskopik görünümü

Kitosan, vücutta var olan glikozaminoglikanlar ve hyaluronik asitle yapısal benzerliklere sahiptir ve reaktif amino gruplarının varlığı nedeniyle organik kimyasal ve biyolojik işlevlerin gerçekleştirilmesi noktasında çok uygun bir biyomalzemedir. Kitin ve kitosanın makrofajlar üzerinde uyarıcı etkiye sahip oldukları ve nötrofillerin işlevlerini arttırdıkları gösterilmiştir (Suh et al., 2000). Bu özellikleri sayesinde kazandıkları antibakteriyel ve kanama durdurucu işlevleri, bunları yara iyileşmesine yönelik biyotıp uygulamalarında çok etkili doğal polimerik biyomalzemeler haline getirmiştir (Burkatovskaya et al., 2006). Daha da ötesinde

yıkılımları sonucu oluşan oligomerlerin makrofaj fonksiyonlarını arttırdıkları belirlenmiştir. Biyobozunum sonucu oluşan N-asetilglukozaminin, deri dokusunun ana bileşkesi olması nedeniyle doku iyileşmesinin çok daha az skar oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı, kitosan çok başarılı bir yara iyileştirici biyomateryaldir.

Kitosan üzerindeki pozitif elektrik yükü, onun müköz membranların negatif elektrik yükü ile etkileşmesini sağlayarak müköz membranlara bağlanmasında artışa neden olur ki, bu mekanizma, birçok kitosan-bazlı biyoyapışkan ilaç/aşı taşıma sistemleri üzerine çalışmalara ilham kaynağı olmuştur (Martinac et al., 2005). Akışkanlar içerisinde çözünbilme özelliği nedeniyle jel, nanofiber, nanokürecik ve mikrokürecik gibi birçok şekilde üretilebilirliği ve çok üst düzey biyoyumluluk özellikleri sergilemesi kitosanı, ilaç taşıma sistemlerinde ve doku mühendisliği uygulaması olarak doku iskelelerinin yapımında ümit vaad eden bir biyomalzeme olarak ilgi odağı haline getirmiştir. DNA ile birleşme özelliği sergilemesi nedeniyle gen taşıma sistemlerinde de araştırmalara konu olmuştur (Mao et al., 2001). Kitosanın kıkırdak, deri ve kemik mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanımı üzerine de çalışmalar yapılmaktadır (Shi et al., 2006). Hücre membranının geçirgenliğini artırma özelliği ve müköz membranlarla birleşme eğilimi, kitosanın ağızdan ya da burundan aşı uygulamalarında kullanımını gündeme getirmiştir. Bu mekanizmadan hareketle kitosan bazlı, solüsyon ya da mikrokürecik şeklinde birçok aşı formülasyonu geliştirilmiştir.

2.9. Polimerik Fiberler

Fiberler olarak bilinen doku mühendisliği malzemeleri; doğal, sentetik, organik ve inorganik olmak üzere geniş bir spektrumu içermektedir. Fiber, boyu çapının en az 100 katı olan malzeme olarak tanımlanır, ancak yapay fiberler duyulan gereksinime göre istenen boy/çap oranında sentezlenebilirler. Hem doğal, hem de sentetik fiberler biyotıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle tıpta yaygın kullanım alanı bulan polimerik fiberler kuru eğirme, ıslak eğirme ve eriterek eğirme yöntemleri ile elde edilebilirler.

2.9.1. Polimerik fiber üretim teknikleri

2.9.1.1. Eriterek eğirme

Eriterek eğirme yöntemi kısmen daha kolay bir teknik gerektirir. Bu yöntemde, erimiş polimer, üzerinde “spineret” adı verilen, çok sayıda delikler bulunan bir plakaya yüksek basınçla pompalanır. Sıvı polimer spineret yüzeyinden aşağıya doğru akarken soğutucu gazlar aracılığıyla katılır. Daha sonra fiberler, ilk hızlarına uygun bir şekilde bir makara üzerine sarılır, sonrasında da ısıtılarak gerilirler. Son olarak fiberler, sait bir hızla dönen bobin üzerine sardırılırlar. Isının fazla olması, polimerlerin monomere dönüşerek yapısının bozulmasına ve hidrolize neden olabileceğinden işlem mümkün olan en düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmelidir.

2.9.1.2. Kuru eğirme

İşlemin adı kuru eğirme olarak geçse de, işlemin başlangıcında kullanılan çözücü nedeniyle polimer ıslaktır. Kuru eğirmede işleme, polimeri organik bir çözücüde çözerek başlanır. Bu aşamada polimer, bazı katkılarla karıştırılabilir. Polimer solüsyonu spinneret plakasındaki ince deliklerden geçerken fiberler oluşur. Kullanılan sıcak hava ya da gazlar aracılığıyla, filamanlar çözücünden arındırılır. Hem eriterek eğirme, hem de kuru eğirme işlemlerinde poli(laktit), poli(glikolid), poli(kaprolakton) ve bunların ko-polimerlerinden ticari üretim amaçlanan biyobozunur fiberler elde etmek mümkündür.

2.9.1.3. Islak eğirme

Islak eğirme, fiber eğirmede kullanılan en eski yöntemdir. Kuru eğirmede olduğu gibi, polimer uygun bir çözücü içerisinde çözünür. Ancak spineretten geçerken, polimer bir çöktürme banyosuna girer. Bu banyo hem polimerin kimyasal olarak çökmesini sağlar, hem de çözücüyü ortamdan uzaklaştırarak filamanı sertleştirir. Islak eğirme ile diğer iki eğirme yöntemi arasındaki farklılık, ıslak eğirmede eğirme işleminin, vizkositesi çok daha yüksek bir sıvı içerisinde olmasıdır. Islak eğirme yöntemi, daha çok kuru ya da eriterek eğirme yöntemi ile elde edilemeyen kitin ve kitosanın üretiminde kullanılır. Hidroksil, asetamido ve amino gruplarından kaynaklanan güçlü zincirler arası kuvvetler, kitin ve kitosanın erime sıcaklığını

yükseltirler. Bu nedenle, kitin ve kitosan eldesinde eriterek eğirme yöntemini kullanmak mümkün değildir. Bunun yanı sıra bu iki doğal polimer, sadece çok yüksek kaynama sıcaklıkları olan polar çözücülerde çözünebilirler. Kitin fiberleri oluşturma noktasında, birçok çözücü-çöktürücü sistemi denenmiştir. Kitin fiberlerinin eğirilebilirliği, çöktürme banyosunun ısısının artırılması ya da uygun bir plastikleştirici eklenmesi ile artırılabilir. İyi mekanik özelliklere sahip fiberler elde etmek için, işlemin sonunda bazı fiziksel ya da kimyasal işlemler uygulanabilir ki, bu işlemlerin de en az eğirme işlemi kadar, fiberin kalitesi üzerine etkisi olduğu saptanmıştır (Tuzlakoğlu, 2005).

2.9.2. Fiberle güçlendirilmiş kompozitler

Fiberle güçlendirilmiş kompozitler; mekanik üstünlükleri, metalle karşılaştırıldıklarında aşınma göstermemeleri, iyi bağlanma özellikleri ve tamir ve yenilenme kolaylığı gibi özellikleriyle birçok doku mühendisliği uygulamasında diğer biyomalzemelere tercih edilirler. Fiber malzemelerin çapları; mikrometrelerden (10-100 µm gibi) nanometrelere değiştiğinden, polimerik malzemelere eklendiğinde çok büyük yüzey alanları sağlamaları, bükülebilirlik özelliğini çok arttırmaları ve üstün mekanik özellikler (sertlik ve dayanıklılık gibi) sağlamaları çok önemli avantajlardır.

3 çeşit güçlendirme bulunmaktadır: Kısa fiberler ile, kesintisiz fiberler ile ve parçacıklar (tozlar) ile. Özellikle fiberle güçlendirme yapılmış sentetik kompozit malzemelerde, fizyolojik olduğu kadar mekanik özelliklerin birçoğu da bazı değişkenlere bağlıdır. Bunlar; ana malzemenin mekanik ve fizyolojik özellikleri ve yapısal içeriği, güçlendirme şekli, güçlendirme malzemesi ve matriksi oluşturan yapılar arasında meydana gelen bağlar şeklinde sınıflandırılabilirler. Bu parametrelerdeki değişiklikler değişik performansta kompozit malzemelerin oluşmasıyla sonuçlanabilir.

2.9.2.1. Güçlendirme malzemeleri

Biyouyumlu olan fiber ve parçacıklar, biyokompozit malzemelerin güçlendirilmesinde kullanılabilirler.

2.9.2.1.1.Karbon fiberler

Karbon (aynı zamanda “grafit” olarak da bilinir); biyouyumluluğu, inert davranışı, yüksek modül ve güçlülük sergilemesi, dirençliliği ve nem emici özelliği nedeniyle güçlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Total diz ve kalça protezleri ile, iç ve dış fiksatorler, ortopedik vida ve plakalar başta olmak üzere ağırlık taşıma gerektiren birçok biyotıp uygulamasında karbon fiberlerin güçlendirici etkisinden yararlanılmaktadır.

2.9.2.1.2.Cam fiberler

Biyokompozit üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Daha ucuz olmakla birlikte karbon fiberlere nazaran daha az biyouyumludurlar. Ancak şeffaf olmalarından kaynaklanan üstünlükleri nedeniyle sağlamlığın geri planda kaldığı estetik uygulamalarda tercih edilirler.

2.9.2.1.3.Aramid fiberler

Aramid fiberler; polimid ve poliamid gibi polimerlerden yapılırlar. Birçok polimerik fiber, genelde yeterli sağlamlık ve dayanıklılığa sahip olmamakla birlikte aramid fiberler bunun istisnasıdır. Moleküler yapıdaki oynamalarla değişik özelliklerde sentezlenmeleri mümkündür. Yüksek dayanıklılık özelliği sergilerler. 300°C'ye varan ısılarda kullanımları mümkündür.

2.9.2.1.4.Diğer polimerik fiberler

Ultrayüksek ağırlıklı polietilen fiberler buna bir örnektir. Çok düşük yoğunluklu olup çok hafiftirler, alkalilere ve neme dirençlidirler, aşınmaya karşı çok dayanıklıdırlar.

2.10. Sitotoksisite

Doku ve hücre kültürleri, uygun testlerle birlikte uygulandığında biyouyumluluğun çok başarılı bir belirleyicisidirler. Birçok özel ve detaylı hücre kültürü yöntemi, malzeme üretiminde ya da işlenmesinde kullanılan hammaddelerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Hücre ya da doku kültürü yönteminin; ucuz ve kolay uygulanabilir olması, insan dokusunda biyomalzemenin denenmesine olanak sağlaması, toksik malzemelere duyarlı

olması, doz-yanıt eğrisi oluşturabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bunun dışında çabuk ve kantitatif sonuç vermesi ve direk inceleme ya da ölçüme izin vermesi gibi çok olumlu yanları da bulunmaktadır.

Sitotoksisite testlerinin amacı, tıbbi araçlarda ya da tıbbi araç parçalarında kullanılan polimer ve elastomer parçaların, memeli hücre kültürleri kullanılarak, biyouyumluluğunun saptanmasıdır. Sitotoksisite yöntemleri; hücre ölümü de dahil olmak üzere, bazı hücrel ve hücrei yapıların ve/veya fonksiyonların kaybını ölçer.

Birçok sitotoksisite yöntemi tanımlanmıştır. Bunlar; mikrofizyometri (metabolik hız ölçümü), üridin uptake inhibisyonu (membran hasarı), nötral kırmızı uptake (genel sitotoksisite), total protein (genel sitotoksisite), koloni oluşturma etkinliği (ölümcül sitotoksisite), floessein sızıntı testi (hücre membran hasarı), MTT boya redüksiyonu (mitokondria hasarı), kristal viyole boyanma (ölümcül sitotoksisite), alkalin fosfataz salınımı (membran hasarı), hücrei ATP belirlenmesi (genel metabolik toksisite).

2.10.1.MTT testi

MTT testi ise, in vitro koşullarda uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntem olup, hücrenin canlılığına dayanarak sitotoksisiteyi ölçme prensibine dayanır. Bu yöntem; hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolium tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür); canlı hücre mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanarak işlev gören sarı renkli bir maddedir. Bu bağlanmanın sonunda; suda çözünmeyen, ancak izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünen koyu mavi renkte kristaller oluşur. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı spektrofotometrik yöntemle görünür bir dalga boyunda ölçülebilen absorbanlar vermektedir. Bu yolla, indirek olarak ölçülen hücre metabolik aktivitesi, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilirdiği bir test olması nedeniyle tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar üç ana başlık altında sunulmuştur. Birinci bölümde poli(L-laktat)-poli(etilen glikol) (PLLA-PEG) blok kopolimerinin sentezi ve karakterizasyonu, ikinci bölümde fiberlerin hazırlanması ve üretilmesi, üçüncü bölümde ise doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak yapılan deneysel çalışmalar tanıtılmıştır.

3.1. Polilaktat-PEG Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Polietilen glikol ve laktat blok kopolimerleri katalizör olarak kalay oktoat kullanılarak daha önce grubumuzun çalışmalarında başarıyla uygulanan koşullarda gerçekleştirilmiştir. Kopolimerler GPC, NMR, DSC, FTIR gibi yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Deneysel çalışmalar aşağıda verilen alt başlıklarda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

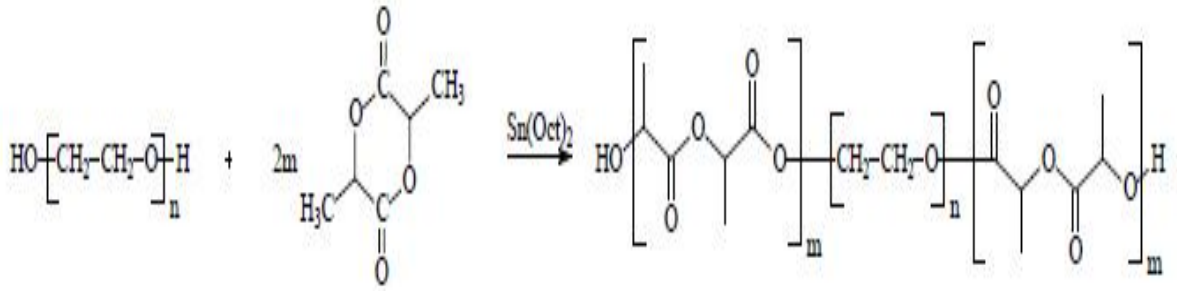
3.1.1. PLLA-PEG blok kopolimerinin sentezi

PLLA-PEG blok kopolimerlerinin sentezlenmesi amacıyla L-laktat (LLA) (Purac, Almanya) dimeri, ve 6000 molekül ağırlığında poli(etilen glikol) (PEG 6000) (Aldrich, Almanya) ve katalizör olarak kalay oktoat (SnOct_2) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Laktat dimeri yapısal olarak nem çeken bir maddedir. Bu nedenle kullanılmadan önce toluen içinde 70°C 'de çözülmüş (ağırlıkça 30%) , daha sonra yavaş yavaş oda sıcaklığına soğutulup kristalleşmesi sağlanmıştır. Kristallenen dimer filtre edilip, tolüenin uzaklaşması amacı ile vakum altında kurutulmuştur. PEG ve çözücüler satın alındığı gibi kullanılmıştır.

Tüm polimerizasyonlarda PEG/LLA dimeri oranı 1/300 mmol/mmol olacak şekilde sabit tutulmuştur. Dimer/katalizör oranı ağırlıkça 1000'dir.

Kopolimerizasyon yığında cam tüp tipi reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Buradaki polimerizasyon reaksiyonu Şekil 3.1'de şematik olarak verilmiştir. Polimerizasyonlar önceki çalışmalarda elde edilen bulgular ışığında PEG/LLA dimeri oranı 1/300 mmol/mmol ve dimer/katalizör oranı 1000 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. LLA dimeri ve PEG 6000 belirtilen oranda karıştırılmış reaktöre konmuş, reaktörün bulunduğu silikon banyosu sıcaklığı 116°C 'a getirilmiştir. Karışımdan 15 dakika süre ile yüksek saflıktaki azot gazı geçirilmiş ve belirtilen

oranda katalizör ilave edilmiştir. Azot gazı geçirmeye devam edilerek katalizörün sıvı fazda tamamen dağılması sağlanmıştır. Karşımın tamamen gerçekleşmesinin ardından reaktörün ağzı kapatılıp sıcaklığı 120°C olan etüv içersine alınmış ve polimerizasyonun tamamlanması için bu koşullarda 24 saat bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan reaktördeki polimer susuz kloroformda çözülmüş ve soğuk metanol ile (-18°C) çöktürülmüştür. Reaksiyona girmemiş PEG'in uzaklaştırılması amacıyla distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından elde edilen kopolimer vakum altında etüvde kurutulup ve 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Isı ve katalizör varlığında PLLA-PEG kopolimerizasyon reaksiyonu

3.1.2. PLLA-PEG Blok kopolimerinin karakterizasyonu

Sentezlenen PLLA-PEG blok kopolimerleri çeşitli yöntemler ile karakterize edilmiştir. Polimerlerin molekül ağırlığı tayini için GPC ("Jel Geçirgenlik Kromatografisi") (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Dar molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standartlar (Merck, Almanya) kullanılarak kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı ve mobil faz akış hızı sırasıyla 25°C ve 1.0 ml/dak olarak seçilmiştir.

NMR spektrum ölçümleri, 400 MHz ve 13°C sabit sıcaklıkta çalıştırılan bir NMR-spektrofotometresi (Brucker UltraShield 400, Almanya) kullanılarak kaydedilmiştir. Numuneler CDCl₃ içerisinde çözülmüş (1 ml içerisinde yaklaşık 4 mg polimer) ve dâhili standart olarak tetrametilsilan kullanılmıştır. Kimyasal kaymalar ppm cinsinden verilmiştir.

Kopolimerlerin ısı özelliklerinin incelenmesi, erime ve camsı geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi amacı ile Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) (Shimadzu DSC-50, Japonya) kullanılmıştır. Çalışmalar 10 °C/dak'lık bir ısıtma hızında 25°C'den

200°C'ye kadar süpürücü gaz olan azot atmosferi (100 ml/dak) altında yürütülmüştür.

FTIR spektrumları 1500-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Shimadzu DR 8101, Japonya) cihazı ile incelenmiştir. Farklı spesifik gruplara ait pikler spektrumlarda gösterilmektedir.

3.2. Fiberlerin Hazırlanması ve Üretilmesi

Sunulan tez kapsamında iki hazır ameliyat ipliğinden (“katgut” ve “vikril”) elde edilen fiberler ve çalışmada ıslak eğirme (“wet spinning”) ile üretilen kitosan fiberler kullanılmıştır. Katgut hayvan bağırsaklarından elde edilen doğal kolajen esaslı fiberlerden oluşan biyobozunur bir ameliyat ipliğidir; çok uzun yıllardır klinik olarak kullanılmaktadır. “Vikril” ticari adı ile satılan ameliyat ipliği, çok katlı polilaktat/glikolat kopolimerlerinden sentetik olarak üretilmektedir. En yaygın ve en başarılı biyobozunur ameliyat ipliğidir. Üçüncü fiber türü ise kitosandır; yine doğal kökenli bir polimerdir, pozitif yüklü olması nedeni ile özel uygulama alanları bulmuş bir biyomateryaldir. Sunulan çalışmada istenilen çapta üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Katgut fiberlerinin hazırlanması

Çalışma kapsamında üç farklı çapta (2/0, 4/0 ve 6/0 olarak adlandırılan; sırasıyla 395 µm, 245 µm ve 192 µm çaplarında) katgut fiber (Boz Absorbable Sterile Plain Catgut, PC1261, PC1000 ve PC 1229) Orhan Boz (Ankara) firmasından temin edilmiştir. Bu farklı çaplı fiberlerden; 1, 3 ve 6 mm olmak üzere 3 farklı uzunlukta fiberler, kesilerek hazırlanmıştır. İkinci gruptaki çalışmalarda ise aynı boyda olanlardan üç farklı çapta olanlar (395 µm, 245 µm ve 192 µm) kullanılmıştır. “Jelatin/HA/okside dekstran” dan hazırlanan doku iskelelerine hazırlama sırasında bu fiberlerden farklı miktarda yüklenerek hem fiber çapının hem de uzunluğunun etkileri araştırılmıştır.

3.2.2. Vikril fiberlerinin hazırlanması

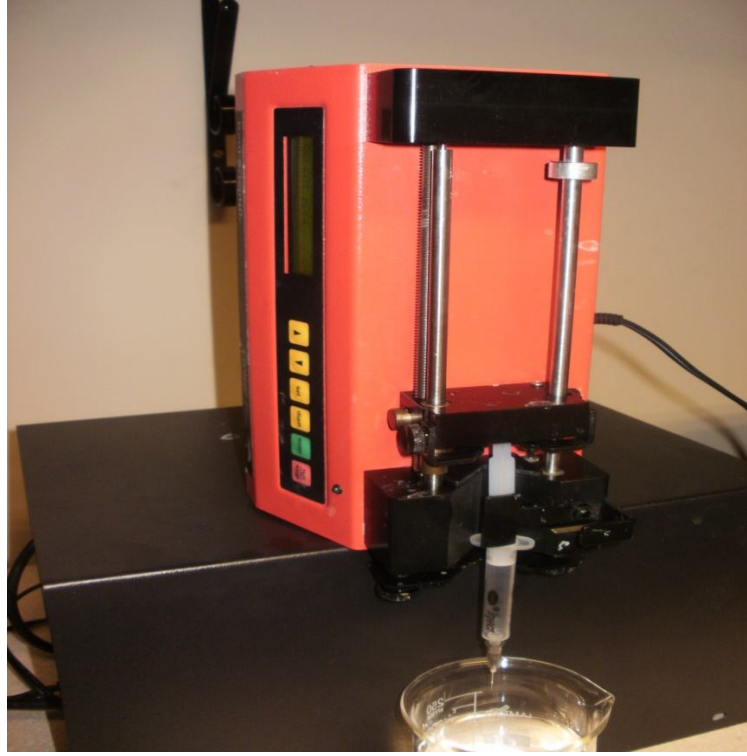
Vikril poli(glikolat-laktat) kopolimeridir. Sunulan çalışmada bu kopolimerden üretilmiş üç farklı çapta fiber kullanılmıştır. Bunlardan ikisi; 2/0 ve 3/0 olanlar, (Polyglactin 910, Violet Braided Absorbable Suture, W9136 ve W904H) Ethicon firmasından (ABD) satın alma yoluyla temin edilmiştir. Üçüncüsü, 4/0 olan,

(Absorbable Synthetic Braided Violet, Surgical Suture, LS7062) Orhan Boz Firması'ndan temin edilmiştir. Bu ipliklerden 1, 2 ve 4 mm uzunluğunda farklı çap ve uzunluklarda fiberler kesilmiştir. Bu fiberlerden PLLA-PEG blok kopolimerine farklı miktarlarda yüklenerek fiber dolgulu doku iskeleleri elde edilmiştir.

3.2.3. Kitosan fiberlerinin ıslak eğirme yöntemi ile üretilmesi

Bu bölümde "Islak Eğirme Yöntemi" ile farklı çaplarda kitosan fiberler üretilmiştir. Kitosan (Fluka Biochemica 22741, İsviçre), asetik asit (Merck K27574156, Almanya), sodyum sülfat (AnalaR 10264, Almanya), sodyum hidroksit (Merck B639062, Almanya) ve mutlak etanol (Carlo Erba, 4146082, Almanya), satın alınma yoluyla temin edilmiş ve doğrudan kullanılmıştır. Fiber üretimi için şırıngalı pompa (Kent Scientific, ABD) ve 3 farklı çapta iğne (0.7, 0.9 mm Mediplus, Hindistan ve 0.8 mm Ayset Steril Şırınga, Türkiye) kullanılmıştır.

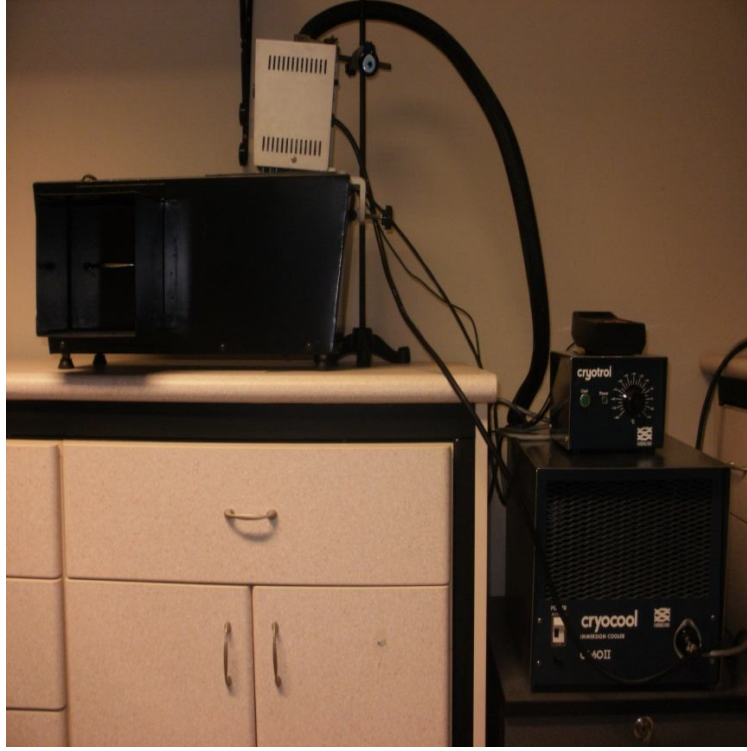
0.33 g kitosan, 7.5 ml %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde karıştırılarak 1 gün süresince oda sıcaklığında çözülmüştür. Çözelti daha sonra şırıngalı pompa aracılığı ile sabit hızda (0.66 ml/saat) çöktürme ortamına (15 ml 0.5 M Na₂SO₄, 5 ml 1 M NaOH ve distile su) enjekte edilerek fiber oluşumu sağlanmıştır. Fiberler sentezlendikten sonra 24 saat boyunca çöktürme ortamında bekletilmiştir. Fiberler distile su ile birkaç kez yıkanmış, daha sonra %30'luk etanol içerisinde 4 saat, %50'lik etanol içerisinde 1 gece bekletilmişlerdir. Sonrasında silindirik plastik kalıp üzerinde oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır. Farklı çapta (298 µm, 207 µm ve 176 µm) kitosan fiberlerden farklı yükleme oranlarında hazırlanarak PLLA-PEG kopolimerlerine yüklenerek doku iskeleleri hazırlanmıştır.



Şekil.3.2. “Islak Eğirme Yöntemi” ile kitosan fiber üretimi

3.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışması kapsamında Şekil 3.3’de görülen soğutma sistemi (kriyostat) kullanılarak kriyojel tekniği ile farklı özelliklerde doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kriyojeller iki farklı polimerden; PLLA-PEG ve jelatinden üretilmiştir. Tez kapsamında sentezlenen PLLA-PEG kopolimerlerine satın alınma yoluyla temin edilen sentetik biyobozunur vikril ameliyat ipliklerinden elde edilen fiberler ve doğal kökenli kitosandan başlanarak “Islak eğirme” ile üretilen fiberler yüklenmiştir. Jelatin esaslı kriyojellere ise yine satın alma yoluyla temin edilen doğal kökenli katgut ameliyat ipliklerinden elde edilen doğal biyobozunur fiberler kullanılmıştır. Fiberlerin polimer faza yüklenmesi kriyojelasyon sırasında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan fiber çap ve boyutları ve yükleme oranı değiştirilmiştir. Doku iskelelerinin hazırlanması ile ilgili izlenen yöntemler aşağıda iki ayrı alt grupta sunulmuştur.



Şekil 3.3. Doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan kullanılan soğutma (kriyostat) sistemi

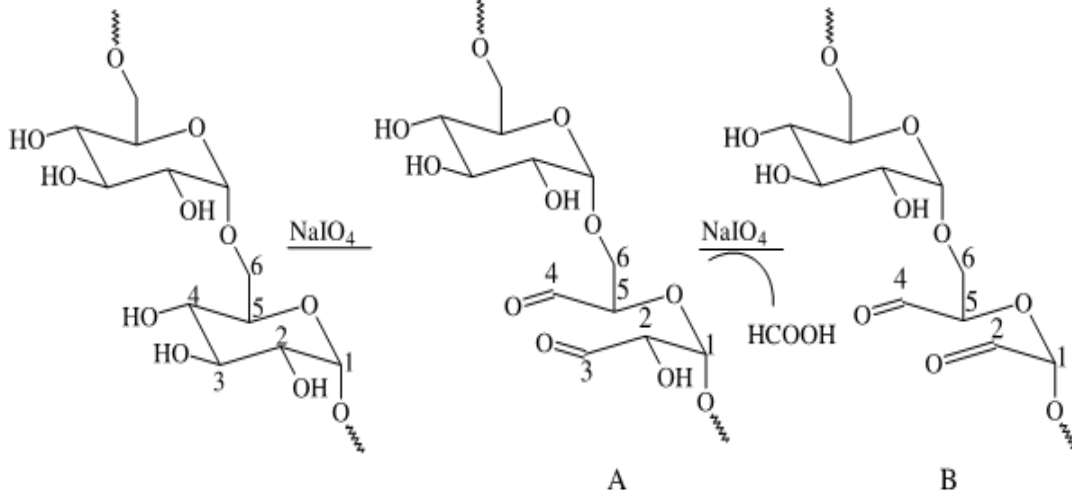
3.3.1. Jelatin esaslı doku iskelelerinin hazırlanması

Jelatin esaslı kriyojellerin hazırlanması için; jelatin (Sigma G7765, ABD), dekstran (Biochemica A2249, molekül ağırlığı: 40000, Almanya), sodyum periodat (Merck, Almanya), diamonyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya), kalsiyum hidroksit (Merck, Almanya) ve selüloz diyaliz membranı (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Doku iskelelerinin hazırlanmasında önce çapraz bağlayıcı okside dekstran sentezi gerçekleştirilmiş, daha sonra kriyojeller hazırlanmıştır. Bu iki adım aşağıda iki alt grupta sunulmuştur.

3.3.1.1. Dekstran oksidasyonu

Sunulan çalışmada jelatin fazının çapraz bağlanması için kullanılan okside dekstran Şekil 3.4'de şematik olarak gösterilen periyodat oksidasyonu ile hazırlanmıştır. 5 g (0.0309 mol) dekstran (Molekül ağırlığı: 40000) 50 ml saf su içerisinde çözülmüş ve içerisine 6.6 g (0.0309 mol) sodyum periodat (molekül ağırlığı: 213,9 g/mol) ilave edilmiştir. Reaksiyon karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Elde edilen okside dekstran, 4°C'da üç gün süresince distile suya karşı (belli aralıklarla değiştirilen) diyaliz işlemine tabi tutulmuştur.

Ürün bir gün boyunca -10°C 'da bırakılmış ve daha sonra 1.5 gün süresince liyofilize edilerek kurutulmuştur. Kuru okside dekstran sonraki kullanımlar için derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.4. Dekstranın sodyum periodat ile oksidasyonunun şematik görünümü

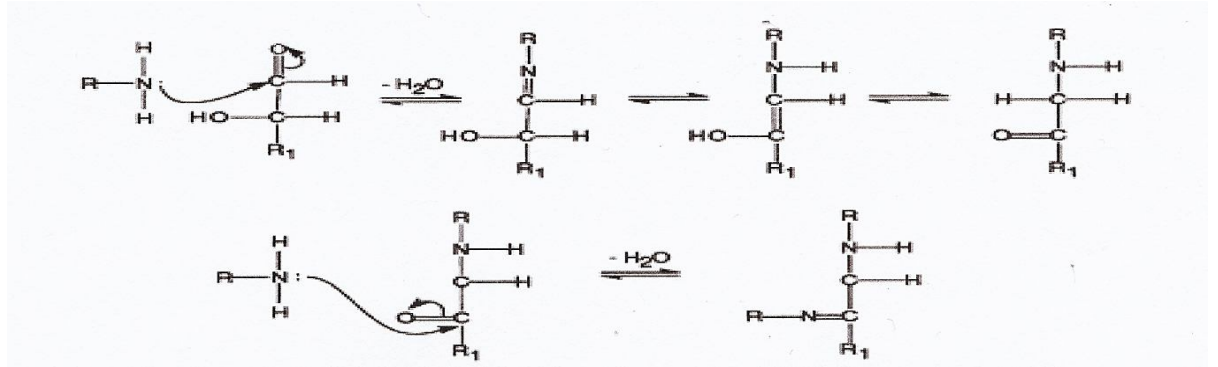
3.3.1.2. Hidroksiapatit yüklü jelatin kriyojellerin hazırlanması

Hidroksiapatit (HA) yüklü jelatin kriyojellerin hazırlanmasında ilk adım HA partikülleri içeren süspansiyonların hazırlanmasıdır. Bunun için 0.3 M diamonyum hidrojen fosfat çözeltisi hazırlamak üzere; 0.594 g diamonyum hidrojen fosfat (Molekül ağırlığı: 132.06 g/mol) 15 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Benzer şekilde, 0.5 M kalsiyum hidroksit çözeltisi hazırlamak üzere; 0.555 g kalsiyum hidroksit (Molekül ağırlığı: 74.09 g/mol) 15 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 15 ml diamonyum hidrojen fosfat çözeltisi, 15 ml'lik kalsiyum hidroksit çözeltisi içerisine manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karışma ortamı sağlanarak damla damla ilave edilmiştir. Homojenitenin sağlanabilmesi amacıyla süspansiyon 2 saat süresince karışma işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem sırasında HA partikülleri oluşmuş ve HA partiküllerini içeren sulu süspansiyonlar elde edilmiştir.

Jelatin doku iskelelerinin hazırlanması için 0.44 g %45'lik jelatin 4.5 ml'lik HA süspansiyonuna ilave edilmiştir ve iyice karışması sağlanmıştır. Çözelti daha sonra buz kalıpları üzerine alınmıştır. Şekil 3.5'de şematik olarak gösterildiği gibi jelatin'in çapraz bağlanması amacıyla sunulan çalışma kapsamında okside dekstran kullanılmıştır. %4'lük okside dekstran çözeltisi hazırlamak üzere; önceki

adımda hazırlanan 0.16 g okside dekstran 4 ml distile su içerisinde çözülmüştür. 0.5 ml'lik %4'lük okside dekstran çözeltisi jelatin/hidroksiapatit karışımına ilave edilmiştir. Bu karışım 8 mm çaplı bir ucu kapalı küçük cam tüplere aktarılmıştır. Tüpler -12°C'da etanol ile soğutulmuş kriyostat cihazı içerisine konulmuştur. 1 saat boyunca kriyostat cihazı içerisinde -12°C'da bekletilmişlerdir. 1 saat sonrasında kriyostat cihazı içerisinden çıkarılan tüpler 24 saat süresince derin dondurucuda, 24 saat süresince de %70'lik etanol içerisinde bekletilmişlerdir. Kriyojeller 4°C'da saklanmışlardır.

Bu kriyojellere farklı çaplarda (395 µm, 245 µm ve 192 µm), boylarda (1 – 3 – 6 mm) ve miktarlarda (0.066 – 0.05 – 0.1 g fiber/0.2 g jelatin) katgut'den hazırlanan fiberler ilave edilmiştir. Bunun için reaksiyon ortamına çapraz bağlayıcı ilave edilirken fiberler de konmuş ve homojen dağılımları sağlanmıştır. Daha sonra soğutma ve kriyojelasyon işlemleri yukarıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Jelatin'in oksidekstran ile çapraz bağlanması

3.3.2. PLLA-PEG doku iskelelerinin hazırlanması

PLLA-PEG kriyojel hazırlanması da jelatin kriyojellerin üretiminde kullanılan kriyostat sisteminde gerçekleştirilmiştir. %5 (ağırlık/hacim) konsantrasyona sahip 0.25 g polimer çözeltisi 5 ml 1,4-dioksan içerisinde çözülmüştür. Çözelti 8 mm çaplı tüplere konmuş, -20°C'de 3 saat süre ile kriyostatda tutulmuştur. Bu sürenin sonunda donmuş yapı, aynı sıcaklıktaki etanol içerisine alınarak -12 °C'lik soğutucu içerisinde 12 saatlik süre ile çözücü fazın ekstraksiyonu için bekletilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 1 gün süresince +4°C'de devam etmiş, düzenli aralıklarla etanol, aynı sıcaklıktaki taze etanol ile yenilenmiştir. Elde edilen doku iskeleleri azalan etanol konsantrasyonlarında (% 95, 75, 50, 25 ve 0) su ile yıkanmış ve 4°C'da saklanmışlardır.

Bu kriyojellere farklı boylarda (1– 2– 4 mm) ve miktarlarda (0,0625 - 0,083 - 0,125 g fiber/0.25g PLLA-PEG) vikrilden hazırlanan fiberler veya farklı çaplarda (298– 207– 176 µm) ve miktarlarda (0,0625 - 0,083 - 0,125 g fiber/0,25g PLLA-PEG) kitosan fiberler ilave edilmiştir. Bunun için tüpler içindeki polimer çözeltilerine kriyostata alınmadan fiberler de konmuş ve homojen dağılımları sağlanmıştır. Daha sonra soğutma ve kriyojelasyon işlemleri yukarda belirtilen şekilde uygulanmıştır.

3.3.3. Doku iskelelerinin karakterizasyonu

Jelatin ve PLLA-PEG polimerlerinden hazırlanan kriyojeller ve bunların fiber dolgulu formları çeşitli yöntemler ile karakterize edilmiştir. Bu yöntemler aşağıda kısaca tanıtılmıştır.

Doku iskelelerinin kimyasal yapı analizi Bölüm 3.1.2’de belirtilen şekilde FTIR ve NMR ile yapılmıştır. Yine aynı bölümde belirtilen şekilde ısı davranışları DSC ile bulunmuştur.

Kriyojellerin en önemli özelliklerinin başında hızlı ve önemli miktarda şişmeleridir. Bunun için kriyojeller elde sıkılmış ve kağıt ile kaba ıslaklıkları alınmış ve tartılmıştır. Daha sonra sulu ortama konularak şişmeleri izlenmiştir. Kriyojellerin hemen hemen hepsinin 1-2 dak içinde şiştikleri gözlenmiştir. Şişmiş halde yine kağıt ile kurutulan kriyojellerin ağırlıkları bulunmuştur. Aşağıdaki ifade ile “yüzde şişme” değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{“Yüzde Şişme”} = \{(\text{son tartım} - \text{ilk tartım}) / \text{son tartım}\} \times 100$$

Kriyojel doku iskelerinin mekanik özellikleri ve dayanımları Şekil 3.6’da fotoğrafı verilen bir mekanik test cihazında (Llyod Instruments, LK-5K, İngiltere) sıkıştırma modunda analiz edilmiştir. Testler oda sıcaklığında 500 N kuvvet ile 10 mm/dak sabit sıkıştırma hızı ile gerçekleştirilmiş; sıkıştırma gerilimine karşı %boyut değiştirme değerleri kaydedilmiştir.

Kriyojellerin gözenek yapıları bir Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Hitachi TM-1000, Japonya) ile görüntülenmiştir. Bu amaçla sulu örnekler kademeli olarak etanol kullanılarak suyu giderilerek ve kaplama yapılmadan incelenmişlerdir.

Kriyojellerin sulu ortamlarda bozunma hızları tamponda (PBS çözeltisinde, pH: 7,4) zamana karşı ağırlık azalması ile belirlenmiştir. Bu amaçla; her bir örnekten 1 cm'lik 4 adet kesit alınmıştır. Ağırlıkları tartılmış ve kaydedilmiştir. Daha sonra hazırlanan PBS çözeltisi içerisine sodyum azid (mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için) ilave edilerek, kesitler küçük cam şişeler içerisindeki bu çözelti içerisine alınmıştır. Hazırlanan her bir kesitin 2., 4., 6. ve 8. haftanın sonunda ağırlıkları tartılmış ve kaydedilmiştir. Bozunma hızları karıştırmasız ortamda oda sıcaklığında yapılmıştır.



Şekil 3.6. Sıkıştırma testlerinde kullanılan mekanik test cihazı (Llyod Instruments LK-5K, İngiltere)



Şekil 3.7. Biyobozunma test sistemi.

Kriyojellerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma, ABD) 'den temin edilmiştir. Yapılan çalışmada MTT, hem doğrudan hem de dolaylı sitotoksitenin tayini için kullanılmıştır.

MTT testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu plakların satırında 12 kuyucuk, sütununda ise 8 kuyucuk bulunmaktadır. İlk sütuna sadece hücre ekimi yapılmış; hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir. Bu sütun pozitif kontrol olarak kullanılmış ve en yüksek absorbans bu sütunda elde edilmiştir.

Çalışmada vikril katkılı PLLA-PEG kriyojel, kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojel, fiber katkısız PLLA-PEG kriyojel, fiber katkısız jelatin/HA kriyojel ve katgut katkılı jelatin kriyojellerin sitotoksiste araştırması yapılmıştır. Her bir örnek için 4 kuyucuk kullanılmıştır. Yüzde canlılık hesaplanırken bu 4 kuyucuktan alınan absorbans değerleri değerlendirilmiştir. Örneklerde 48 saat süre sonucunda oluşan sitotoksiteleri belirlenmiştir. MTT testi için 96 kuyucuklu plakalara L929 Fare Fibroblast hücreleri ekilmiştir (10.000 hücre/kuyu) ve hücreler DMEM/F12 (Dulbeco's Modified Eagle Medium), %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve % 0.5 Penisilin Streptomisin antibiyotik çözeltisi içerisinde inkübe edilmiştir. Doğrudan sitotoksiste tayini için; örneklerden eşit boyutta küçük parçalar, hücreler ile etkileştirilmiştir. Dolaylı sitotoksiste testi için örnekler hücre besiyeri içerisinde inkübe edildikten sonra bu besiyeri kuyulara aktarılarak hücrelerin bu besiyeri ile

inkübe edilmesi sağlanmıştır. Sonuçlar 570 nm’de absorbans okuyan çoklu plak okuyucu spektrofotometre kullanılarak elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan çalışmada kriyojellerin hazırlanmasında kullanılan ilk polimer PLLA-PEG kopolimeridir. Bu kopolimerler ve benzerleri H.Ü., Biyomühendislik AD'de başka bir doktora tezi kapsamında, Dr. Sinan Eğri tarafından sentezlenmiş, kriyojeller hazırlanmış ve deney hayvanlarında kranial defektlerin iyileşmesinde doku iskeleleri olarak kullanılabilirlikleri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. O tezde de kriyojel oluşturmada bu polimerin seçilmesinin nedeni bu tezinde genel bilgilerinde açıklandığı gibi hem PLLA'nın biyomateryal olarak en yaygın kullanılan biyozunur polimer olması hem de PEG in suda çözünebilen en önemli biyoyouumlu sentetik polimerlerden biri olmasıdır. PLLA ve PEG homo ve kopolimerleri toksik özellik göstermemeleri ve biyobozunur olmaları dolayısı ile birçok farklı biyomedikal uygulamada (ilaç salım sistemleri, implant vb.) tercih edilmektedirler (Anderson et al., 1976; Schope et al. 1976; Wise et al. 1976; Wise et al. 1978; Wise et al. 1980; Grijmpa, 1991). PEG; biyoinert bir polimer olarak bilinmektedir ve hücreler ve proteinler ile etkileşime girmemesi nedeni ile, yüzey özelliklerinin değiştirilmesinde çok yaygın kullanım alanı vardır (Altankov et al., 2000; Amiji ve Park, 1992; Hubbel, 1995). PLLA ve PEG kopolimerlerinin suda çözünmedikleri ancak %60'a varan kapasitede su absorplayabildikleri rapor edilmiştir (Sawhney ve Hubbell, 1990; Churchill et al, 1985; Cohn ve Younes, 1988).

Sunulan tez oluşturulurken PLLA-PEG kopolimerlerinden hazırlanan kriyojellerin mekanik özelliklerinin geliştirilmesi gereksinimi dikkate alınmış ve polimerik fiberler ile güçlendirilmeleri ("reinforced" edilmeleri) öngörülmüştür. Polimerik fiberler ile plastiklerin güçlendirilmesi plastik teknolojisinde önemli uygulama alanları bulan bir yaklaşımdır. Kolay biçim verilebilir olmaları, metallere oranla daha düşük yoğunlukta olmaları, korozyona karşı dayanımlarının yanı sıra, sertlik ve dayanıklılık özelliklerinin düşük olması plastik malzemelerin güçlendirilmesi için çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Bu amaçla 1950'li yıllarda polimer esaslı kompozit malzemeler geliştirilmiştir. Polimerik kompozitlerin tercih edilmelerinin nedenleri arasında; termal kararlılık, yüksek mukavemet, sertlik, aşınmaya karşı direnç gibi özelliklerinin yanı sıra hafif olmaları sayılabilir (Mayer, 1993). Tez kapsamında, ilk kez bu çalışmada bu kriyojellerin iki tür fiber kullanılarak güçlendirilmesi amaçlanmıştır. Bunlardan birincisi "vikril" (Ethicon, ABD) ticari ismiyle bilinen klinik olarak yaygın bir şekilde uygulanan biyobozunur çok flamanlı

ameliyat ipliklerini oluşturan fiberlerdir. Bir laktat-glikolat kopolimerinden üretilen bu fiberler, PLLA-PEG kopolimeri ile iyi uyuşacağı ve yapıda kolay ve kriyojel yapıda homojen dağılacığı öngörüsüyle seçilmiştir. Bu fiberlerin çapları ortalama 480, 337 ve 247 μm dir, bunlardan farklı uzunluklarda fiberler kesilmiş, PLLA-PEG kriyojeller oluşturulurken yapıya farklı miktarlarda ilave edilmiştir.

İkinci tür fiber kitosandan tez kapsamında farklı çaplarda üretilmiştir. Genel Bilgiler bölümünde tanıtıldığı gibi, kitosan bir doğal polimer olan kitinden elde edilen biyoesaslı, yara iyileşmesindeki önemli pozitif katkıları olan biyouyumlu dolayısıyla çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımı araştırılan önemli bir polimerdir. Tez kapsamında “ıslak eğirme” ile farklı çaplarda üretilmiş, 3 farklı yükleme miktarında (Matriks/fiber oranı: 2/1, 3/1, 4/1; sırası ile 0.25/0.125 g; 0.25/0.083 g ve 0.25/0.0625 g) PLLA-PEG kriyojellere ilave edilmiştir.

Tez kapsamında kriyojel oluşturulmasında değerlendirilen ikinci materyal jelatindir. Jelatin bağ dokusun temel maddesi olan doğal polimer kolojenin denatüre formudur. Kolojen ve jelatin Genel Bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak tanıtılmıştır. Satın alınma yoluyla temin edilip bu tezde kullanılmıştır. Jelatin kriyojellerin hazırlanmasında yeni bir teknik kullanılmıştır. Bu teknik HÜ, Biyomühendislik AD’de devam eden başka bir doktora çalışmasının (İlyas İnci) kapsamında geliştirilen yeni bir yöntemdir. Burada hidroksiapatit (HA) partiküllerinin süspansiyonu oluşturulup; bu ortamda jelatin, oksi dekstran ile çapraz bağlı kriyojeller haline dönüştürülmektedir. Oksidekstran bu çalışmada da dekstranın periyodat oksidasyonu ile sentezlenmiştir. İlyas İnci bu kriyojellerin farklı özelliklerde üretimi için ayrıntılı çalışmalar yapmaktadır. Sunulan tez kapsamında başarılı bir protokol izlenerek yalnızca bir tür kriyojel üretilmiştir. Bu tezin amacına yönelik olarak bu kriyojellerin mekanik özelliklerini geliştirmek üzere fiber dolgusu yapılması öngörülmüştür. Jelatin ile uyumlu olması nedeniyle yine kolojen esaslı hayvan barsaklarından doğrudan elde edilen katgut kullanılmıştır. Katgut farklı çaplarda satılan ve çok eski tarihlerden bu yana ameliyat ipliği olarak kullanılan bir malzemedir. Sunulan tezlerde farklı çaplarda olanlar satın alınma yoluyla temin edilmiş, farklı uzunluklarda kesilmiş ve jelatin kriyojeller üretilirken farklı miktarlarda yapıya eklenmiştir.

Aşağıda farklı bölümlerde bu ürünler ile ilgili sonuçlar verilmiş çeşitli karakterizasyon yöntemleri uygulanarak elde edilen özellikleri ayrıntılı olarak tanıtılmıştır.

4.1. PLLA-PEG Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Satın alınma yoluyla temin edilen LLA dimeri ve 6000 Da molekül ağırlığındaki PEG (PEG 6000), Dr. Sinan Eğri'nin tezinde uyguladığı ve kriyojel oluşumunda başarılı olarak kullanılabileceğini gösterdiği yöntemle Çizelge 4.1'de verilen koşullarda, kalay oktoat katalizörlüğünde yığın polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. PLLA-PEG blok kopolimerinin sentez koşulları

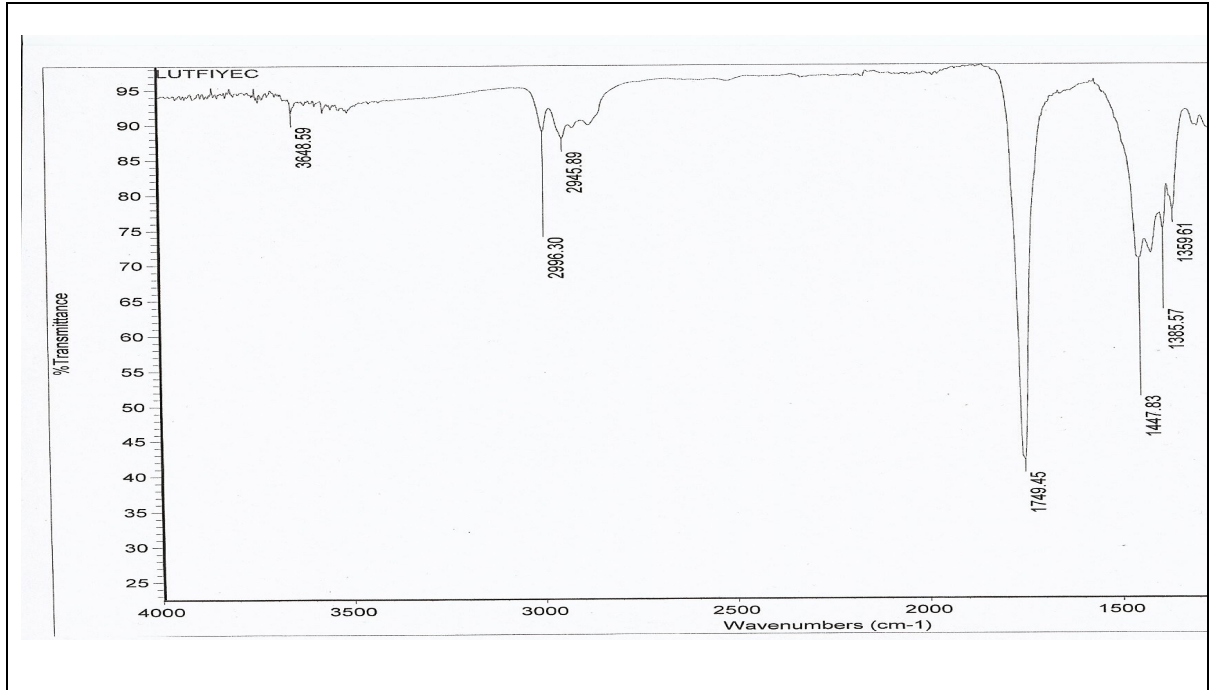
Dimer/PEG oranı (mol/mol)	300/1
Polimerizasyon süresi	24 saat
Polimerizasyon sıcaklığı	120°C
Monomer/katalizör oranı	1000 (w/w)
Atmosfer	Azot

Sentezlenen kopolimerinin Deneysel Çalışmalar Bölümünde belirtilen şekilde yapılan GPC yöntemiyle bulunan sayıca (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlıkları ve heterojenlik indisi (M_w/M_n), sırasıyla 18.810, 53.383 ve 2.838'dir. Dr. Eğri tarafından aynı koşullarda yapılan sentezlerden elde edilenlere oldukça yakın değerlerdir. Burada L-laktat dimeri kalay oktoat katalizörlüğünde halka açılması ile polimerleşmektedir. Ortamda PEG bulunduğu için PEG in OH uç grupları ile LLA' in (açılan dimer halkasının) COOH grupları transesterifikasyon ile birleşmekte ve kopolimer oluşmaktadır. Bunun yanı sıra LLA'in kendi başına homopolimerizasyonu da söz konusudur. Bu durumda reaksiyona girmeyen PEG'ler de ortamda bulunacaktır. Ancak önceki çalışmada belirlenen koşullarda transesterifikasyonun ağırlıklı olarak oluştuğu belirlenmiştir (yaklaşık %60 verimle). Buna rağmen oluşan PLLA homopolimeri ve PEG, üründen önceki bölümlerde belirtilen şekilde uzaklaştırılmıştır. Uzaklaşmamış PLLA ve PEG kalsa da bunun

kriyojel ve medikal uygulamalarında çok olumsuz yan etkiler yaratmayacağı düşünülmektedir.

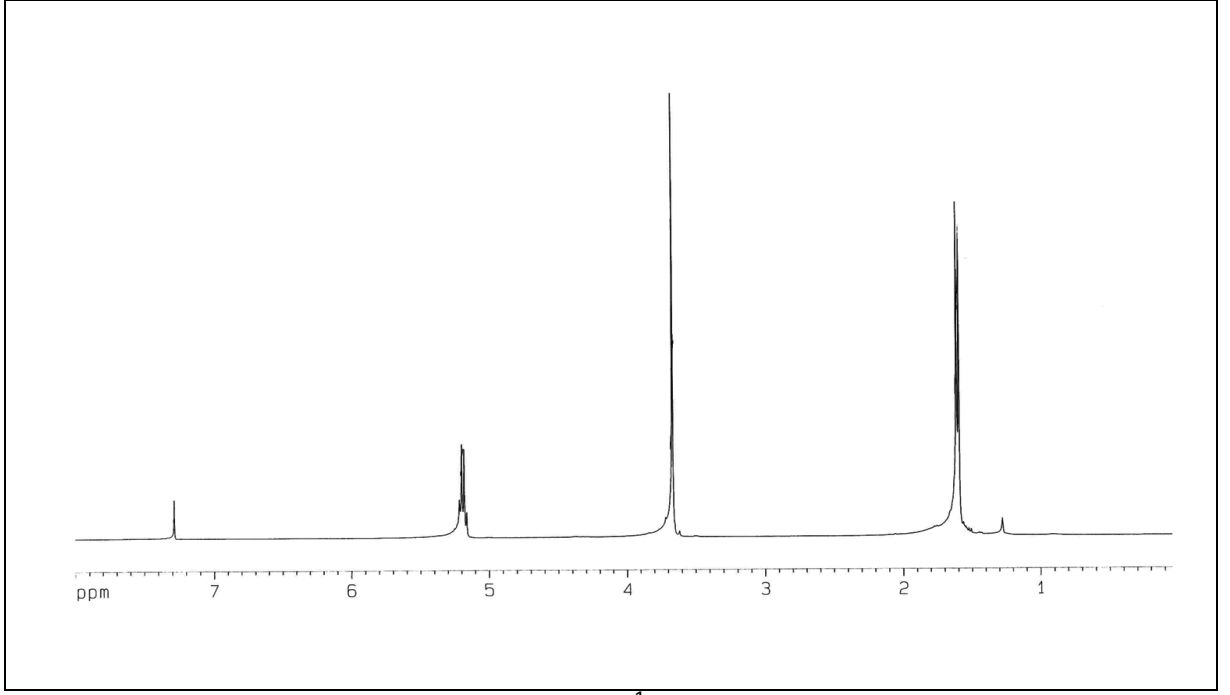
Sentezlenen kopolimerin kimyasal yapısının gösterilmesi için Deneysel Çalışmalar Bölümünde belirtilen şekilde FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ analizi yapılmıştır. Tipik spektrumlar sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2 de örnek olarak verilmiştir.

FTIR spektrumdaki 1749.45 cm^{-1} piki (C=O gerilmesi) karakteristik LLA segmentini temsil etmektedir ve kopolimerdeki ester yapısının varlığını konfirme etmektedir (Du et al., 1995). Karakteristik etilen glikol segmentlerini ise 3648.59 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 2945.89 cm^{-1} ve 2996.30 cm^{-1} (C-H gerilmesi) pikleri temsil etmektedir (Nguyen et al., 2010).



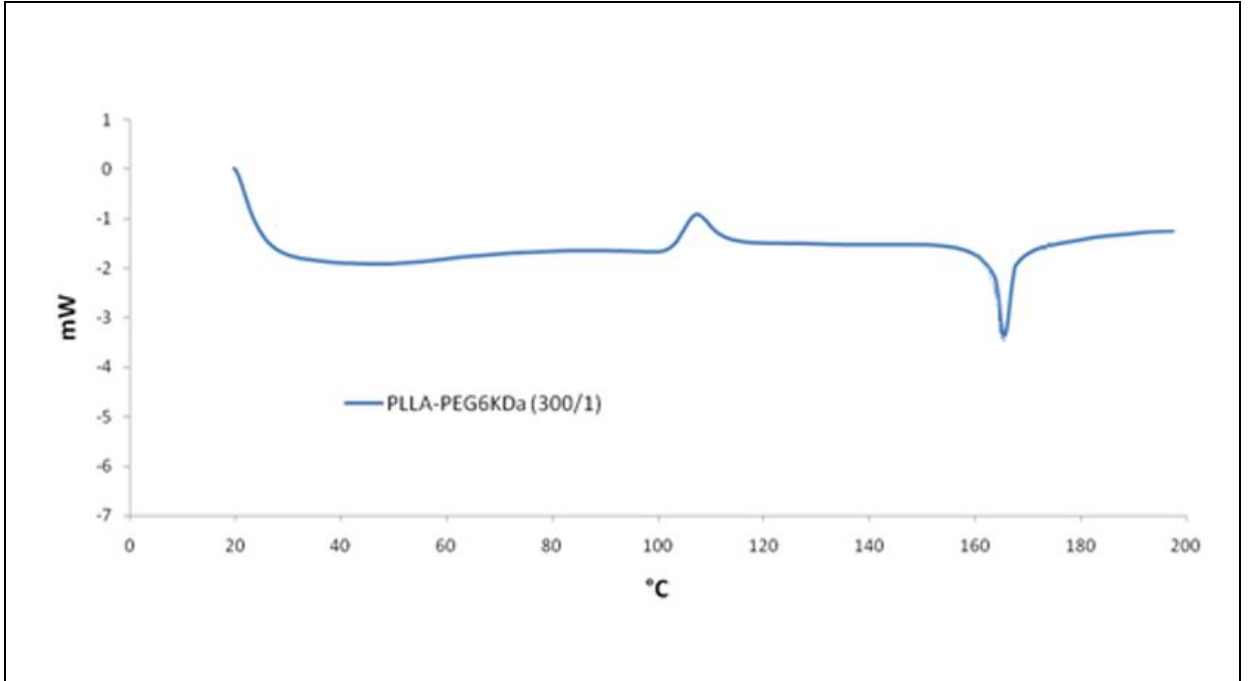
Şekil 4.1. PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir FTIR spektrumu

NMR spektrumda görülen karakteristik pikler şöyledir: (i) PEG zincirindeki metilene ait karakteristik pik $\delta=3.6\text{ ppm}$ 'de görülmektedir; (ii) laktat zincirindeki CH'a ait proton $\delta=5.2\text{ ppm}$ 'de görülmektedir. (Rashkov et al., 1996; Li et al., 1996; Zhu et al., 1997; Ge et al., 2002).



Şekil 4.2. PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir ¹H-NMR spektrumu

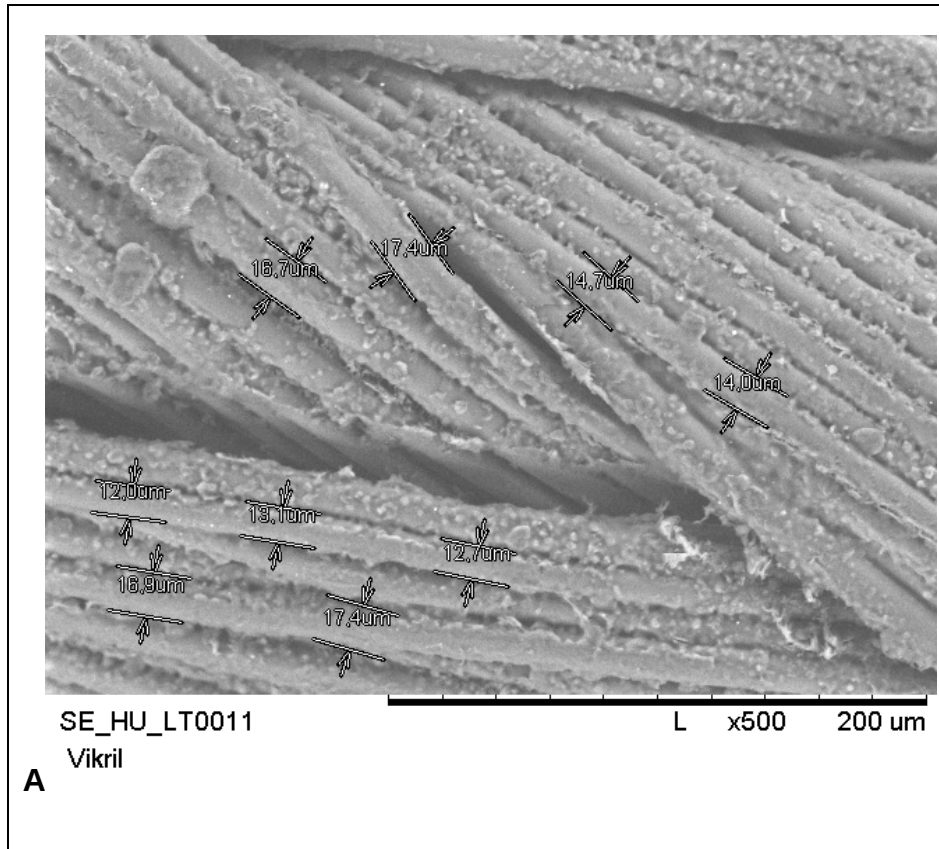
PLLA-PEG kopolimerinin DSC ile bulunan tipik bir termogramı Şekil 4.3'de verilmiştir. DSC taramaları sonucu elde edilen erime sıcaklığı PEG6KDa (300/1) 165.5 °C'dır.

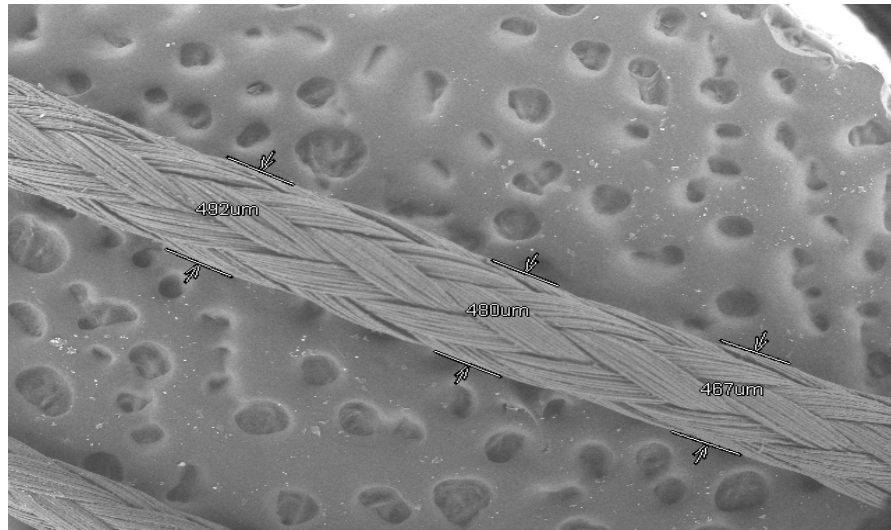


Şekil 4.3. PLLA-PEG kopolimerinin tipik bir DSC termogramı

4.2. Fiberlerin Hazırlanması/Üretilmesi

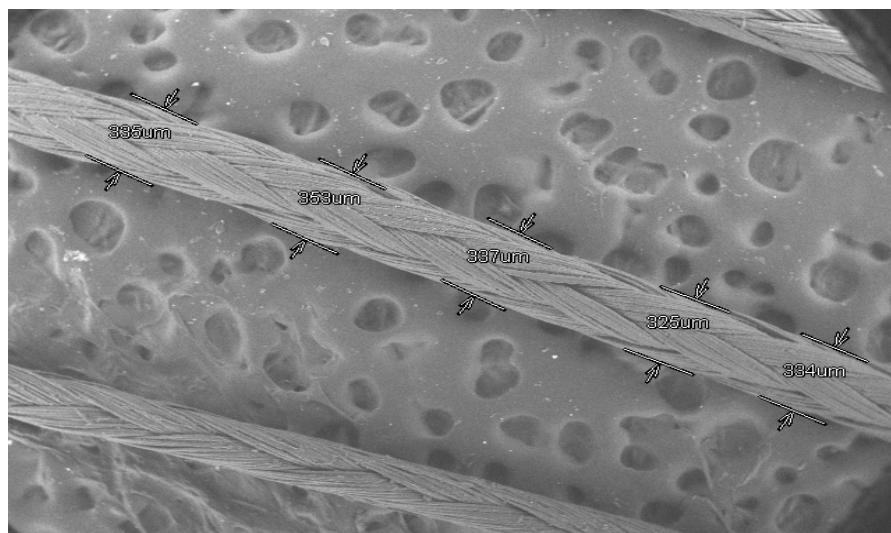
Sunulan tez kapsamında PLLA-PEG kriyojeller vikril ve kitosan esaslı fiberler ile jelatin kriyojeller ise katgut fiberler ile yüklenmiştir. Vikril çok flamanlı bir ameliyat ipliğidir. Farklı kalınlıklarda orijinal vikril kullanılmasına karşın bunlardan ipliğin dağıtılması ile elde edilen fiberlerin hemen hemen aynı çapta ($15\ \mu\text{m}$) olduğu not edilmelidir (Şekil 4.4A). Bunlardan 3 farklı uzunlukta (1, 2 ve 4 mm) kesilmiş, ve PLLA-PEG kriyojel oluşumu sırasında yapıya farklı miktarlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 sırası ile 0.25 g PLLA-PEG/0.125 g fiber; 0.25 g PLLA-PEG/0.083 g fiber ve 0.25 g PLLA-PEG/0.0625 g fiber) ilave edilmiştir.





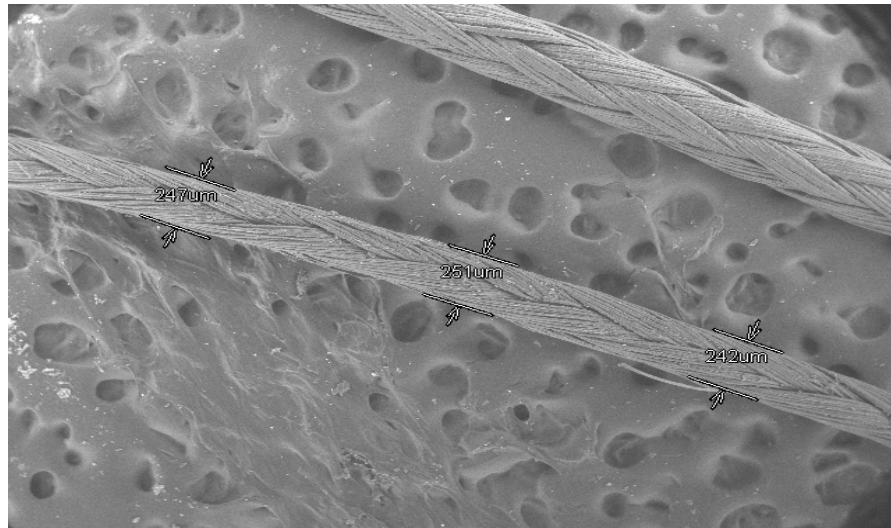
SE_HU_LT0009
Vikril: 2/0

A



SE_HU_LT0013
Vikril: 3/0

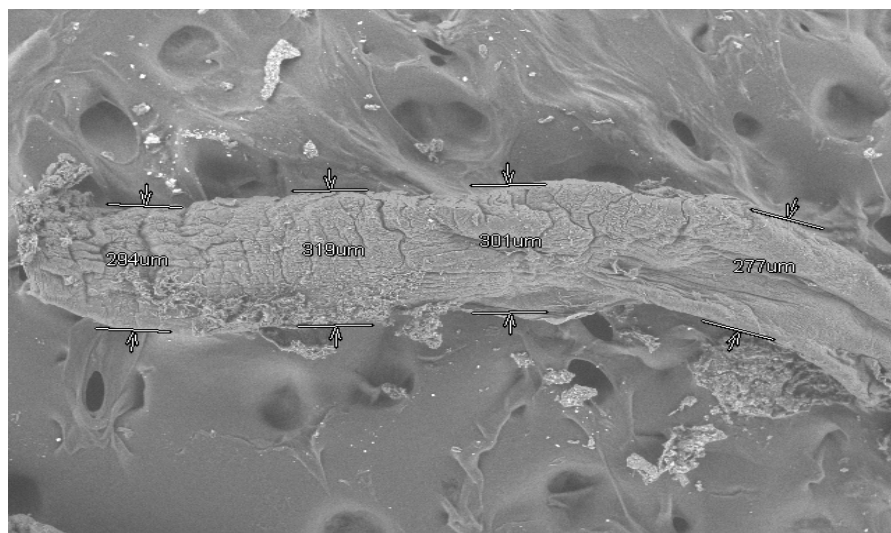
A



SE_HU_LT0018

L x50 2 mm

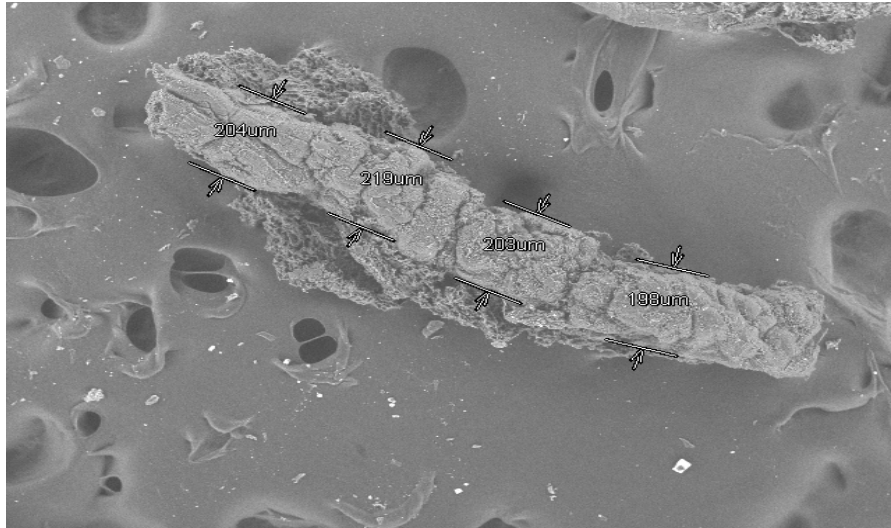
A Vikril: 4/0



SE_HU_LT0020

L x100 1 mm

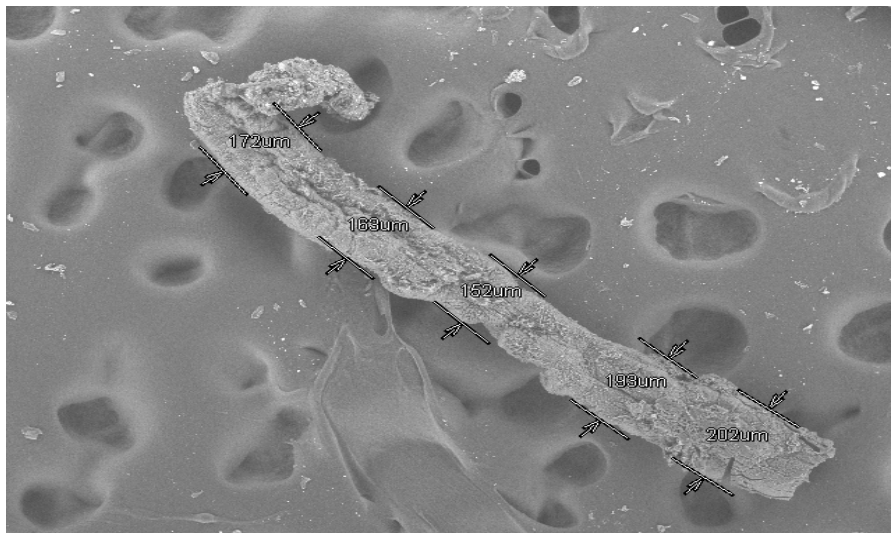
B Kitosan: 0.9 mm



SE_HU_LT0022

L x100 1 mm

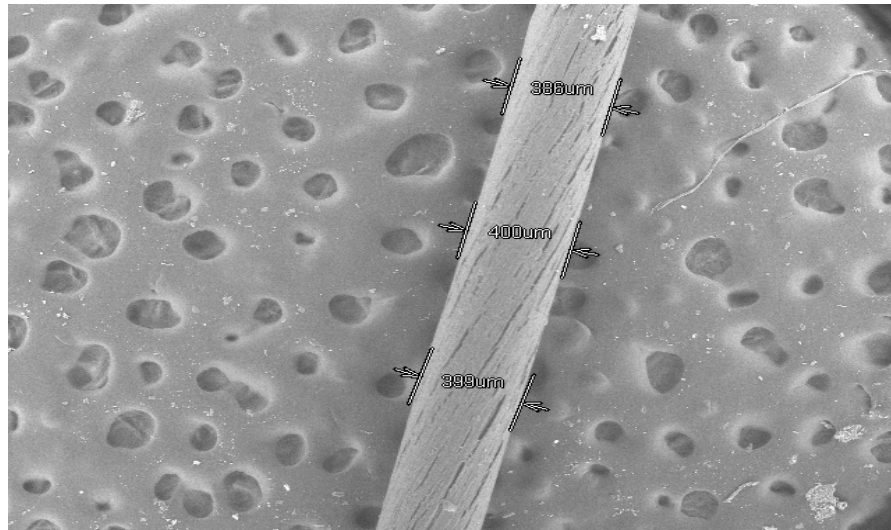
B Kitosan: 0.8 mm



SE_HU_LT0024

L x100 1 mm

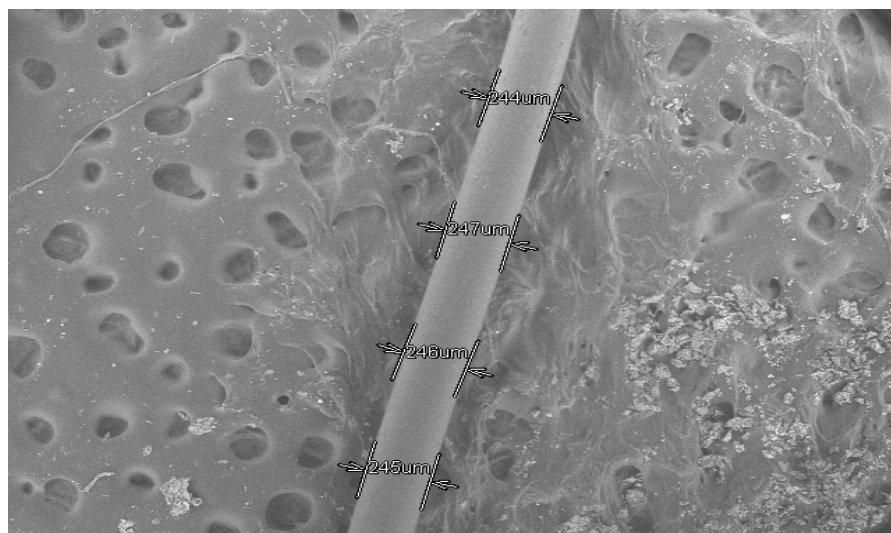
B Kitosan: 0.7 mm



SE_HU_LT0002

L x50 2 mm

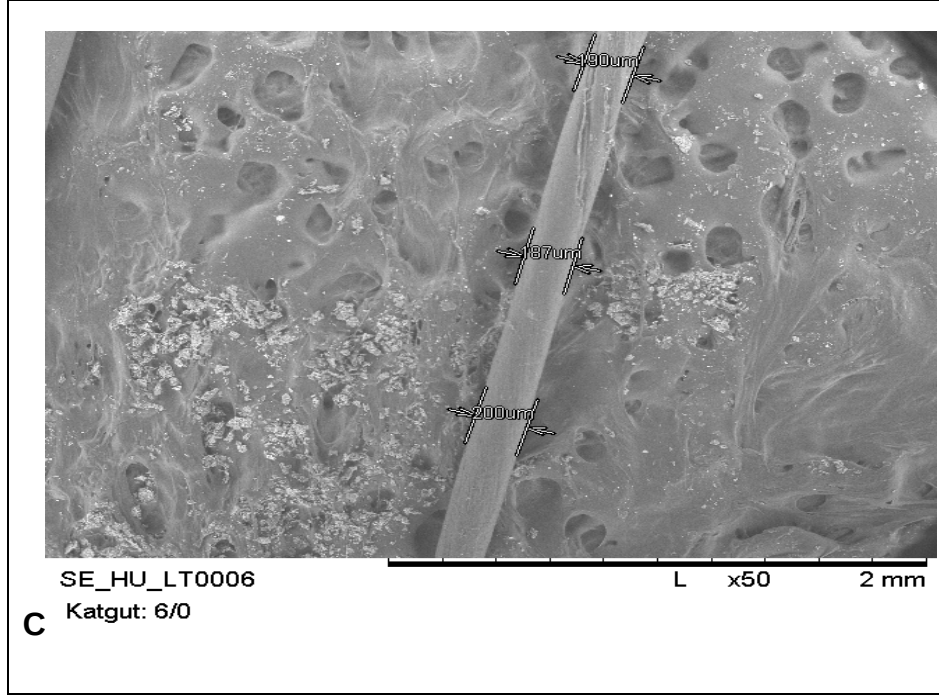
C Katgut: 2/0



SE_HU_LT0004

L x50 2 mm

C Katgut: 4/0



Şekil 4.4. Kriyojellerin güçlendirilmesinde kullanılan fiberlerin SEM fotoğraflarına örnekler: (A) vikril esaslı (çapları sırası ile 2/0, 3/0, 4/0); (B) kitosan esaslı (şırınga iğnesi çapları sırası ile 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm); ve (C) katgut esaslı (çapları sırası ile 2/0, 4/0, 6/0)

Kitosan fiberler ise tez kapsamında “ıslak eğirme” ile sentezlenmiştir. Önceki bölümlerde ayrıntılı olarak tanımlandığı gibi, satın alınma yoluyla temin edilen kitosan asetik asit içerisinde çözülmüş (% 2 konsantrasyonda) şırıngalı pompanın şırıngasına konulmuş, farklı çapta fiber üretimi için üç farklı iğne kullanılarak çöktürme ortamına (15 ml 0.5 M Na_2SO_4 , 5 ml 1 M NaOH ve distile su) şırınga edilmiş ve oluşan fiber yumakları çeşitli yıkama basamaklarından sonra kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu örgülerden tek boyda (yaklaşık 1 mm) kesilerek hazırlanan fiberlerin görüntüleri Şekil 4.4B de verilmiştir. Hazırlama tekniği orijinal ıslak eğirme yönteminin çok basit şekilde bir uygulamasıdır. Beklendiği gibi çekme/uzama işlemi yapılamadığından aynı işlemde elde edilen fiberlerin çapları arasında fark vardır. Her örnekten çok sayıda fiberin çapı ölçülmüş ve ortalama değerler bulunmuştur. Buna göre PLLA-PEG kriyojellerin yüklenmesinde kullanılan, üç farklı iğne kullanılarak hazırlanan üç grup kitosan fiberin ortalama çapları 298, 207 ve 176 μm 'dir. Bu fiberler PLLA-PEG kriyojellerin hazırlanması sırasında yapıya farklı oranlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 sırası ile 0.25 g PLLA-PEG/0.125 g fiber; 0.25 g PLLA-PEG/0.083 g fiber ve 0.25 g PLLA-PEG/0.0625 g fiber) ilave edilmiştir.

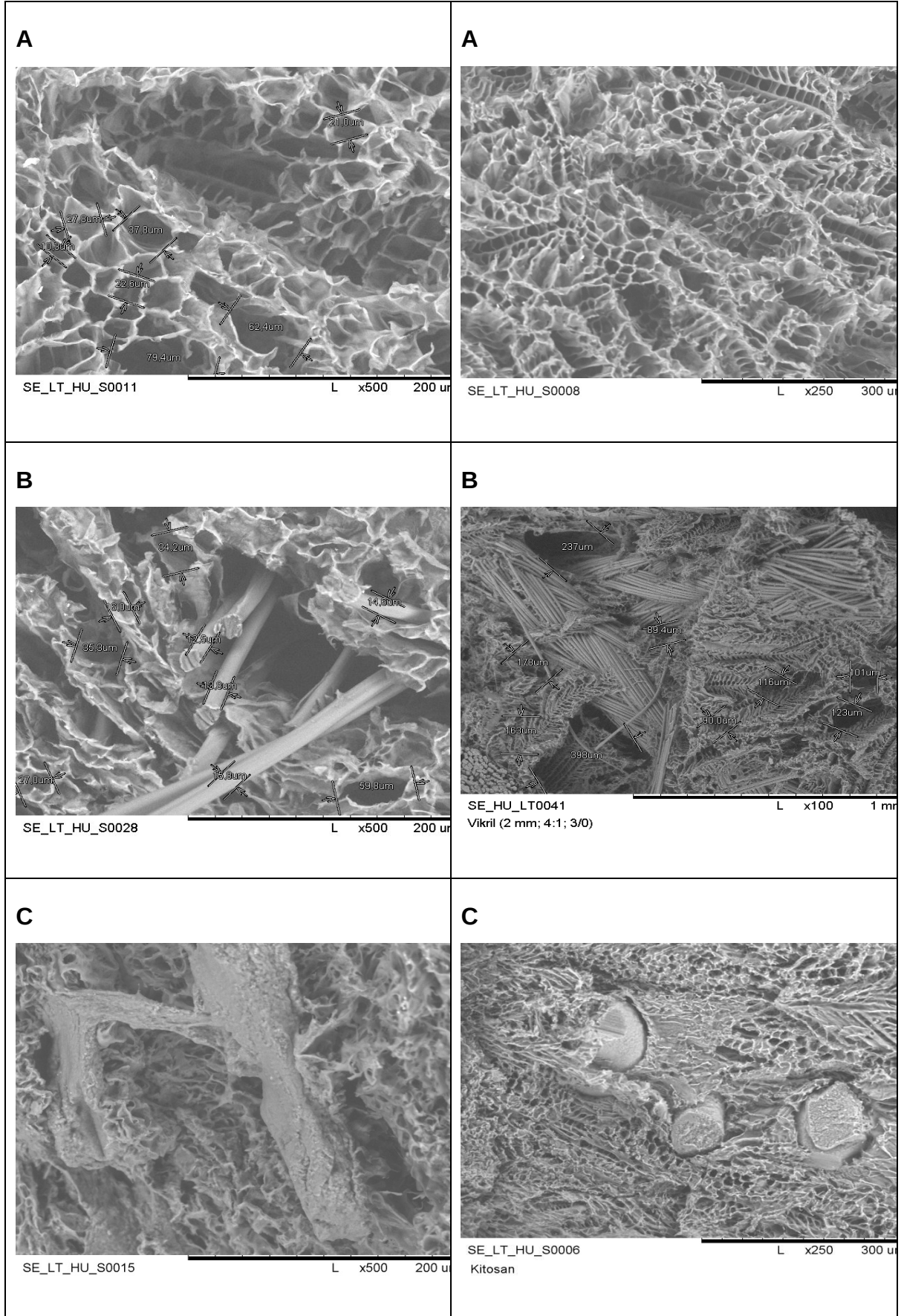
Sunulan tez kapsamında üretilen jelatin esaslı kriyojellere yalnızca katgut ameliyat ipliklerinden elde edilen fiberler yüklenmiştir. 3 farklı çaplarda katgut ipliklerden farklı uzunluklarda (1, 3 ve 6 mm) kesilen fiberler (Şekil 4.4C) jelatin esaslı kriyojeller oluşturulurken yapıya farklı oranlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 olacak şekilde sırası ile 0.2 g jelatin/0.1 g katgut; 0.2 g jelatin/0.066 g katgut ve 0.2 g jelatin/0.05 g katgut) konmuştur.

4.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında kriyojel tekniği kullanılarak iki tür doku iskelesi hazırlanmıştır. Birinci tür doku iskelesi PLLA-PEG kriyojelleri olup, üretim protokolu daha önce Dr. Sinan Eğri'nin doktora tezinde geliştirdiği ve optimize ettiği protokolün aynısıdır. Jelatin esaslı HA içeren oksidekstran ile çapraz bağlanmış kriyojellerin hazırlanmasında uygulanan protokol ise İlyas İnci'nin devam eden doktora tezi kapsamında geliştirdiği ve optimize ettiği yöntemin protokolüdür. PLLA-PEG esaslı olanlara satın alma yoluyla temin edilen vikril ameliyat ipliklerinden elde edilen fiberler ve tez kapsamında "ıslak eğirme" yöntemiyle üretilen kitosan fiberler yüklenmiştir. Jelatin esaslı olanlara ise yalnızca katgut ameliyat ipliklerinden elde edilen fiberler yüklenmiştir. Aşağıdaki alt bölümlerde bu kriyojellerin çeşitli özellikleri verilmiş ve tartışılmıştır.

4.3.1. Doku iskelelerinin gözenek yapıları

Tez kapsamında üretilen PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin SEM görüntülerine örnekler sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6 ve 4.7'de verilmiştir. Kriyojeller üretildiklerinde su ile şişmiş durumdadırlar. Tamamen kurutulunca gözenek yapıları çökmekte bir daha orijinal boyuta şişmeleri çok zor olmaktadır. Dolayısıyla, gözenek yapılarını korumalarını sağlamak için kademeli olarak farklı konsantrasyonlarda etil alkolün sudaki çözeltileri ile etkileştirilerek gözenek yapılarını korumaları sağlanmıştır (örnekler % 2.5 glutraldehid fosfat tamponunda (pH: 7.2) 1 gece bekletilmiş; %25, %50, %75 ve %96 konsantrasyonlardaki etanol çözeltisi ile dehidrate edilmişlerdir). Bu durumda iken SEM fotoğrafları çekilmiştir. Kullanılan SEM cihazının (Hitachi TM-1000, Japonya) görüntü almak için herhangi bir kaplama gerektirmemesi kriyojellerin gözenek yapılarının bozulmadan görüntülenmelerine olanak vermiştir.

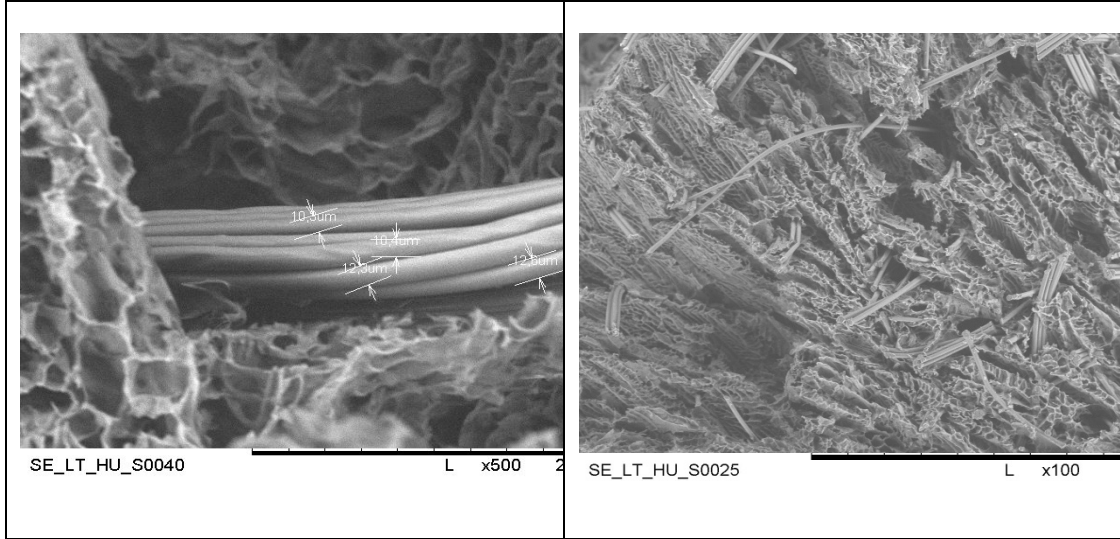


Şekil 4.5. PLLA-PEG esaslı kriyojellerin örnek kesit SEM fotoğrafları: (A) fiber katkısız; (B) vikril katkılı ve (C) kitosan katkılı

Şekil 4.5A daki kesit fotoğrafında görüldüğü gibi PLLA-PEG kriyojeller geniş ve birbiriyle bağlantılı gözenek yapısına sahiptir. Şekil 4.5B ve C'de sırasıyla vikril ve kitosan fiberler ile yüklenmiş PLLA-PEG kriyojellerin kesit fotoğraflarına örnekler verilmiştir. Fiber yüklenmeyen PLLA-PEG kriyojelinin gözenek çapının ortalama 45 μm olduğu ve homojen bir gözenek dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Vikril ve kitosan fiberlerin yapıya ilave edilmesi sonrasında, homojen gözenek dağılımının ilave edilen fiberin boyu, çapı ve yükleme oranına göre farklılıklar ortaya çıkardığı ve genel olarak homojen gözenek dağılımını bozduğu gözlenmiştir. İlave edilen fiberin yükleme oranı arttıkça, boyu uzadıkça ve çapı arttıkça homojen gözenek yapısı ve dağılımının bozulduğu görülmüştür. Şekil 4.5B ve C'de de görüldüğü gibi; fiberlerin etrafındaki bölgelerde gözenek çapının daha büyük olduğu saptanmıştır. Fiberlerin bulunduğu bölgelerin etrafında, özellikle ilave edilen fiberin çapı arttıkça derin yarıklar oluştuğu, fiberlerin boyu uzadıkça da gözenek yapısının bir miktar bozulduğu görülmüştür. Genel olarak vikril fiberlerinin etrafında gözenek çapı 180-210 μm değerinde gözlenirken, fiberlerin bulunduğu bölümlerden uzaklaşıldıkça gözenek çapının ortalama 105 μm olduğu belirlenmiştir. Kitosan fiberlerin yüklenmesi sonrasında ise gözenek çapının, kullanılan şırınga iğnesinin çapına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Şırınga iğnesinin çapı 0.7 mm iken gözenek çapı ortalama 14 μm olarak gözlenmiştir. Şırınga iğnesinin çapı 0.8 mm ve 0.9 mm iken gözenek boyutunun homojen bir dağılım sergilemediği saptanmıştır. Kitosan fiberlerin bulunmadığı bölgelerden başlayarak fiberlerin bulunduğu bölümlere yaklaşıldıkça 53 μm , 143 μm ve 213 μm gibi gözenek boyutları homojen olmayan bir görünüm sergilemektedir. 0.7 mm'lik şırınga iğnesi ile sentezlenen kitosan fiberlerinin ilave edildiği kriyojel yapısında ise, gözenek boyutunun daha homojen bir dağılım sergilediği gözlenmektedir. Sonuç olarak; fiberlerin boyu uzadıkça ve kullanılan şırınga iğnesinin çapı arttıkça homojenitenin bozulmakta olduğu gözlenmiştir. Ek olarak; PLLA-PEG kriyojellerin SEM görüntülerinde “balık sırtı” şeklinde yapılar görülmektedir. Bu yapılar; çözelti sıcaklığı donma noktasına yaklaşırken, artan vizkozite ile birlikte, çözücü kristallerinin ilerlemesine karşı oluşan direnç sonucu oluşan yapılardır.

Bu şekillerde gözlenen önemli bir özellikte fiberlerin yapı içinde dağılmasıdır. Elde edilen çok sayıda görüntünün incelenmesi ile özellikle fiber çapı, boyu ve yükleme miktarı artınca homojenitenin bozulduğu gözlenmiştir. Özellikle yüklenen fiber

boyu arttıkça homojen dağılımın sağlanmasının oldukça zor olduğu saptanmıştır. İlgili SEM görüntüleri örnek olarak Şekil 4.6.'de sunulmuştur. Homojen dağılımın değişen fiber boyu, çapı ve yükleme miktarı koşullarında kriyojel üretiminde büyük bir sorun olduğu deneyimlenmiştir. Bu sorunların giderilmesi için daha fazla çalışma yapılması, ultrason vb. teknikler ile daha iyi bir dağılım için yeni yaklaşımların uygulanması ve yeni tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir.



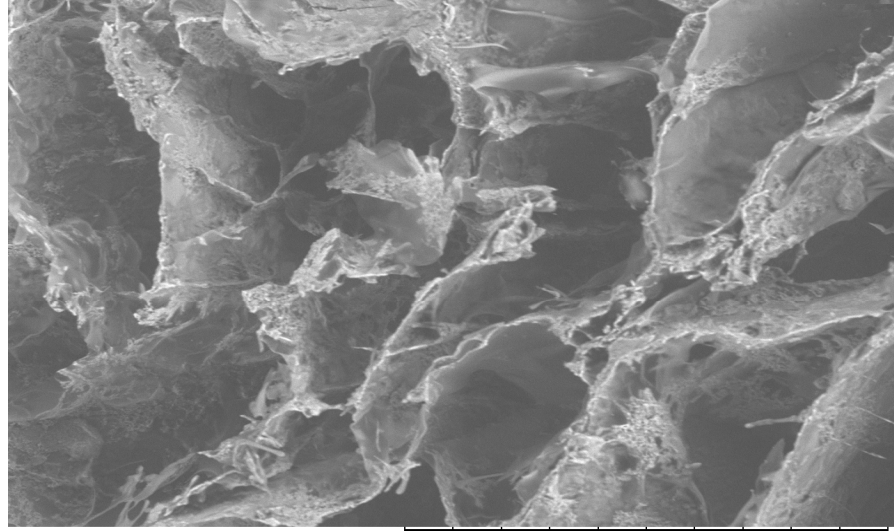
Şekil 4.6. Fiber yüklemelerin homojen dağılımı bozduğu yapılara birer örnek

Jelatin esaslı kriyojellerin örnek kesit fotoğrafları Şekil 4.7 de verilmiştir. Fiber katkısız jelatin/HA kriyojelinde; hidroksiapatit partiküllerinin gözenek duvarlarına kümelenmiş oldukları dikkat çekmekle birlikte matriks içerisinde homojen bir dağılım sergiledikleri görülmektedir. Oldukça gözenekli olduğu görülen fiber katkısız jelatin/HA kriyojelin, ortalama gözenek çapının 200 μm olduğu belirlenmiştir.

Katgut katkılı jelatin/HA kriyojellerde ise; fiberlerin etrafındaki gözeneklerin çaplarının oldukça büyük (300-350 μm 'ye varan çaplarda) olduğu ve fiberlerin bulunduğu bölgeden uzaklaştıkça gözenek çaplarının küçüldükleri (ortalama 100 μm) saptanmıştır. Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi; katgut fiberlerin bulunduğu bölgelerin etrafında, artan yüzey geriliminden kaynaklanan derin yarıklar göze çarpmaktadır. İlave edilen katgut fiberinin boyu, çapı ve yükleme oranı arttıkça; fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellere benzer olarak, jelatin kriyojellerde de gözenek dağılımının homojenliğinin bozulduğu, gözenek yapısının değiştiği, daha kapalı gözeneklerin olduğu görülmektedir. Katgut'un çapı, yükleme miktarı ve boy oranı

azaldıkça; matris içindeki homojen dağılımın daha kolay sağlanabildiği, kriyojelin gözenek yapısını daha çok koruduğu ve birbirleri ile bağlantılı gözeneklerin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, HA kristallerinin fiberler üzerindeki dağılımı da dikkat çekmektedir.

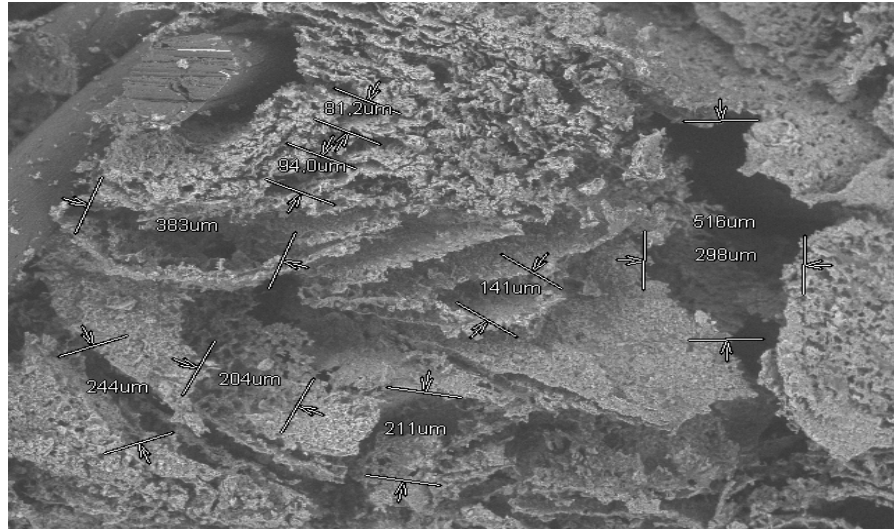
PLLA-PEG kriyojellerden farklı olarak; jelatin esaslı kriyojellerin gözenek çapının yaklaşık 4.5-5 kat daha büyük olduğu gözlenmiştir.



SE_HU_LT_00045
Fiber katkısız jelatin/HA

L x300 300 um

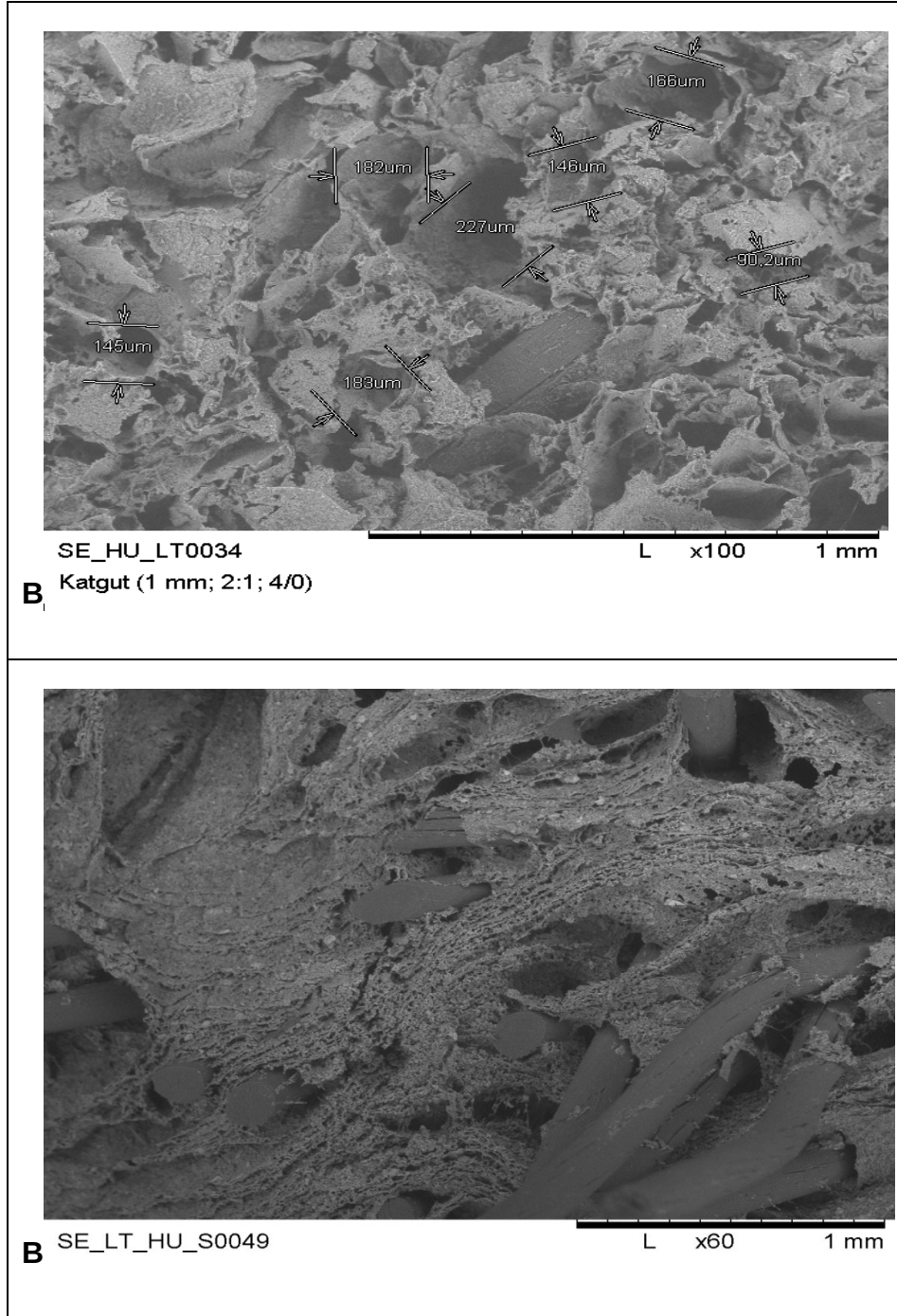
A



SE_HU_LT0031
Katgut (3 mm; 4:1; 4/0)

L x100 1 mm

B



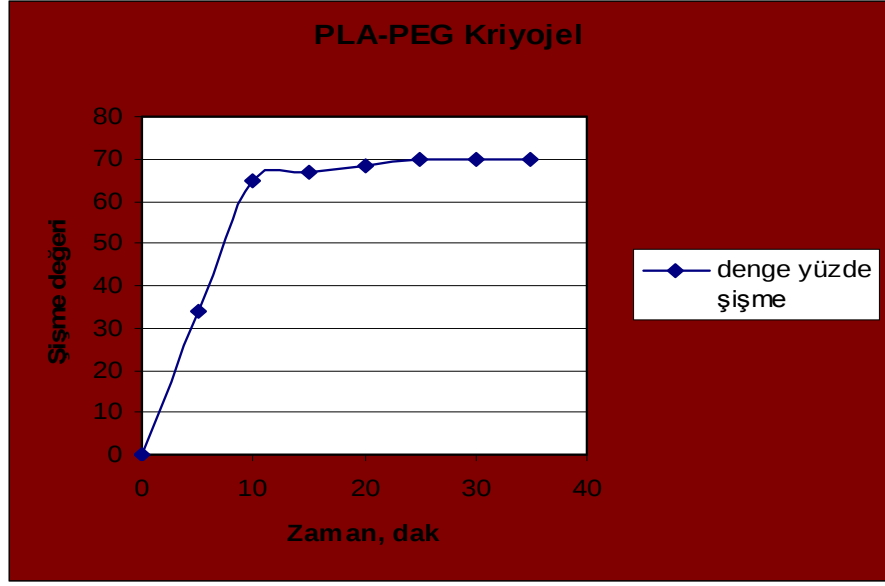
Şekil 4.7. Jelatin esaslı kriyojellerin örnek kesit SEM fotoğrafları: (A) fiber katkısız; (B) katgut katkılı

Homojen dağılımın değişen fiber boyu, çapı ve yükleme miktarı koşullarında kriyojel üretiminde büyük bir sorun olduğuna yukarıdaki bölümde değinilmiş idi. Bu durum özellikle kriyojelin sentezlendiği polimerin içeriğine bağlı olarak da birtakım ek zorluklar getirmektedir. Jelatin/HA/oksidekstran kriyojeli hazırlanırken; hidroksiapatit partiküllerinin süspansiyonu oluşturulup; bu ortamda jelatin, oksidekstran ile çapraz bağlı kriyojeller haline dönüştürülmektedir. Kriyojel sentezi gerçekleştirilirken, oksidekstran karışıma ilave edildikten sonra kriyojel tüpünün

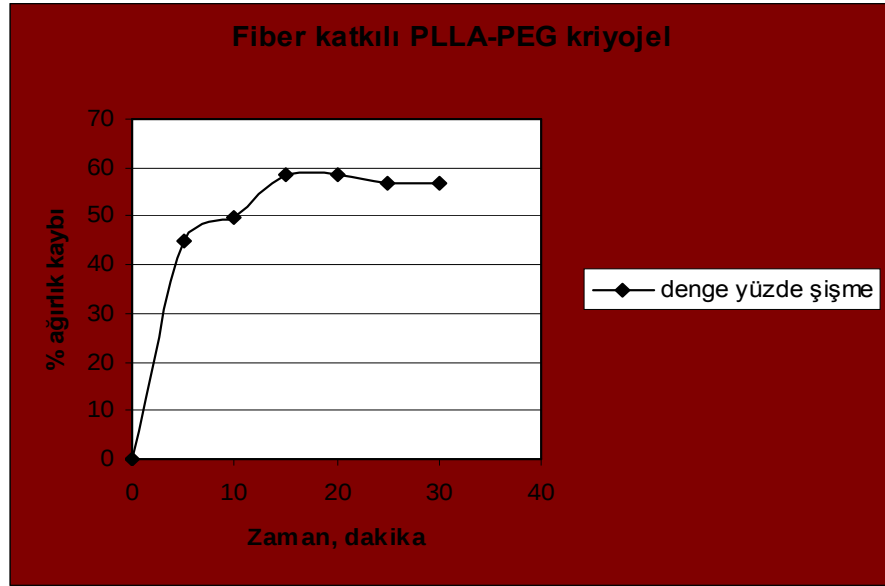
çok hızlı bir şekilde soğutma sistemi (kriyostat) içerisine konulması gerektiğinden, fiber ilavesi ve fiberlerin homojen dağılımının sağlanması son derece güç olmaktadır. PLLA-PEG kriyojeline fiber yükleme yapılırken, benzer bir durum deneyimlenmez iken, tez çalışması kapsamında hazırlanan jelatin esaslı kriyojellere fiber yüklemesi yapılırken bu durum ek bir zorluk getirmiştir.

4.3.2. Doku iskelelerinin şişme davranışları

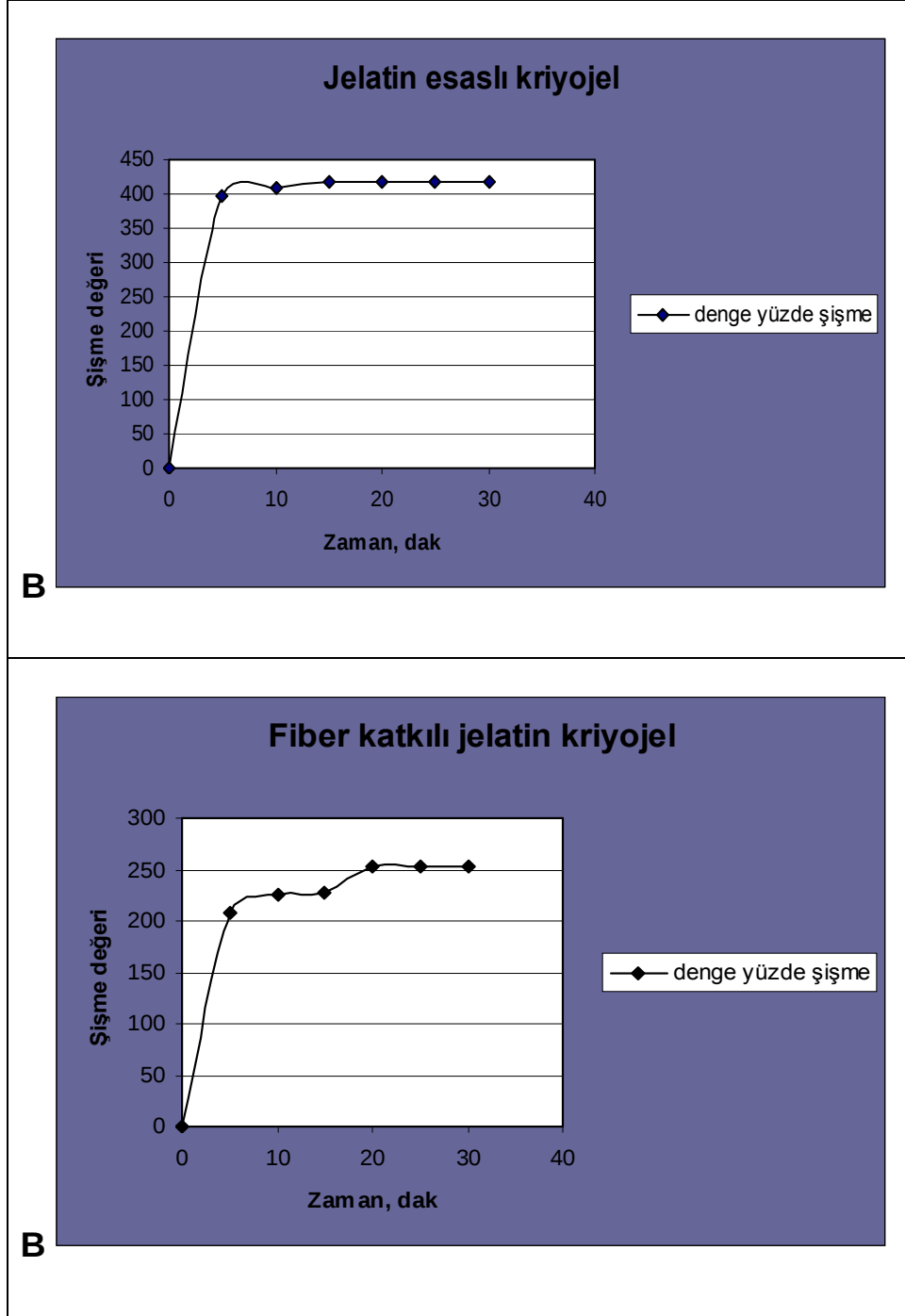
Bu bölümde sunulan tez kapsamında üretilen PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin fiber katkısız ve katkılı formlarının şişme davranışlarının sonuçları sunulmuş ve tartışılmıştır. Şekil 4.8 A ve B de sırasıyla PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin fiber katkısız ve katkılı formlarının şişme hızlarını gösteren örnekler verilmiştir. Bu verilerin elde edilmesi için kriyojel elde sıkılmış ve suyu bir peçete ile kurularak alınmış ve tartılmıştır. Daha sonra sulu ortama konmuş ve şişmeleri zamana karşı tartılarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi kriyojeller çok hızlı şişmekte hemen hemen 10-15 dakika içinde son boyutlarına gelmektedir. Bu tüm kriyojellerin en önemli özelliklerinden birisidir (Lewandrowski, 2002). Sıkılarak suyu atılan kriyojeller suya konulunca hızla şişmekte ve orijinal boyutlarına geri dönmektedir. Araştırma kapsamında hazırlanan tüm kriyojeller (fiber katkılı/katkısız) bu davranışı göstermektedir. PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin suyu alınmış ve şişmiş hallerinin görüntüleri (optik fotoğrafları) sırasıyla Şekil 4.9 A ve B’de örneklenmiştir.



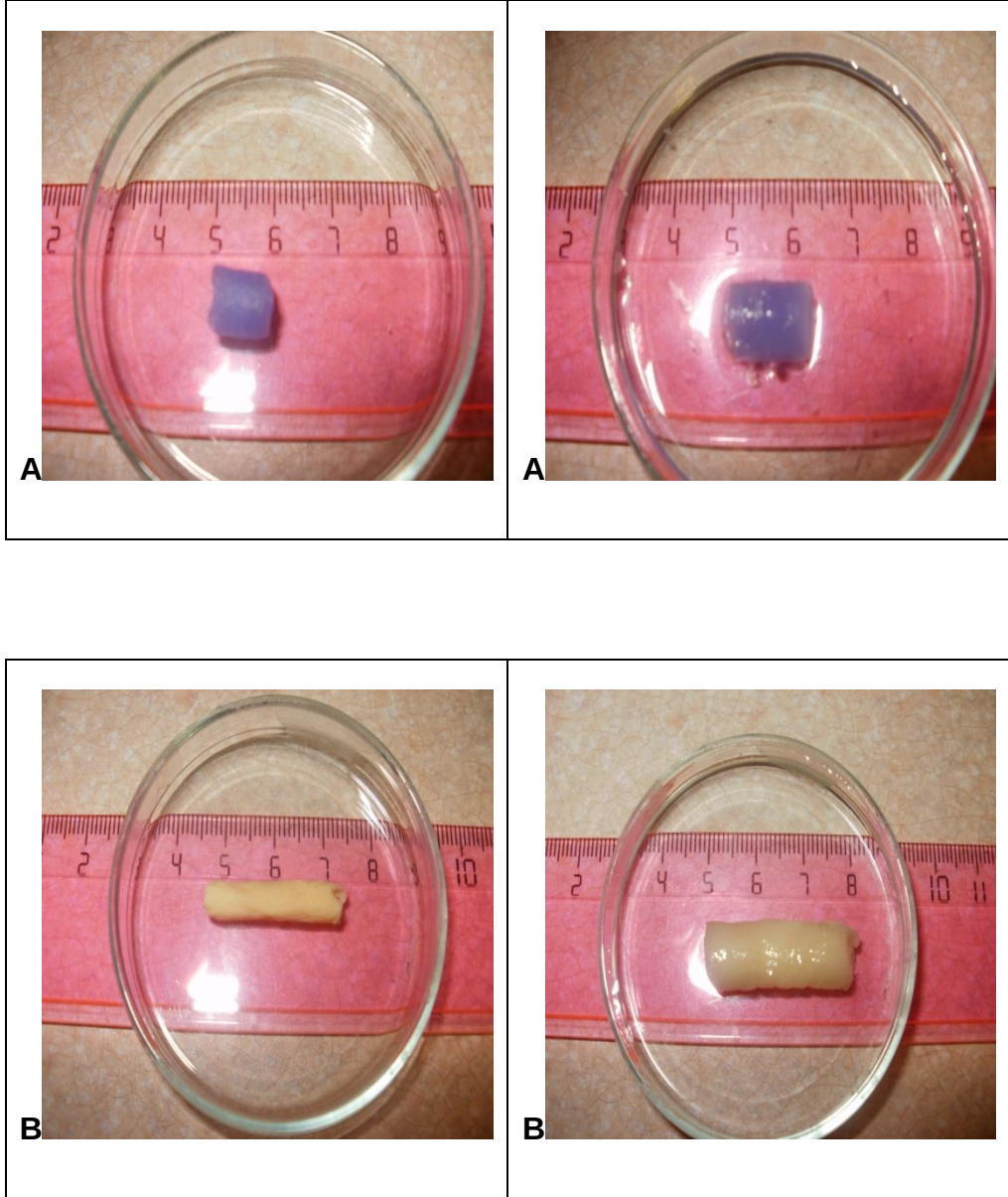
A



A



Şekil 4.8. Kriyojellerin sulu ortamda şişme hızlarını gösteren grafikler: (A) PLLA-PEG esaslı ve fiber katkılı PLLA-PEG kriyojel ve (B) jelatin esaslı ve fiber katkılı jelatin kriyojel



Şekil 4.9. Kriyojellerin suyu alınmış ve suda yeniden şişmiş hallerini gösterir optik fotoğraf örnekleri: (A) PLLA-PEG esaslı ve (B) jelatin esaslı

Sunulan tez kapsamında üretilen PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin farklı boyutlardaki fiberler ile farklı oranlarda yüklenmiş formlarının denge şişme yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplanmış ve elde edilen veriler (en az üç tekrar deneyin ortalaması) sırasıyla PLLA-PEG ve jelatin kriyojeller için Çizelge 4.2 ve 4.3’de topluca sunulmuştur.

$$\text{Denge Yüzde Şişmesi} = [(m_d - m_0) / m_0] \times 100$$

Burada “ m_0 ” sıkılıp suyu uzaklaştırılan kriyojelin ağırlığı; ve “ m_d ” 30 dak sulu ortamda şişirildikten sonra ulaşılan denge durumundaki şişmiş kriyojelin ağırlığını göstermektedir.

Çizelge 4.2. Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin “denge yüzde şişme değerleri”

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Denge yüzde şişme değerleri (%)
PLLA-PEG	Katkısız	79 ± 0.1
PLLA-PEG	vikril (337 μm /1 mm/2:1)	48 ± 0.07
PLLA-PEG	vikril (337 μm /1 mm/3:1)	55 ± 0.11
PLLA-PEG	vikril (337 μm /1 mm/4:1)	57 ± 0.57
PLLA-PEG	vikril (337 μm /2 mm/4:1)	58 ± 0.08
PLLA-PEG	vikril (337 μm /4 mm/4:1)	59 ± 0.08
PLLA-PEG	kitosan (207 μm /2:1)	63 ± 0.22
PLLA-PEG	kitosan (207 μm /3:1)	66 ± 0.25
PLLA-PEG	kitosan (207 μm /4:1)	75 ± 0.24
PLLA-PEG	kitosan (176 μm /4:1)	53 ± 0.07
PLLA-PEG	kitosan (298 μm /4:1)	77 ± 0.32

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir (n=3).

Çizelge 4.3. Fiber katkısız ve katkılı Jelatin esaslı kriyojellerin “denge yüzde şişme değerleri”

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Denge yüzde şişme değerleri (%)
Jelatin Esaslı	Katkısız	419 $\pm$ 0.5
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/2:1)	249 $\pm$ 0.53
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/3:1)	297 $\pm$ 0.42
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/4:1)	300 $\pm$ 0.54
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/3 mm/4:1)	322 $\pm$ 0.72
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/6 mm/4:1)	334 $\pm$ 0.91
Jelatin Esaslı	katgut (192 μ m /1 mm/4:1)	275 $\pm$ 0.66
Jelatin Esaslı	katgut (395 μ m /1 mm/4:1)	409 $\pm$ 0.67

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir (n=3).

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi; fiber katkısız PLLA-PEG, PLLA-PEG esaslı kriyojeller arasında %79 oranı ile en iyi şişme değerine sahip kriyojeldir. Vikril katkısının genel olarak şişme değerinde azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Vikril yükleme oranına göre değerlendirme yapıldığında; yükleme oranı arttıkça şişme değerinde azalma olduğu, yükleme oranı azaldıkça şişme değerinin arttığı belirlenmiştir. Boy oranına göre değerlendirme yapıldığında ise, yüklenen vikrilin boyu arttıkça şişme değerinin arttığı görülmüştür.

Kitosan fiberleri ilave edilen kriyojeller, kitosan katkısız kriyojel ile karşılaştırıldığında, şişme değerinde genel olarak azalma olduğu gözlenmektedir. Yükleme miktarı açısından değerlendirildiğinde; yüklenen kitosan fiberi miktarı arttıkça şişme değerinin azaldığı belirlenmiştir. Çap oranı açısından

değerlendirme yapıldığında ise; elde edilen verilere göre, ilave edilen kitosan fiberlerinin çapı arttıkça şişme değerinin arttığı gözlenmiştir.

Katgut ilave edilen kriyojeller katgut katkısız jelatin esaslı kriyojel ile karşılaştırıldığında da benzer şişme davranışları gözlenmektedir. En iyi şişme değerinin katgut katkısız kriyojel olduğu gözlenmiştir. Yükleme miktarı açısından değerlendirildiğinde; yükleme miktarı arttıkça şişme değerinin azaldığı gözlenmiştir. Boy oranına göre değerlendirme yapıldığında ise; yüklenen katgut boyu arttıkça şişme davranışında artış gözlenmiştir. Çap farklılığına göre değerlendirme yapıldığında ise; ilave edilen katgut çapının artması ile birlikte, şişme değerinde artma gözlenmiştir.

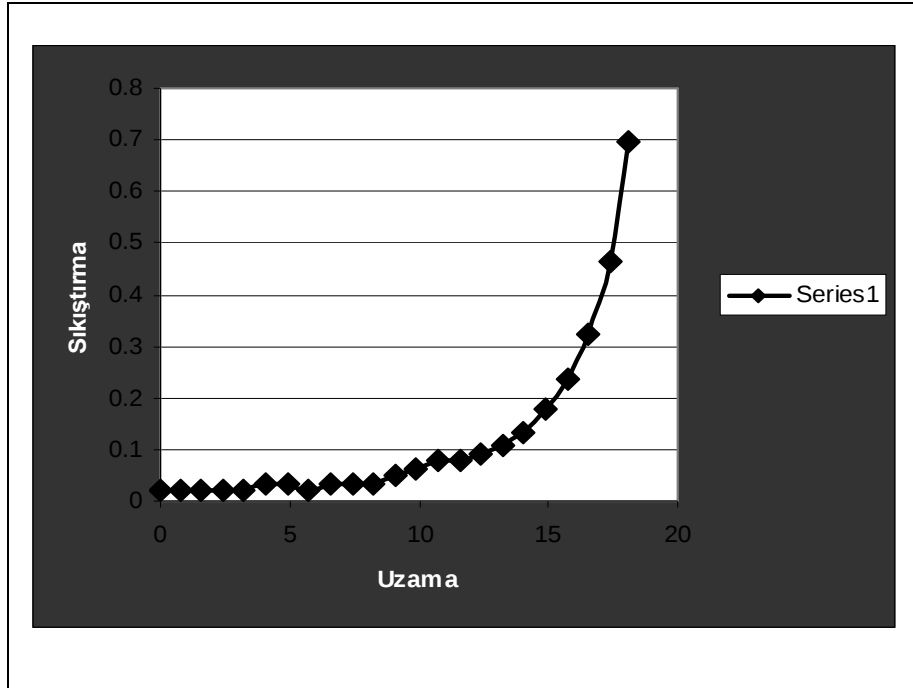
Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi; fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelinde şişme ilk 10 dakika içerisinde yaklaşık en yüksek değerine ulaşmakta, daha sonra şişme derecesinde önemli bir değişim gözlenmemekte ve denge değerine ulaşmaktadır. Fiber katkılı PLLA-PEG kriyojelinde ise, şişme davranışı zamana bağlı olarak daha yavaş bir yükselme sergilemektedir. Fiber katkılı kriyojelde gözenekler daha yavaş su absorbe ederlerken; fiber katkısız kriyojeller, gözenekler arası boşluk nedeni ile ilk 10 dakika içerisinde yaklaşık en yüksek şişme değerine ulaşmaktadırlar. Bu durum; fiber katkısız kriyojelin gözenek yapısının fiber katkılı olana göre daha farklı bir yapı oluşturmuş olması ile açıklanabilir. Şekil 4.8. 'de görüldüğü gibi; fiber katkılı ve fiber katkısız jelatin kriyojel için de benzer sonuç elde edilmiştir.

Genel olarak; jelatin esaslı kriyojelin hem fiber katkılı hem de katkısız olmak üzere PLLA-PEG kriyojeline oranla çok daha yüksek şişme davranışı sergilediği gözlenmiştir. Fiber katkısız jelatin esaslı kriyojelin, fiber katkısız PLLA-PEG kriyojeline oranla yaklaşık 5.3 kat daha fazla su absorblayabildiği gözlenmiştir.

Yüksek şişme derecesine sahip olan doku iskeleleri, daha geniş yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler; bu nedenle üç boyutlu hücre büyümesi için daha uygundurlar. Gözenek boyutu arttıkça, doku iskelelerinin iç yüzeylerinde hücre büyümesi için yüzey alanı artmış olur. Şişme derecesindeki artma, aynı zamanda örneklerin, hücre kültüründeki besin maddelerinden daha çok yararlanabilmelerine olanak sağlar. Bununla birlikte; doku iskelesinin şişme derecesinin fazla olması, mekanik özelliklerin daha zayıf olması anlamına gelmektedir.

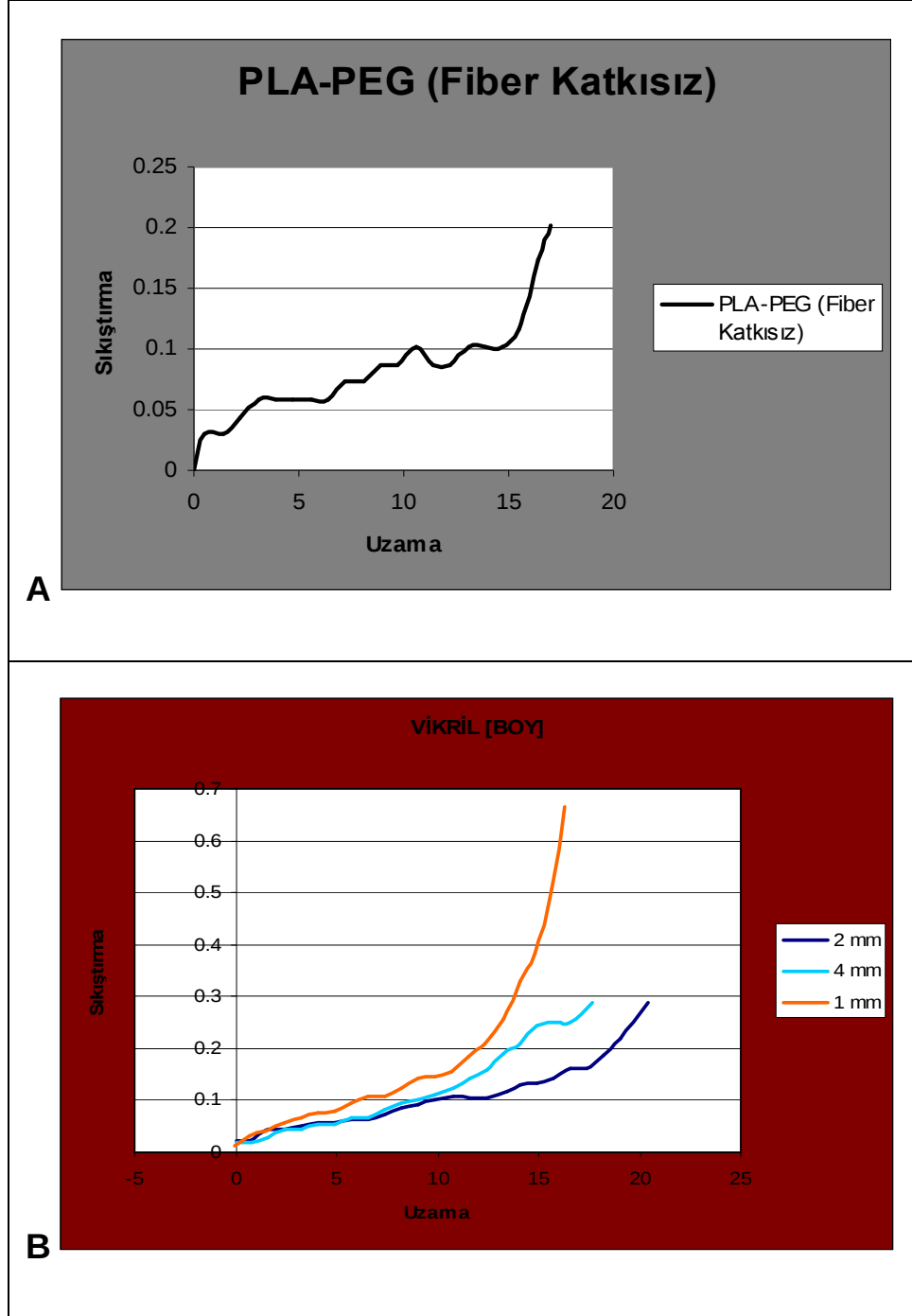
4.3.3. Doku iskelelerinin mekanik özellikleri

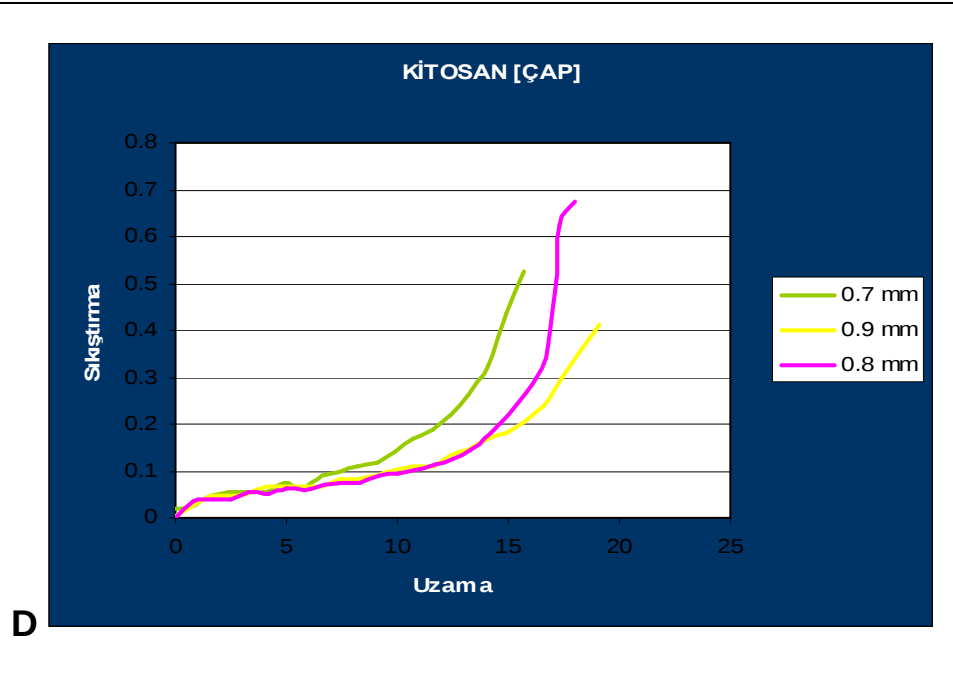
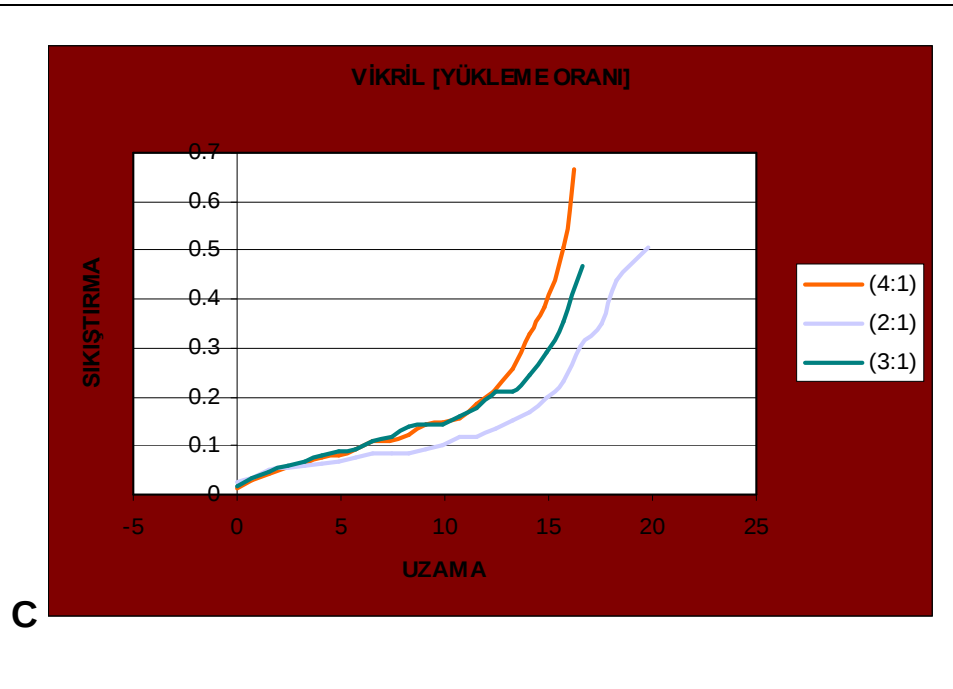
Tez kapsamında üretilen kriyojellerin mekanik özellikleri Lloyd Universal Tensile test cihazı (Lloyd Instruments, LRX Internal Extensometer, ABD) kullanılarak sıkıştırma modunda incelenmiştir. Testler oda sıcaklığında 500 N kuvvet ile 10 mm/dak sabit sıkıştırma hızı ile gerçekleştirilmiş; % uzama değerlerine karşılık sıkıştırma gerilimini veren grafikler elde edilmiştir. Şekil 4.10'da tipik bir sıkıştırma grafiği görülmektedir. Görüldüğü gibi % uzama ile sıkıştırma gerilimi arasında eksponansiyal bir ilişki vardır. Bu çalışmada üretilen tüm kriyojeller için (fiber katkılı katkısız) benzer davranış gözlenmiştir. Eğrinin başlangıç bölümünde eğiminden elastik modulün hesaplanabileceği doğrusal ilişkinin gözlemlendiği bir bölüm vardır. Bu bölümdeki eğimler PLLA-PEG kriyojelleri için 86.20 Mpa, jelatin esaslı olanlar için ise 58.52 Mpa civarındadır. Bu da PLLA-PEG kriyojellerinin jelatine göre çok daha sert olduğunu göstermektedir. Bu değerlerde her iki kriyojelde de fiber katkısı ile önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak eğrilerin sonraki bölümlerinde önemli farklılıklar görülmüştür. Bu bölgeleri temsil etmek için son ("ultimate") yüzde uzama (%) ve son sıkıştırma gerilim (Mpa) değerleri bulunup birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

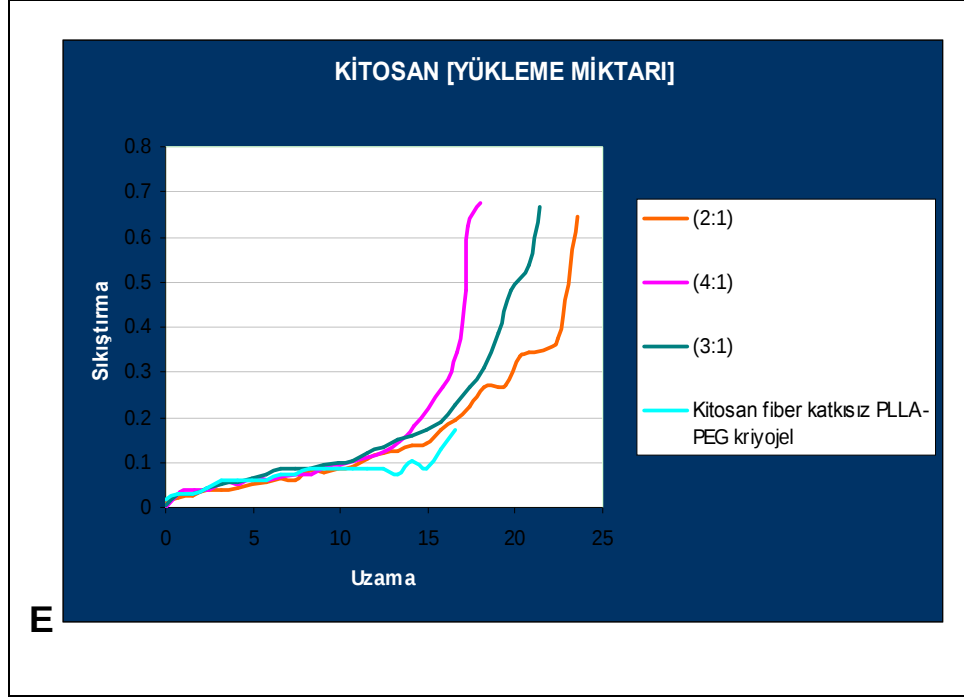


Şekil 4.10. Kriyojeller için tipik bir sıkıştırma grafiği

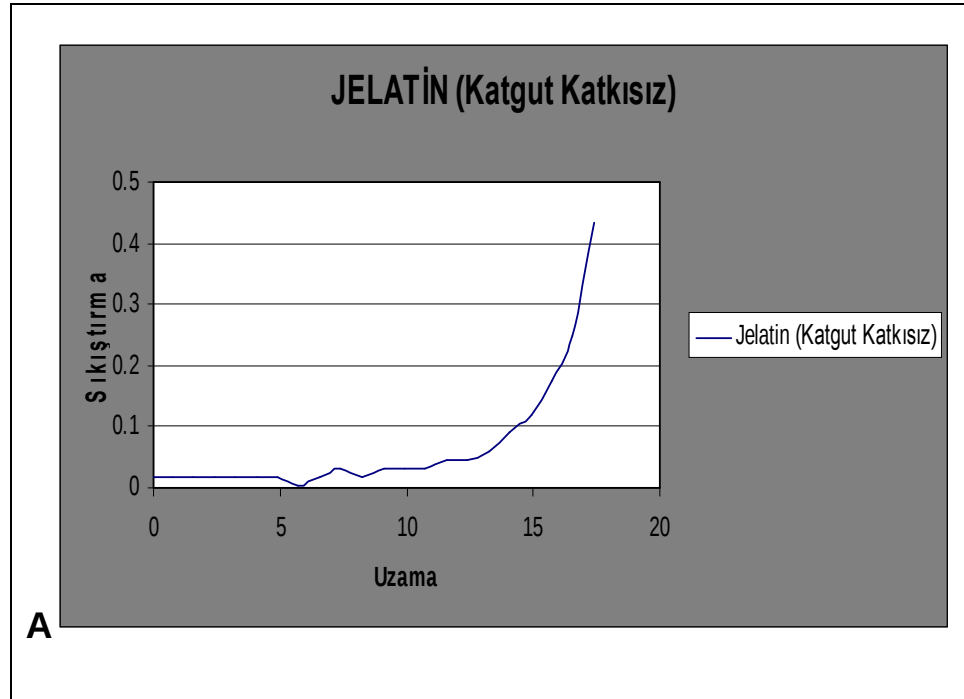
Şekil 4.11 ve 4.12’de katkısız ve fiber katkılı sırasıyla PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin sıkıştırma grafikleri her parametre için ayrı grup olarak verilmiştir. Karşılaştırmanın sayısal olarak yapılabilmesi için son yüzde uzama ve son sıkıştırma gerilim değerleri okunup, PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojeller için gözlenen değerler sırasıyla Çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

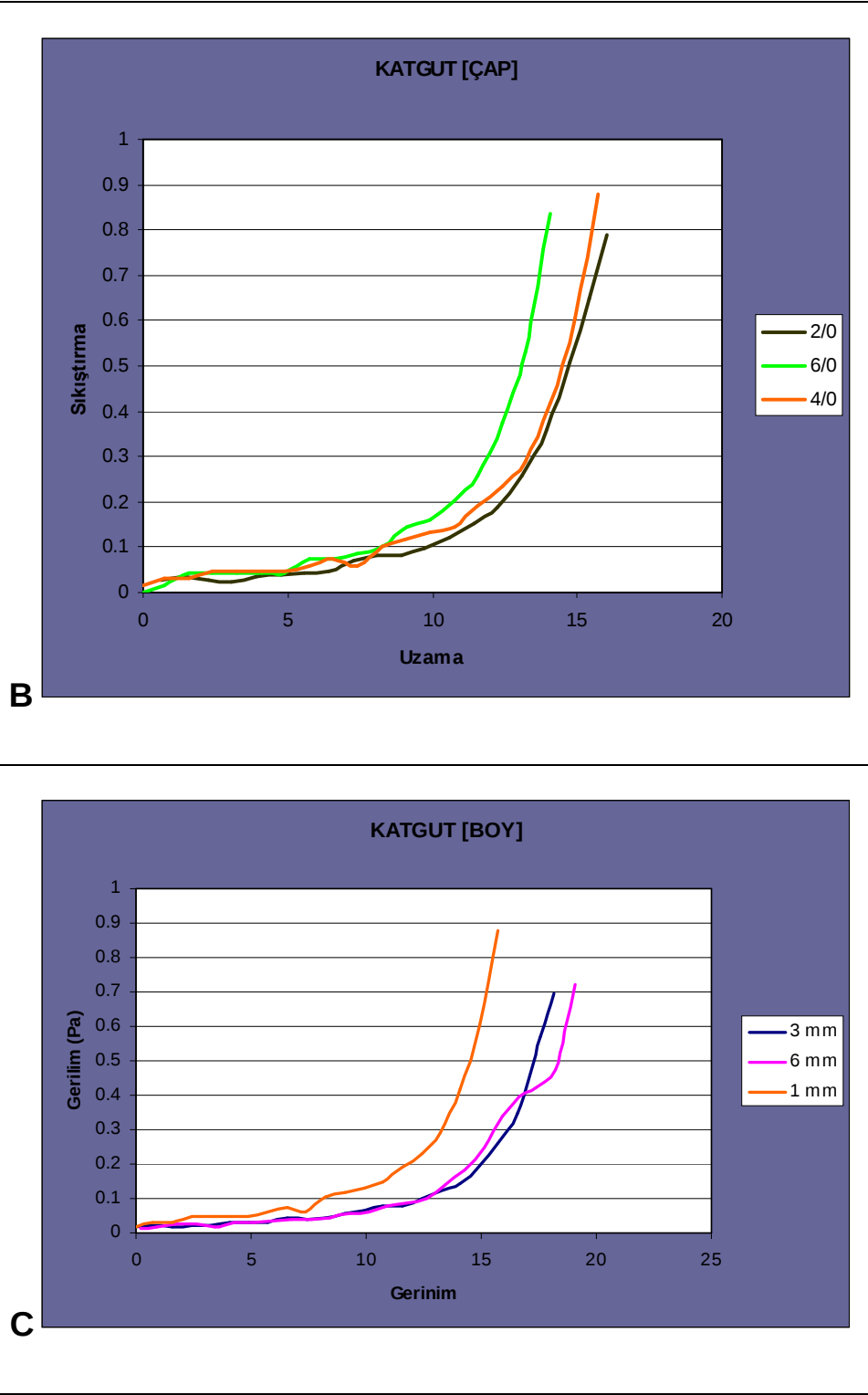


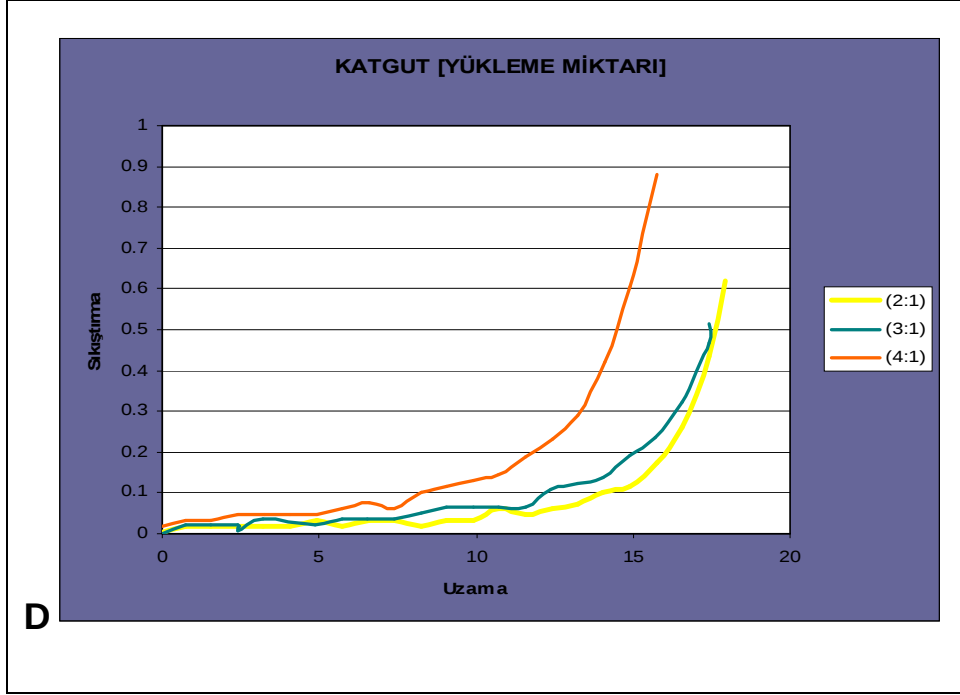




Şekil 4.11. PLLA-PEG kriyojeller için örnek sıkıştırma grafikleri: (A) katkısız; (B) farklı uzunluklarda vikril katkılı; (C) farklı yükleme oranlarında vikril katkılı; (D) farklı çapta kitosan katkılı; (E) farklı yükleme oranlarında kitosan katkılı.







Şekil 4.12. Jelatin esaslı kriyojeller için örnek sıkıştırma grafikleri: (A) katkısız; (B) farklı çaplarda katgut katkılı; (C) farklı uzunluklarda katgut katkılı; ve (D) farklı yükleme oranlarında katgut katkılı

Çizelge 4.4. Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin son yüzde uzama ve sıkıştırma gerilim değerleri

Polimer Türü Fiber Katkısı*		Son Yüzde Uzama (%) /
		Son Sıkıştırma Gerilimi (Mpa)
PLLA-PEG	Katkısız	16.969 / 0.202
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/1 mm/4:1)	16.268 / 0.665
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/1 mm/2:1)	19.761 / 0.506
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/1 mm/3:1)	16.600 / 0.467
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/2 mm/4:1)	20.368 / 0.289
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/4 mm/4:1)	17.657 / 0.286

PLLA-PEG	kitosan (207 μm /2:1)	23.562 / 0.646
PLLA-PEG	kitosan (207 μm /4:1)	17.967 / 0.675
PLLA-PEG	kitosan (207 μm /3:1)	21.372 / 0.667
PLLA-PEG	kitosan (176 μm /4:1)	15.747 / 0.525
PLLA-PEG	kitosan (298 μm /4:1)	19.071 / 0.411

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir.

Çizelge 4.5. Fiber katkısız ve katılı PLLA-PEG kriyojellerin son yüzde uzama ve sıkıştırma gerilim değerleri

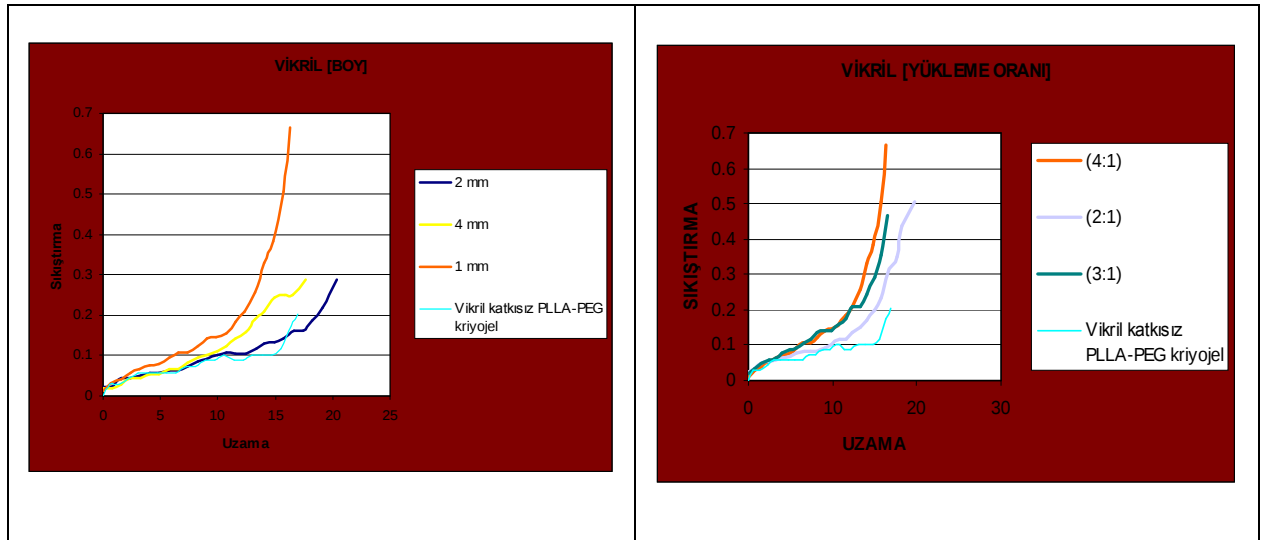
Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Son Yüzde Uzama (%) / Son Sıkıştırma Gerilimi (Mpa)
Jelatin Esaslı	Katkısız	17.387 / 0.434
Jelatin Esaslı	katgut (245 μm /1 mm/2:1)	17.956 / 0.620
Jelatin Esaslı	katgut (245 μm /1 mm/4:1)	15.738 / 0.879
Jelatin Esaslı	katgut (245 μm /1 mm/3:1)	17.409 / 0.514
Jelatin Esaslı	katgut (245 μm /3 mm/2:1)	18.127 / 0.694
Jelatin Esaslı	katgut (245 μm /6 mm/2:1)	19.054 / 0.722
Jelatin Esaslı	katgut (192 μm /1 mm/2:1)	14.061 / 0.833
Jelatin Esaslı	katgut (395 μm /1 mm/2:1)	16.023 / 0.789

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir.

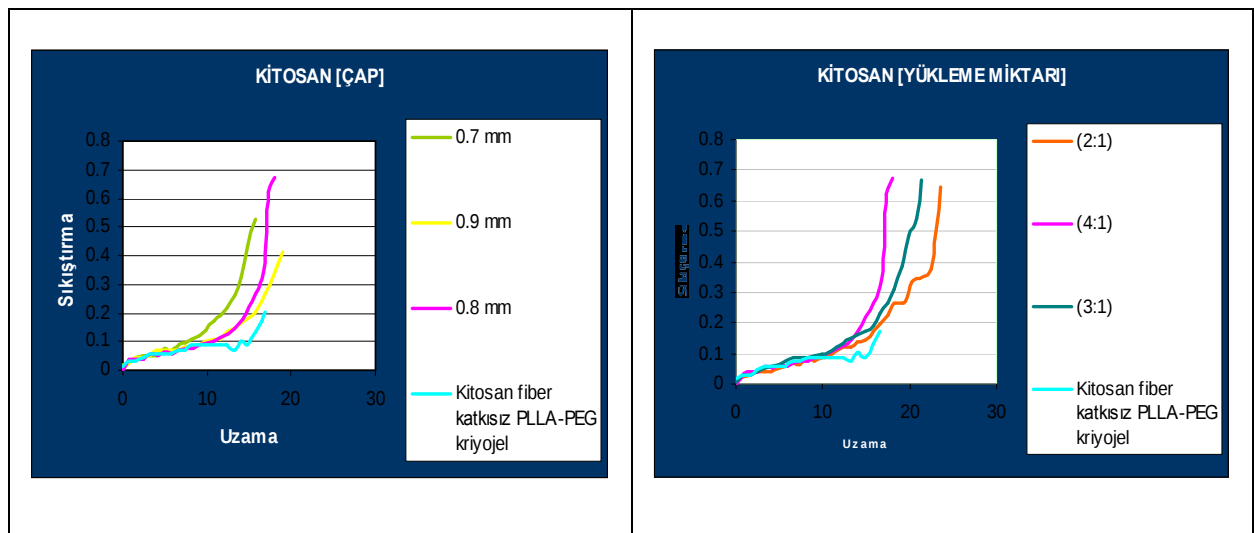
Şekil 4.11 ve Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi PLLA-PEG kriyojellerinde; yüzde uzama değerleri minumum yüzde 15.747 ile maksimum yüzde 23.562 değerleri arasında değişmektedir. Fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelinde ise bu değer 16.969 ile 0.202 olarak gözlenmiştir.

Vikril katkılı hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinde; ilave edilen vikrilin boyu arttıkça; yüzde uzama değeri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. İlave edilen vikrilin yükleme oranı arttıkça; yüzde uzama değerleri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri azalmaktadır. Bir malzemenin aldığı yüke göre değiştirdiği boyut ne kadar az olursa, mekanik dayanımı o kadar fazla anlamına gelir. Şekil 4.11 ve Çizelge 4.4.'den de görüldüğü gibi; vikril katkılı olarak hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinde ilave edilen vikrilin boyu arttıkça, mekanik dayanımının azaldığı; yükleme miktarı arttıkça, mekanik dayanımının yine azaldığı ve çapı büyüdükçe mekanik dayanımının azaldığı belirlenmiştir.

Kitosan katkılı hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinde; ilave edilen kitosan fiberlerinin yükleme oranı arttıkça; yüzde uzama değerleri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. İlave edilen kitosan fiberlerinin çapı arttıkça; yüzde uzama değerleri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. Kitosan fiberleri için de sonuçlar benzer şekilde bulunmuştur. Ancak kitosan fiberleri için boy parametresi değerlendirilmemiş, çap ve yükleme miktarı oranları değerlendirilmiştir. Şekil 4.11 ve Çizelge 4.4.'den de görüldüğü gibi; kitosan katkılı olarak hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinde ilave edilen kitosan fiberlerinin çapı arttıkça, mekanik dayanımının azaldığı; yükleme miktarı arttıkça, mekanik dayanımının azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.13. Vikril katkısız ve vikril katkılı PLLA-PEG kriyojellerinin sıkıştırma grafikleri



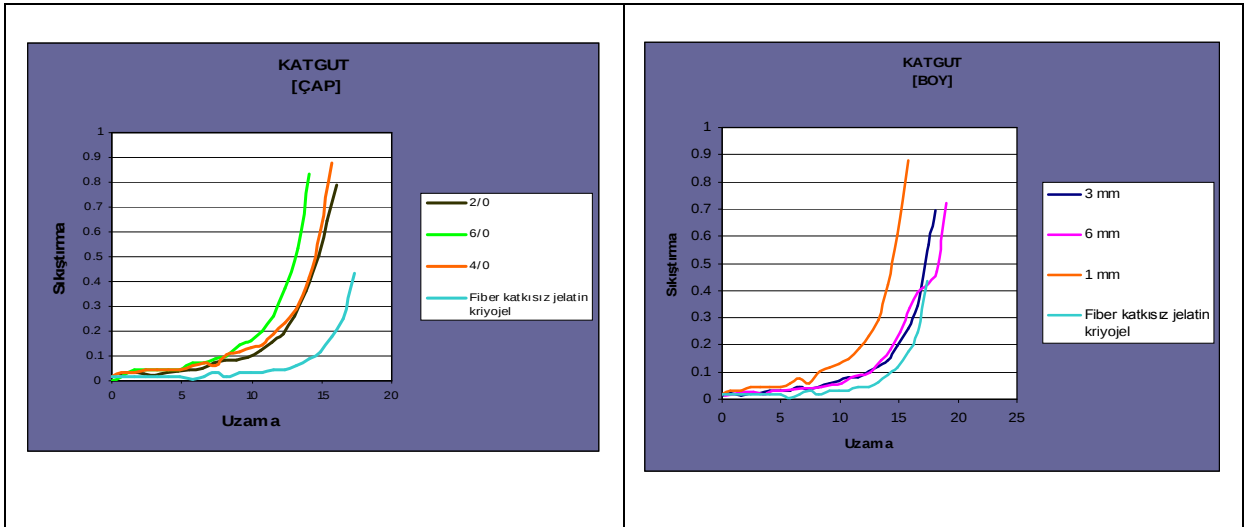
Şekil 4.14. Kitosan fiber katkısız ve kitosan fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellerinin sıkıştırma grafikleri

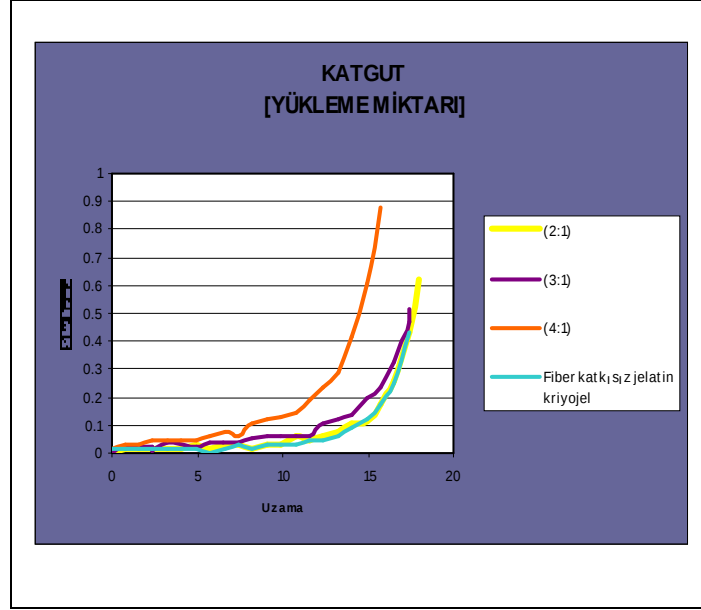
Farklı boy, çap ve yükleme oranında ilave edilen vikril ve kitosan fiberleri katkılı PLLA-PEG kriyojelleri ile fiber katkısız olarak hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinin yüzde uzama değerleri ve özellikle son sıkıştırma gerilimi değerleri arasında Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'den de görüldüğü gibi fark vardır. Gözenekli matrislerin mekanik dayanımındaki en önemli etkenlerden biri gözenek boyutudur. Gözenek boyutu artan malzemelerin mekanik kararlılıklarında da azalma gözlenmektedir (Ulbricht, 2006). Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler değerlendirildiğinde; en büyük gözeneklere sahip fiber katkısız olarak hazırlanan PLLA-PEG kriyojelinin mekanik dayanımı en az olarak saptanmıştır; fiber katkılı

olarak hazırlanan PLLA-PEG kriyojellerinin mekanik dayanımının arttığı gözlenmiştir.

Şekil 4.12 ve Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi jelatin esaslı kriyojellerde; yüzde uzama değerleri minimum yüzde 14.061 ile maksimum yüzde 19.054 değerleri arasında değişmektedir. Fiber katkısız jelatin kriyojelinde ise bu değer 17.387 ile 0.434 olarak gözlenmiştir.

Katgut katkılı hazırlanan jelatin kriyojellerinde; ilave edilen katgut’ün boyu arttıkça; yüzde uzama değeri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. İlave edilen katgut’ün yükleme oranı arttıkça; yüzde uzama değerleri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. İlave edilen katgut’ün çapı arttıkça; yüzde uzama değerleri artmakta, sıkıştırma gerilimi değerleri ise azalmaktadır. Şekil 4.12 ve Çizelge 4.5’den de görüldüğü gibi; katgut katkılı olarak hazırlanan jelatin esaslı kriyojellerde ilave edilen katgut’ün boyu arttıkça, mekanik dayanımının azaldığı; yükleme miktarı arttıkça, mekanik dayanımının yine azaldığı ve çapı arttıkça mekanik dayanımının azaldığı belirlenmiştir.





Şekil 4.15. Katgut katkısız ve katgut katkılı jelatin kriyojellerin çap, boy ve yükleme miktarına göre karşılaştırmalarını gösteren sıkıştırma grafikleri

3 farklı boy, çap ve yükleme oranında ilave edilen katgut katkılı kriyojeller ile fiber katkısız olarak hazırlanan jelatin esaslı kriyojellerin yüzde uzama değerleri ve özellikle son sıkıştırma gerilimi değerleri arasında Şekil 4.15’de de görüldüğü gibi fark vardır. Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler değerlendirildiğinde; en büyük gözeneklere sahip fiber katkısız olarak hazırlanan jelatin kriyojelin mekanik dayanımının en az olduğu gözlenmiş; fiber katkılı olarak hazırlanan jelatin kriyojellerin mekanik dayanımının arttığı saptanmıştır.

4.3.4. Doku iskelelerinin bozunurlukları

Tez kapsamında üretilen kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanımları öngörülmektedir. Dolayısıyla *in vivo* kullanımlarında konuldukları bölgede zaman içinde bozunmaları ve yerlerini oluşturan yeni dokuya bırakmaları beklenir. Şüphesiz *in vivo* uygulamada biyobozunma hızı çok farklı olacaktır. Ancak, sunulan tez kapsamında üretilen kriyojelleri bozunma hızları hakkında bir ön fikir edinme ve özellikle fiber yüklemenin etkilerini tartışmak üzere bu gruptaki deneyler planlanmıştır. Kriyojel örnekleri PBS tampon çözeltiler içine konmuş, karıştırma yapmadan oda sıcaklığında 8 hafta sürede ağırlık kayıpları ölçülerek bozunma miktarları “yüzde ağırlık kaybı” olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Sonuçlar PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojeller için, sırasıyla Çizelge 4.6 ve 4.7’de topluca sunulmuştur.

$$\text{Yüzde Ağırlık Kaybı} = [(m_b - m_d) / m_d] \times 100$$

Burada “m_b” kriyojelin başlangıç ağırlığı ve “m_d” 8 hafta sonundaki ağırlıktır.

Çizelge 4.6. Fiber katkısız ve katkılı PLLA-PEG kriyojellerin 8 hafta yüzde ağırlık kayıpları

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Yüzde Ağırlık Kaybı (%)
PLLA-PEG	Katkısız	3.828 ± 0.05
PLLA-PEG	vikril (337 µm/1 mm/2:1)	2.588 ± 0.004
PLLA-PEG	vikril (337 µm/1 mm/3:1)	2.596 ± 0.004
PLLA-PEG	vikril (337 µm/1 mm/4:1)	2.625 ± 0.007
PLLA-PEG	vikril (337 µm/2 mm/4:1)	2.733 ± 0.007
PLLA-PEG	vikril (337 µm/4 mm/4:1)	2.822 ± 0.005
PLLA-PEG	kitosan (207 µm/2:1)	2.512 ± 0.008
PLLA-PEG	kitosan (207 µm/3:1)	2.579 ± 0.008
PLLA-PEG	kitosan (176 µm/4:1)	2.714 ± 0.01
PLLA-PEG	kitosan (207 µm/4:1)	2.786 ± 0.004
PLLA-PEG	kitosan (298 µm/4:1)	2.853 ± 0.007

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir (n=3).

Çizelge 4.7. Fiber katkısız ve katkılı jelatin kriyojellerin 8 hafta yüzde ağırlık kayıpları

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Yüzde Ağırlık Kaybı (%)
Jelatin Esaslı	Katkısız	12.990 $\pm$ 0.04
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/2:1)	10.337 $\pm$ 0.07
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/3:1)	10.361 $\pm$ 0.05
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/4:1)	10.397 $\pm$ 0.08
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/3 mm/4:1)	10.423 $\pm$ 0.04
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/6 mm/4:1)	10.488 $\pm$ 0.09
Jelatin Esaslı	katgut (192 μ m/1 mm/4:1)	10.386 $\pm$ 0.05
Jelatin Esaslı	katgut (395 μ m/1 mm/4:1)	10.511 $\pm$ 0.11

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir (n=3).

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi; fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelin, vikril ve kitosan fiber katkılı kriyojellere göre daha hızlı bozunduğu gözlenmiştir. Vikril katkılı PLLA-PEG kriyojellerinde; ilave edilen vikrilin yükleme oranı azaldıkça ve vikril boyu arttıkça bozunma hızının arttığı gözlenmiştir. Kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojellerinde ise; kitosan fiberlerinin yükleme oranı azaldıkça ve kitosan fiberlerin çapı arttıkça bozunma hızının arttığı belirlenmiştir.

Doku iskelelerinin bozunur olmaları, doku mühendisliği uygulamalarında çok önemli bir yer tutmaktadır. İdeal olarak; yeni doku oluşumunun gerçekleşmesi esnasında, doku iskelesinin bozunması gerekir. Biyobozunur polimerlerin en büyük avantajı vücuda yerleştirildiklerinde zamanla vücutta hiçbir yapay madde kalmamasıdır. PLLA-PEG kriyojellerde bozunma ürünlerinden biri poly (L_lactide),

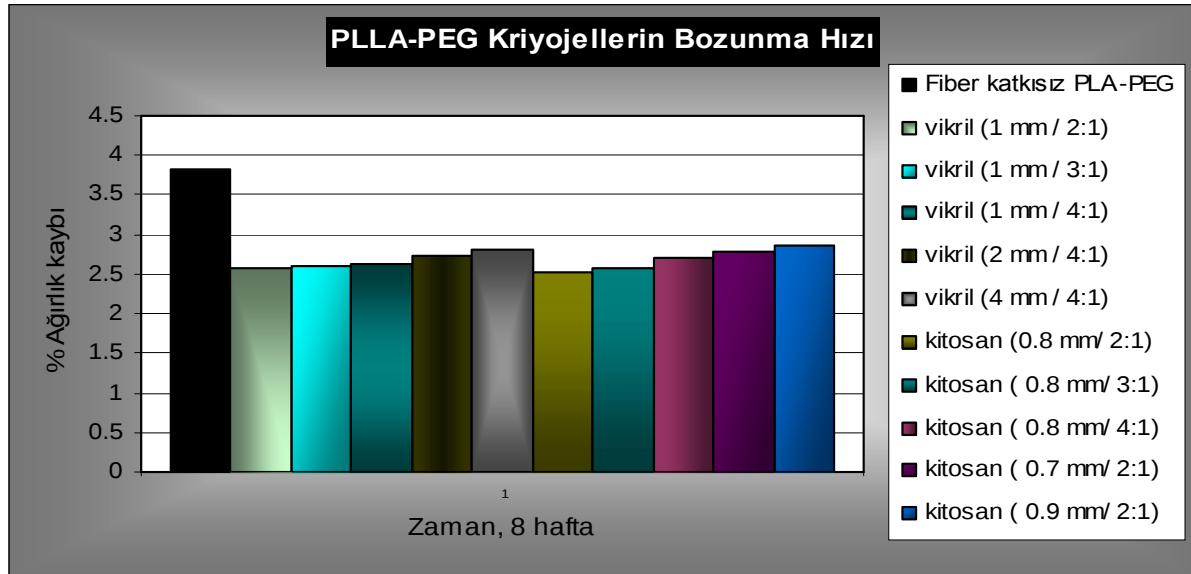
yani laktik asittir. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan bir moleküldür ve polimerlerinin doku mühendisliğinde, biyobozunur doku iskelesi olarak birçok biyomedikal uygulamada geniş kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. PLLA; beyaz renkli kristal yapıya sahiptir ve hidrofobiktir. Su ile ester bağları hidrolize uğrayarak bozunur ve bozunma sonucu ortaya çıkan ürün (laktik asit) zaten vücutta var olan bir metabolittir; dolayısıyla son ürün olarak su ve karbondioksit kadar parçalanır. PEG ise; toksik olmayan, renksiz, biyouyumluluğu nedeni ile ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir polimerdir. PLLA hidrofobik, PEG ise hidrofilik karakterdedir. PLLA ile PEG kopolimerleştirilerek daha hidrofilik yapıda polimerik yapı elde edilmektedir. Kopolimerin daha hidrofilik yapıda olması hidrolitik bozunma karakterine sahip PLLA'nın daha yüksek hızlarda bozunmasına olanak sağlamaktadır. PLLA-PEG kriyojellerinde, bir başka bozunma ürünü de vikrildir. Vikril, %90 glikolik asit ve %10 L-laktik asit içeren bir kopolimerdir. Miller ve arkadaşları, 50/50 poli(laktit-ko-glikolid)'in çok hızlı hidroliz olması nedeniyle hidrolitik biyobozunumunun son derece hızlı olduğunu göstermişlerdir (Miller et al., 1977). Ara ko-polimerlerin, homopolimerlerle karşılaştırıldığında daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. 50/50 poli(DL-laktit-ko-glikolid)'in yaklaşık 1-2 ay içerisinde biyobozunuma uğrarken, 75/25'in 4-5 ay, 85/15'in 5-6 ay içerisinde biyobozunuma uğraması buna bir örnektir (Middleton et al., 1998). Poli(laktit-ko-glikolid)'lerin değişik oranlardaki ürünleri ticari olarak geliştirilmiş ve biyotıp uygulamalarında denenmişlerdir. %90 glikolik asit (GA) ve %10 L-laktik asid (LA) içeren bir kopolimer olan Vicryl® de çok filamanlı bir suture malzemesi olarak ticari kullanıma sunulmuştur. PLLA-PEG kriyojellerindeki son bozunma ürünü ise kitosandır. Kitosan zincirlerinin 1, 4 N-asetil-glukozamin grupları *in vivo* ortamda lizozim enzimi ile hidroliz olur ve bozunma sonrasında ortama salınan amino şekerleri, glikozaminoglikan ve glikoprotein metabolik yollarına karışırlar ya da vücuttan atılırlar. Kitosanın kimyasal yapısı üzerindeki oynamalar, çözünürlüğünü ve biyobozunum hızını doğrudan etkiler. Hızlı biyobozunum, kitosanda mevcut olan hidrojen bağlarının bozulması ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi; katgut katkısız jelatin esaslı kriyojelin, katgut katkılı kriyojellere oranla daha hızlı bozunduğu saptanmıştır. Katgut katkısız kriyojelin, katgut katkılı kriyojellere oranla gözeneklilik oranı daha fazla, dolayısı ile bozunum hızı daha yüksektir. Jelatin esaslı kriyojellerde; ilave edilen katgut'un yükleme

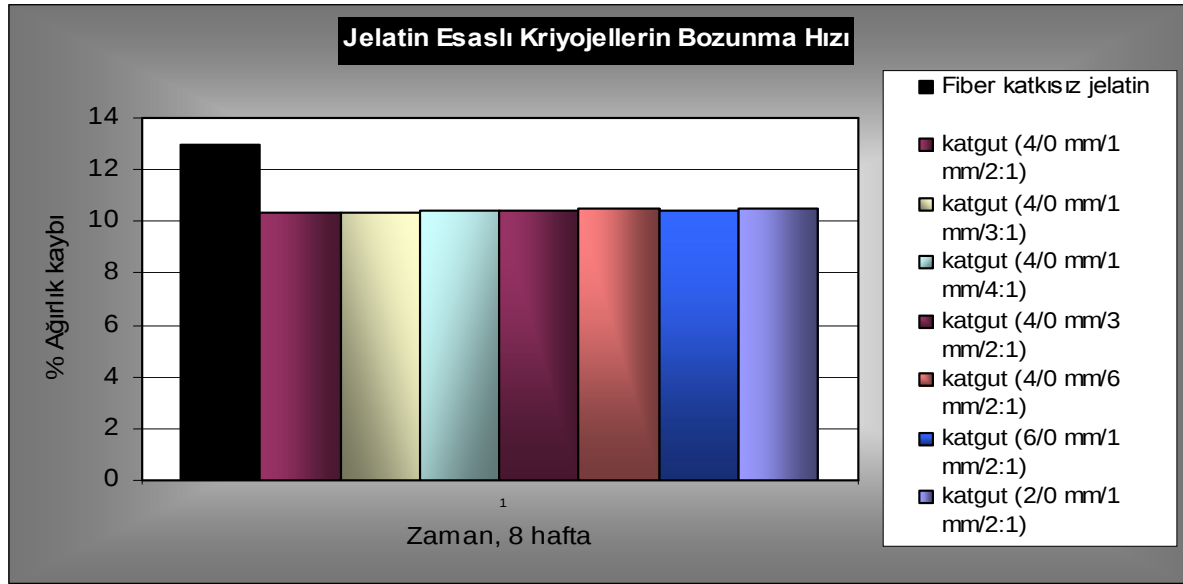
oranı arttıkça bozunma hızının azaldığı, boy ve çap oranı arttıkça bozunma hızının arttığı gözlenmiştir.

Hidrofilik amino ve hidroksil gruplarına sahip olan çapraz bağlı jelatinin makromoleküler zincirleri su varlığında hızla hidroliz olurlar. Dekstran; bakteriyel kaynaklı bir polisakkarittir ve in vivo ortamda enzimatik biyobozunma davranışı sergileyen hidrofilik bir polimerdir (Van Dijk-Wolthuis et al., 1997) Karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsak dahil olmak üzere vücut içerisindeki birçok organda bulunan dekstranaz enzimi aracılığı ile bozunur (Mehvar, R., 2000). Hidroksiapatit, kemiğin temel inorganik bir bileşeni olarak kalsiyum ve fosfat kaynağıdır; yüzeyinde kemik oluşumuna olanak sağlar ("osteiletken") ve düşük bozunma hızına sahiptir (Hoepfner et al., 2000). Cerrahi steril katgüt ise; emilebilir bir dikiş malzemesidir ve saflaştırılmış koyun ince barsağı mukoza altı fibroz dokusundan (çoklukla kolojen) oluşur.

Şekil 4.16'da PLLA-PEG ve şekil 4.17'de jelatin kriyojellerin 8 haftaya karşılık gelen yüzde ağırlık kayıpları şematize edilmiştir.



Şekil 4.16. Fiber katkısız ve fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellerin 8 hafta sonundaki yüzde ağırlık kaybı'nın şematik görünümü



Şekil 4.17. Fiber katkısız ve fiber katkılı jelatin kriyojellerin 8 hafta sonundaki yüzde ağırlık kaybı'nın şematik görünümü

Geniş ve büyük gözenekler (birkaç yüz mikrometre civarında) hücre ve doku penetrasyonu açısından uygun iken; daha küçük, mikro, hatta nano boyuttaki gözenekler bozunma hızının kontrolü açısından daha yüksek yüzey alanı sağlarlar. Jelatin esaslı kriyojelin, PLLA-PEG kriyojele oranla daha hızlı bozunmasının nedenlerinden biri de; jelatin esaslı kriyojelin gözeneklilik oranının PLLA-PEG kriyojele oranla daha fazla olması, dolayısı ile iç yüzey alanı/hacim oranının daha fazla olmasıdır.

4.3.5. Doku iskelelerinin sitotoksisite testleri

Tez kapsamında üretilen kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanımlarında en önemli özelliklerinden biri de biyoyumlu olmalarıdır. Bunun belirlenmesi için deneysel çalışmalar bölümünde belirtilen protokol kullanılarak sitotoksisite testleri yapılmıştır. Bu testlerde 5 örnek test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de topluca sunulmuştur.

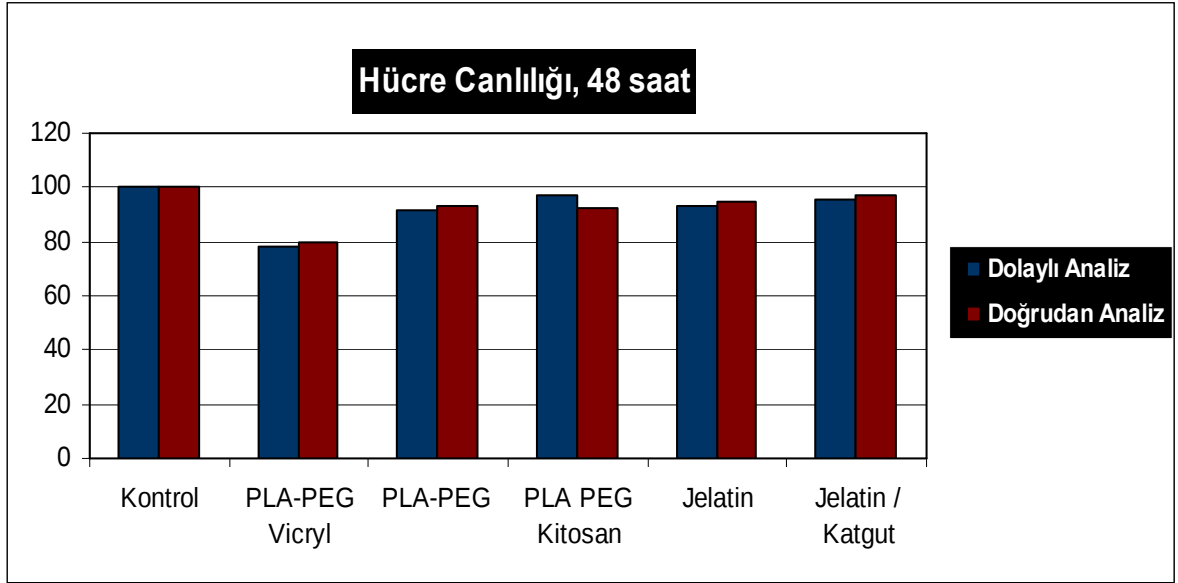
Çizelge 4.8. Kriyojellerin sitotoksisiteleri

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Hücre Canlılığı (%) “Doğrudan Sitotoksisite”
PLLA-PEG	Katkısız	93.34 $\pm$ 0.10
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/1 mm/3:1)	80.11 $\pm$ 0.40
PLLA-PEG	kitosan (207 μ m/4:1)	92.00 $\pm$ 0.39
Jelatin Esaslı	Katkısız	95.09 $\pm$ 0.32
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/3:1)	97.15 $\pm$ 0.33

* Parantez içindeki değerler sırasıyla katılan fiberin çapını, boyunu ve katılma oranını göstermektedir. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir.

Polimer Türü	Fiber Katkısı*	Hücre Canlılığı (%) “Dolaylı Sitotoksisite”
PLLA-PEG	Katkısız	91.91 $\pm$ 0.09
PLLA-PEG	vikril (337 μ m/1 mm/3:1)	78.54 $\pm$ 0.41
PLLA-PEG	kitosan (207 μ m/4:1)	97.36 $\pm$ 0.29
Jelatin Esaslı	Katkısız	92.77 $\pm$ 0.28
Jelatin Esaslı	katgut (245 μ m/1 mm/3:1)	95.65 $\pm$ 0.28

Şekil 4.18’de PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin sitotoksik etkilerinin incelenmesi için yapılan MTT testinin sonuçları şematize edilmiştir.



Şekil 4.18. PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin sitotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan MTT testi sonucu

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.18’de görüldüğü gibi MTT testi sonucunda; doğrudan yapılan sitotoksisite analizleri, dolaylı yapılan analizlere göre kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojeli hariç olmak koşulu ile daha iyi sonuç vermiştir.

Dolaylı yapılan sitotoksisite testlerinde PLLA-PEG esaslı kriyojeller için en yüksek hücre canlılığı ortamı kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojelinde gözlenirken, en düşük hücre canlılığı vikril katkılı PLLA-PEG kriyojelinde gözlenmiştir. Jelatin esaslı kriyojellerde ise; katgut katkılı jelatin esaslı kriyojel, katgut katkısız olana göre daha iyi hücre canlılığı ortamı sergilemiştir.

Doğrudan yapılan sitotoksisite testleri sonucunda ise; PLLA-PEG esaslı kriyojeller arasında en iyi hücre canlılığı ortamı fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelinde gözlenirken, en düşük hücre canlılığı ortamı kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojelinde gözlenmiştir. Jelatin esaslı kriyojellerde ise; katgut katkılı kriyojel, fiber katkısız olana göre daha iyi hücre canlılığı ortamı sergilemiştir.

Genel olarak; kriyojellerin hücre canlılığı açısından uygun oldukları söylenebilir; ancak gözlenen ortalama yüzde 75 oranındaki kirlilik, kriyojellerin daha iyi yıkanmaları sonucu ortadan kaldırılabilir.

5. SONUÇLAR

- Poli(laktat)-Poli(etilen glikol) kopolimeri, laktat dimeri ve PEG (6000 Da) kullanılarak kalay oktoat katalizörlüğünde yığın polimerizasyonu ile sentezlenmiştir (dimer/PEG oranı (mol/mol) 300/1).
- Kopolimerin GPC yöntemiyle bulunan sayıca (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlığı ve heterojenlik indisi (M_w/M_n), sırasıyla 18.810, 53.383 ve 2.838'dir.
- Sentezlenen kopolimerin kimyasal yapısı FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ ile analiz edilmiş ve laktat ve PEG'e ait karakteristik pikler gözlenmiştir.
- Kopolimerin termal davranışları DSC ile karakterize edilmiştir. DSC taramaları sonucu elde edilen erime sıcaklığı PEG6 kDa (300/1) 165.5 °C'dir.
- Vikril fiberleri 3 farklı uzunlukta (1, 2 ve 4 mm) kesilmiş ve PLLA-PEG kriyojel oluşumu sırasında yapıya farklı miktarlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 sırası ile 0.25 g PLLA-PEG/0.125 g fiber; 0.25 g PLLA-PEG/0.083 g fiber ve 0.25 g PLLA-PEG/0.0625 g fiber) ilave edilmiştir.
- Kitosan fiberler; üç farklı çapta iğne kullanılarak ıslak eğirme yöntemi ile üretilmiştir. Üç grup kitosan fiberin ortalama çapları 298, 207 ve 176 μm olarak Taramalı Elektron Mikroskobu ile belirlenmiştir. Bu fiberler PLLA-PEG kriyojellerin hazırlanması sırasında yapıya farklı oranlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 sırası ile 0.25 g PLLA-PEG/0.125 g fiber; 0.25 g PLLA-PEG/0.083 g fiber ve 0.25 g PLLA-PEG/0.0625 g fiber) ilave edilmiştir.
- 3 farklı çaptaki (2/0, 4/0 ve 6/0 sırası ile 395 μm , 245 μm ve 192 μm) katgut fiberleri, 3 farklı uzunlukta (1, 3 ve 6 mm) kesilmiş, jelatin esaslı kriyojeller oluşturulurken yapıya farklı oranlarda (matriks/fiber oranı 2:1, 3:1 ve 4:1 olacak şekilde sırası ile 0.2 g jelatin/0.1 g katgut; 0.2 g jelatin/0.066 g katgut ve 0.2 g jelatin/0.05 g katgut) konmuştur.
- Tez kapsamında kriyojel tekniği kullanılarak iki tür doku iskelesi hazırlanmıştır. Birinci tür doku iskelesi PLLA-PEG kriyojelleridir. Kopolimerler (%5) ile 1,4-dioksan içerisinde çözeltiler hazırlanarak bu çözeltilerden kriyojel tekniği kullanılarak organik fazdan gözenekli matrisler elde edilmiştir. İkinci tür ise, jelatin esaslı HA içeren oksidekstran ile çapraz

bağlanmış kriyojellerdir. PLLA-PEG esaslı olanlara vikril ameliyat ipliklerinden hazırlanan fiberler ve tez kapsamında “ıslak eğirme” yöntemiyle üretilen kitosan fiberler yüklenmiştir. Jelatin esaslı olanlara ise yalnızca katgut ameliyat ipliklerinden elde edilen fiberler yüklenmiştir.

- Hazırlanan kriyojellerin gözenek yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Fiber katkısız PLLA-PEG kriyojellerin geniş ve birbirleri ile bağlantılı, homojen dağılımlı gözenek yapısına sahip olduğu gözlenmiş ve ortalama gözenek çapının 45 µm olduğu belirlenmiştir. Vikril ve kitosan fiberlerin ilave edildiği PLLA-PEG kriyojellerin ise; ilave edilen fiberin boyu, çapı ve yükleme oranına göre farklılıklar ortaya çıkardığı ve genel olarak homojen gözenek dağılımını bozduğu gözlenmiştir. İlave edilen fiberin yükleme oranı arttıkça, boyu uzadıkça ve çapı arttıkça homojen gözenek yapısı ve dağılımının bozulduğu görülmüştür. Genel olarak vikril fiberlerin bulunduğu bölgelerde gözenek çapı 180-210 µm değerinde gözlenirken, fiberlerin bulunduğu bölümlerden uzaklaşıldıkça gözenek çapının ortalama 105 µm olduğu belirlenmiştir. Kitosan fiberlerin yüklenmesi sonrasında ise gözenek çapının, kullanılan şırınga iğnesinin çapına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Şırınga iğnesinin çapı 0.7 mm iken gözenek çapı ortalama 14 µm olarak belirlenmiştir. Şırınga iğnesinin çapı 0.8 mm ve 0.9 mm iken gözenek boyutunun homojen bir dağılım sergilemediği saptanmıştır. Kitosan fiberlerin bulunmadığı bölgelerden başlayarak fiberlerin bulunduğu bölümlere yaklaşıldıkça; 53 µm, 143 µm ve 213 µm gibi gözenek boyutlarının, homojen olmayan bir görünüm sergilediği görülmüştür. 0.7 mm çaplı şırınga iğnesi ile sentezlenen kitosan fiberlerin ilave edildiği kriyojel yapısında ise, gözenek boyutunun daha homojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir.
- Fiber katkısız jelatin esaslı kriyojelde; hidroksiapatit partiküllerinin gözenek duvarlarına kümelenmiş oldukları dikkat çekmekle birlikte matriks içerisinde homojen bir dağılım sergiledikleri görülmüştür. Fiber katkısız jelatin/HA kriyojelin, oldukça gözenekli olduğu ve ortalama gözenek çapının 200 µm olduğu saptanmıştır.
- Katgut katkılı jelatin/HA kriyojellerde ise; fiberlerin etrafındaki gözeneklerin çaplarının oldukça büyük (300-350 µm'ye varan çaplarda) olduğu ve fiberlerin bulunduğu bölgeden uzaklaşıldıkça gözenek çaplarının

küçüldükleri (ortalama 100 μ m) görülmüştür. Katgut fiberlerin bulunduğu bölgelerin etrafında, artan yüzey geriliminden kaynaklanan derin yarıklar göze çarpmaktadır. İlave edilen katgut fiberinin boyu, çapı ve yükleme oranı arttıkça; fiber katkılı PLLA-PEG kriyojellere benzer olarak, jelatin kriyojellerde de gözenek dağılımının homojenliğinin bozulduğu, gözenek yapısının değiştiği, daha kapalı gözeneklerin olduğu görülmüştür. Katgut'un çapı, yükleme miktarı ve boy oranı azaldıkça; matris içindeki homojen dağılımın daha kolay sağlanabildiği, kriyojelin gözenek yapısını daha çok koruduğu ve birbirleri ile bağlantılı gözeneklerin olduğu gözlenmiştir.

- PLLA-PEG kriyojellerden farklı olarak; jelatin esaslı kriyojellerin gözenek çapının yaklaşık 4.5-5 kat daha büyük olduğu belirlenmiştir.
- Homojen fiber dağılımı sağlamanın değişen fiber boyu, çapı ve yükleme miktarı koşullarında kriyojel üretiminde büyük bir sorun olduğu deneyimlenmiştir.
- Üretilen PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin farklı boyutlardaki fiberler ile farklı oranlarda yüklenmiş formlarının denge şişme yüzdeleri hesaplanmış ve kriyojellerin şişme davranışları incelenmiştir. Fiber katkısız PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerin, fiber katkılı kriyojellere oranla şişme yüzdelerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Fiber katkısının genel olarak şişme değerinde azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Fiber yükleme oranına göre değerlendirme yapıldığında; yükleme oranı arttıkça şişme değerinde azalma olduğu, yükleme oranı azaldıkça şişme değerinin arttığı belirlenmiştir. Boy oranına göre değerlendirme yapıldığında ise, yüklenen fiberin boyu arttıkça şişme değerinin arttığı görülmüştür. Fiber çapına göre değerlendirilme yapıldığında ise; fiber çapı arttıkça şişme değerinde artma olduğu saptanmıştır.
- Genel olarak; jelatin esaslı kriyojelin hem fiber katkılı hem de katkısız olmak üzere PLA-PEG kriyojeline oranla çok daha yüksek şişme davranışı sergilediği gözlenmiştir. Fiber katkısız jelatin esaslı kriyojelin, fiber katkısız PLA-PEG kriyojeline oranla yaklaşık 5.3 kat daha fazla su absorblayabildiği gözlenmiştir.

- Kriyojellerin mekanik özellikleri; sıkıştırma modunda, oda sıcaklığında 500 N kuvvet ile 10 mm/dak sabit sıkıştırma hızında, Lloyd Universal Tensile test cihazı (Lloyd Instruments, LRX Internal Extensometer, ABD) kullanılarak incelenmiştir; % uzama değerlerine karşılık sıkıştırma gerilimini veren grafikler elde edilmiştir. PLLA-PEG kriyojellerinde; yüzde uzama değerleri minimum yüzde 15.747 ile maksimum yüzde 23.562 değerleri arasında değişmektedir. Fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelinde ise bu değer 16.969 ile 0.202 olarak gözlenmiştir. Jelatin esaslı kriyojellerde; yüzde uzama değerleri minimum yüzde 14.061 ile maksimum yüzde 19.054 değerleri arasında değişmektedir. Fiber katkısız jelatin kriyojelinde ise bu değer 17.387 ile 0.434 olarak gözlenmiştir.
- Sonuç olarak; fiber katkılı PLLA-PEG ve jelatin kriyojeller, fiber katkısız kriyojeller ile karşılaştırıldığında mekanik dayanımlarının arttığı saptanmıştır. Fiber katkılı olarak hazırlanan PLLA-PEG ve jelatin esaslı kriyojellerde ilave edilen fiberin boyu ve yükleme miktarı arttıkça mekanik dayanımının azaldığı ve çapı azaldıkça mekanik dayanımının arttığı belirlenmiştir.
- Kriyojellerin *in vitro* koşullarda bozunurluk testi gerçekleştirilmiştir. Fiber katkısız PLLA-PEG kriyojelin, vikril ve kitosan fiber katkılı kriyojellere göre daha hızlı bozunduğu gözlenmiştir. Vikril katkılı PLLA-PEG kriyojellerinde; ilave edilen vikrilin yükleme oranı azaldıkça ve vikril boyu arttıkça bozunma hızının arttığı gözlenmiştir. Kitosan katkılı PLLA-PEG kriyojellerinde ise; kitosan fiberlerinin yükleme oranı azaldıkça ve kitosan fiberlerin çapı arttıkça bozunma hızının arttığı belirlenmiştir. Katgut katkısız jelatin esaslı kriyojelin, katgut katkılı kriyojellere oranla daha hızlı bozunduğu saptanmıştır. Katgut katkısız kriyojelin, katgut katkılı kriyojellere oranla gözeneklilik oranı daha fazla, dolayısı ile bozunum hızı daha yüksektir. Jelatin esaslı kriyojellerde; ilave edilen katgut'ün yükleme oranı arttıkça bozunma hızının azaldığı, boy ve çap oranı arttıkça bozunma hızının arttığı gözlenmiştir.
- Kriyojellerin biyouyumluluğunun test edilmesi amacı ile sitotoksikite testleri yapılmıştır. Genel olarak; kriyojellerin hücre canlılığı açısından uygun oldukları görülmüştür. Kriyojellerin tümü için ortalama yüzde 7.5 oranında kirlilik saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Alcantar, N.A., Aydil, E.S. Israelachvili, J.N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51(3), 343-351, 2000.
- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L. Silk based biomaterials. *Biomaterials*, 24, 410-416, 2003.
- Andac, M., Plieva, F.P., Denizli, A., Galaev I.Y., Mattiasson, B. Poly(hydroxyethyl methacrylate)-based macroporous hydrogels with disulphide cross-linker. *Macromol. Chem. Physc.*, 209, 577-584, 2008.
- Attawia, M.A., Uhrich, K.E., Botchwey, E., Langer, R., Laurencin, C.T. In vitro bone compatibility of poly(anhydride-co-imides) containing pyromellitylimidoalanine. *J. Orthopaedic Res.*, 14, 445-454, 1996.
- Athanasίου, K.A., Niederauer, G.G., Agrawal, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers, *Biomaterials*, 17, 93-102, 1996.
- Azab Ak, Orkin, B., Doviner, V., Nissan, A., Klein, M., Srebnik, M. Crosslinked chitosan implants as potential degradable devices for brachytherapy: In vitro and in vivo analyses. *J. Control. Release*, 111, 281-289, 2006.
- Behraves, E., Vasko, A.W., Engels, P.S., Mikos, A.G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications, *Clin. Orthopaed. Rel. Res.* 367, 118-125, 1999.
- Bergsma, J.E., Rozema, F.R., Bos, R.R., Boering, G., de Bruijn, W.C., Pennings, A.J. In vivo degradation and biocompatibility study of in vitro pre-degraded as-polymerized polylactide particles. *Biomaterials.*, 16, 267-274, 1995.
- Bölgen, N., Plieva, F., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Piskin, E. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition.*, 18, 1165–1179, 2007.
- Bonzani, I.C., Adhikari, R., Houshyar, S., Mayadunne, R., Gunatillake, P., Stevens, M.M. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 423-433, 2007.

- Bran G.M., Stern-Straeter J., Hörmann K., Riedel F., Goessler U.R., Apoptosis in Bone For Tissue Engineering, *Archives of Medical Research*, 39, 467, 2008.
- Breme, H.J., Biehl, V., Helsen, J.A. Metals and implants. In Helsen JA, Breme HJ (eds), *Metals as Biomaterials*, Chichester; Wiley, 1998, pp. 37-72.
- Bryant, S.J., Nuttelman, C.R., Anseth, K.S. The effects of crosslinking density on cartilage formation in photocrosslinkable hydrogels. *Biomed. Sci. Instrum.* 35, 309-314, 1999.
- Burkatovskaya, M., Tegos, G.P., Swietlik, E., Demidova, T.N., Castano, A.P., Hamblin, M.R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*, 27, 4157-4164, 2006.
- Cao, Y., Vacanti, J.P., Palge, K.T., Upton, J., Vacanti, C.A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 100(2), 297-302, 1997.
- Chan, P.S., Caron, J.P., Rosa, G.J., Orth, M.W. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandine E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 387-394, 2005.
- Chen, G.Z., Fray, D.J., Farthing, T.W. Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride. *Nature* 407: 361-364, 2000.
- Chen, G.Z., Xu, L., Liang, Y., Wang, J., Zhao, M., Li, Y. Polyethylene glycol diacrylate-based supermacroporous monolithic cryogels as high-performance liquid chromatography stationary phase for protein and polymeric nanoparticle separation. *J. Chromatogr., A* 1182, 128-131, 2008.
- Chuang, V.T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm. Res.*, 19(5), 569-577, 2002.
- Cooper, J.A., Lu, H.H., Ko, F.K., Freeman, J.V. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 26(13), 1523-1532, 2005.
- Deraz, S., Plieva, F.M., Galaev, I., Nordberg Karlsson, E., Mattiasson, B. Capture of bacteriosins directly from non-clarified fermentation broth using

- macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands. *Enzyme Microb. Tech.*, 40, 786-793, 2007.
- Doblare, M., Garcia, J.M., Gomez, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng. Fract. Mech.*, 71, 1809-1840, 2004.
- Dorgan, J.R., Lehermier, H.J., Palade, L.I., Cicero, J. Polylactides: properties and prospects of environmentally benign plastic from renewable sources. *Macromol. Symp.*, 175, 55-66, 2001.
- Dorgan, J.R., Lehermerier, H., Mang, M. Thermal and rheological properties of commercial-grade poly(lactic acid)s. *J. Polym. Environ.*, 8, 1-9, 2000.
- Drosse I., Volkmer E., Capanna R., De Biase P., Mutschler W., Shieker M., Tissue Engineering For Bone Defect Healing: An update on a multi-component approach, *International Journal of The Care of The Injured*, 39, 9, 2008.
- Duan, X., McLaughlin, C., Griffith, M., Sheardown, H. Biofunctionalization of collagen for improved biological response: scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterial*, 28, 78-88, 2007.
- Dunn, R. Clinical applications and update on the poly(alpha-hydroxy acids, *Biomedical Applications of Synthetic Biodegradable Polymers*, J. Hollinger Ed. CRC Press; New York, 1995.
- Eastoe, J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biorheni.*, 61, 589-600, 1955.
- Elisseeff, J., McIntosh, W., Anseth, K., Riley, S., Ragan, P., Langer, R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating Networks. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51(2), 164-171, 2000.
- Filippova I, Y., Proteinases immobilised on poly(vinyl alcohol) cryogel: novel biocatalyst for peptide synthesis in organic media. *Russ. Chem. Bull.*, 10, 1886-1901, 2001.
- Gilbert, M.E., Kirker, K.E., Gray, S.D., Ward, P.D., Szakacs, J.G., Preswitch, G.D. Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa. *Laryngoscope*, 114(8), 1406-1409, 2004.
- Gomes, M.E., Salgado, A.J., Reis, R.L. Polymer based systems on tissue engineering: replacement and regeneration. 1st edn. Kluwer, Dordrecht, p 221.

- Gomes, M.E., Godinho, J.S., Tchalamov, D., Cunha, A.M., Reis, R.L. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. *Mater. Sci. Eng.*, 20(1-2), 19-26, 2002.
- Gordon, M.J. Measurement of Gd-DTPA diffusion through PVA hydrogel using a novel magnetic resonance imaging method. *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 459-467, 1999.
- Gruessner, U., Clemens, M., Pahlplatz, P.V., Sperling, P., Witte, P., Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamycin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer. *Am. J. Surg.*, 182, 502-509, 2001.
- Gunatillake, P., Mayadunne, R., Adhikari, R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnol. Ann. Rev.*, 12, 301-347, 2006.
- Hearer, J.C., Dee, K.C. Proteins and amino acid-derived polymers. In: Guelcher S.A., Hollinger, J.O., editors. *An introduction to biomaterials*. Boca Raton, F.L.: CRC Taylor and Francis, p. 121-138, 2006.
- Heller, J., Ocular delivery using poly(ortho esters). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 2053-2062, 2005.
- Hench, L.L. and Polak J.M. Third generation biomedical materials. *Science.*, 295 (5557), 1014-1017, 2002.
- Hill-West, J., Chowdhury, S., Sawney, A., Pathak, C., Dunn, R., Hubbell, J. Prevention of postoperative adhesions in the rat by in situ photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers. *Obstet. Gynecol.*, 83, 59-64, 1994.
- Hollister, S.J., Lin, C.Y., Saito, E. Engineering craniofacial scaffolds. *Orthod. Craniofac. Res.*, 8, 162-173, 2005.
- Holy, C.E., Shoichet, M.S., Davies, J.E. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51(3), 376-382, 2000.
- Hoepfner, T.P., Case, E.D, Physical Characteristics of Sintered Hydroxyapatite, *Bioceramics: Materials and Applications III*, Ceramic Transactions, 110, 53-54, 2000.

- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.
- Hutmacher, D.W. Scaffold design and fabrication Technologies for engineering tissue-state of art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym*, 12, 107-124, 2001.
- Ibim, S.E., Urich, K.E., Attawia, M., Shastri, V.R., El-Amin, S.F., Bronson, R. Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 43, 374-379, 1998.
- Ivanov, R.V., Lozinsky, V.I., Noh, S.K., Lee, Y.R., Han, S.S., Lyoo, W.S., Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. *J. Appl. Polymer Sci.*, 107, 382-390, 2007.
- Karageorgiou, V., Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-91, 2005.
- Karp, J.M., Shoichet, M.S., Davies, J.E. Bone formation on two-dimensional poly(d-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 64(2), 388-396, 2003.
- Katti, D.S., Robinson, K.W., Ko, F.K., Laurencin, C.T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B.: Appl Biomater.*, 70, 286-296, 2004.
- Kemp, P.D. Tissue engineering and cell populated collagen matrices. In: Streuli, C., Grant, M. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 139, pp. 287-293, 2000.
- Kim, S.S., Utsunomiye, H., Koski, J.A., Wu, B.M., Cima, M.J., Sohn, J., Mukai, K., Griffith, L.G., Vacanti, J.P. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable scaffold with an intrinsic network of channels. *Ann.Surg.*, 228(1), 8-13, 1998.
- Kim, T.K., Yoon, J.J., Lee, D.S., Park, T.G. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*, 27, 152-159, 2006.

- Kirker, K.R., Luo, Y., Nielson, J.H., Shelby, J., Prestwich, G.D. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials*, 17, 3661-71, 2002.
- Kosir, M.A., Quinn, C.C., Wang, W., Tromp, G. Matrix glycoseaminoglycans in the growth phase of fibroblasts: more of the story in wound healing. *J. Surg. Res.*, 92, 45-52, 2000.
- Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378, 2003.
- Li, X., Feng, Q., Jiao, Y., Cui, F. Collagen-based scaffolds reinforced by chitosan fibers for bone tissue engineering. *Polymer Internat.*, 54, 1034-1040, 2005.
- Liu, L., Zhang, L., Ren, B., Wang, F., Zhang, Q. Preparation and characterization of collagen hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotech.*, 31, 435-448, 2003.
- Liu, J.C., Heilshorn, S.C., Tirrell, D.A. Comparative cell response to artificial extracellular matrix proteins containig the RGD and CS5 cell-binding domains. *Biomacromolecules*, 5, 497-504, 2004.
- Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, 71(6), 489-511, 2002.
- Lu, L., Mikos, A.G. The importance of new processing techniques in tissue engineering. *MRS Bull.*, 21(11), 28-32, 1996.
- Lu, Y., Chen, S.C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 1621-1633, 2004.
- Lusta, K.A. Immobilization of E. Coli cells in macroporous polyacrylamide cryogels. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 24, 418-426, 2004.
- Macchiarini, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M.A., Rees, L.E., Cogan, T.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372(9655), 2023-2030, 2008.
- Maheswari, G., Brown, G., Lauffenburger, D.A., Wells, A., Griffith, L.G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.*, 113(Pt 10), 1677-1686, 2000.

- Mao, H.G., Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control Release*, 70, 399, 2001.
- Mao, J.S., Zhao, L.G., Yin, Y.J., Yao, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074, 2003.
- Martinac, A., Filipovi, J., Voinovich, D., Perissutti, B., Franceschinis, E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int. J. Pharm.*, 291, 69-77, 2005.
- Matthews, F.L. and Rawlings, R.D. *Composite Materials: Engineering and Science* (Chapman and Hall, London, 1994).
- Maurus, P.B., Kaeding, C.C. Bioabsorbable implant material review. *Oper. Tech. Sport Med.*, 12, 158-160, 2004.
- Matsumara, G., Hibino, N., Ikada, Y., Kurosawa, H., Shin'oka, T. Successful application of tissue engineered vascular scaffolds: clinical experience. *Biomaterials*, 24(13), 2303-2308, 2003.
- Mehvar R., *J. Control. Rel.* 69, 1, 2000.
- Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21, 2335-2346, 2000.
- Miller, R.A., Brady, J.M., Cutright, D.E. Degradation rates of oral reabsorbable implants (polylactates and polyglycolates: rate modofocation with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.*, 11, 711-719, 1977.
- Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., Langer, R. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation., *J. Biomed. Mater. Res.* 27(2), 183-189, 1993.
- Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D.N., Vacanti, I.P. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer*, 35, 1068, 1994.
- Miot, S., Woodfield, T.B.F., Daniels, A.U. Effects of scaffolds composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials*, 28, 2479-2489, 2005.
- Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., Vacanti, J.P., Langer, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14), 1417-1422, 1996.

- Moy, R.L., Waldman, B., Hein, D.W. A review of sutures and suturing techniques. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 18(9), 785-795, 1992.
- Murphy, W.L., Dennis, R.G., Kileny, J.L., Mooney, D.J. Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng.*, 8(1), 43-52, 2002.
- Murphy, M.; Mikos AG, Polymer scaffold fabrication. In *Principles of Tissue Engineering*, Third Edition ed.; 2007; pp 309-321.
- Muzarelli, R.A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M.A., Fini, M., Giardino, R., Ilari, P., Biagini, P. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15, 1075-1081, 1994.
- Nair, L.S., Laurencin, C.T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. In: Lee K Kaplan D, editors. *Tissue engineering I. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin: Springer Verlag Review Series; p. 47–90 (a), 2006.
- Nair, L.S., Lee, D.A., Bender, J.D., Barrett, E.W., Greigh, Y.E., Brown, P.W. Synthesis, characterization and osteocompatibility evaluations of novel alanine based polyphosphazens. *J. Biomed. Mater.*, 76A, 206-213, 2006.
- Naroatham, P.K., Jose, S., Nathoo, N., Taylon, C., Vora, Y. Collagen matrix (DuraGen) in dural repair: analysis of a new modified technique. *Spine*, 29, 2861-2867, 2004.
- Noir, M.L., Plieva, F.M., Hey, T., Guiyesse, B., Mattiasson, B. Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants. *J Chromatogr., A* 1154, 158-164, 2007.
- Nordtveit, R.J., Varum, K.M., Smitsrod, O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with egg white and human lysozyme., *Carbonhyd. Polym.*, 29, 163-167, 1996.
- Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J.J., Atala, A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat. Biotechnol.*, 17(2), 149-155, 1999.
- Orban, J.M., Marra, K.G., Hollinger, J.O. Composition options for tissue-engineered bone. *Tissue Eng.*, 8, 529-539, 2002.

- Park, Y.J., Lee, Y.M., Park, S.N., Sheen, S.Y., Chung, C.P., Lee, S.J. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21, 153-159, 2000.
- Penczek, S., Pretula, S., Kalyznski, K. Poly(alkylene phosphates): from synthetic models of biomacromolecules and biomembranes toward polymer-inorganic hybrids (mimicking bone biomineralization). *Biomacromolecules*, 6, 547-551, 2005.
- Perez, P., Plieva, F., Gallardo, A., Roman, J.S., Aguilar, M., Morfin, I., Ehrburger-Dolle, F. Bioresorbable and nonresorbable macroporous thermosensitive hydrogels prepared by cryopolymerization: Role of cross-linking agent. *Biomacromolecules*, 9, 66-74, 2008.
- Peter, S.J., Miller, M.J., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. Poly(propylene fumarate). In: Domb, A.J., Kost, J., Wiseman, D.M. editors. *Handbook of biodegradable polymers*. Amsterdam: Harwood Academic, 1997, p. 87-97.
- Petrov, P., Petrova, E., Stamenova, R., Tsvetanov, C.B., Riess, G. Cryogels of cellulose derivatives prepared via UV irradiation of moderately frozen systems. *Polymer*, 47, 6481-6484, 2006.
- Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I.Y. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1, 303-309, 2005.
- Plieva, F.M., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenstahl, B., Mattiason, B. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: Control of porous structure. *J. Mater. Chem.*, 16, 4065-4073, 2006.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B.; Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. *J.Sep.Sci.* 30, 1657-1671, 2007.
- Priscilla, A.M.L., van Luyn, M.J.A., Chiellini, F., Brouwer, L.A., Velthoen, I.W., Dijkstra, P.J. Biocompatibility and degradation of aliphatics segmented poly(ester amide)s: in vitro and in vivo evaluation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 76A, 699-710, 2006.
- Purna Sai, K., Babu, M. Collagen-based dressings-a review. *Burns*, 26, 54-62, 2000.

- Ratanavoraporn, J., Damrongsakkul, S., Sanchavanakit, N., Banaprasert, T., Kanokpanont, S., Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture. *Journal of Metal, Materials and Minerals*, 16, 31-36, 2006
- Rimondini, L., Cerroni, L., Carrasi, A., Toricelli, P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J OralMaxillofac. Implants*, 17(6): 793-798, 2002.
- Rout, P.G.J., Tarrant, S.F., Frame, J.W., Davies, J.E. Interaction between primary bone cell cultures and biomaterials. Part 3: a comparison of dense and macroporous hydroxyapatites. In: Pizzoferratto, A.R.P., Lee, A.J.C. eeditors. *Bioceramics and clinical applications*. Amsterdam Elsevier, 1988, p. 591-596.
- Saad, B., Hirt, T.D., Welti, M., Uhlscgmid, G.K., Neuenschwander, P., Suter, U.W. Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 65-74, 1997.
- Sano, A., Maeda, M., Nagahara, S., Ochiye, T., Honma, K., Itoh, H. Atelocollagen for protein end gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 1651-1677, 2003.
- Saxena, A.K., Marler, J., Benyenuto, M., Willital, G.H., Vacanti, J.P. Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers preliminary studies. *Tissue Eng*, 5(6), 525-532, 1999.
- Schieker, M., Seitz, H., Drosse, I., Seitz, S., Mutscler, W. Biomaterials and scaffold for bone tissue engineering. *Eur. J. Travma*, 32, 114-124, 2006.
- Scycher, M., Scycher's Handbook of Polyurethanes. BocaRaton, F.L.: CRC Press; 1999.
- Shea, L.D., Wang, D., Francheschi, R.T., Mooney, D.J. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng.*, 6(6), 605-617, 2000.

- Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., Cheng, T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J. Surg. Res.*, 133, 185-192, 2006.
- Sodian, R., Sperling, J.S., Martin, D.P., Egozy, A., Stock, U., Mayer, J.E., Vacanti, J.P. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng.*, 6(2), 183-188, 2000.
- Storey, R.F., Wiggins, J.S., Puckett, A.D. Hydrolyzable poly(ester urethane) Networks from L-lysine diisocyanate and D,L-lactide/e-caprolactone homo and copolyester triols. *J. Polym. Chem.*, 32, 2342-2345, 1994.
- Suggs, L., Kao, E.Y, Palombo, L.L., Krishnan, R.S., Widmer, M.S., Mikos, A.G. Preparation and characterization of poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 9(7), 653-666, 1998.
- Suda, T, Nakahashi, N., Martin, T.J., Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrin Rev.* 13 (1), 66-80, 1992.
- Such, J.K.F., Matthew, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21, 2689-2698, 2000.
- Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., Mikos, A.G. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7(1), 23-38, 1995.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 244-251, 2006.
- Tuzlakoğlu, K., Reis, R., Processing and biomedical applications of degradable polymeric fibers, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, in CRC Press, 2005.
- Tuzlakoglu, K., Bölgen, N., Salgado, A. J., Gomes, M. E., Piskin, E., Reis, R. L., Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine.*, 16, (12), 1099-1104, 2005.
- Ueda, H., Tabata, Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 501-518, 2003.
- Usami, K., Mizuno, H., Okada, K., Narita, Y., Aoki, M., Kondo, T., Mizuno, D. Composite implantation of mesenchymal stem cells with endothelial

- progenitor cells enhances tissue-engineered bone formations. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 102-107, 2008.
- Vacanti, J.P., Morse, M.A., Saltzman, W.M., Domb, A.J., Peter-Atayde, A., Langer, R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.*, 23, 3-9, 1998.
- Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Hallen, J.M., The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.*, 113(pt 3), 377-381, 2000.
- Van Dijk-Wolthuis W. N. E., J. A. M. Hoogeboom, M. J. van Steenberg, S. K. Y. Tsang and W. E. Hennink, *Biomacromolecules* 30, 4639 (1997).
- Van Susante, J.L., Pieper, J., Buma, P., van Kuppevelt, T.H., Beuningen, H.V., van der Kraan, P.M. Linkage of chondroitin-sulfate to type 1 collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials*, 22, 2359-2369, 2001.
- Vink, E.T.H., Rabago, K.R., Glassner, D.A., Gruber, P.R. Application of life cycle assessment to NatureWork™ polylactide (PLA) production. *Polym. Degrad. Stab.*, 80, 403-419, 2003.
- Wang, J., Zhang, P.C., Mao, H.Q., Leong, K.W. Enhanced gene expression in Mouse muscle by sustained release of plasmid DNA using PPE-EA as a carrier. *Gene Ther.*, 9, 1254-1261, 2002.
- West, J., Hubbell, J. Polymeric biomaterial with degradation sites for proteases involved in cell migration. *Macromolecules*, 32(1), 241-244, 1999.
- Williams, D.F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press: 1999.
- Woodfield, T.B.F., Malda, J., de Wijn, J. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-composite technique. *Biomaterials*, 25, 4149-4161, 2004.
- Woodhouse, K.A., Klement, P., Chen, V., Gorbet, M.B., Keeley, F.W. Investigation of recombinant human elastin polypeptides as non-thrombogenic coatings. *Biomaterials*, 25, 4543-4553, 2004.
- Wong, C., Inman, E., Spaethe, R., Heigerson, S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb. Haemost.*, 89, 573, 2003.
- Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I: Traditional factors. *Tissue Eng.*, 7(6), 679-689, 2001.

- Yıldırım, M., Fischer, H., Marx, R., Edelhoff, D. In vivo fracture resistance of implant supported all-ceramic restorations. *J Prosthet. Dent.*, 90(4), 325-331, (2003).
- Yoon, J.J., Park, T.G. Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55(3), 401-408, 2001.
- Zang, J.Y., Beckman, E.J., Peisco, N.P., Agrawal, S. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials*, 21, 1247-1258, 2000.
- Zhang, Z., Kuijer, R., Bulstra, S.K., Grijpma, D.K., Feijen, J.F. The in vivo and in vitro degradation behaviour of poly(trimethylene carbonate). *Biomaterials*, 27, 1741-1748, 2006.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Lütfiye Tutkun

Doğum yeri: Aydın

Doğum yılı: 1975

Medeni hali: Evli

İletişim: lutfiyetutkun@hacettepe.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Yüksek Lisans: 2008-2010 Biyomühendislik Anabilim Dalı/Fen Bilimleri Enstitüsü/
Hacettepe Üniversitesi

Lisans: 1992-1997 Kimya Mühendisliği Bölümü/ Ankara Üniversitesi

Lise: 1989-1992 Nazilli Lisesi/ AYDIN

Yabancı Dil: İngilizce

POSTER SUNUMLARI

Tutkun L, İnci İ, Piskin E, Gelatin Cryogel Scaffolds Reinforced with Hydroxyapatite Particles and Collagen Fibers, TERMIS EU 2010, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, June 13-17, 2010, Galway, Irlanda

SERTİFİKALAR

Monaco-Extra Summer School; Porous Hydrogels for Biomedical Applications from Cytapheresis to Tissue Engineering, 29 September-2 October, 2009, Antalya, Türkiye

Cost Action B28; Workshop on Array Technologies, 5-6 May, 2010, İstanbul, Türkiye

TÜBA; I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu, 25-26 Haziran, 2010, Ankara, Türkiye

Expertissues; Training Course on “Cranio-Maxillofacial Animal Models”, July 28-31, 2010, Ankara, Türkiye