



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KİTOSAN-KO-HYALURONİK ASİT
KRİYOJELLERİNİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

TUĞÇE KUTLUSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilhan Kayaman APOHAN

İSTANBUL, 2016



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KİTOSAN-KO-HYALURONİK ASİT KRİYOJELLERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

TUĞÇE KUTLUSOY
(520813017)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilhan Kayaman APOHAN

İSTANBUL, 2016

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Tuğçe KUTLUSOY'un "Kitosan-ko-Hyaluronik Asit Kriyojellerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu" başlıklı tez çalışması 19 Temmuz 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Nilhan Kayaman APOHAN (Danışman)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. Memet Vezir KAHRAMAN (Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Doç.Dr. Betül TAŞDELEN (Üye)

Namık Kemal Üniversitesi(İMZA).....

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.08.2016 Tarih ve 2016/1802 Sayılı kararı ile Tuğçe KUTLUSOY'un Kimya Anabilim dalı Organik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur Yahşi

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya programında gerçekleştirilmiştir. BAPKO FEN-C-YLP-130116-0009 numaralı proje kapsamında tez çalışılmıştır.

Gerek lisans gerek yüksek lisans çalışmalarım süresince değerli katkıları ve yardımlarıyla beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerini samimi bir şekilde aktaran, karşılaştığım problemler esnasında desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Nilhan Kayaman APOHAN' a, lisanstan bu yana değerli bilgi ve tecrübelerini en içten şekilde aktaran sayın Prof. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN' a çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen ve gerekli bilgi aktarımını cömertçe sunan sayın Prof. Dr. Serap KURUCA' ya ve doktora öğrencisi sevgili Mediha SÜLEYMANOĞLU' na,

Laboratuvar ortamında her türlü yardım ve desteği sağlayan sayın Uzm. Dr. Burcu OKTAY' a, Araş. Gör. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI' ya, doktora öğrencisi Emre BAŞTÜRK' e,

Laboratuvar ortamını yardımları ve sohbetleriyle daha keyifli hale getiren sevgili laboratuvar arkadaşlarım Merve YAŞAR' a ve Emre AYTAN' a,

Her zaman dostluklarıyla ve destekleriyle yanımda olduklarını bildiğim sevgili arkadaşlarım Çiğdem DOMANIÇLİ ve Ayşegül AKSOY' a

Her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim, beni her durumda daha iyisini yapmak için cesaretlendiren sevgili anneme, babama ve kardeşime,

Teşekkürlerimi içtenlikle sunmayı bir borç bilirim.

Haziran, 2016

Tuğçe KUTLUSOY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. LİTERATÜR IŞIĞINDA TEZ ÇALIŞMASININ YERİ	3
1.2. TEZİN AMACI	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. HİDROJELLER	7
2.1.1. Hidrojellerin Tarihi Gelişimi	7
2.1.2. Hidrojellerin Yapısı ve Özellikleri	9
2.1.3. Hidrojellerin Kullanım Alanları	11
2.1.4. Hidrojellerin Doku Mühendisliğindeki Kullanımı	12
2.2. KRIYOJELLER	14
2.2.1. Kriyojelasyon Tekniği	14
2.2.2. Makro Gözenekli Kriyojellerin Hazırlanışı ve Özellikleri	15
2.2.2.1. Kriyotropik Jelleşme	15
2.2.2.2. Kriyojellerin Özellikleri ve Uygulama Alanları	16

2.2.3.1. Kriyojelasyon Tekniğinin Avantajları	18
2.2.3.2. Kriyojelasyon Tekniğinin Dezavantajları	19
2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	19
2.3.1. İskelede (scaffold) Aranacak Özellikler	20
2.4. BİYOMATERYALLER	24
2.4.1. Biyomateryal Olarak Kullanılan Polimerler	25
2.4.1.1. Sentetik Polimerler	25
2.4.1.2. Doğal Polimerler	27
2.5. KİTOSAN	29
2.5.1. Kitosanın Yapısı ve Elde Edilişi	29
2.5.2. Kitosanın Yapısı ve Özellikleri Arasındaki İlişki	29
2.5.3. Biyomateryal Olarak Kitosanın Özellikleri	31
2.5.4. Doku Mühendisliği için Üç Boyutlu Kitosan İskeleler	32
2.5.4.1. Kitosan Hidrojeller	33
2.5.4.1.1. Fiziksel Bağlı Kitosan Hidrojeller	33
2.5.4.1.2. Koordinasyon Kompleksi ile Çapraz Bağlı Kitosanlar	35
2.5.4.1.3. Kimyasal Çapraz Bağlı Kitosan Hidrojeller	35
2.5.4.2. Kitosan Süngerler	36
2.7. HYALURONİK ASİT	36
2.7.1. Yapısı ve Kaynağı	37
2.7.2. Çözelti Özellikleri	38
2.7.3. Hyaluronik Asit İskele Yapı Tekniği	38
2.7.4. Hyaluronik Asit Bazlı İskele Materyallerinin Uygulamaları	39

2.7.4.1. Kemik ve kıkırdak doku onarımı ve yenilenmesi	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM	40
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	40
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	43
3.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	45
3.3.1. Kitosan Kriyojelinin Hazırlanması	45
2.3.2. Kitosan-ko-Hyaluronik Asit Kriyojelinin Hazırlanması	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Kitosan ve Kopolimer Kriyojellerin Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR) Analizi	49
4.2. Kriyojelin Termal Analizleri	53
4.2.1. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)	53
4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	59
4.3. Kriyojellerin Şişme Davranışları	64
4.4. Kriyojellerin Gözenek Yapıları	68
4.5. Kriyojellerin Gözenekliliği	73
4.6. Kriyojellerin in Vitro Degradasyonu	75
4.7. Kriyojellerin Mekanik Özellikleri	76
4.8. Hücre Çalışmaları	78
4.8.1. Hücre Ekimi Sonrası SEM Görüntüleri	78
4.8.2. MTT Testi	85
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKÇA	90
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Kitosan-ko-Hyaluronik Asit Kriyojellerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hidrojeller; hidrofilik homopolimerler veya kopolimerlerden oluşan çapraz bağlı polimerik ağ yapılarıdır ve bu yapıların hidrofilik gruplardan dolayı suya karşı yüksek ilgileri vardır. Suda belli bir denge hacmine kadar şişerler fakat orijinal şekillerini korurlar. Hem doğal hem de sentetik polimerlerden hazırlanabilmektedirler. Hidrojeller, biyolojik sıvılarda biyouyumluluk gösterirler.

Biyoteknolojide önemli bir potansiyele sahip polimerik jellerin yeni tiplerinden birisi de ‘kriyojeller’ dir. Kriyojeller; ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları nedeniyle biyolojik uygulamalarda önem kazanmışlardır. Kriyojellerin oluşumu çözücünün donma noktasının altında gerçekleşir. Böylelikle zamanla çözücünün büyük bir kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafında donmamış sıvıda bulunan polimer öncülleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev yapar. Polimerleşmeden sonra donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve makrogözeneklere sahip polimer ağ yapı elde edilir.

Bu tez çalışmasında kitosan-ko-hyaluronik asit kriyojellerinin doku mühendisliği uygulamasında yapı iskelesi (scaffold) olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Bu nedenle çalışmada kitosan-ko-hyaluronik asit kriyojelleri sentezlendi. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldı. Kopolimerler, hyaluronik asitin farklı konsantrasyonları (ağırlıkça %0, %10, %20, %30, %50) kullanılarak elde edildi. Bu çalışma ile saf kitosandan elde edilen kriyojellerin, hyaluronik asitin farklı konsantrasyonlarda kopolimerleri yapılmasıyla mekanik ve biyomalzeme özellikleri iyileştirildi ve doku iskelesi olarak kullanılmaları ile hücre uyumlulukları incelendi.

Elde edilen kriyojellerin yapı karakterizasyonu Infrared spektroskopisi ile yapıldı. Morfolojik yapısına SEM analizi ile bakıldı. Termal analizleri DSC ve TGA ile incelendi ve şişme davranışı takip edildi. MTT testi ile ekilen 3T3 fibroblast ve SAOS-2 hücrelerinin canlılığı takip edildi.

ABSTRACT

Preparation and Characterization of Chitosan-co-Hyaluronic Acid Cryogels

Hydrogels are crosslinked polymer networks which consists of hydrophilic homo or copolymer and they show high affinity to water due to its hydrophilic structure. They swell to a maximum equilibrium swelling value but they don't lose their original form. They can be synthesized with both natural and synthetic polymers. Hydrogels shows biocompatibility in biological liquids.

Cryogels are considered as a new type of polymeric gel which have significant potential in the area of biotechnology. Cryogels gained prominence in biologic applications due to their osmotic properties and chemical-mechanical stability. Cryogel formation is carried out under the temperature of freezing point of the solvent. Therefore, while a interconnected structure is formed by the crystallization of solvent due to freezing of solvent, a network is formed around these frozen structure by polymerization of precursors. The frozen solvent crystals play role as a pore forming agents. After the polymerization, frozen solvent melts when the frozen mixture is warmed up to room temperature thus an interconnected macroporous polymer network is obtained.

In this thesis work, the usability of chitosan-co-hyaluronic acid cryogels as a tissue engineering scaffold was investigated. Firstly, chitosan-co-hyaluronic acid cryogels were synthesized. Glutaraldehyde was used as a crosslinker. Several different composition of this copolymer was synthesized (0 wt %, 10 wt %, 20 wt %, 30 wt %, 50 wt %) In this work the mechanical and biomaterial properties of pure chitosan was improved by making copolymer with hyaluronic acid in different concentration and it was investigated that their application as a scaffold in tissue engineering and cell biocompatibility .

Chemical structure of cryogels analysed by Infrared Spectroscopy. Morphology of cryogels was investigated by SEM technique. Thermal properties of cryogels were investigated by DSC and TGA. Also swelling ratio of cryogels were measured. The cell viability of 3T3 fibroblast and SAOS-2 on cryogels was investigated by MTT tests.

SEMBOL LİSTESİ

°C	: Derece Celsius
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
gr	: Gram
kV	: Kilovolt
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
T	: Sıcaklık
T_g	: Camı geçiş sıcaklığı
W_ş	: şişmiş kriyojelin ağırlığı
W_k	: kuru kriyojelin ağırlığı
%	: Yüzde
ρ	: Yoğunluk
E	: Elastik Modül

KISALTMALAR

ADSCs	: Adipose Derived Stem Cells (yağ dokusu kök hücresi)
BPM-2	: Bone Morphogenetic Protein-2 (kemik morfogenetik protein-2)
DSC	: Diferansiyel Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
DTG	: Diferansiyel Termo Gravimetrik Analiz
ECM	: Ekstra selüler matriks
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
GAG	: Glikozaminoglikan
HA	: Hyaluronik Asit
LCST	: Lower Critical Solution Temperature (Düşük Kritik Çözelti Sıcaklığı)
PAA	: Poliakrilamid
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PEC	: Polielektrolit Kompleks
PEO	: Polietilenoksit
PEGDA	: Polietilenglikoldiakrilat
pHEMA	: Polihidroksietilmetakrilat
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
TGA	: Termo Gravimetrik Analiz
UFLMP	: Donmamış Sıvı Mikro Faz (unfrozen liquid microphase)

ŞEKİL LİSTESİ	SAYFA
Şekil 2.1. pHEMA' nın yapısı	7
Şekil 2.2. Büzülme-şişme durumunda bir hidrojin şematik olarak yapısı	8
Şekil 2.3. Hidrojin pH ve ısıya duyarlı olarak şişme-büzülme halinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.4. Hidrojellerde kimyasal etkileşim, fiziksel etkileşim ve degrede olabilen bölgeler için örnek şematik gösterim	10
Şekil 2.5. Hidrojellerin kullanım alanları	12
Şekil 2.6. Kriyojelasyon işleminin şematize hali ve kitosan kriyojin SEM görüntüsü	16
Şekil 2.7. Şişmiş bir kriyojelde yapıdaki ortalama değerlerde su dağılımı	17
Şekil 2.8. Doku mühendisliğinde kullanılan polimer iskelelerde hücre çoğalma döngüsü	23
Şekil 2.9. Kitosanın kitinden deasetilasyon ile eldesi	29
Şekil 2.10. Hyaluronik asitin yapısı	37
Şekil 3.1. Kitosan kriyojin glutaraldehit ile çapraz bağlanması	46
Şekil 3.2. Kriyojelasyon işleminin sembolize edilmesi	47
Şekil 3.3. Kitoson-hyaluronik asit kriyojellerinin sentezi	48
Şekil 4.1. (A) saf kitosan (çapraz bağlı olmayan kitosan) (B) 4G2C FTIR spektrumu	49
Şekil 4.2. (A) 10G2C (B) 6G2C (C) 4G2C FTIR spektrumu	49
Şekil 4.3. Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanın gösterimi	51
Şekil 4.4. (A) çapraz bağlı olmayan saf hyaluronik asit (B) çapraz bağlı olmayan saf kitosan (C) 4G2C (D) 4G2C50HY FTIR spektrumu	52
Şekil 4.5. (A) 4G2C (B) 4G2C10HY (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY	

(E) 4G2C50HY FTIR spektrumu	53
Şekil 4.6. (A) 4G2C10HY (B) 4G2C (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY	
(E) 4G2C50HY TGA eğrileri	55
Şekil 4.7. 4G2C TGA ve DTG eğrisi	56
Şekil 4.8. 4G2C10HY TGA ve DTG eğrisi	56
Şekil 4.9. 4G2C20HY TGA ve DTG eğrisi	57
Şekil 4.10. 4G2C30HY TGA ve DTG eğrisi	57
Şekil 4.11. 4G2C50HY TGA ve DTG eğrisi	58
Şekil 4.12. (A) 4G2C (B) 4G2C10HY (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY	
(E) 4G2C50HY (F) Saf kitosan Tg değerleri	61
Şekil 4.13. 4G2C DSC eğrisi	61
Şekil 4.14. 4G2C10HY DSC eğrisi	62
Şekil 4.15. 4G2C20HY DSC eğrisi	62
Şekil 4.16. 4G2C30HY DSC eğrisi	63
Şekil 4.17. 4G2C50HY DSC eğrisi	63
Şekil 4.18. Saf kitosanın DSC eğrisi	64
Şekil 4.19. Çapraz bağlı yapıdaki polimerlerin şişme davranışının sembolik gösterimi	65
Şekil 4.20. Şişmiş ve kuru kriyojellerin görüntüleri	65
Şekil 4.21. Kitosan ve kitosanın hyaluronik asit kopolimeri ile sentezlenen kriyojellerin zamana karşı şişme grafiği	66
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki çapraz bağlayıcılar ile kitosan kriyojellerin zamana karşı şişme grafiği	67
Şekil 4.23. Kriyojellerin altın kaplanma öncesi ve sonrası	68
Şekil 4.24. 4G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	69

Şekil 4.25. 6G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	69
Şekil 4.26. 10G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	70
Şekil 4.27. 4G2C10HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	70
Şekil 4.28. 4G2C20HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	71
Şekil 4.29. 4G2C30HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	71
Şekil 4.30. 4G2C50HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)	72
Şekil 4.31 (A) Su ile şişen kriyojeller (B) Baskı uygulandığında suyun bırakılması (C) Tekrar eski haline gelmesi	74
Şekil 4.32. PBS içerisinde inkübatörde degradasyon için bekletilen kriyojeller	75
Şekil 4.33. Kriyojellerin yüzde degradasyon grafiği	76
Şekil 4.34. (A) Basma Testi Şeması (B) Gerilim-Gerinim eğrisinin grafik gösterimi (kitosan-hyaluronik asit kriyojellere ait genel bir grafik)	77
Şekil 4.35. Kuyulara iskele materyalinin yerleştirilmiş hali	79
Şekil 4.36. 4G2C kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması	80
Şekil 4.37. 4G2C10HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması	80
Şekil 4.38. 4G2C20HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması	81
Şekil 4.39. 4G2C30HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması	81
Şekil 4.40. 4G2C50HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması	82
Şekil 4.41. 4G2C kodlu kriyojele SAOS 2 hücresinin yapışması	83
Şekil 4.42. 4G2C10HY kodlu kriyojele SAOS 2 hücresinin yapışması	83
Şekil 4.43. 4G2C20HY kodlu kriyojele SAOS 2 hücresinin yapışması	84
Şekil 4.44. 4G2C30HY kodlu kriyojele SAOS 2 hücresinin yapışması	84
Şekil 4.45. 4G2C50HY kodlu kriyojele SAOS 2 hücresinin yapışması	85
Şekil 4.46. (1) 4G2C (2) 4G2C10HY (3) 4G2C20HY (4) 4G2C30HY (5) 4G2C50HY 3T3 ve SAOS-2 hücrelerinin canlılık oranları	86

TABLO LİSTESİ	SAYFA
Tablo 2.1. Oda sıcaklığındaki jeller ile kriyojeller arasındaki en belirgin farklar	18
Tablo 3.1. Hazırlanan kriyojellerin içerik yüzdeleri	47
Tablo 4.1. Kitosan ve kopolimerlerinin ilk kısımdaki su kaybını, maksimum hangi derecede bozunduğunu ve kül miktarını gösteren tablo	58
Tablo 4.2. Kitosan ve kopolimerleri olan kriyojellerin Tg değerleri	64
Tablo 4.3. Kriyojellerin denge durumunda şişme oranları	67
Tablo 4.4. Kriyojellerin gözenekliliği ve ortalama gözenek çapları	73
Tablo 4.5. Kitosan ve kopolimerlerinden elde edilen kriyojellerin elastik modülleri	78
Tablo 4.6. Hücrelerin fiksasyonu için kullanılan prosedür	79

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Polimerlerin insan yaşamındaki önemi tartışmasız her dönemde araştırmacıların ilgi alanı olmuştur. Modern dünyanın vazgeçilmezi haline gelen polimer endüstrisinin insan yaşamı için kolaylaştırıcı etkileri günümüzde de artarak önem kazanmaktadır. Gelişen polimer teknolojisinde ise jeller önemli bir yer edinmekle beraber özellikle son zamanlarda hidrojeller oldukça öne çıkmaktadır [1, 2, 3].

Hidrojeller; su içerisinde çözünmeyen ancak çok miktarda suyu yapısına alarak şişebilen, üç boyutlu ağ yapıya sahip polimerler olarak adlandırılırlar. Hidrojinin suda çözünmemesinin nedeni, yapısında kimyasal veya fiziksel çapraz bağların olmasıdır. Yapısına çok miktarda su alabilmesi ise suyu seven (hidrofilik) karaktere sahip olması ve ağ şeklindeki yapısından kaynaklanır. Bir polimerin hidrojel olabilmesi için ana zincirde veya yan zincirlerinde hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilen hidrofilik grupların bulunması gerekir. Bu gruplar nedeniyle bağı durumuna geçen su, çapraz bağı polimerde hacim ve kütle artışı ile şişmeye neden olur. Çapraz bağı polimerdeki hidrofilik grupların sayısının fazla olması daha çok şişmeye sebep olur [4].

Hidrojellerdeki üç boyutlu yapı; kimyasal bağlar veya ikincil etkileşimler olan iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir ve bu etkileşimler jellerin şişme davranışını etkiler. Hidrojellerin yapılarında çok fazla su bulundurması, yumuşak ve esnek yapılara sahip olmaları gibi taşıdıkları pek çok fiziksel özellik bakımından canlı dokularla aralarında büyük bir benzerlik gözlenmektedir [1].

Son yıllarda hem bilimsel hem de teknolojik bakımdan hidrojellerin önemi hızla artmakla beraber geniş kullanım yelpazesine de sahiptirler. Yumuşak ve elastik yapıları, çok miktarda suyu absorbe ederek yapılarında tutabilme özellikleriyle hidrojeller; tıbbi uygulamalar ve biyoteknolojik alanda sıkça kullanılan önemli malzemelerdir [4].

Polimerik jellerin kullanımında ortaya çıkan bazı sorunlar ve kısıtlamalarla beraber yeni jel materyallerinin geliştirilmesi düşüncesi yeni arayışlara neden olmuştur.

Bu gereklilikle beraber biyolojik alanlarda kullanılacak olan yeni polimerik jellerin geliştirilmesi ve ticarileştirilmesi hız kazanmıştır. Biyoteknoloji alanında kullanılmak üzere geliştirilen ve büyük bir potansiyele sahip olan kriyojeller keşfedilmiş ve sahip oldukları süper gözenekli yapı ve hızlı şişebilme davranışı ile özellikle doku mühendisliği alanında iskele yapımında ve ilaç salınım sistemlerinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır [5].

Kriyojeller; monomerik veya polimerik öncüllerin sıfırın altındaki sıcaklıklarda donmuş çözeltileri ile elde edilen jel matrisleri olarak adlandırılmışlardır. Elde edilirken takip edilen kriyojelasyon prosesi şu basamaklardan meydana geldiği düşünülür: Buz kristalleri ile birlikte faz ayrılması, çapraz bağlanma, buz kristallerinin çözülmesiyle meydana gelen birbirine bağlı gözenekli kriyojel ağ yapının oluşması [6].

Kriyojeller; doğal veya sentetik polimerler kullanılarak elde edilebilirler. Doğal polimerlerin biyoyumlu ve biyobozunur özellikte oluşu, toksik etkileri olmaması, hücre yapışmasına, hücre büyümesine, farklı fonksiyondaki hücrelerin tutunmasına ve taşınmasına izin verdiği için özellikle doku mühendisliği alanında iskele yapımı için sıkça kullanılan materyaller olduğu görülmektedir [2].

Doğal polimerlerden biri olan kitosan, dünyada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polisakkarit olan kitinin deasetillenmiş türevidir [7]. Literatüre göre doku mühendisliği için kullanılan iskeleler; akut ve kronik tepkiler vermemeli, iyileşen doku biyomateryalin yerini alabilmesi için biyobozunur olmalı, hücre tutunmasını sağlayacak yüzeye sahip olmalı, farklılaşmaya ve hücre çoğalmasına olanak sağlayabilen, hasar gören dokuyu taklit edebilecek ve dokunun yapabileceği mekanik etkilere dayanabilecek bir yapıya sahip olmalı ve son olarak çeşitli şekillerde üretilebilmesi gerekmektedir. Biyobozunur ve biyoyumlu olma, toksik etkiye sahip olmama ve antibakteriyel özelliğe sahip bir biyopolimer olan kitosan doku iskeleleri için gerekli eşsiz özelliklere sahip bir polimer olarak görülmektedir. Kitosan ayrıca çözelti, toz, lif ve film gibi değişik formlara dönüşebilmesiyle farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamıştır [8].

Bir diğer önemli doğal polimer ise vücudun her dokusunda bulunan ve belirli hayati aktiviteleri gerçekleştirmekten sorumlu olan hyaluronik asittir. Hyaluronik asit,

dokuların hidrasyonu ve nemlenmesi, dokulardan madde geçisi, hücrelerin hareketi, farklılaşması ve bölünmesinde, eklem kayganlığının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Diğer doğal polimerler ve sentetik polimerlere ile karşılaştırıldığında çok daha fazla su tutma kapasitesine sahip olup kendi hacminden bin kat fazla su tutabilme kapasitesine sahiptirler. Özellikle kırıldak hücreleri gibi doğrudan kan temini olmayan hücreler için hyaluronik asitin su tutma kapasitesi, bu hücreler için besinin sağlanması ve atıkların hücrelerden dışarı atılması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca enjekte edilen yerde uzun süre boyunca yapısında ve şeklinde deformasyon olmadığından en çok tercih edilen dolgu maddesi olarak da görev yapmaktadır. Bu özellikleri ile hyaluronik asit, yara tedavisinde de kullanılmaktadır. Hyaluronik asitin yüksek biyouyumluluk göstermesi ve dokuların ekstrasellüler matriksinde bolca bulunması bu polimeri doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryal iskele olarak kullanılabilecek popüler bir malzeme yapmaktadır [9].

1.1. LİTERATÜR IŞIĞINDA TEZİN YERİ

Kriyojeller ilk olarak 1970 yıllarında rapor edilmiş ve biyoteknoloji potansiyelleri ise yeni keşfedilmektedir. Kriyojeller makrogözenekli yapısı sayesinde hızlı şişme kinetiği göstermektedir. Bu özelliği sayesinde biyosensör uygulamaları ve ilaç salım sistemlerin tasarımında sıkça kullanılmaktadırlar. Elastik yapıdaki kriyojeller genellikle doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Doğal polimerler, biyolojik ortamdaki makromoleküllerin benzeri veya aynısı olduklarından, canlı vücuduyla temas ettiklerinde toksik etki, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar vermezler. Enzim varlığında yapılarının bozunması yani biyobozunur oluşlarıysa geçici ev sahipliği gerektiren iskele uygulamalarında kullanılmaları açısından avantaj sağlar [10, 11].

Nano gümüş içeren kitosan-hyaluronik asit kompozit hidrojenlerinin enfekte olmuş diyabet yaraları için ideal bir yara örtüsü bant olabileceği konusunda çalışma yapılmıştır [12]. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada kitosan-hyaluronik asit hidrojenleri genipin ile çapraz bağlanarak kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) salınımında ilaç taşıyıcı matris olarak kullanılmıştır [10].

Jeong Kim ve arkadaşlarının hyaluronik asit ile olan çalışmalarında kitosanla polielektrolit kompleks (PEC) yaparak hidrojel oluşturmuşlar ve daha sonra bu PEC ile kas gibi kasılabilen yapılar için yapay organ çalışması, sensör ve ilaç taşıma sistemleri gibi ileri çalışmalar için araştırmalarda bulunmuşlardır. PEC iyonik etkileşimlerle çapraz bağlanma gerçekleştirebilen bir yapıdır. Kitosan polimeri artı yüklü, hyaluronik asit ise bu komplekste eksi yüklü olan materyaldir. Bu şekilde karşıt iki yük ile oluşturulan iyonik bir kompleks elde edilir [13].

Başka bir araştırmada ise makrogözenekli elastik kriyojeller, yağ dokusu için iskele materyali oluşturmak amacıyla jelatin ve hyaluronik asit biyopolimerleri kullanılarak elde edilmiştir. Bu kriyojeller birbirine bağlı gözeneklere, yüksek gözenekliliğe ve yüksek çapraz bağlanma oranına sahiptirler. Yüksek jelatin konsantrasyonu gözenek boyutunda, gözeneklilikte ve kriyojelin şişme oranında düşüşe neden olmuş fakat şişme kinetiğini arttırmıştır. Ayrıca fazla jelatinin varlığı elastik modülü, dayanıklılığı ve depolama modülünü arttırmıştır. Bu iskele yapılara domuz yağı kök hücreleri (ADSCs) ekilmiştir. Bu hazırlanan kriyojeller hem in vitro ortamda hem in vivo ortamda hücre çoğalması ve gelişmesi için uygun bir ortam sağladığı görülmüştür [14]. Hyaluronik asit, dokuların hidrasyonu ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişinde, hücrelerin hareketinde, farklılaşmasında ve bölünmesinde, eklem kayganlığının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Diğer doğal ve sentetik polimerlere göre çok daha fazla su tutma kapasitesine sahiptir, kendi hacminden bin kat fazla su tutabilir. Kıkırdak hücreleri gibi doğrudan kan temini olmayan hücreler için hyaluronik asitin su tutma kapasitesi bu hücrelerde besinin sağlanması ve atıkların hücrelerden uzaklaştırılması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesine yardımcı olur. Ayrıca enjekte edildiği yerde uzun süre yapısında ve şeklinde deformasyon olmadığı için en çok tercih edilen dolgu maddesi olarak da görev yapmaktadır. Bu özellikleri ile hyaluronik asit yara tedavisinde de kullanılmaktadır. Hyaluronik asitin yüksek biyouyumluluk göstermesi ve dokuların ekstrasellüler matriksinde bol bulunması onu doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryal iskele olarak kullanılabilecek popüler bir malzeme yapmaktadır [9, 15, 16].

Literatürde bir diğer araştırmada, kitosan ve jelatin kriyojelleri doku mühendisliği için kullanılmıştır. Bu çalışmada polimer öncüllerinin değişen

konsantrasyonları çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanılarak sentezlenmiştir. Glutaraldehit, çapraz bağlı polimer ağı oluşturmak için jelatin ve kitosan polimer zincirlerindeki amin grubu ile reaksiyona girer. Düşük yoğunluklu kitosan kriyojelleri, kahverengi renkte, kırılğan ve deformasyonda kusur eğilimlidir. Jelatin ise açık sarı renkte, çok yumuşak, elastik fakat mekanik olarak zayıftır. Kitosan-ko-jelatin kriyojelleri ise koyu sarı renkte, jelatin kriyojelleri gibi elastik fakat mekanik mukavemet açısından daha güçlüdür. Kitosanın düşük viskozitesi, orta ve yüksek olana göre daha iyi sonuç verir. SEM analizi esnasında düşük viskoziteli kitosan kriyojellerinde kitosan-ko-jelatin kriyojellerine göre daha kalın duvarlar gözlenir. Jelatin kriyojel durumunda ise dar gözenek çaplı ve ince duvarlar gözlenir. Jelatin kriyojel tek eksenli deformasyonda çok küçük stress gösterir, düşük viskoziteli kitosan ise %10 civarında baskıya kadar elastik deformasyon gösterir fakat sonra kırılır ve bundan dolayı baskıyla herhangi bir stress artışına yol açmaz. Kitosan-ko-jelatin kriyojel numuneleri ise %60 deformasyona kadar elastik davranış gösterir. Şişme özelliklerine bakıldığında ise jelatin daha yüksek oranda şişerken düşük viskoziteli kitosan daha düşük oranda şişer. Jelatin-ko-kitosan ise ikisinin arasında ancak düşük viskoziteli kitosana biraz daha yakın şişme gösterir. Son olarak hücre yapışması ve çoğalması incelendiğinde, hücrelerin iyi yapıştığı ve doğal bir ortam sağlayan kitosan-ko-jelatin kriyojel üzerinde hücrelerin çoğaldığı görülür. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehitin ise hücre büyümesi ve çoğalmasını etkilemediği, düşük konsantrasyonda kullanılan glutaraldehitin iskelede herhangi bir sitotoksik etki göstermediği gözlenir. Sonuç olarak; basit bir takım prosedür adımları kullanılarak elastik yapıya sahip, dinamik germelerle herhangi bir kusur göstermeyen, biyobozunur ve biyoyumlu, kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilen bir iskele oluşturulabilir [17].

1.2. TEZİN AMACI

Kitosan, aktif gruplarının (reaktif amino ve hidroksil grupları içermesi) varlığından dolayı hem kimyasal olarak kolaylıkla modifiye edilebilmekte hem de fiziksel çapraz bağlar ile gözenekli yapılar oluşturulabilmektedir. Biyobozunur, biyoyumlu, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri sayesinde yoğun olarak araştırılan biyomateryallerden biri olan kitosanın kemik oluşumunu ve yara iyileşmesini arttırdığı

ve ayrıca hücre yapışması ve üremesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kitosanın dezavantajları içerisinde en önemlisi zayıf fiziksel özellikleridir [17]. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması için literatüre bakıldığında birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle kitosanın diğer polimerlerle ya da seramiklerle kompozitlerinin oluşturulması sıkça kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Hyaluronik asitin dokuların hidrasyonu ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişi için kullanılmasında, hücrelerin hareketini, farklılaşması ve bölünmesinde, eklem kayganlığının sağlanmasında önemli rol oynadığı araştırmalarda görülmüştür. Diğer doğal ve sentetik polimerler ile kıyaslandığında çok daha fazla su tutma kapasitesine sahip olup kendi hacminden bin kat fazla su tutabilir. Hyaluronik asitin yüksek biyouyumluluğu ve dokuların ekstra selüler matriksinde bol bulunması onu doku mühendisliği alanında biyomateryal iskelet olarak kullanılabilecek popüler bir malzeme yapmaktadır [9]. Bu nedenle kitosan ve hyaluronik asit doğal polimerleri bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir. Kitosan ve hyaluronik asit kopolimerlerinin polielektrolit kompleksleri, hidrojel ve kriyojel çalışılmış olup kriyojelleri ilk kez bu tez çalışmasında incelenmiştir.

Bu projenin amacı; doğal biyopolimerler olan kitosan-hyaluronik asitten elde edilen kriyojellerinin doku mühendisliği uygulamasında yapı iskelesi (scaffold) olarak etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu nedenle tez çalışmamızda ilk olarak kitosan kriyojelleri sentezlenip ardından kitosanın hyaluronik asit kopolimer kriyojelleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak mekanik ve biyomalzeme özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmış ve bu materyallerin doku iskelesi olarak kullanımı ve hücre uyumluluğu incelenip termal dayanımlarına, şişme davranışlarına, morfolojik yapılarına bakılmıştır.

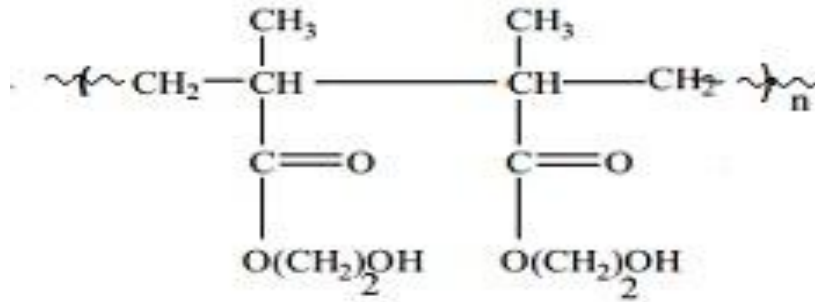
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. HİDROJELLER

2.1.1. Hidrojellerin Tarihi Gelişimi

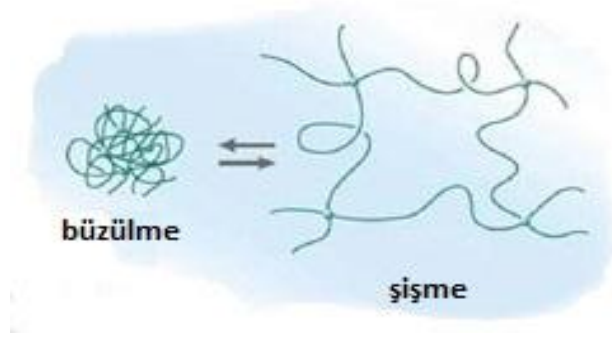
Hidrojel kelimesi; Lee, Kwonve ve Park' a göre ilk defa 1894 yılında yayınlanan bir makalede kullanılmaktadır. Fakat kullanılan bu hidrojel tanımı bugün kullandığımız hidrojel tanımıyla birebir benzerlik göstermemektedir. Literatürde ilk çapraz bağlı ağ yapı ve gerçek manada hidrojinin karakteristik yüksek su ilgisi özelliğini taşıyan malzeme Wichterle ve Lim tarafından geliştirilen ve insan dokusu ile kalıcı bir uyum sağlayarak tedavi amaçlı kullanılan polihidroksietilmetakrilat (pHEMA)' tır. Biyomedikal alanda kullanımları daha sonraları yumuşak kontakt lens olarak patentlendiği 1960 yılına kadar uzanmaktadır [18].



Şekil 2.1. pHEMA' nın yapısı

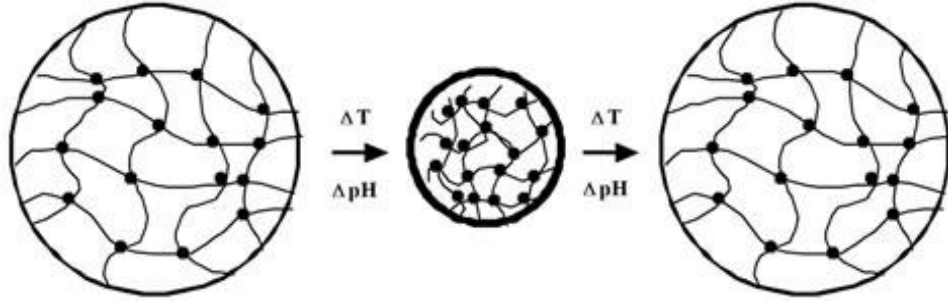
Bu üretilen hidrojelden sonra, hidrojellerin biyomedikal alanda kullanımı hızlı bir şekilde artmış ve 1970' lerde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yıllar boyunca çeşitli malzemelerle üretilen hidrojellerin amaçları ve hedefleri geniş bir yelpazeye sahiptir. Buwalda' ya göre hidrojellerin tarihi üç ana bölümde incelenebilir.

Monomer veya polimerlerin bir başlatıcı ile kimyasal modifikasyonlar sonucu yüksek miktarda çapraz bağlanma prosedürü içeren hidrojeller ilk jenerasyon olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.2. Büzülme-şişme durumunda bir hidrojinin şematik olarak yapısı

Daha sonra 1970'lerden itibaren hidrojinlerin farklı konseptleri önem kazanmaya başlamıştır. Bu ikinci jenerasyon hidrojinler; farklı sıcaklıklarda, farklı pH larda veya konsantrasyon gibi spesifik etkilere cevap vermeye başlamışlardır.



Şekil 2.3. Hidrojinin pH ve ısıya duyarlı olarak şişme-büzülme halinin şematik gösterimi

Son olarak üçüncü jenerasyon hidrojinler, hidrojinlerin çeşitli fiziksel etkileşimlerle çapraz bağlanma yaparak stereokompleks yapıda materyallerin incelenmesi ve geliştirilmesi ile elde edilmiştir.

Hidrojel bilimi hızlı bir şekilde akıllı hidrojinler olarak adlandırılan, istenilen özelliklere sahip ve spesifik etkenlere cevap verebilen akıllı hidrojinlere kaymaktadır. Bu sayede elde edilecek hidrojinlerin kullanım alanları sadece insanların hayalleri ile sınırlanmaktadır.

Wichterle ve Lim'in 1960'lerde öncülük yaptığı çapraz bağlı hidrojinlerden beri geliştirilen hidrojinler, hidrofilik karakterlerinden ve biyouyumlu olma potansiyeline sahip olduklarından dolayı bilim adamları tarafından biyomateryal olarak kullanılması incelenmiştir.

Lim ve Sun'ın 1980'de yaptığı hücre kapsülasyonu için başarılı bir şekilde uyguladıkları kalsiyum aljinat mikro kapsülleri bu alanda büyük ilerleme sağlamıştır.

1980' lerin sonlarında Yannas, hidrojellerin içersine kolajen ve köpek balığı kıkırdığı ekleyerek yanık tedavisi için kullanılacak sargı geliştirmiştir. Hidrojeller hem doğal hem sentetik polimerlerden elde edilebilir olup hücrelerin enkapsülasyonu için kullanılmakla beraber günümüzde en çok doku mühendisliğinde hasar görmüş doku ve organların yenilenmesi ve onarılması için kullanılan matrisler olarak kullanılmaktadırlar [19].

2.1.2. Hidrojellerin Yapısı ve Özellikleri

Hidrojeller suda şişen ama suda çözünmeyen malzemelerdir. Emilim özellikleri, polimer matrisini hazırlamak için kullanılan solvante bağlı olarak yüksek bir termodinamiksel ilgiden kaynaklanmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda hidrojellerin yüksek çeşitliliği ve istenilen özelliklerde elde edilebilmeleri hidrojeller konusunda derin bir araştırmaya gidilmesini sağlamıştır. Bu ağların şekil ve mekanik dayanımları sıvı faz ile hidrojellerin etrafındaki sıcaklığa bağlıdır. Bugüne kadar yapılan hidrojeller çeşitli monomerler kullanılarak, farklı katalizörler kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda ve farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak elde edilmişlerdir. Bu değişkenlerin her birinin oluşacak yapı üzerinde etkisi vardır [20].

pH, iyonik konsantrasyon, ışık, sıcaklık, manyetik alan, elektrik alan ve kimyasallara karşı tepki veren akıllı hidrojel sistemler geliştirilmiştir. Akıllı hidrojellerin dış etkilere karşı uyarı olarak şekillerini değiştirebildiği fark edilmiştir ve bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere incelenmeye başlanılmışlardır [21].

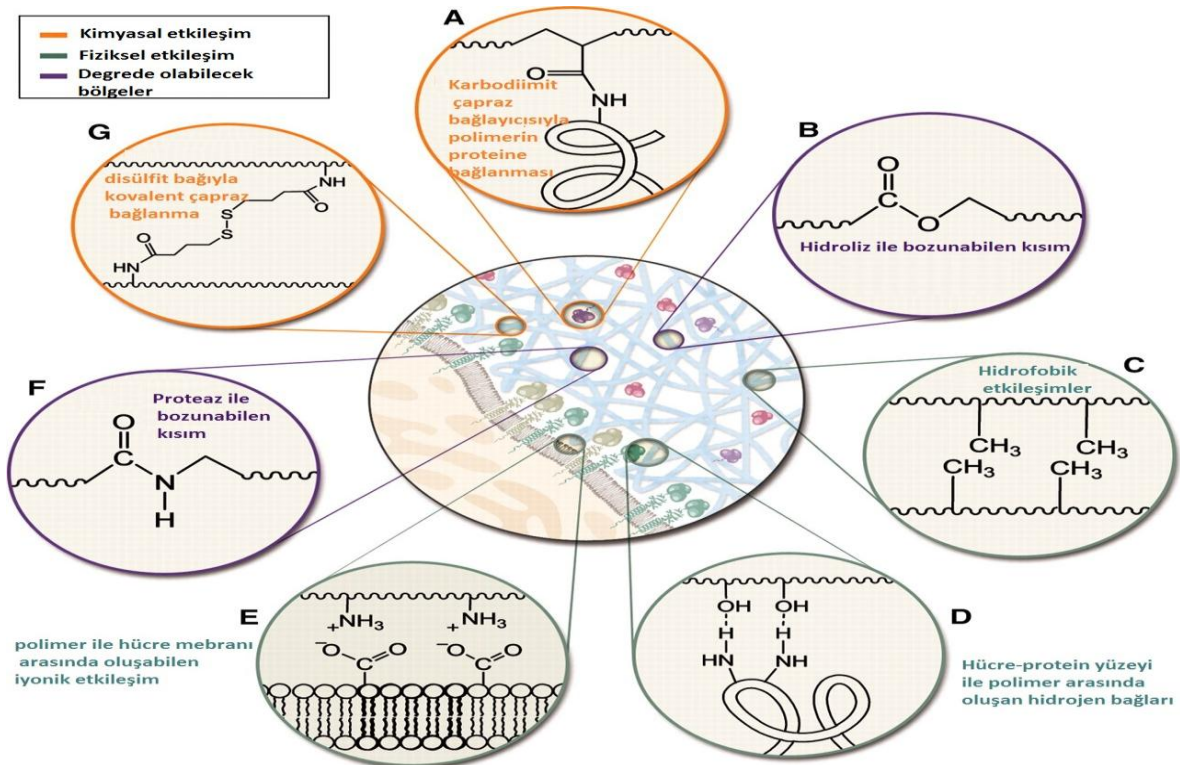
Hidrojeller genel olarak doğal ve sentetik polimerler olarak iki grupta incelenmektedir. Doğal hidrojel polimerler kolajen, fibrin, hyaluronik asit ve kitosan ile aljinat gibi doğal yapıların türevleridir. *in vivo* ortamdaki ekstraselüler matris (ECM) olarak kullanılan ana komponentler doğal polimerlerden elde edilmektedir. Doğal hidrojellerin iki tane ana dezavantajı vardır. Öncelikle ilk olarak mekanik özelliklerin polimerizasyon veya jelleşme koşullarına ne kadar bağlı olduğu anlaşılamamaktadır. İkinci olarak doğal kaynaklı olmalarından dolayı kompozisyonlarında her biri diğerine göre farklılık göstermektedir.

Tam tersi olarak polietilenglikoldiakrilat (PEGDA), poliakrilamid (PAA), polivinilalkol (PVA) gibi sentetik hidrojellerin son yapıları polimerizasyon şartlarına

bağlı olmalarına rağmen yeniden tekrarlanabilir şekilde üretilmektedirler. Genel olarak sentetik hidrojellerde, kimyasal kompozisyon ve mekanik özelliklerinin ayarlanabilmesinden dolayı daha geniş bir yelpazeye sahiptirler. Ayrıca hidrolizlenme ve biyobozunur olma özelliklerini taşımaktadırlar.

Hidrojeller kimyasal olarak kararlı olabilirler veya zaman içinde bozunup kaybolabilirler. İyonik etkileşim, hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşim gibi ikincil etkileşimlerle oluşan ağ yapılar tersinir veya fiziksel jel olarak adlandırılırlar. Fiziksel jeller homojen değildirler. Serbest zincir uçları ve zincir boşlukları fiziksel jellerde bulunan defolardır.

Bir polielektrolit gibi zıt yüklü moleküllerin birleşmesiyle biraraya gelerek fiziksel hidrojeller oluşur. (örnek olarak kalsiyum aljinat) Kimyasal hidrojeller kovalent çapraz bağlı jellerdir. Bazı durumlarda jel formasyonu sırasında solvent kompozisyonu, sıcaklık ve konsantrasyon ile faz ayrımı oluşabilmektedir. Kimyasal hidrojellerde serbest zincir uçları jel ağlarında defo olarak adlandırılmaktadır [19].



Şekil 2.4. Hidrojellerde kimyasal etkileşim, fiziksel etkileşim ve degrede olabilen bölgeler için örnek şematik gösterim

Birçok uygulamada polimer matrisinin özelliklerini arttırmak için fonksiyonel dolgu maddeleri matrise eklenmektedir. Ancak polimer ve bu dolgu maddesi bir yüzeye uygulandığı zaman fonksiyonel monomer kolayca yok olmaktadır.

2.1.3. Hidrojellerin Kullanım Alanları

Hidrojellerin kullanım alanlarında ilk uygulama, kontakt lensler olarak bilinmektedir. Mekanik kararlılıkları bakımından iyi oluşu, yüksek derecede oksijen geçirgenliğine ve uygun kırınım indisine sahip olmaları kontakt lenslerde uygulanmasının temel nedenleri arasında görülmektedir.

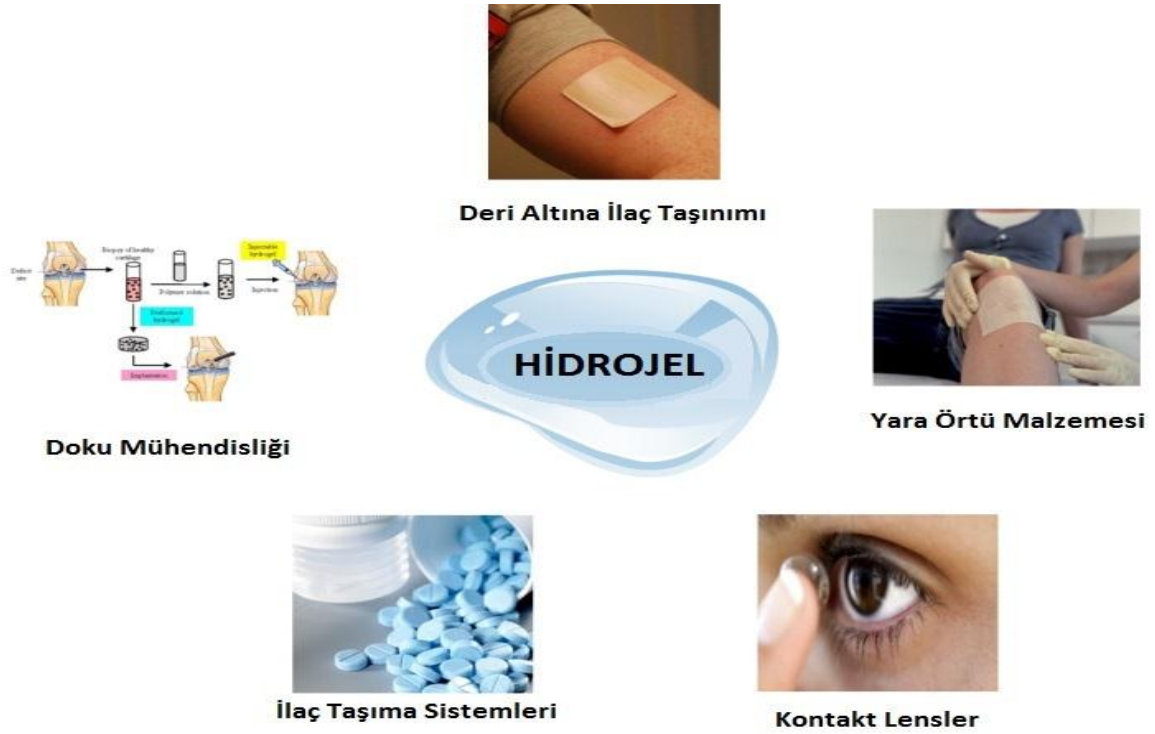
Düşük çapraz bağ yoğunluğuna sahip olmalarıyla hidrojeller; çeşitli ilaçlar, peptidler ve proteinler için taşıyıcı olarak kullanılırlar.

Hidrojellerin dış çevreye (sıcaklık, pH, iyon derişimi) cevap verebilmeleri, şişme özelliğine sahip olmalarıyla ve ilaç moleküllerinin difüzyonunu kontrol edebildiği için kontrollü salım sistemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan polimerlerdir [21].

Biyoteknolojik alanındaki uygulamalarda, özellikle biyoaktif proteinlerin ayrılması için hidrojellerden yararlanılmaktadır.

Hidrojellerin ileri uygulamalarından biri de yapay kasların geliştirilmesidir. Elektrokimyasal uyarıları mekanik işe çeviren akıllı hidrojeller, insan kas dokusu işlevi görebilmektedir. Bu özellikten faydalanarak yapay kaslar yapılabilir. Fizikokimyasal uyarılara karşı tersinir büzülme ve genişleme yeteneği olan polimerik jeller, ileri robotiklerin geliştirilmesin için önemlidir.

Hidrojellerin diğer uygulamaları ise; yapay tendon materyalleri, yara iyileşmesi için biyo yapışkan madde, yapay böbrek zarları, yapay deri, estetik cerrahide malzeme olarak kullanımları sıralanabilir [22]. Hidrojellerin yapılarında çok fazla su bulundurması, yumuşak ve esnek yapılara sahip olmaları gibi taşıdıkları pek çok fiziksel özellik bakımından canlı dokularla aralarında büyük bir benzerlik gözlenmesi doku mühendisliğinde iskele olarak sıkça kullanılan bir malzeme olmasına neden olmuştur. Özellikle bu iskeleler kırıldık, kemik ve yumuşak kas gibi dokuları uygulamaları için kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.5. Hidrojellerin kullanım alanları

2.1.4. Hidrojellerin Doku Mühendisliğindeki Kullanımı

Her yıl milyonlarca hasta organ yetmezliği ya da kaza sonucu meydana gelen doku zedenlenmeleri gibi nedenlerle hastanelere kaldırılmaktadır. Amerika’ da bu tedavilere her yıl 400 milyar dolar harcanmakta ve 8 milyona aşkın ameliyat gerçekleştirilmektedir.

Doku mühendisliği ilk defa 1988’ de yayınlanan bir makale ile ortaya çıkmış ve spesifik doku veya organlar için tedavi, gelişim veya değiştirme işlemi uygulama olarak tanımlanmıştır.

Doku mühendisliğinde kullanılan bir malzeme olan hidrojeller; boşluk doldurma ajanı, bioaktif malzeme iletici veya hücre gelişimi için 3 boyutlu bir yapı oluşturma görevini oynarlar. Boşluk doldurucu ajanlar iskele olarak kullanılan en genel materyaller olup dokular arasında oluşabilecek istenmeyen yapışmayı önlemek görevindedirler. Ayrıca hidrojel iskeleler vücuttaki kıkırdak, kemik ve yumuşak kas gibi dokuları tasarlamak için kullanılmaktadırlar. Doku mühendisliğinde kullanılan hidrojellerin en önemli özellikleri biyouyumlu malzemeler olmalarıdır. Bu sayede vücut içerisindeki organlara veya organların etraflarındaki dokulara istenmeyen reaksiyonlar vererek zarar vermezler. Hidrojel olarak kullanılan sentetik polimerler içerisinde

polietilenoksit, polipropilenfumaratkoetilenglikol, polivinilalkol, poliakrilikasit ve polipeptitler yer almaktadır.

Bir Avrupa patenti olan EP 1 664 168 B1 patentinde gözenekli hidrojel elde etmek için değişik kompozitler belirlenmiştir. Bu kompozit biyobozunur ve kendiliğinden çapraz bağlanabilen polipropilenfumarat, biyobozunur hidrojel mikroparçacıklar, hapsedilmiş su ve serbest radikaller içeren bir karışımdır. Mikroparçacıklar çapraz bağlanmış kollojen fibrin, jelatin ve hyaluronik asitten meydana gelmektedir ve biyoaktif malzeme içermeye özellikleri vardır. Bu metot ile süperemici yarı katı hidrojel, mikropartiküllerin üretilebileceğini ve bu mikrotaneciklerin suda şiştiğini ancak sıvılar gibi akışkan olmadıklarını, ayrıca çapraz bağlı bir yapıda oldukları için de belirli bir şekle sahip olduklarını ortaya koymaktadırlar. Polimerizasyon işlemi sonucunda elde edilen iskele hiçbir ekstra işleme tabi tutulmadan iskeletsel yaralara uygulanabilirler [19].

Harris ve arkadaşları mikro ve nano gözenekliliğe sahip, doku mühendisliğinde kullanılacak iskeleler üretmişlerdir. Bu hidrojel nanoelyaf morfolojisine sahip olup kendiliğinden birleşen, immünojenik olmayan, biyobozunur ve hücrelerle etkileşime girebilen peptitlerden meydana gelmektedirler. Kendiliğinden düzenlenen hidrojellerin bir hidrofilik ve bir hidrofobik kısımları vardır. Bu yöntemle elde edilen ve günümüzde kullanılan en yaygın peptit ‘puramatrix’ peptididir. Bu peptidin kendiliğinden düzenlenmesi sığır serumu içeren doku kültür ortamında kolayca gerçekleşebilmektedir. Bu iskeleler açık yaralara doğrudan uygulanabileceği gibi operasyonlar ile implant olarak da kullanılabilir. Tek bileşenli yapılan iskelelerin doku yenilenmesi için ideal bir ortam yaratamadıkları düşünülmektedir. Bu yüzden hibrit materyaller geliştirilmiş ve hücre çoğalması ile hücre göçü gibi durumlarda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Hidrojel iskeleler doku üretimi ve hücre katmanı üretimi için kullanılabilir. Kumar; fenilboranat içeren polimerler ile polivinilalkol polimerini kompleks olarak kullanarak biyobozunur olan ve hücre ile doku büyümesine olanak tanıyan iskeleler üretmiştir. Sakkaritin biyobozunması fenilboranat ligantlarının varlığında gerçekleştiğinden fenilboranik asit oluşmaktadır. Bunun sonucunda iskele

üzerinde oluşan hücre katmanları rahatlıkla ekstrakte edilip tedavi için gerekli yere implant edilebilmektedir.

Blanchard ve çalışma arkadaşları saf çapraz bağlı keratin bazlı hidrojel iskeleler üretmişlerdir. Keratin biyuyumlu ve immünojenik olmayan bir biyopolimer olup hastaların saçlarından veya tırnaklarından toplanabilmektedir. Toplanan bu keratinlerin saflaştırılması ve oksidasyonundan sonra hücre büyümesi için iyi bir iskele olduğu düşünülmektedir.

Song ve arkadaşları radyasyon-füzyon teknolojisini kullanarak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere beta glukon bazlı hidrojel iskeleler kullanılmasını önermişlerdir. Beta glukonun hücre yenilenmesi ve kolajen biyosentezi için uygun bir ortam yarattığı ve ayrıca biyoyumlu ve güvenli olduğu bilinmektedir.

Doku mühendisliğinin önündeki en büyük engellerden biri, polimerlerin hedeflenen dokuya hangi biçimde nasıl uygulanacağı ve bu uygulama sonunda ne gibi ek takviyeler gerektireceğinin önceden tahmin edilememesidir. Hidrojeller; damarlanma işleminin kontrol edilebildiği ve hem anyojenik faktör hem de endotenial hücrelerin hedeflenen bölgeye ulaştırabildiği için avantajlı malzemelerdir. Ek olarak kemik, kas veya kan damarları gibi iyi mekanik özelliklere sahip olan dokulara hidrojeller rahatlıkla uygulanabilmektedir [6].

2.2. KRIYOJELLER

2.2.1. Kriyojelasyon Tekniği:

Günümüzde polimerik jeller; kromatografik materyal, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcılar, elektroforez için matris ve immünodifüzyon gibi biyoteknolojinin değişik alanlarında, ayrıca katı kültür ortamında jel tabakası olarak kullanılmaktadır. Polimerik jellerin kullanımıyla ortaya çıkan bazı sorunlar yeni jel materyallerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu gereklilik biyolojik alanlarda kullanılacak olan yeni polimer jellerin geliştirilmesine ve ticarileştirilmesine hız kazandırmaktadır. Biyoteknoloji alanında kullanılmak üzere geliştirilen ve büyük bir potansiyele sahip olan polimerik jellerden ‘kriyojel’ Yunanca ‘donmuş jel’ anlamına gelmektedir. Kriyojeller, kriyojenik işleme (dondurma ve belli bir süre için donuk halde

bekletme ve çözme işlemi) tabi tutulmuş düşük veya yüksek molekül ağırlıklı öncüller veya jelleşmeye müsait olan kolloidal sistemlerden oluşmaktadır [3,23].

Bu teknik, doğada görülen denizde oluşan buzun deniz suyundan daha az tuzlu olması ilkesine dayalıdır. Bilindiği üzere denizde oluşan buz, saf hekzagonal buz kristalleri oluşturmakta ve çeşitli kirlilikler (tuz, biyolojik canlı vb.) oluşan buzdan atılmakta ve buz kristalleri arasındaki sıvı kanallarına yerleşmektedirler. Bu doğal ilkenin ilk defa Lozinsky tarafından kullanılmasıyla birbirleriyle bağlantılı gözenekli sünger yapıdaki sistemler elde edilmiştir. Doğada olduğu gibi monomer çözeltisinin donması sırasında monomerler, buz kristallerinden atılarak buz kristalleri arasında oluşan donmamış likit kanallarında polimerizasyon gerçekleştirirler. Polimerizasyonun bitişi ve erimenin sona ermesi ile gözenekli bir yapı elde edilir.

Bu kriyojelleşme sistemlerinde ağ yapılarının esasında bir faz ayrımı gerçekleşmeye de reaksiyon sisteminin kalıp rolü oynayan donmuş bölgesi eritilerek uzaklaştırıldığında gözenekli bir yapı elde edilir [11].

2.2.2. Makro Gözenekli Kriyojellerin Hazırlanışı ve Özellikleri

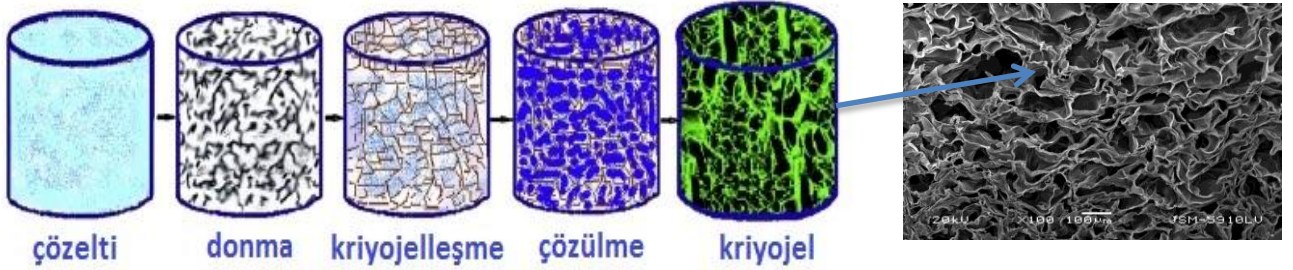
2.2.2.1. Kriyotropik Jelleşme

Kriyotropik jel prosesi ile elde edilen ve kriyojel olarak adlandırılan jeller, donmuş karışım içerisinde yer alan donmamış sıvı mikro faz (unfrozen liquid microphase (UFLMP)) içerisinde gerçekleşmektedir. Çözücünün kristalleşmesi sebebiyle, donmamış sıvı mikro fazın toplam hacmi başlangıçtaki hacminden daha düşük bir miktardadır. Diğer bir deyişle, donmamış sıvı mikro faz içerisinde bulunan polimer veya monomer derişimi başlangıç derişimine göre daha yüksektir. Jel oluşturuca ajanların derişiminin hızla artması jel oluşumunu tetiklemekte ve jelleşme hızını arttırmaktadır. Kriyojelasyon basamakları şunlardır;

1. Başlangıç sistemi: Monomer/polimer çözeltisi ve jel oluşturuca ajanları içeren çözelti sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurulur.

2. Donmuş sistem: Donmuş gibi görünen sistem içerisinde sıvı mikro faz içeren kısım bulunmaktadır. Mikro faz içerisinde olan jel oluşum ajanlarının derişimi çözücünün donması sebebiyle yükselir. ‘Kriyoderişim’ olarak adlandırılan olayla beraber sistemde buz kristalleri çevresinde çapraz bağlanmalar gerçekleşir.

3. Erimiş sistem: Polimerizasyon işleminin bitmesiyle donmuş çözücü eritilip makro gözenekli bir ağ yapısına sahip kriyojeller elde edilmiş olur. Gözeneklerin şekli ve boyutları, monomer derişimi ve sıcaklık gibi parametrelere bağlıdır [6,23].



Şekil 2.6. Kriyojelasyon işleminin şematize hali ve kitosan kriyojelin SEM görüntüsü

Genellikle kriyojel eldesi serbest radikalik polimerizasyon ile gerçekleşmektedir. Polimerizasyonu etkileyen kritik bazı parametreler bulunmaktadır. Bunlar çözücünün donma sıcaklığı ve çözeltinin konsantrasyonu olarak bilinmektedir. Kriyojelasyon tekniğinde çözeltideki monomer konsantrasyonu arttırıldığında gözeneklilikte düşüş meydana gelmekte ve böylece daha yoğun yapıya sahip jeller elde edilmektedir. Kriyojeller elde edilirken polimerizasyon sıcaklığı -10°C ile -30°C aralığında en uygun olduğu görülmüştür.

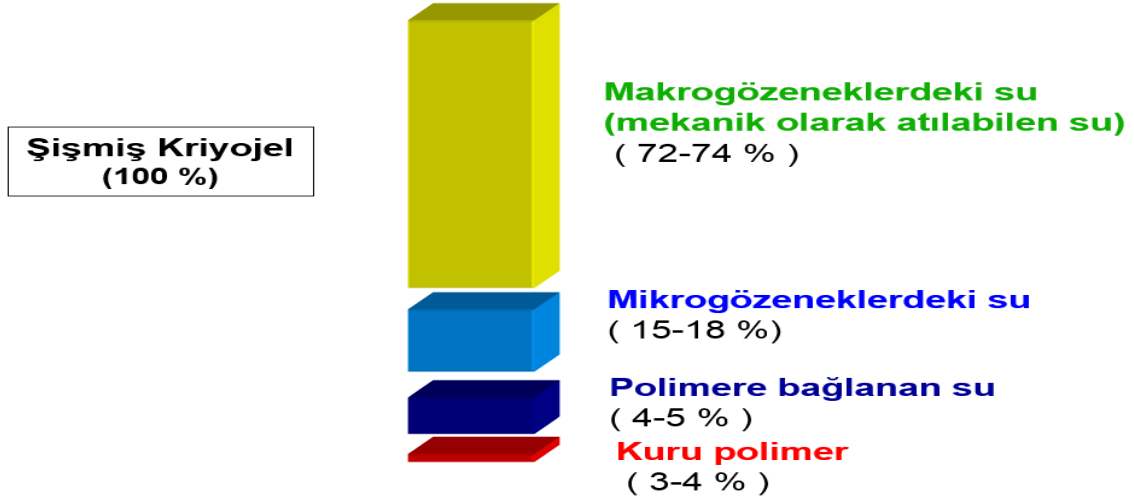
2.2.2.2. Kriyojellerin Özellikleri ve Uygulama Alanları

Bu malzemelerin biyomedikal ve biyoteknolojik alanlardaki uygulama potansiyelleri büyük ilgi görmektedir.

Kriyojeller tipik olarak, hemen hemen her boyuttaki taneciklerin difüzyonuna engel olmadan birbirine bağlı süper makro gözeneklerden oluşur. Öyle ki bu yapı nano ve mikro taneciklerin geçişine bile olanak tanır.

Kriyojellerin kendilerine has yapısı ve bununla beraber osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığa sahip olması gibi özelliklerinin kombinasyonu, onları hücre gibi biyolojik nanopartiküllerin (plazmid, virüs ve organel gibi) kromatografisinde kullanılmak üzere çekici kılar.

Kriyojeller ayrıca, yüksek gözenekliliğe ve birbirine bağlı süper makro gözeneklere sahip malzemelerdir. Bu materyallerin gözenek çapları 0,1 ile 200 µm arasında değişmektedir. Tipik olarak kriyojellerin gözenekleri sahip oldukları çaplara göre $d_{nano} < 0,1 \mu m$, $0,1 < d_{mikro} < 100 \mu m$ ve $d_{makro} > 100 \mu m$ olarak sınıflandırılır [11].



Şekil 2.7. Şişmiş bir kriyojelde yapıdaki ortalama değerlerde su dağılımı [24]

Şişme oranları yüksek ve makro gözenekli yapıya sahip bu materyaller özellikle hücrelerin büyümesi ve çoğalmasına ortam sağlayacak doku iskelesi olarak da kullanılmaktadır. Günümüzde popüler olarak araştırılan alanlardan biri olan doku mühendisliğinde, çeşitli doğal polimerler (kitosan, gelatin, hyaluronik asit, kolajen vb.) veya sentetik polimerler (polistiren, polilaktik asit, poliglikolik asit vb.), kriyojelasyon tekniğiyle çapraz bağlanarak hücreler için doku iskelesi oluşturulmaktadır [23].

Biyoteknoloji ve biyomedikal amaçlı kullanımlarda kriyojeller disk, silindirik kolon ya da tabaka gibi çok çeşitli formlarda üretilirler. Bu malzemelerin gözenekliliği %90' lara kadar çıkabildiği için immobilizasyon ve ayırma tekniklerinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bakteri saflaştırmasında, çeşitli endotoksinlerin uzaklaştırılmasında ve protein saflaştırılması gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Polimerik kriyojeller, hücrelerin immobilizasyonunda etkinliği yüksek malzemelerdir.

Tablo 2.1. Oda sıcaklığındaki jeller ile kriyojeller arasındaki en belirgin farklar

<u>Oda Sıcaklığında Üretilen Jeller</u>	↔	<u>Kriyojeller</u>
Monofaz	↔	Heterofaz
Kırılgan	↔	Süngerimsi
Transparan	↔	Opak
Çözücünün tümü polimerik ağa bağlı	↔	Çözücü hem polimerik ağda hem de kapillerler içerisinde

Kriyojeller ilk defa 40 yıl önce incelenmeye başlanmıştır ve polimerik jellere kıyasla sahip oldukları sıra dışı özellikler halen dikkatleri üzerlerine çekmektedir [3].

2.2.3.1. Kriyojelasyon Tekniğinin Avantajları

Kriyojelasyon tekniği, sıkça kullanılan diğer polimerizasyon tekniklerine göre oldukça yeni ve uygulanış açısından da kolay olduğu düşünülen bir tekniktir. Örnek olarak karşılaştırma yapıldığında süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyon tekniklerinde, polimerizasyon işlemi sona erdiğinde çoğunlukla gözlenen safsızlık ve yapılan zahmetli yıkama aşaması kriyojelasyon tekniğinde bulunmamaktadır.

Yığın (kütle) polimerizasyon tekniğiyle karşılaştırma yapıldığında ise gözeneklilik elde etmek için eklenen porojen isimli kimyasal ajanlara gereksinim duyulmamaktadır. Porojen ilavesi olmadan gözeneklilik elde edilmesi kriyojelasyon tekniğinin en büyük avantajları arasında görülür. Kriyojelasyon tekniğinde porojen görevini çözücünün donmasıyla elde edilen buz kristalleri üstlenmektedir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra yapıdaki buz kristallerinin oda sıcaklığında çözülmesiyle gözenekli bir yapı elde edilir. Kriyojelasyon tekniğinde porojen maddenin uzaklaştırılması için uygulanan zahmetli yıkama işlemlerine gerek yoktur.

Dondurarak kurutma işlemi ise kriyojelasyon tekniği ile benzerlik göstermektedir. Bu teknikte solvent kristallerinin süblimleştirilmesi sonucu birbirine bağlı gözenekli ağ yapıları içeren polimerik malzemeler elde edilir. Ancak yapı içinde solvent, sıvı bir şekilde kalırsa jel oluşumu gerçekleşmemektedir. Dondurarak-kurutma ile elde edilebilecek jeller ince objelerken (örneğin, film, katman ve küçük toplar)

silindirik veya kalın bloklar şeklindeki malzemeleri dondurarak-kurutma yöntemi ile teknik olarak elde etmek mümkün değildir. Buna karşın kriyojeller; silindirler, granüller, tüpler ve diskler gibi istenilen şekil ve boyutlarda elde edilir. Ayrıca kriyojellerin elde edilme işleminde düşük basınçlarda solvent uzaklaştırılması gerekli olmadığından dondurarak-kurutmaya göre daha kolay olduğu düşünülmektedir [3, 23].

2.2.3.2. Kriyojelasyon Tekniğinin Dezavantajları

Kriyojelasyon tekniğinde ana prensip olan donma ve çözünme işlemi basit bir işlem gibi görülse de pek çok parametreye bağlıdır. Bu parametrelere bağlı olarak kriyojelasyon tekniği oldukça karmaşık bir olay zincirine dönüşebilmektedir. Uygulama alanına göre talep edilen kriyojelin optimum koşulları için parametrelerin tümü kendi içinde de incelenip araştırılmalı, sonuçlarda karşılaştırma yapıp optimum parametreye göre çalışılmalıdır. Bununla beraber polimerizasyonun kinetik verilerinin alınması oldukça güçtür. Bu sebeplerden dolayı jellerin talep edilen özellikte olabilmesi zahmetli bir takım çalışmalar gerektirebilmektedir.

Bilindiği üzere serbest radikal polimerizasyonda polimerizasyonun başlaması için başlatıcı, dahası bu türden ajanların oluşmasını sağlayabilmek için ortama polimerizasyonu hızlandırıcı moleküller de koyulmaktadır. Fakat bu türden moleküller, genellikle ısıtmayla aktifleşmektedir. Kriyojelasyonda ise polimerizasyon işlemini başlatacak ajanların solventin donma sıcaklığının altında (sıfırın altında) dahi aktifliğini koruması gerekmektedir. Bu sorun kriyojelasyon tekniği için kısıtlayıcı bir faktördür [3,23].

2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Hastalık, yaralanma ve travma insan vücudundaki dokuların hasarına ve dejenerasyonuna sebep olur. Bu da onarım, yenilenme gibi uygulamalara gereklilik kazandırır. Tedavi tipik olarak aynı hastada sağlıklı dokunun zarar görmüş dokuya taşınmasıyla (otograft) yapılır veya bir kişiden başka bir kişiye taşınmasıyla (transplant veya allograft) yapılır. Bu tedavi yöntemleri çığır açıcı ve hayat kurtarıcı olsa bile bu iki teknikte de çok büyük problemler vardır. Otograft işlemi dediğimiz sağlıklı dokunun hasar görmüş dokuya taşınması için kullanılan yöntemler pahalı ve acı vericidir. Ayrıca anatomik olarak sınırlıdır ve enfeksiyon veya hematoma gibi komplikasyonlar

yarattığından dolayı donöre zarar vermektedir. Benzer olarak allograft veya transplant işlemlerinde, hastalara ihtiyaç duydukları kadar yeterli miktarda doku sağlanamaması ciddi şekilde sınırlama getirmektedir. Ayrıca hastanın bağışıklık sistemi tarafından eklenen doku reddedilebilir ve donörden hastaya enfeksiyon veya hastalık geçme riski ortaya çıkmaktadır.

Alternatif olarak doku mühendisliği, doku fonksiyonlarını koruyacak, yenileyecek veya geliştirecek biyolojik materyaller geliştirerek zarar görmüş dokuları değiştirmek yerine yenilemeyi hedefler.

Doku mühendisliği terimi resmi olarak ilk defa 1988’ de düzenlenen Ulusal Bilim Vakfı organizasyonunda ismini duyurmuştur. Fakat doku mühendisliği alanı yeni bir konu gibi gözükürken dokuların değiştirilmesi fikri 16. yy’ a kadar dayanmaktadır. Bologna Üniversitesi’nde Cerrahi ve Anatomi bölümünde profesör olan Gasparo Tagliacozzi ilk defa 1597’de yayınlanan ‘The surgery of defects by implantation’ makalesinde kol derisinden elde edilen burun implantını transfer ederek ilk doku mühendisliği çalışmasını yapmıştır. Doku mühendisliği multidisipliner bir alandır ve klinik ilaç alanından, makine mühendisliği alanından, materyal bilimi alanından, genetik ve genetiğe bağlı disiplin gibi doğal bilim ve mühendislik alanlarından birçok uzmanın dikkatini çekmiştir. Bu alan dokuların gelişmesine ve yenilenmesine olanak sağlayan uygun ortamı yaratan üç boyutlu gözenekli iskelelerin (scaffold) kullanımına çok fazla bel bağlamaktadır. Bu iskeleler esasen organ oluşumu için uygun bir ortama sahip ve genellikle büyüme faktörü olan hücreler ekilmiş olurlar veya biyofiziksel olarak gelişimi sağlayan bir alet veya sistem görevi gören biyoreaktör görevini üstlenerek hücreleri fiziksel veya kimyasal etkilerden korurlar ve doku gelişiminde görev alırlar [25, 26, 27].

2.3.1. İskelede (scaffold) Aranılan Özellikler

Üretim tekniklerine ve kullanılan biyomateryallere bağlı olarak doku yenilenmesi için birçok sayıda iskele üretilmiştir. Doku tipine bağlı kalmaksızın doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerde aranan bazı önemli konular vardır.

a) Biyouyumluluk

Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin ilk ve en önemli kriteri biyouyumlu olmasıdır; hücreler bu iskeleye yapışmalı, normal fonksiyonlarını gerçekleştirmeli ve iskelenin yüzeyinden yeni matrise göç ederek yeni matriste yaşamı başlatmalıdırlar. İskele veya doku mühendisliği ile yapılmış yapı implante edildikten sonra bağışıklık sistemiyle uyumlu olmalıdır ve böylece iyileşme işlemine zarar vermeyip hastanın vücudu tarafından reddedilmesinin önüne geçmelidir.

b) Biyobozunurluk

Doku mühendisliğinin esas amacı, vücudun kendi hücrelerinin yenilenmesine ve daha sonra yenilenmiş hücrelerin implante edilmiş yapının yerini almasını sağlamaktır. Bu iskeleler ve yapılar kalıcı olmamalıdır. Bu iskele bozunur olmalıdır ki hücrelerin kendi hücresel matrislerini oluşturmalarına izin vermelidir. Bu bozunma sonucu ortaya çıkan yan ürünlerin toksik olmaması ve vücuttan organlarla etkileşime girmeden kolayca atılması lazımdır. Doku mühendisliğinin artık klinik alanlarda kullanılması hedeflendiği için bağışıklık sistemi ile olan uyumluluğu üzerine yapılan araştırmalar önem kazanmaktadır.

c) Mekanik özellikler

İdeal olarak iskeleler anatomik olarak bir takım tutarlı özelliklere sahip olmalıdır; implantlanma sırasında gerçekleştirilen cerrahi işlemde yapı bozulmamalıdır. Bu bütün dokular için önemli olmakla birlikte özellikle kardiyovasküler ve ortopedik alan uygulamalarında bir takım zorluklar gözlemlenmektedir. Kemik ve kıkırdak dokuları için yeterli mekanik özelliklere sahip iskelelerin üretilmesi büyük bir zorluktur. Bu dokular için implante edilmiş iskele, eklenme zamanından yeniden modelleme işleminin bitişine kadar yeterli mekanik bütünlüğüne sahip olmalıdır. Bir başka zorluk da iyileşme oranının yaş ile değişiklik göstermesidir. Örneğin, genç bireylerde kırıkların yaklaşık 6 haftada kaynadığı ve bir yılda tamamen iyileştiği gözlenmektedir. Ancak yaşlı insanlarda bu iyileşme süreci daha yavaştır. Bu etken de ortopedik amaçla kullanılan iskelelerin dizaynı aşamasında hesaba katılmalıdır. Fakat bu alan evrim geçirdikçe kemik ve kıkırdak dokular için yapılan iskelelerin sahip olduğu mekanik

özelliklerine benzer mekanik özelliklere sahip iskelelerin yapımına çok fazla odaklanıldığı görülmektedir. İyi mekanik özelliklere sahip birçok materyal üretilmiştir. Cansız ortamlarda (*in vitro*) yüksek potansiyele sahip üretilen birçok gözenekli ve fazla materyal içeren malzemelerin canlı ortamında (*in vivo*) yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Başarılı bir iskele üretmenin en önemli faktörü iyi mekanik özellikler ile hücrelerin içine girebileceği birbirine bağlı gözenekli yapının uyumlu olmasıdır.

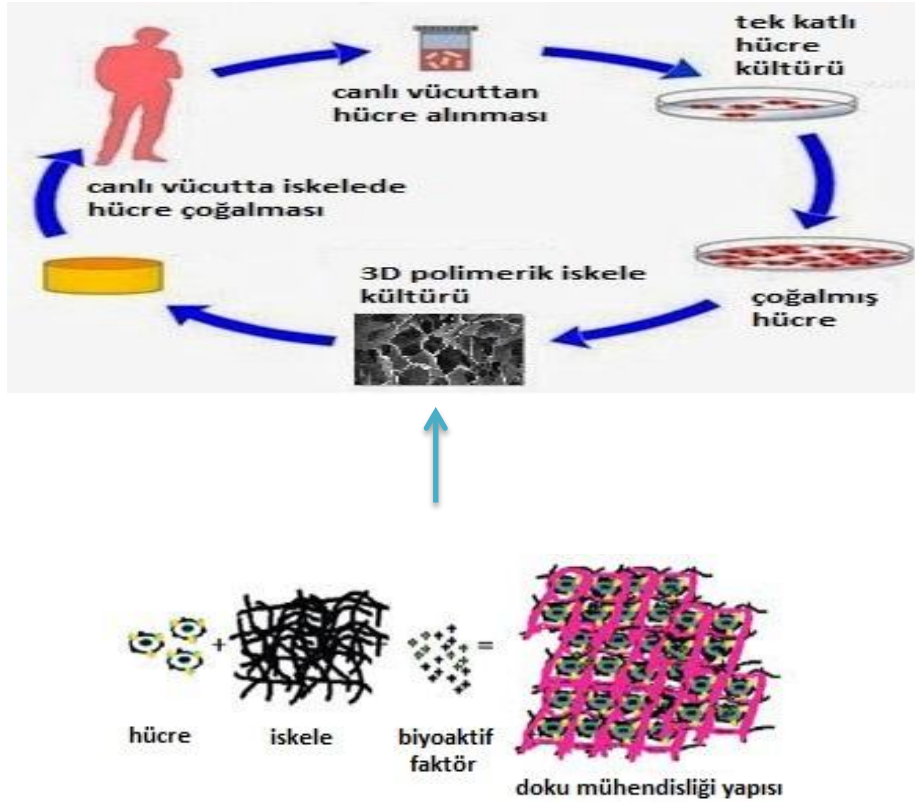
d) İskele mimarisi

Doku mühendisliği için kullanılan iskelelerin yapısı kritik önem taşır. İskeleler yüksek gözenekliliğe ve birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olmalıdırlar ki hücrelerin girmesine ve yapı içindeki hücrelere yeterli miktarda besleyici maddenin difüzyonuna olanak sağlayabilsinler. Dahası birbirine bağlı gözenekli yapı, iskele içinde oluşan atıkların dışarı difüzyonuna olanak sağlamalıdır ve degrede olan iskele organlarla etkileşime girmeden dışarı atılmalıdır. Doku mühendislik malzemesinin merkezinde oluşan atıkların uzaklaştırılamaması ve yeterli miktarda damar olmamasından dolayı meydana gelen iç bozunma doku mühendisliği alanında büyük bir sorundur. Diğer bir önemli konu ise iskelenin gözenek boyutudur. Hücreler iskelenin yüzeyindeki gruplarla kimyasal bağ yaparak etkileşime girerler. Doğal malzemelerden sentezlenmiş iskelelerin yüzeyinde Arg-Gly-Asp (ligand) bağlanma sekansları bulunur. Ancak sentetik materyallerden yapılmış iskelelere protein adsorpsiyonu gibi yöntemlerle yüzeye bu sekans eklenmelidir. Bu ligand yoğunluğu gözenek içinde hücrelerin tutunabileceği serbest alan gibi spesifik yüzey alanlarına bağlıdır. Bu da iskele üzerinde bulunan gözenek büyüklüğünün önemini ortaya koyar. Gözenekler hücrelerin hareketine olanak tanıyacak kadar büyük olmalı ve bu yapı içerisinde hareket eden hücreler eninde sonunda ligandlara bağlanabilecek uygun ortam sağlamalıdır. Ancak yüksek miktarda hücre sayısının iskeleye bağlanması için gerekli olan minimum ligand yoğunluğuna sahip olacak kadar da küçük olmalıdır. Bu yüzden çeşitli gözenek büyüklüklerine sahip birçok iskele doku mühendisliği araştırmalarında incelenmiştir.

e) Üretim teknolojisi

Bir iskelenin veya doku mühendisliği ürününün klinik alanda kullanılabilmesi için veya ticari değeri olabilmesi için; fiyat performans değerinin iyi olması ve araştırma laboratuvarlarında aynı anda birden fazla şekilde üretilmesi olanağı olmalıdır. İskele üretimindeki bir diğer ana unsur ise malzemenin nasıl kullanılacağıdır. Yani anlık kullanıma uygun olmalı ya da depolamaya elverişli olmalıdır. Genellikle klinik görevlileri *in vitro* ortamında toplanan kültürlerin kullanımını ekstra cerrahi işlem ile hücre toplanmasına tercih eder. Ancak bazı doku tipleri *in vitro* ortamlarda yetiştirilmeye uygun değildir.

Bu kriterlere göre doku mühendisliğinde kullanılacak iskelenin seçimi kullanılacağı yere göre uygun biyomateryallerden yapılmalıdır [25].



Şekil 2.8. Doku mühendisliğinde kullanılan polimer iskelelerde hücre çoğalma döngüsü

2.4. BİYOMATERYALLER

1976' da biyomateryaller için düzenlenen Avrupa Derneği Konferansında; 'biyomateryal' ler biyolojik sistemlerle etkileşime giren medikal aletlerde kullanılan cansız materyaller olarak tanımlanmıştır. Ancak bu dernek şu anda 'biyomateryal' i; biyolojik sistemlerle etkileşime girerek sistemleri geliştiren, tedavi eden, doku-organ veya vücuttaki fonksiyonları değiştirmek için kullanılan materyaller olarak tanımlamaktadır. Bu basit tanım değişimi bile biyomateryal teknolojisinin ne kadar geliştiğini göstermektedir. Biyomateryaller sadece vücutla etkileşime girmek görevinden çıkıp doku yenilenmesinde ve tedavisinde kullanılan materyaller sınıfına da girmiştir.

Tipik olarak doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin yapımında biyomateryal olarak 3 ana malzeme grubu vardır. Bunlar; seramikler, sentetik polimerler ve doğal polimerlerdir.

Her grubun kendine has bir takım avantajları ve dezavantajları vardır. Bu yüzden her grubun iyi yanlarını alarak hazırlanan kompozit iskeleler daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Seramik iskeleler yumuşak doku yenilenmesinde kullanılmaz. Genellikle kemik gibi sert doku tedavisinde kullanılırlar. Seramik iskeleler tipik olarak yüksek mekanik dayanıma, düşük elastikliğe ve kırılğan sert bir yapıya sahiptirler. Çeşitli seramikler ortopedik ve dental alanlarda metalik implant yüzeylerini kaplayarak tedavi edilecek sert dokunun korunmasına ve yenilenmesine uygun bir ortam sağlamaktadır. Ancak doku mühendisliği alanındaki klinik uygulamalar, implantların şekillendirilmesi işleminde sertliklerinden dolayı oluşan zorluklar sebebiyle sınırlıdır.

Polistiren, polilaktik asit, poliglikolik asit ve poli-dl-laktik-ko-glikolik asit gibi çeşitli sentetik polimerler iskele yapımı için kullanılmıştır. Sentetik polimerler istenilen fonksiyonel gruplarda ve istenilen mekanik özelliklerde üretilebilmek gibi önemli avantajlara sahiptirler. Ancak hidrolizleri sonucunda ortama karbondioksit verirler ve kanın pH derecesini düşürerek doku ve hücre ölümlerini neden olabilmektedirler. Ayrıca düşük biyoaktiviteye sahip olduklarından dolayı vücut tarafından reddedilebilirler.

İskele olarak kullanılan biyomateryallerden bir diğeri de doğal polimerlerdir. Kolajen, çeşitli proteoglikanlar ve kitosan gibi pek çok doğal polimerden elde edilen biyomateryaller iskele yapımında kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden elde edilen iskelelere göre doğal polimerler biyolojik olarak aktiftirler ve hücre yapışması ve büyümesi için uygun bir ortam sağlarlar. Dahası biyobozunur olmalarından dolayı biyobozunma sonucu açılan alana ev sahibi hücrelerin yayılmasına olanak sağlarlar. Ancak doğal materyaller, homojen ve yeniden üretebilme kısıtlamalarından dolayı iskele elde etme açısından bir takım güçlükler sunmakta ve zayıf mekanik özelliklerinden ötürü biyomalzemele olarak kullanımına sınırlama getirmektedir.

Sıralanan problemlerin üstesinden gelebilmek için birçok faz içeren (sentetik, doğal ve seramik içeren) kompozit iskeleler günümüzde halen araştırılmakta ve ilgi görmektedir. Örneğin sentetik polimer bazlı iskelelerin biyolojik kapasitelerini arttırmak için, sentetik polimerler doğal polimerlerle kopolimer yapılarak yeni kompozit iskeleler yapılmıştır. Bu şekilde yapılmış iskeleler gelecek vaad etse de bunların içerisinde vücutta doğal olarak bulunmayan en az bir faz bulunur. Bu da biyomateryalin biyoyumluluğunu düşürmektedir. Bu düşünceyle çalışılan kolajen bazlı iskeleler ya tek başına kolajen kullanılarak yapılmış ya da mekanik ve biyolojik aktivitelerini arttırıcı fazlar eklenerek biyomateryaller elde edilmiştir [25,28].

2.4.1. Biyomateryal Olarak Kullanılan Polimerler

Günümüzde biyomateryal olarak kullanılan polimerler elde ediliş biçimlerine göre doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.4.1.1. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, monomerlerden çeşitli metotlarla sentezlenme sonucunda elde edilen polimerlerdir. Bu gruptaki polimerler, kendi içinde biyobozunabilen ve bozunamayan sentetik polimerler olarak ikiye ayrılır.

a. Biyobozunur olmayan sentetik polimerler: Poliakrilonitril (PAN), polimetilmetakrilat (PMMA) ve benzeri polimerler bu gruba örnek olarak verilebilmektedirler.

PMMA polimeri, doğrusal yapıda ve hidrofobik olan bir zincir polimerdir. Ticari olarak Lucite ve Plexiglas isimleri ile bilinmektedirler ve bu polimer sert kontakt lenslerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Poliakrilonitril (PAN) ise yapay iplik olarak da bilinen fibröz ve de kauçuk benzeri organik bir polimerdir. Kullanım alanı olarak tekstil başta olmak üzere pek çok alanda yaygındır.

b. Biyobozunur sentetik polimerler: Poliglikolik asit ve polilaktik asit ya da bu iki polimerin kopolimerleri, polianhidritler, polialkilsiyanoakrilatlar bu grup için örnek verilebilir. Doku mühendisliği alanı için biyobozunur ve de biyouyumlu olma özelliği, organik solventlerde çözünabilmeleri ve işlenmeye müsait fiziksel özellikleri sebebiyle sıkça tercih edilebilen polimerler grubundandır.

Sentetik polimerler grubundan taşıyıcı sistem olarak kullanma amaçlı en sık kullanılan polimerler tamamen bozunabilir özellikte olan polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve bu polimerler ile sentezlenen kopolimeri olan polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)' dir. Diğer bir polimer ise biyobozunur olan polikaprolakton (PCL) doku mühendisliği alanında özellikle de kemik dokusu için öneme sahiptir. Biyobozunur olan diğer sentetik polimere ise poli(fosfazen), polietilen glikol (PEG) ve PEG/PLA kopolimeri, poli(propilen fumarat) (PPF) ve poli (anhidrid) polimerleri örnek verilebilir ve biyobozunur özellikleri dolayısıyla pek çok alanda kullanılmaktadırlar [94]. Bozunma hızları açısından yapılan bir araştırmada hidrofilikliğe bağlı olarak poliglikolik asit hızlı bozunmaya sahipken polilaktik asit daha yavaş bir bozunmaya sahip olduğu gözlenmiş, polikaprolaktonun ise en yavaş oranda bozunma hızına sahip olduğu görülmüştür.

Polilaktik-ko-glikolik asit, polilaktik asit, poliglikolik asit polimerleri biyobozunur özellikleri dışında sahip oldukları yüksek mekanik özellikleri sebebiyle ameliyat ipliklerinde, tıbbi implantlarda ve ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanıldığı görülür. Bu polimerlerin dezavantajı pahalı olmalarıyla beraber bozunma hızlarının yavaş olması uygulamalarda kısıtlamalara yol açmaktadır.

Doku mühendisliği uygulamalarında taşıyıcı sistem olarak sıkça kullanılan sentetik polimerler, doğal polimerlere kıyasla hazırlama esnasında ve ayrıca depolama süresince de daha dayanıklıdırlar. Sentetik polimerlerin önemli avantajlarından biri de

talep edilen kimyasal ve de mekanik özelliklere sahip polimerlerin üretim kolaylığıdır. Bununla beraber sentezleme esnasında polimerler talep edilen özellik ve büyüklükte sentezlenme kolaylığına da sahiptirler. Bunlara ek olarak polimer zincirlerinin molekül ağırlığı, konformasyon ve konfigürasyonları ve fonksiyonel gruplarının kontrol edilebilmesi bakımından önemli bir avantaj olarak görülmektedir. Bu durumda hidrofilik bir polimer olma veya hidrofobik özellikte olmayı ayarlama imkanı sağlanmış olunmakta ve biyoyapışmaları da farklılaştırılabilmektedir. Sentetik polimerlerin mekanik bakımdan bozunma hızları da doğal polimerlere oranla daha yavaştır.

Doğal polimerlere kıyasla sentetik polimerlerde bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerin oluşması ya da öldürücü olabilen hastalıklara yol açma ihtimali olan patojenlerin bulaşma ihtimali oldukça azdır.

Sentetik polimerlerin araştırılıp aydınlatılan bütün bu avantajlarına rağmen en önemli dezavantajı bozunma sonucu açığa çıkan toksik etki gösteren yan ürünlerin meydana gelmesidir. Ortaya çıkan bu toksik maddelerin vücutta akut veya kronik inflamasyonlara sebep olması da önemli bir kısıtlamaya neden olmaktadır. Canlı açısından önemli bir sorun oluşturan bu kısıtlama vücut pH' ında değişikliklere sebep olup bireyin sağlığını riske sokmaktadır [2, 29, 26, 30, 31].

2.4.1.2. Doğal Polimerler

Doğal polimerler; polisakkarit yapısındaki polimerler, protein kaynaklı polimerler ve türlü mikroorganizmalar tarafından sentezlendiğinden dolayı sentetik doğal polimer olarak bilinen polihidroksialkonatlar olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Bu polimerler biyoyumlu olma ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı (aljinat, hyaluronik asit, kitosan nişasta gibi polisakkarit yapıda olanlar ve jelatin, kolajen, ipek, fibrin, fibroin gibi protein yapılı polimerler; poli(β -hidroksibütirat) (PHB) ve poli(hidroksibütirat-ko-valerat) (PHBV) gibi polihidroksialkonatlar grubunda olan polimerler) doku mühendisliği için önemli malzemelerdir.

Doğal polimerler; doku mühendisliği alanının önemli koşullarından olan biyoyumlu özellikte olma, biyolojik ortamda degrade olabilme, toksik olmama gibi özellikleri içerisinde barındırır. Mekanik özelliklerini arttırmak için sentetik ya da inorganik malzemelerle kompozit olarak da kullanılabilirler.

Dezavantajları arasında ise canlı dokudan elde edilmelerinden dolayı bağışıklık sistemini tetiklemesi ve hayvan kaynaklı olan patojenlerin bulaşması durumu risk oluşturmaktadır. Bazı doğal polimerlerin doğal ortamdan eldesi sırasında karşılaşılan zorluklar ve ayrıca yüksek molekül ağırlığına sahip doğal polimerlerdeki işleme zorluğu bir diğer olumsuz yönüdür

Hücre yapışmasına, hücre büyümesine, farklı fonksiyondaki hücrelerin tutunmasına ve taşınmasına izin verdiği, biyouyumlu olduğu, biyobozunur özellikte oluşu ve toksik etkisi olmamasından dolayı hyaluronik asit doku mühendisliği alanında oldukça dikkat çekmektedir [2, 29, 26, 30, 31].

Jeong Kim ve arkadaşlarının hyaluronik asit ile olan çalışmalarında kitosanla polielektrolit kompleks (PEC) yaparak film oluşturmuşlar ve daha sonra bu PEC ile kas gibi kasılabilen yapılar için yapay organ çalışması, sensör ve ilaç taşıma sistemleri gibi ileri çalışmalar için araştırmalarda bulunmuşlardır. PEC iyonik etkileşimlerle çapraz bağlanma gerçekleştirebilen bir yapıdır. Kitosan polimeri artı yüklü, hyaluronik asit ise bu komplekste eksi yüklü olan materyaldir. Bu şekilde karşıt iki yük ile oluşturulan iyonik bir kompleks elde edilir [32].

Huaping Tan ve arkadaşları çalışmalarında N-süksinil-kitosan (S-CS) ve aldehit hyaluronik asit ile Schiff base formunda çapraz bağlı hidrojeller sentezleyerek toksik olmayan ve degrade olabilen kıkırdak doku mühendisliği için doku iskelesi çalışmaları yapmışlardır [33].

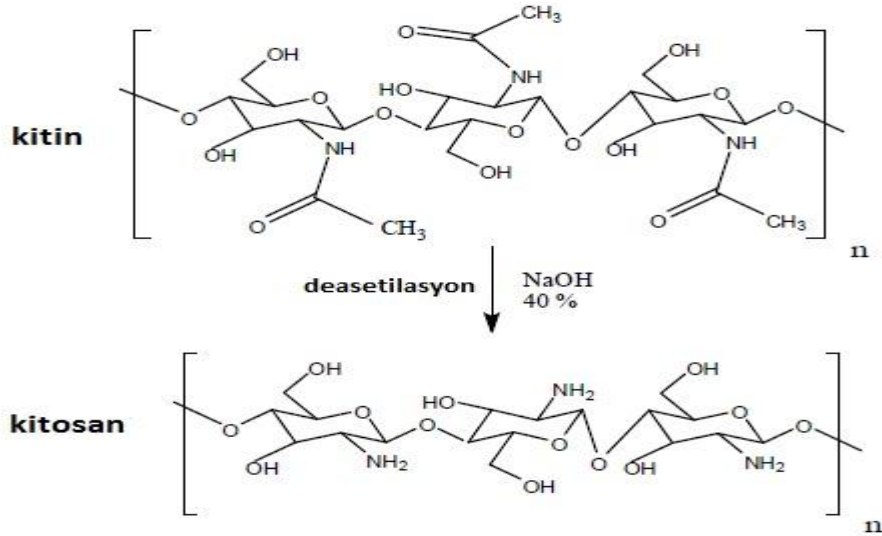
Bir diğer çalışmada ise Kun-Hung Chang ve arkadaşları tarafından hyaluronik asit ile gene doğal bir polimer olan jelatinin kopolimerleri kriyojelasyon yöntemiyle sentezlenmiş ve doku mühendisliği alanında uygun doku iskeleleri elde etmeye çalışmışlardır [14]. Benzer bir çalışma Kathuria ve arkadaşları tarafından kitosan ve jelatin polimerleri kullanıp gerçekleştirilmiştir [17]. Bu iki çalışmada da hücrelerin yaşayıp üremesi uygun koşulların sağlandığı biyomalzemeler sentezlenmiştir.

Üzerinde çalıştığımız tez içeriği ise doğal polimerler olan kitosan ve hyaluronik asit kopolimerlerini içermektedir. Bu iki polimerden kriyojel yöntemiyle sentezlenen jellerin doku mühendisliği alanında önemli bir yeri vardır.

2.5. KİTOSAN

2.5.1. Kitosanın Yapısı ve Elde Edilişi

Kitosan; lineer, yarı kristalin ve (1→4)- 2 -asetamido- 2 -deoksi- β -D-glukan (N-asetil D-glukozamin) ve (1→4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukan (D-glikozamin) üniteleri içeren bir polisakkarittir. Doğada direk olarak bulunması zor olmakla beraber kitin gibi doğal polimerlerin kısmi deasetilasyonu ile elde edilebilir. Kitinden elde edilen bir malzemenin kitosan olabilmesi için deasetilasyon sonucunda en az %60 miktarında D-glikozamin kalıntısı içermesi gerekmektedir. Kitinin deasetilasyonu; alkali ortamda kimyasal hidrolizle veya kitin deasetilaz enziminin varlığında enzimatik hidrolizle gerçekleşir. Selülozdan sonra kitin doğada en fazla bulunan polimerdir. Genellikle yengeç kabuklarında veya böcek iskeletlerinde bulunmaktadır, ancak bazı mantarlarda da görülmektedir [34].



Şekil 2.9. Kitosanın kitinden deasetilasyon ile eldesi

2.5.2. Kitosanın Yapısı ve Özellikleri Arasındaki İlişki

Kitin ve kitosan arasında bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bu da kitosanın sahip olduğu özellikleri farklılaştırmaktadır. Kitosanın yapısında bulunan D-glikozamin

üzerindeki amin grupları seyreltik asitlerle protonlanarak çözünürlük kazanmaktadır. Ancak tam tersine kitinin üzerinde serbest amin grupları bulunmadığından dolayı çözünürlük yok denecek kadar azdır. Bu da kitinin uygulamalarını sınırlandırır. İlginçtir ki kitosanın bazı koşullardaki pH a bağlı olan çözünürlüğü kitosanın geniş bir aralıkta, özellikle kozmetik alanındaki uygulamalarına olanak tanımaktadır [8].

Bu amino gruplarından dolayı kitosan metal iyonları gibi değişik malzemelerle kompleks oluşturabilmektedirler, buna bağlı olarak da atık suların arıtımı ile ağır metallerin geri kazanımında kullanılabilirler [35]. Kitosanın bu kompleks yapma özelliği, içeceklerin (şarap, meyve suyu gibi) saflaştırılmasında kullanılmasına da olanak tanır [36].

Polikasyon yapısına geçmiş protane olmuş kitosanlar; lipid, protein ve DNA gibi biyolojik polianyonlarla ya da poli (akrilik asit) gibi sentetik anyonik polimerlerle iyonik kompleks yapma kabiliyetine sahiptirler [37]. Kitosan pozitif yüklenen tek doğal polisakkarittir. Polielektrolit olarak kitosan, katman üzerine katman ekleme yöntemiyle elde edilen filmlerin yapımında kullanılabilir [34].

Kitosan üzerinde bulunan amino ve hidroksil fonksiyonel grupları başka materyallerle kararlı kovalent bağlar oluşturulmasına olanak tanır. Alkol grupları ile esterifikasyon ve eterleşme reaksiyonları gerçekleştirebilirler [35] D-glukozamin üzerindeki amino grupları kuaternize olabilir veya aldehitlerle tepkimeye girerek indirgenebilirler. Bu özellikleri sayesinde kitosan üzerine çeşitli fonksiyonel gruplar eklenerek çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlanır.

Bu özelliklere ek olarak kitosanın kendine has dikkat çekici özellikleri vardır. Bu polisakkarit; antibakteriyal, antifungal, mukoz yapıştırıcı özellik, analgesik ve homeostatik özelliklere sahiptir. Kitosan in vivo ortamda lizozim enzimiyle parçalanmaktadır. Bozunduğunda toksik olmayan malzemelere ayrılmaktadır. Malzemenin bozunma hızı deasetilasyon derecesine bağlıdır. Degradasyon derecesi kitosanın kristallik derecesi ile doğrudan orantılıdır. Yüksek miktarda deasetile olmuş (%85' den fazla deasetile olmuş) malzemelerin bozunumları en az seviyededir ve cansız ortamda bozunmaları uzun süreler alabilir. Ancak deasetile derecesi düştükçe bozunma hızının arttığı gözlemlenmiştir. Yukarıda anlatılan bütün bu özellikler kitosanın biyomalzeme olarak kullanılmasına olanak sağlar [28].

2.5.3. Biyomateryal Olarak Kitosanın Özellikleri

Bahsedildiği üzere kitosanın bazı dikkat çekici özellikleri biyomedikal uygulamalarda benzersiz fırsatlar yaratmaktadır. Kitosanın oluşum mekanizmasının aydınlatılması biyomedikal ve ilaç uygulama alanlarında kitosan kullanımına yönlentmektedir. Kitosanın özelliklerinin açıklanmasında D-glikozamin kalıntısı ile gelen protonlanmaya müsait amin grupları kullanılmıştır. Gerçekten de mukozaya yapışma özelliği, sialik asit gibi musin içinde negatif yüklü malzemelerin varlığında ortaya çıkmaktadır. Asidik ortamlarda kitosanın amino grupları pozitif yüklüdür ve böylece musin ile etkileşime girebilirler. Kitosanın mukozaya yapışma özelliği deasetilasyon derecesi ile orantılıdır. Deasetilasyon derecesi arttıkça pozitif yük artar. Böylece mukozaya yapışma özelliği artar [38].

Minumum kristallik orta miktarda deasetilasyon sonucu oluşur. Kararlı bir kristalin yapısı olduğundan dolayı kitosan, pH 7 üzerindeki su içeren çözücülerde çözünmez. Ancak pH derecesi 5 civarında olan zayıf asitlerde, protonlanmış serbest azot grubu içeren çözücülerde çözünür. pH a bağlı çözünürlük kitosana uygun koşullarda kolay bir üretim mekanizması sağlar.

Kitosanın homeostatik aktivitesi, kitosan iskeletini üzerinde bulunan pozitif yüklerle ilişkilendirilebilir. Kırmızı kan hücrelerinin zarları negatif yüklüdür ve böylece pozitif yüklü kitosana etkileşime girebilirler.

Biyobozunma özelliğini açıklarken kitosanın sadece amino grubu içeren bir polimer olmadığını ayrıca kırılabilir bir glikozidik bağa sahip olan bir polisakkarit olduğunu da hatırlamak gerekir. Canlı ortamda (in vivo) kitosanın yıkımı birkaç proteaz enzimi (özellikle lizozim) ile gerçekleşir. Bu güne kadar insanlarda sekiz tane kitinaz enzimi belirlenmiştir. Bunlardan üçü kitosan üzerinde enzimatik aktivasyon göstermektedir [39]. Kitosanın bozunması ile çeşitli uzunluklarda toksik olmayan oligosakkaritler oluşmaktadır. Bu oligosakkaritler metabolik yapıya katılabilir ya da daha küçük parçalara ayrıştırılabilir. Degredasyon hızı deasetilasyon derecesine bağlıdır fakat ayrıca moleküldeki N-asetil D-glikozamin kalıntılarının dağılımına da bağlıdır.

Biyobozunma ile deasetilasyon derecesini ilişkilendirirken kitosanın yarı kristalin bir polimer olduğunu göz önünde bulundurmak gerekir. Kitosanın kristallik derecesi deasetilasyonun maksimum olduğu (kristallik derecesi %0) değer ile kitin

formuna geçtiği minumun (kristallik derecesi %100) değer arasında bir değerdedir (Kristallik %60' a yakın). Kristallik arttıkça biyobozunum düşer. Son olarak diyebiliriz ki kısa zincirli kitosanlar yüksek molekül ağırlıklı kitosanlara göre daha hızlı bozunarak oligosakkaritlere dönüşürler.

Bahsedilen tüm bu özelliklere göre kitosanın dışçilikten yapay deri yapımına kadar birçok alanda kullanılması sürpriz bir durum değildir. Bu alanlarda yapılan bu denemeler Yiyecek ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration (FDA))' ne uygundur.

Kitosanın biyoyumluluğu hazırlanış metoduna ve deasetilasyon miktarına bağlıdır. Deasetilasyon miktarı arttıkça biyoyumluluğun arttığı gözlemlenmiştir. Kitosanın hücre uyumluluğunun kitine göre daha fazla olması bu sebeptendir.

Kitosanın en çok umut vaad eden özelliklerinden biri de hücre aktarımı ve doku yenilenmesi için gözenekli yapıda malzeme üretimi için uygun olmasıdır. Gözenekli kitosan yapıları, kitosanın asetik asit içerisinde çözülerek dondurulması ve liyofilize edilmesiyle elde edilirler. Gözenek büyüklükleri dondurulma işlemi sırasında asetik asit yoğunluğuna bağlı olarak ayarlanabilir. Oluşan kitosan yapının fiziksel özellikleri gözenek büyüklüklerine bağlı olup gözenek boyutları arttıkça mekanik özellikleri düşmektedir. Ancak gözenek boyutlarının büyük olması hücrelerin difüzyonlanmasında kolaylık ve hücre çoğalması için geniş bir ortam sağlar [8].

2.5.4. Doku Mühendisliği için Üç Boyutlu Kitosan İskeleler

İmplant edilen iskelelerin yapımı sırasında; vücut uyumluluğuna, mekanik özelliklere, iskele morfolojisine ve gözenekliliğe bakılırken iyileştirme ve doku yenileme kapasitesine de dikkat edilmelidir. Literatüre göre doku mühendisliğinde kullanılan iskeleler yukarıdaki özelliklere ek olarak akut ve kronik tepkiler vermemeli, biyobozunur olmalıdır ki iyileşen doku biyomateryalin yerini alabilmeli, hücre tutunmasını sağlayacak yüzeye sahip olmalı, farklılaşmaya ve hücre çoğalmasına olanak sağlayan, hasar gören dokuyu taklit edebilen ve dokunun yapabileceği mekanik etkilere dayanabilecek bir yapıya sahip olmalı ve son olarak çeşitli şekillerde üretilebilmelidir.

Bahsedilen olağanüstü özelliklere sahip olan kitosan, eksik veya zarar görmüş dokunun ve organın yenilemesine dolayısıyla hücre yaşamına ve çoğalmasına elverişli

bir ortam sağlayabilmesinden dolayı biyomateryal olarak aday gösterilmektedir [40]. Hastalıklı dokulara göre değişik özelliklerde iskele yapımı kullanılan metotlara bağlıdır. Bu yüzden iyi şekil almış üç boyutlu kitosan hidrojeller ve köpükler üretebilmek için çeşitli metotlar geliştirilmiştir.

2.5.4.1. Kitosan Hidrojeller

Jeller %10 katı faz, %90 sıvı fazdan oluşan malzemelerdir. Hidrojelerde sıvı faz sudur. Katı faz da jelin bütünlüğünü korumaktadır. Katı faz likit fazda çözülmez ve yüksek miktarlarda su emilimini sağlar. Hidrojeller, yapısında %90 su olduğundan dolayı yaşayan dokularla uyum gösterir. Dahası hidrojeller hastaya implante edildikten sonra etraflarındaki dokuya verilen zararı minimuma indirir. Hidrojellerin mekanik özellikleri, yaşayan dokulara benzetilmeye çalışılmıştır. Böylelikle jeller hem fonksiyonel bakımdan hem de morfolojik bakımdan onarılabilecek doku ile uyumlu hale gelmektedir. Bu yüzden hidrojeller genellikle doku değişiminde kullanılan biyomedikal iskelelerdir. Fakat ilaç iletimi ve büyüme faktörü taşınımı gibi değişik biyomedikal uygulamaları da vardır [41].

2.5.4.1.1. Fiziksel Bağlı Kitosan Hidrojeller

Fiziksel hidrojellerin oluşumu polimer zincirleri arasında oluşan tersinir etkileşimle gerçekleşebilir. Bu etkileşimler kovalent olmayan, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarıdır. Bu etkileşimler pH, konsantrasyon ve sıcaklık gibi birçok parametreye bağlı olabilir. Bu yüzden bu bağlar kararlı değildir ve tersinir jelleşme gerçekleştirilebilir. Bu hidrojellerin şişme özelliği bahsedilen parametrelere bağlı olarak azaltılabilir veya artırılabilir. Kural olarak daha az etkileşim yumuşak jeller oluştururken yüksek etkileşimde sert jeller oluşturulur.

Kitosanın ek bir malzeme olmadan tek başına jel oluşturabilmesi dikkat çekmektedir. Bu jelleşme işlemi kitosanların amino gruplarının nötralizasyonuna dayalıdır. Nötralizasyon gerçekleştirildiği zaman kitosan zincirleri arasındaki amonyum itme kuvveti kaldırılır ve böylece zincirler arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve kitosan kristallenmesi ile jelleşme gerçekleşir.

Dahası kitosan hidroojeller PVA gibi suda çözünen, iyonik olmayan polimerlerle blend yapılarak elde edilebilirler. Termal duyarlığa sahip kitosan hidroojeller, gliserol fosfatdisodyum tuzu gibi poliol tuzları ile blend yapılarak elde edilir. Kitosan yapısı ayrıca fiziksel bağlı hidrojel elde edebilmek için polietilenglikol gibi malzemelerle modifiye edilebilir.

Kitosan asidik koşullarda poli katyonik doğaya sahip olduğundan dolayı, kitosan hidroojeller çok az miktarda anyonik malzemeler varlığında elektrostatik etkileşimlerle kolay bir şekilde fiziksel bağlı hidroojeller elde edilebilir. Pozitif yüklü kitosanlar fosfat, sitrat ve sülfat gibi negatif yüklü moleküllerle etkileşerek hidroojeller oluşturabilir. Çeşitli konsantrasyonlarda ve boyutlarda anyonik materyallerle iyi bir şişme yapabilen jeller elde edilmiştir.

Daha fazla negatif yüke sahip moleküller, sentetik ve doğal polianyonlar kitosanlarla jel oluşturabilir. Doğal polianyonlara örnek olarak; protein (albümin fibroin), anyonik polisakkaritler (hyaluronik asit vb.), karboksimetilselüloz ve glikozaminoglikan (GAG) gösterilebilir. Sentetik polianyonlara örnek olarak poliakrilik asit gösterilebilir. Kitosanın yük yoğunluğu ve polianyonun yük yoğunluğu hidroojellerin şişme ve kararlılığına etki eden en büyük iki etkindir. pH da etkilidir ancak yük yoğunluğuna göre daha az etkili bir rol oynamaktadır.

Elektrostatik etkileşimler, sadece anyon ve katyon arasında değil hidrojen bağları gibi ikincil etkileşimlerle de olabilir. Ancak iyonik etkileşimler hidrojen bağlarından çok daha güçlüdür. İyonik kitosan hidroojeller yapılırken katalizör ve toksik reaktif ajan kullanılmaz. Böylece biyomedikal uygulamalarda kullanımı daha kolay olmaktadır.

Toksik reaktif içermeyen hidroojellerin kolayca jelleşmesi insan vücuduna enjekte edilebilen ve eklendiği zaman sol jel özelliği gösteren çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler hasar görmüş dokuların etrafını sararak onun şeklini alırlar ve uygun iskeleler oluştururlar. Ancak böyle jeller hidrolizlendikleri zaman vücut tarafından reddedilebilecek ve vücuda zararlı yapılar oluştururlar [42].

2.5.4.1.2. Koordinasyon Kompleksi ile Çapraz Bağlı Kitosanlar

Kitosan; Pt (II), Pd (II) ve Mo (IV) ile koordine kovalent bağlar oluşturarak hidrojel yapabilmektedirler. Biyomedikal kullanımları yoktur.

2.5.4.1.3. Kimyasal Çapraz Bağlı Kitosan Hidrojeller

Bu tip hidrojel zincirler arasında kovalent bağlar oluşturularak elde edilir. Bu hidrojel fiziksel bağlı hidrojelere göre tersinir bir jelleşme gerçekleştirmediğinden dolayı daha kararlıdır. Ancak bu çapraz bağlanma bir takım modifikasyon gerektirdiği için kitosanın başlangıçtaki özelliklerini değiştirebilir. Ayrıca toksik reaktif kalıntıları ve katalizör kalıntıları biyomedikal kullanımı sınırlandırabilir.

Amino ve hidroksil grupları ile amit ve ester bağları yapılarak çeşitli bağlantılar kurularak ve ayrıca Schiff base formu ile hidrojel elde edilebilir. Küçük multi fonksiyonlu moleküller veya polimerik çapraz bağlayıcılar ile kitosan etkileşime girer ve çapraz bağlanma gerçekleşir. Kitosan çapraz bağlanma başlatılmadan önce, enzimatik katalizli reaksiyon ve foto indüklenmiş reaksiyon ile aktive edilmiş fonksiyonel gruplar ile modifiye edilebilir.

Tersinir olmayan kitosan hidrojel için kitosan üzerindeki amino grupları ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren glioksal ve glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcılar kullanılır. Tripolifosfat, etilenglikol, diglisidileter ve diizosiyanat da çapraz bağlı kitosanlar elde etmek için kullanılabilirler. Ancak bahsedilen bütün çapraz bağlayıcılar toksik etki gösterebilir ve bu da çapraz bağlı kitosanların gelecekteki biyomateryal uygulamalarını kısıtlayabilmektedir. Son zamanlarda genipin isimli bir malzeme alternatif bir çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Bu çapraz bağlayıcı diğer malzemelere göre daha yavaş bozunur ve toksiklik etkisi henüz tespit edilmemiştir. Genipin primer amin ile reaksiyona girerek çapraz bağlanma yaptığından dolayı çeşitli protein ve kitosanlarla çapraz bağlanabilir. Hidrojellerin özellikleri, çapraz bağlanma yoğunluğu ve çapraz bağlanan molekül miktarıyla doğrudan orantılıdır.

Kitosanların üzerinde bulunan primer aminler kullanılarak çapraz bağlanma yapıldığından dolayı kitosanın bazı özellikleri kısıtlanır. Ancak amin gruplarının reaktivite derecesi hidroksil gruplarından daha fazla olduğundan dolayı çapraz bağlanma

amin grupları üzerinden başlar. Deasetilasyon derecesi yüksek olan kitosanlar ilginç bir başlangıç malzemesidir [8].

2.5.4.2. Kitosan Süngerler

Süngerler açık gözenekli katı köpüklerdir. Bu katı yapılar mikro gözenekli oldukları için yüksek miktarda sıvı emilimi yaparlar. Süngerler genellikle iyi hücre etkileşimine sahiptirler, yumuşaktırlar ve esnektirler. Kitosan süngerler genellikle yaradan kaynaklı sıvıları emerek doku yenilenmesine yardımcı olduklarından dolayı yara tedavilerinde kullanılırlar. Ayrıca kitosan süngerler dolgu maddesi olarak doku mühendisliğinde kemik uygulamalarında kullanılırlar.

Bu süngerler genellikle kitosan çözeltisinin dondurulması ve düşük basınçta solventin süblimleştirilmesine dayalı dondurarak-kurutma (freeze drying) yöntemiyle elde edilirler. Örneğin kitosan/trikalsiyumfosfat ve kitosan/kolajen süngerler bu yöntemlerle hazırlanarak kemik yenilenmesinde kullanılmıştır. Kitosan-ZnO kompozit süngerler, dondurarak kurutma ile hazırlanıp iyi şişme ve antibakteriyal özellikler taşımaktadır.

Dondurarak-kurutma (freeze drying) yöntemine benzer olarak keşfedilen ve düşük basınçta solventin süblimleştirilmesine gerek duyulmayan kriyojelasyon yöntemi ile de süngerler elde edilmiştir. Doku iskelesi uygulamaları sıkça kullanılmaktadır.

Antibiyotik ilaçlar taşıyabilen çapraz bağlı kitosan süngerler solvent buharlaştırma tekniği ile hazırlanmaktadır. Fibril yapısı elde edilmiş ve böylelikle bu süngerler yara kapama uygulamalarında kullanılmıştır.

Son zamanlarda kitosan iskelelerde gözenekliliği arttırmak için süper kritik karbondioksit kullanılması araştırılmaktadır. Süper karbondioksit metodu basınç kalktığı zaman hücre kültürlerine uygun gözenekli kitosan iskeleler elde etmek için kullanılmaktadır [8].

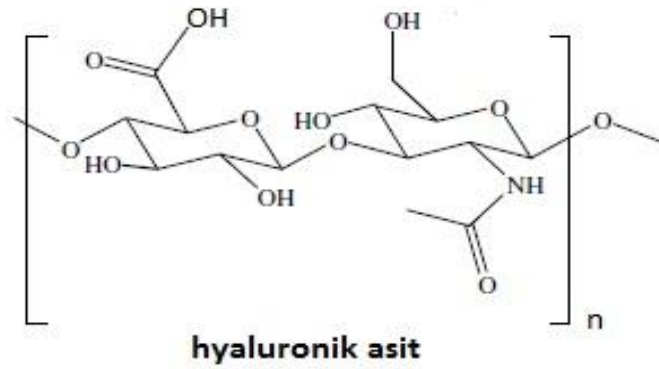
2.7. HYALURONİK ASİT

1934’ de Karl Meyer ve John Palmer sığır gözünün camsı tabakasından glikozaminoglikan izole etmişlerdir. Elde ettikleri bu malzemenin üronik asit ve amino şeker içerdiğini göstermişlerdir. Bu materyali ‘hyaluronik asit’ ve bazı özel durumlarda

‘hyaluronan’ olarak adlandırmışlardır. Konulan hyaluronan ismi aynı zamanda canlı ortamda (in vivo) prontanlanmış asit formunda değil de poli anyon formunda olduğunu göstermektedir. Hyaluronik asit her glukuronat ünitesi belli pH aralıklarında anyonik yük taşıdıklarından dolayı glikozaminoglikandır ve sodyum gibi mobil katyonlarla dengelenen eksi yüklü karboksilat grupları negatif yükler meydana getirmektedir [43].

2.7.1. Yapısı ve Kaynağı

Hyaluronik asit (HA) bütün omurgalılarda bulunmaktadır. Hyaluronik asit (HA) β -1,3 ve β -1,4 glikozidik bağıyla bağlanmış olan D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinin tekrarlanması sonucu oluşan bir polimerdir. Ekstraselüermatris (ECM) i oluşturan yapıda en fazla bulunmaktadır (örneğin insan gözünün canlı tabakası gibi). Son zamanlarda HA fermantasyon yapan bakterilerden elde edilmektedir. Böylelikle türler arası hastalık geçişi engellenmektedir. HA doku iskelesine birçok avantaj sağlar [9]. Yüksek viskoelastisite özelliği, nem tutma kapasitesi ve biyoyumluluğa sahip olmasından dolayı tıp, gıda, kozmetik ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır.



Şekil 2.10. Hyaluronik asitin yapısı

- a. Biyobozunurluk, biyoyumluluk ve biyoçözünürlük katmaktadır.
- b. HA; birbirine bağlı olan hücreler arasında gerçekleşen hücre büyümesinde, hücre farklılaşmasında, kayganlaştırmada büyük rol oynar.
- c. HA ana iskeletinde bulunan fonksiyonel gruplar (karboksilik asit ve alkol) yardımıyla çapraz bağlanarak hidrojel oluşturulabilmektedirler.

- d. HA yaralanmaların iyileşmesindeki her basamakta yer aldığından dolayı HA eklenmesi iyileşmenin hızlanmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir.
- e. Nemli bir ortam yaratma özelliğinden dolayı hücre girişimine uygun ortam sağlar. HA bazlı hidrojeller, kronik yaralanmaların tedavisinde veya diyabetik hastalar gibi sürekli tedavi gerektiren durumlarda kullanılmak üzere üretilen tedavi malzemesi için idealdir.
- f. HA doku mühendisliğinde hem uzun hem kısa zincirlerinde biyoaktif olma özelliğinden dolayı kullanılacak yeni tür iskelelerin yapımında kullanılabilir.

2.7.2. Çözelti Özellikleri

HA nın doku iskelesi materyali olarak kullanımında, kısa ömürlü olması ve sulu ortamda yeterli miktarda mekanik sağlamlıkta olmamasından dolayı kullanımında bir takım sınırlamalar vardır. Bu dezavantajlar kimyasal modifikasyon ve çapraz bağlanma gibi yöntemlerle aşılmaya çalışılmaktadır. Ancak yapılan iskelelerin özellikleri, HA üzerinde uygulanan modifikasyon ve çapraz bağlama işlemlerinin tekrar edilebilirliği; HA çözeltisinin özelliklerini iyi bir şekilde bilinmesini gerekli kılar. HA nın çözülmesini kontrol etmek önemlidir. Çünkü çözünme ve çözelti degradasyonu birbirine bağlı işlemlerdir. Tam bir çözünme, maksimum moleküler arası çapraz bağlanma elde etmek için ve moleküler arası istenmeyen reaksiyonları minimize etmek için önemlidir. HA çözeltisinin çeşitli derecelerde çözülmesi ile oluşan viskozite ile çapraz bağlanma verimliliği araştırılmıştır [9].

2.7.3. Hyaluronik Asit İskele Yapı Tekniği

HA bazlı hidrojeller kalıplara dökülerek değişik boyutlarda, değişik şekillerde üretilmekle kalmayıp mikro kürecik şablonlara koyularak büyük gözenekli iskeleler yapmak mümkündür. Bu işlem sırasında HA ortamdaki mikro küreciklerle çapraz bağlanarak daha büyük mikro kürecikler oluşturur. Daha sonra bu büyümüş olan mikro kürelerin çözülmesiyle hücre ve doku için yeterli miktarda gözeneklilik yaratılır. Açık gözenekli HA iskeleler buz partiküllü içeren şablon metodu ile ilk defa Ko Oh Kawazoe Tateishi ve Chen tarafından yapılmıştır. Barbeta, HA bazlı iskeleleri elde etmek için likit içerisindeki gaz şablonunu kullanarak, likit nitrojen içerisinde köpük dondurma

yöntemini geliştirmiştir. Bu iskeleler birbirine bağlı birkaç yüz nanometre çapındaki gözeneklere sahiptirler. Bu özellik de onlara hücre tutunması için avantaj sağlamaktadır [44].

2.7.4. Hyaluronik Asit Bazlı İskele Materyallerinin Uygulamaları

2.7.4.1. Kemik ve kıkırdak doku onarımı ve yenilenmesi

Kıkırdak doku yenilenmesi için fotopolimerize olan HA bazlı dondurarak kurutma yapılmış HA-kitosan iskeleler incelenmiştir. İnsan menüsküs hücreleri dondurarak kurutma yapılmış olan HA/poliglikolik asit iskelelerine başarılı bir şekilde yerleştirilmişlerdir. HA varlığı hem protein üretimine hem de hücre yaşamı başlaması için uygun bir ortam sağlar. Genel olarak yaşam başlangıcı yeterli miktarda hücre popölasyonu elde etmek için önemlidir. Ancak kemik dokunun oluşması, glikoaminoglikan (GAG) sentezlenmesi ve ikinci tip kolojenlerin sentezlenmesine bağlıdır.

Küçük miktarda peroksit ve hidrojen peroksit eklenmesi ile in vivo ortamda kovalent bir şekilde çapraz bağlanabilecek, enjekte edilebilir ve biyobozunur olan HA-triamin hidrojel sistemleri incelenmiştir. Bulgular göstermektedir ki bu ayarlanabilen üç boyutlu mikro ortamlar kondrajenesiz fazda hücresel kondenzasyonu kontrol edebilmekte ve kıkırdak dokunun sertleşmesini geliştirmektedirler.

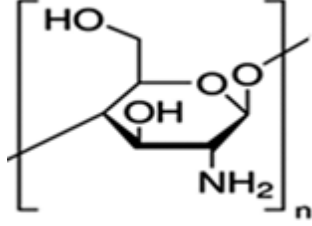
Polietilenglikodiakrilat (PEGDA); apraz bağlı tiyole edilmiş HA mekaskimal kök hücrelerini, femur kıkırdak yapısında oluşan bozulmaları gidermek için kullanılmıştır. Son zamanlarda in vitro ortamlarda kemik büyümesini tetikleyen BMP-2, gözenekli HA iskeleler ile taşınımı sağlanmıştır. Katı olmayan polilaktik-ko-glikolik asit graştlanmış HA/polietilenglikolik iskeleler başarılı bir şekilde BMP-2 yi bir aya kadar iskeleden kontrollü bir şekilde salabilmeyi başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Farelerde yapılan deneyler göstermektedir ki bu yöntemle yapılan aşılama BMP-2 ye bağlı olarak kemik yenilenmesini hızlandırmıştır [9].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Kitosan



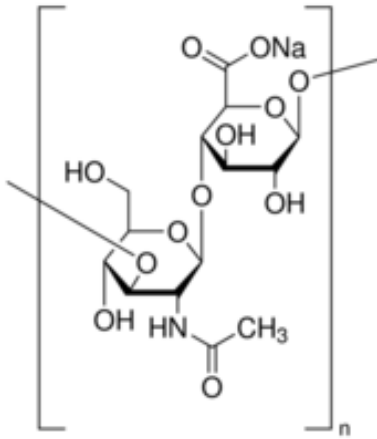
Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül ağırlığı: Düşük molekül ağırlığı

Deasetilasyon derecesi: %75-85

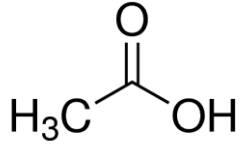
Viskozite: 20-300 cP (%1 asetik asit çözeltisi içerisinde, 25°C' de)

Hyaluronik Asit



Sigma firmasından hyaluronik asit Rooster Comb sodyum tuzu olarak temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı. Poly(β-glucuronic acid-[1→3]-β-N-acetylglucosamine-[1→4]) olarak da isimlendirilir. Temin edilen hyaluronik asit horoz ibiğinden (rooster comb) ekstraksiyon ile üretilmiştir.

Asetik asit



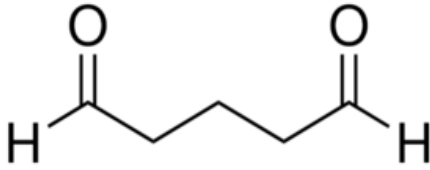
Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Temin edildiği gibi kullanılmıştır.

Kapalı formülü: CH₃CO₂H

Molekül ağırlığı: 60.05 g/mol

Safılık (%): 99.7

Glutaraldehit



Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Kapalı formülü: OHC(CH₂)₃CHO

Molekül ağırlığı: 100.12 g/mol

Konsantrasyonu: %25' lik (su içerisinde)

Sodyum Klorür

Merck firmasından temin edildi.

Kimyasal formülü: NaCl

Molekül ağırlığı: 58.44 g/mol

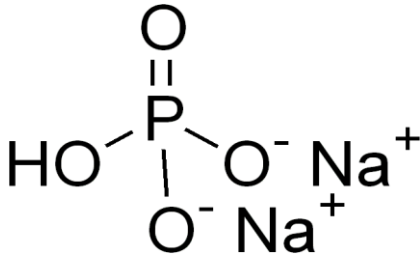
Potasyum Klorür

Merck firmasından temin edildi.

Kimyasal formülü: KCl

Molekül ağırlığı: 74.55 g/mol

Disodyum fosfat



Merck firmasından temin edildi.

Kimyasal formülü: Na₂HPO₄

Molekül ağırlığı: 141.96 g/mol (anhidrat)

Yoğunluğu: 1.7 g/cm³

Monopotasyum fosfat

Merck firmasından temin edildi.

Kimyasal formülü: KH₂PO₄

Molekül ağırlığı: 136,09 g/mol

Yoğunluğu: 2.338 g/cm³

Hidroklorik Asit

Merck firmasından temin edildi.

Kimyasal formülü: HCl

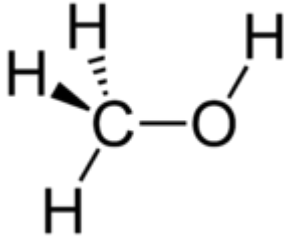
Molekül ağırlığı: 36.46 g/ mol

Yoğunluğu: 1.18 g/ cm³

Kaynama noktası: 110 °C

Erime noktası: -27.32 °C

Etanol



Merck firmasından temin edildi.

Kapalı formülü: C₂H₅OH

Molekül ağırlığı: 46.07 g/ mol

Kaynama noktası: 78.4 °C

Erime noktası: -114.3 °C

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

FTIR Spektrofotometre

Perkin–Elmer 100 FT-IR spektrofotometre cihazı kullanıldı. Alınan spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedildi. Kitosan kriyojelin, kitosan-hyaluronik asit kopolimer kriyojellerinin, kitosan ve hyaluronik asitin saf hallerinin spektrumları alındı ve spesifik pikler incelendi.

Termal Gravimetrik Analiz Cihazı (TGA)

Farklı kompozisyonlarda hazırlanmış kitosan kriyojellerinin ve kitosan-hyaluronik asit kopolimer kriyojellerinin termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla Perkin Elmer Pyris 1 model TGA cihazı kullanıldı. Ölçümler azot atmosferinde 10°C/dak ısıtma hızıyla 30°C-700°C sıcaklıkları arasında yapıldı.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Kriyojellerin camısı geçiş sıcaklıklarını belirlemek amacıyla Perkin Elmer Pyris Diamond markalı DSC cihazı kullanıldı.

Taramalı Elektron Mikrokobu (SEM)

Kriyojelasyon yöntemiyle hazırlanmış jellerin gözenek yapısını ve boyutunu incelemek, hücre ekiminden sonra da yüzeye tutunan hücreleri gözlemlemek amacıyla Phillips XL 30 ESEM-FEG cihazı kullanıldı. SEM analizi öncesinde kriyojeller altın ile kaplandı.

Liyofilizatör

Laboratuvar tipi Alpha 1-2 LD markalı liyofilizatör, kriyojellerin kurutulması amacıyla kullanıldı.

İnkübatör

Kriyojellerin şişme davranışı ve degradasyonu incelenirken sabit sıcaklıkta (37°C' de) kalmaları için Nüve EN 025 - 055 – 120 marka inkübatör kullanıldı.

Basma (Mekanik test) Testlerinde Kullanılan Tensilon Cihazı:

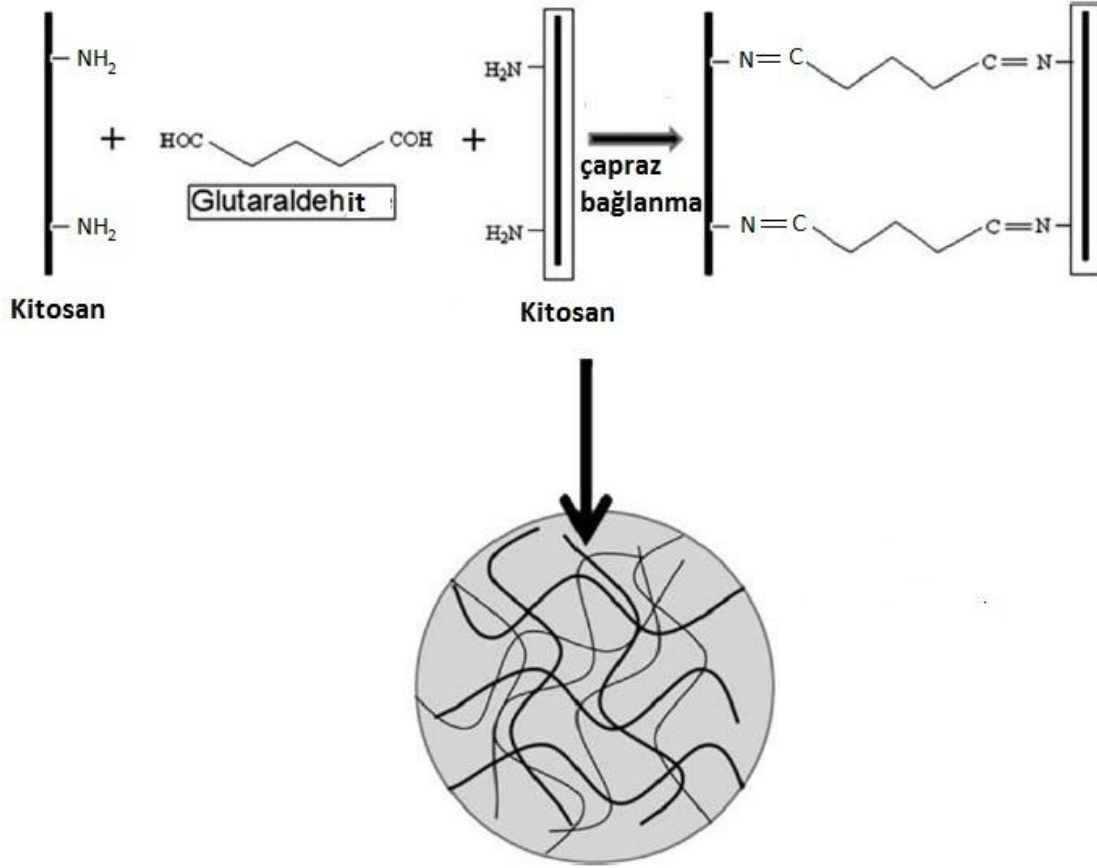
Kriyojellerin mekanik mukavemetini ölçmek amacıyla Zwick-Roell BDO-FB0.5TH marka cihaz kullanıldı. Test %100 deformasyon ile ön yükü 0.1 N ve test hızı 1 mm/dk olarak uygulandı.

3.3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.3.1. Kitosan Kriyojelinin Hazırlanması

Kitosan kriyojeli ilk olarak farklı konsantrasyonlarda çapraz bağlayıcı ile sentezlendi. Kitosan çözeltisini hazırlamak için %1' lik seyreltik asetik asit çözeltisi kullanıldı. Kitosan çözeltisi hazırlanırken 2 g kitosan tartıldı ve beherin içerisine %1' lik hazırlanmış olan asetik asit çözeltisinden 100 mL eklendi ve manyetik karıştırıcı ile yaklaşık bir gün boyunca karıştırılmaya bırakıldı. Böylelikle ağırlıkça %2' lik kitosan çözeltisi hazırlanmış oldu. Kitosan kriyojelleri için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldı. %25' lik glutaraldehit çözeltisi 3 farklı konsantrasyon için asetik asit ile seyreltilti. Ağırlıkça %0,4 ; %0,6 ve %1,0 olarak glutaraldehit çözeltileri hazırlandı. Değişik glutaraldehit oranlarında çapraz bağlanan kitosan kriyojelleri sentezlendi. Kriyojelasyon işlemi için öncelikle %2' lik kitosan çözeltisinden 8 mL pipetle alınarak beher içerisine konuldu. Daha sonra %0,4' lük glutaraldehit çözeltilerinden 2 mL beher eklendi. Ekleme yapılırken çözeltiyi köpürtmemeye dikkat edildi. Viskoz olan kitosan çözeltisi çapraz bağlayıcı eklendikten sonra hızlıca ve dikkatle karıştırılıp 5 mL' lik şırıngalara alındı ve -20°C olan buzluğa konuldu. Diğer glutaraldehit konsantrasyonları için aynı işlem tekrarlandı. Yaklaşık 2 gün bekletilen şırıngalar, içerisinde destile su koyulan beherlere şırıngaların başları kesilerek bırakıldı. Destile suyla 5 dk ara ile 3 defa yıkama işlemi uygulandı. Hazırlanan kriyojeller liyafilizatörde kurutuldu ve analizleri yapıldı.

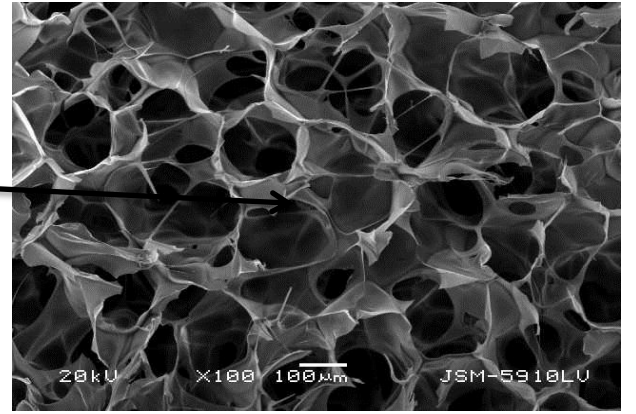
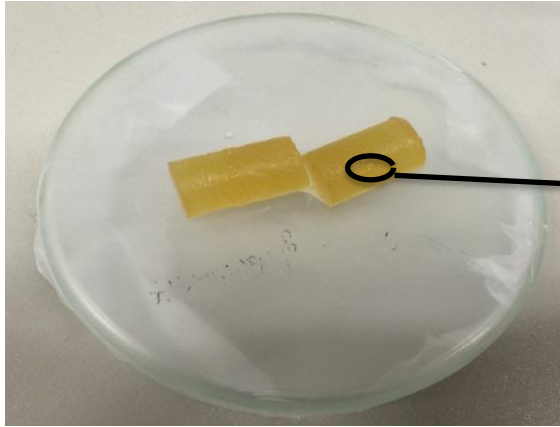
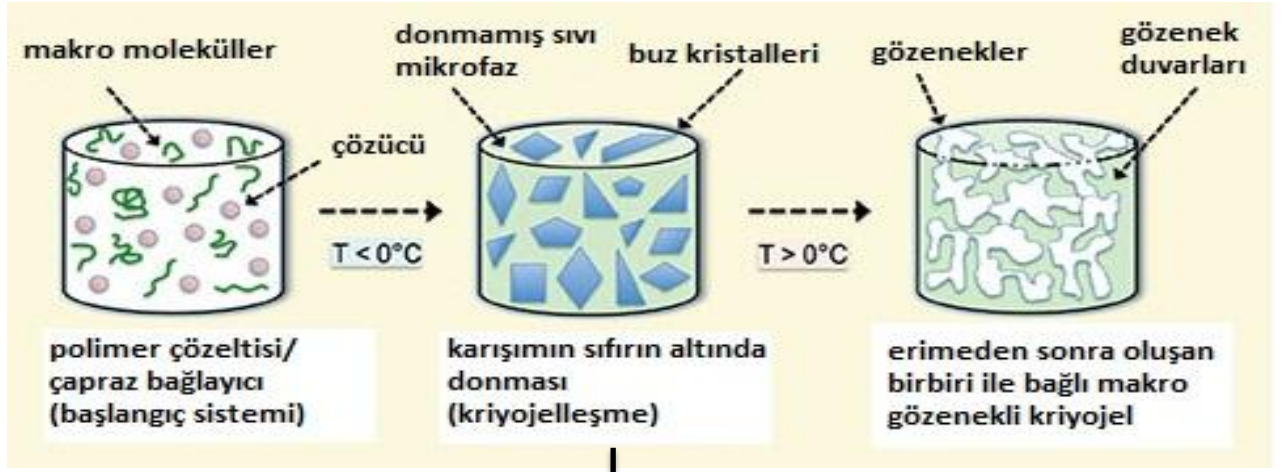
Aynı prosedür kullanılarak saf hyaluronik asit olan kriyojeller elde edilmek istendi fakat başarılı olunamadı. %2' lik olarak hazırlanan hyaluronik asit çözeltisi glutaraldehit çapraz bağlayıcı eklenip buzlukta 2 gün bekletildi. Uçları kesilen şırıngalardan alınan madde suda yıkama yapılırken çözöldü ve jelleşme gözlenmedi.



Şekil 3.1. Kitosan kriyojelin glutaraldehit ile çapraz bağlanması [17]

2.3.2. Kitosan-ko-Hyaluronik Asit Kriyojelinin Hazırlanması

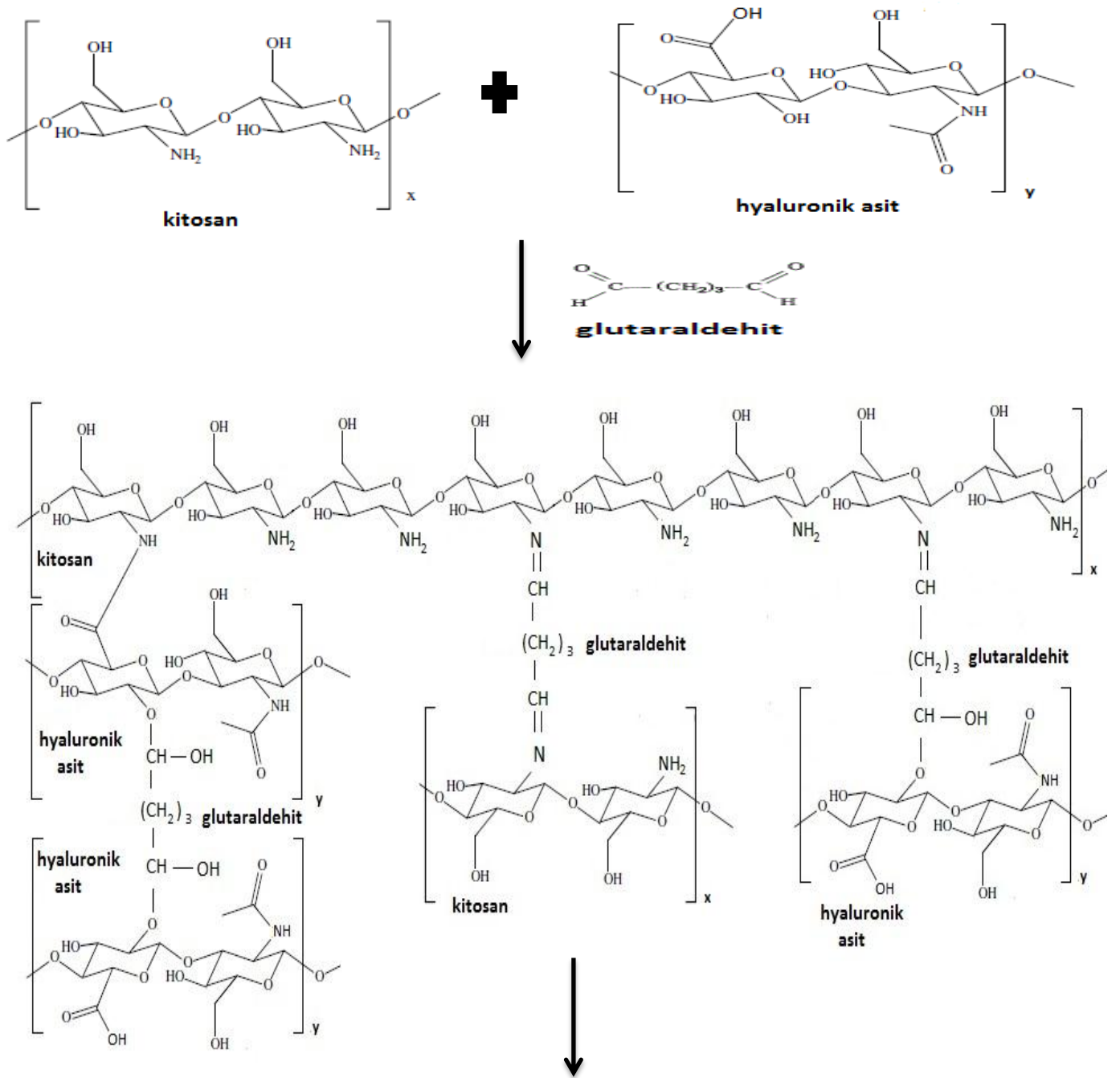
Aynı metot ile daha önceden hazırlanmış olan %2' lik kitosan çözeltisi, kopolimer sentezi için kullanıldı. Kriyojelasyon işlemi için %2' lik kitosan çözeltisinden 8 mL behere konuldu. Ağırlıkça kitosanın %10, %20, %30, %50' lik konsantrasyonları olan hyaluronik asit hesaplanarak kitosan çözeltisi üzerine eklendi. Ekleme işleminden sonra kitosan ile hyaluronik asit homojen olana kadar karıştırma işlemi yapıldı. Bu karışımın içine glutaraldehitin %0,4' lük konsantrasyonu çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı. Çapraz bağlayıcı eklendikten sonra hızlıca karıştırma işlemi yapıp 5 mL' lik şırıngalara karışım alındı. Ardından buzluğa koyulan şırıngalar -20°C de yaklaşık 2 gün bekletildi. Destile su dolu beherlerin içerisine uçları kesilen şırıngalardan kriyojeller çıkarıldı. 5 dk aralıklarla destile suyun değiştirilmesiyle beherlerde yıkama işlemi yapıldı. Liyafilizatörde kurutuldu ve analizleri yapıldı.



Şekil 3.2. Kriyojelasyon işleminin sembolize edilmesi

Tablo 3.1. Hazırlanan kriyojellerin içerik yüzdeleri

Kod	Kodun içeriği	Çapraz bağlayıcı
4G2C	% 2 Kitosan	%0,4 Glutaraldehit
6G2C	% 2 Kitosan	%0,6 Glutaraldehit
10G2C	% 2 Kitosan	% 1,0 Glutaraldehit
4G2C10HY	% 2 Kitosan % 10 Hyaluronik Asit	%0,4 Glutaraldehit
4G2C20HY	% 2 Kitosan % 20 Hyaluronik Asit	%0,4 Glutaraldehit
4G2C30HY	% 2 Kitosan % 30 Hyaluronik Asit	%0,4 Glutaraldehit
4G2C50HY	% 2 Kitosan % 50 Hyaluronik Asit	%0,4 Glutaraldehit

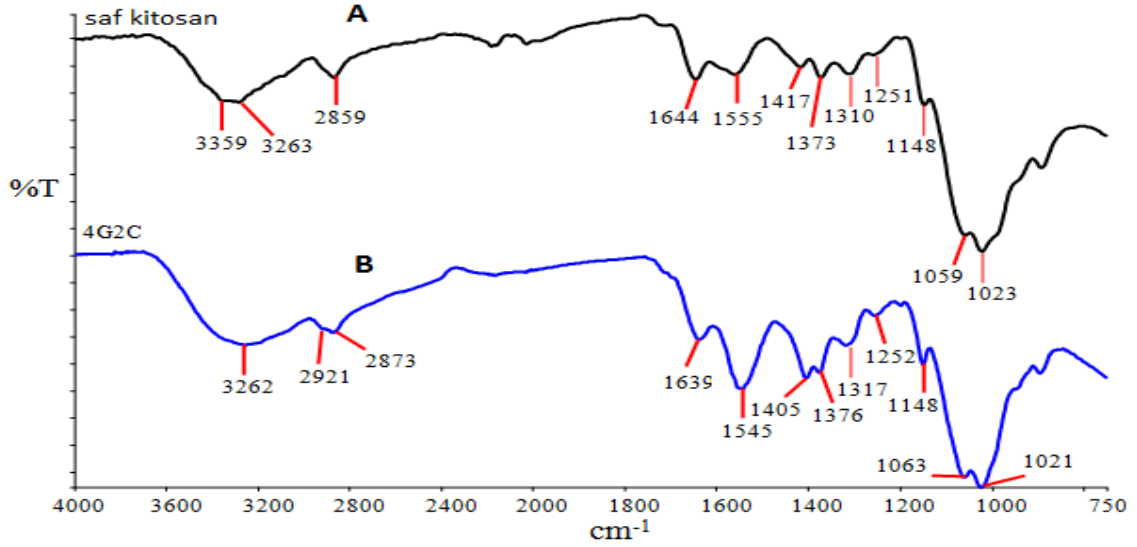


Şekil 3.3. Kitoson-hyaluronik asit kriyojellerinin sentezi

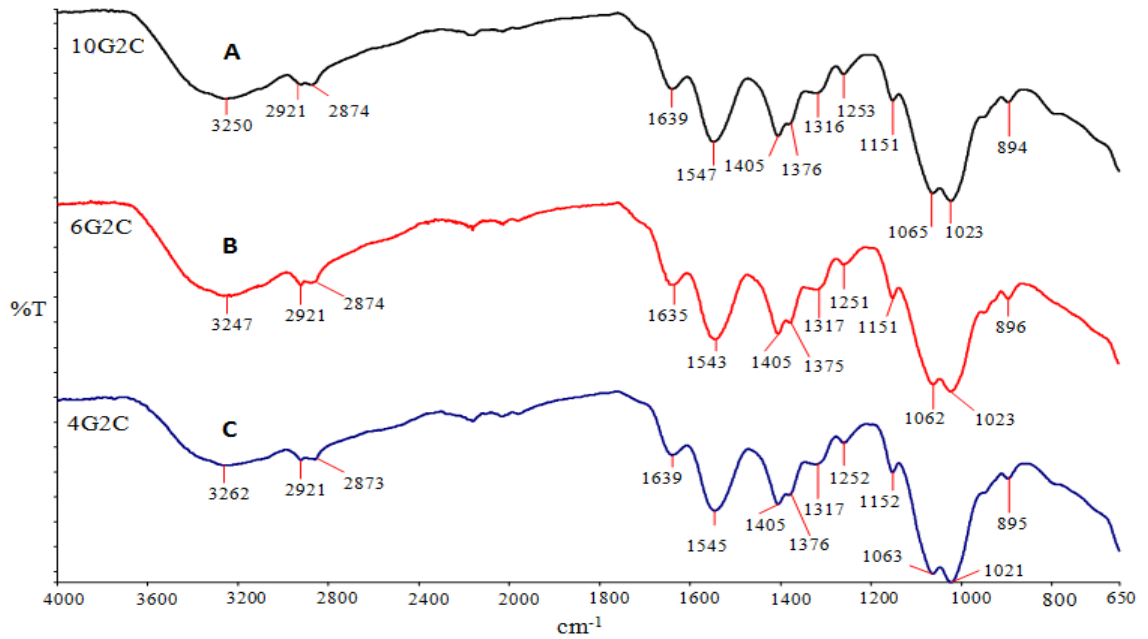
BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kitosan ve Kopolimer Kriyojellerin Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi



Şekil 4.1. (A) saf kitosan (çapraz bağlı olmayan kitosan) (B) 4G2C FTIR spektrumu



Şekil 4.2. (A) 10G2C (B) 6G2C (C) 4G2C FTIR spektrumu

Çapraz bağı olmayan saf kitosan ve kriyojelasyon yöntemiyle sentezlenmiş çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı kitosan kriyojellerinin FTIR spektrumları şekil 4.1 ve 4.2 de verilmiştir.

Çapraz bağlanma olmayan saf kitosanda 3263 cm^{-1} de hidroksil gruplarından (O-H) ve moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklı yayvan bir bant (broad) gözlenir. Bu bant % 0,4; 0,6 ve 1,0 glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanlarda da gözlenmektedir (sırasıyla 3262 cm^{-1} , 3247 cm^{-1} ve 3250 cm^{-1}) [45-54].

Saf kitosana ait olan 3359 cm^{-1} de gözlenen bandın kitosanda bulunan primer aminlerden kaynaklı (NH_2 -) olduğu düşünülmektedir. Fakat normalde primer aminler (N-H) için gözlenen bant asimetric ve simetric iki bant veren keskin pikler olarak gözlenmesine rağmen yapıdaki hidroksil varlığından dolayı bu bant yayvanlaşmıştır. Çapraz bağlı kitosan kriyojellerde ise primer aminler glutaraldehit ile reaksiyona girdiğinden dolayı bu pikteki yayvanlaşma artmıştır [45-54].

% 0,4; 0,6 ve 1,0 glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan kriyojellerde sırasıyla 1639 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} ve 1639 cm^{-1} de gözlenen spesifik bant C=N imin bandıdır. Bu bant, glutaraldehitin karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) ile kitosan zincirlerindeki amin ($-\text{NH}_2$) grubunun reaksiyona girdiği anlamına gelir ve bu spesifik bant ‘Schiff base’ formasyonu olarak bilinir [2]. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi aynı zamanda yapının çapraz bağlandığı anlamına da gelmektedir. Bu yakın aralıkta saf kitosan için kaydedilen 1644 cm^{-1} teki pik ise kitin formunda yapıda kalmış karbonil ($\text{C}=\text{O}$) grubu için olan bant olarak düşünülmektedir [45-54].

Polimer ana iskeletindeki temel piklerden olan sp^3 hibritleşmesi yapmış C-H gerilme titreşim bandı ise iki pik olarak sırasıyla (% 0,4; 0,6 ve 1,0’ lik glutaraldehit konsantrasyonu için) 2921 cm^{-1} ve 2873 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} ve 2874 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} ve 2874 cm^{-1} de kaydedilmiştir. Saf kitosanda ise bu pik tek baskın pik olarak 2859 cm^{-1} de kaydedilmiştir.

Saf kitosan ve çapraz bağlı kitosan kriyojellerde 1250 cm^{-1} civarında kaydedilen pik ise aminden kaynaklı C-N bağının gerilme piki olarak düşünülür.

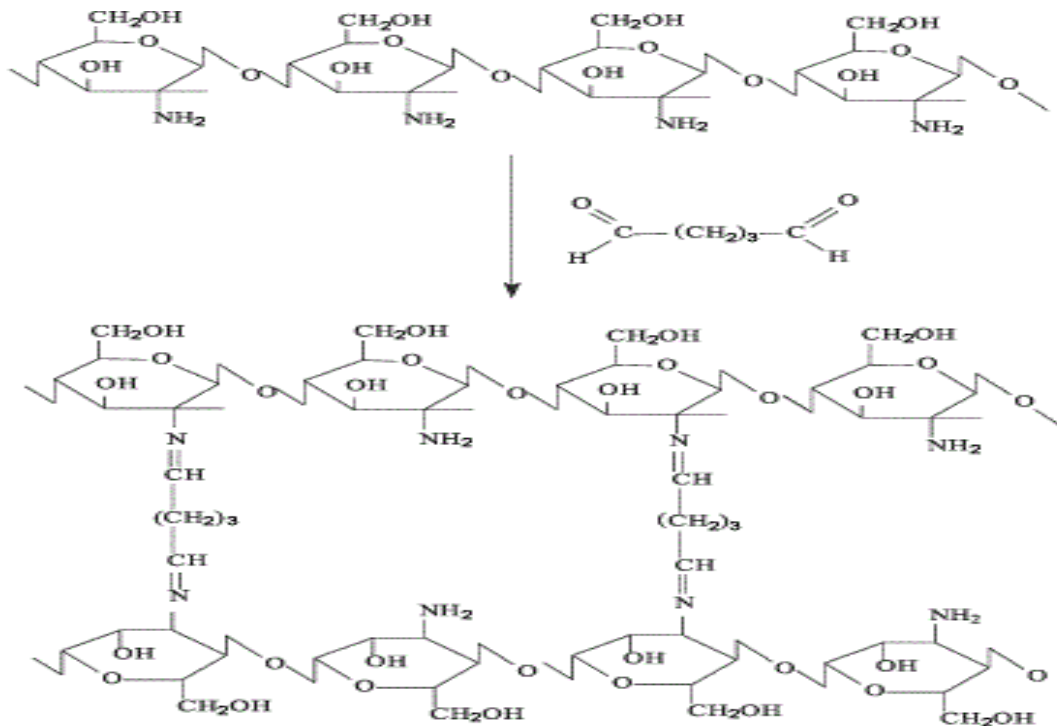
Spektrumlarda saf kitosanda 1417 cm^{-1} de kaydedilen değer çapraz bağlandığında 1405 cm^{-1} e kayma gözlenmiştir. Bu bantla beraber her birinde yaklaşık 1376 cm^{-1} gözlenen bantların sp^3 hibriti yapmış CH_2 gruplarının bükülme bantları

olarak kaydedilmiş ve bu bantlardaki şiddet artışı ise glutaraldehit eklenmesinden kaynaklı olarak CH_2 miktarının artmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

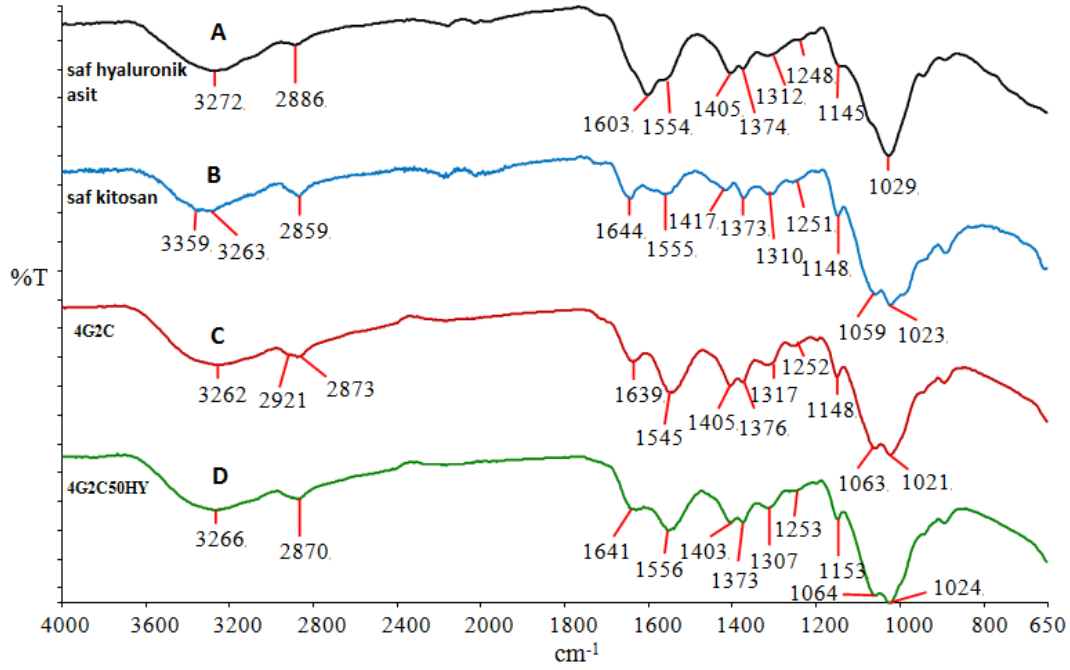
Saf kitosanda 1555 cm^{-1} de gözlenen pik yapının üzerindeki primer aminlerden kaynaklı N-H gruplarının bükülme titreşimini vermektedir. Fakat saf kitosana glutaraldehit eklenmesiyle sentezlenen kriyojellerde oluşan imin ($\text{C}=\text{N}$) yapısının rezonans yaparak etilen ($\text{C}=\text{C}$) yapısına geçmesinden kaynaklı çapraz bağlı kitosan kriyojellerde sırasıyla 1545 , 1543 ve 1547 cm^{-1} e kayma gözlenmiş ve şiddetinde de artma olmuştur [55, 56].

Spektrumlarda 1315 cm^{-1} civarında gözlenen pikler ise O-H gruplarının bükülme piklerini verir. Parmak izi (fingerprint) bölgesinde ise kitosan yapısı için spesifik olan eter bağı ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) 1150 cm^{-1} civarında ve yapıdaki primer alkollerden kaynaklı C-OH bağı ise yaklaşık 1070 cm^{-1} civarında gerilme bandı verir.

Bu FTIR sonuçları literatürde Oytron ve arkadaşlarının ayrıca Guogen ve arkadaşlarının daha önce çalıştıkları çalışmalar ile uyumluluk gösterir [56,57].



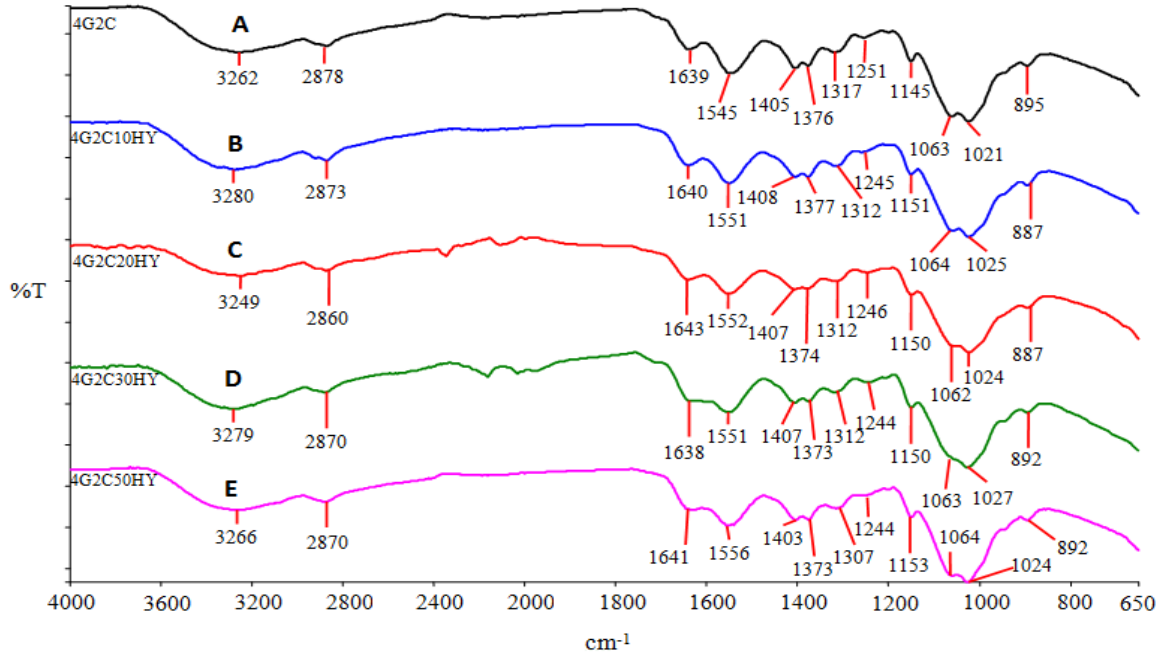
Şekil 4.3. Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanın gösterimi



Şekil 4.4. (A) çapraz bağlı olmayan saf hyaluronik asit (B) çapraz bağlı olmayan saf kitosan (C) 4G2C (D) 4G2C50HY FTIR spektrumu

Şekil 4.4 de hyaluronik asit, saf kitosan, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan kriyojeller ve hyaluronik asitle kopolimer yapılmış çapraz bağlayıcı olarak da glutaraldehit kullanılmış kitosan kriyojellerin FTIR spektrumları verilmiştir.

Saf hyaluronik asitte 3272 cm^{-1} 'de ve % 50' lik hyaluronik asit ile sentezlenen kitosan kopolimerinde ise 3266 cm^{-1} 'de hidroksil gruplarından ve moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklı yayvan bir pik kaydedilmiştir. Hyaluronik asitin yapısındaki karboksil gruplarından ($\text{C}=\text{O}$) kaynaklı gerilme bandı 1603 cm^{-1} 'de, amit yapısı kaynaklı N-H grubu bükülme bandı 1554 cm^{-1} 'de, polimer ana iskeletinde sp^3 hibriti yapmış C-H grubu kaynaklı gerilme bandı 2886 cm^{-1} 'de, ayrıca 1405 cm^{-1} 'de ve 1374 cm^{-1} civarında C-H grubu bükülme bantları verir. 1312 cm^{-1} 'de O-H grubu kaynaklı zayıf bükülme bandı ve 1248 cm^{-1} civarında ise amit yapısı kaynaklı C-N grubunun zayıf gerilme titreşim bandı kaydedilmiştir. Bunların yanı sıra $1150\text{-}1070 \text{ cm}^{-1}$ civarında spesifik bant olan eter köprüleri (C-O-C) ve $1070\text{-}1030$ civarında ise primer alkollerden (C-OH) kaynaklı bant kaydedilmiştir. Tomihata ve arkadaşları da hyaluronik asit polimeri için benzer sonuçları değerlendirmişlerdir [44].



Şekil 4.5. (A) 4G2C (B) 4G2C10HY (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY (E) 4G2C50HY FTIR spektrumu

Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin kullanıldığı hyaluronik asit-kitosan kopolimeri ile sentezlenen kriyojellerin FTIR spektrumlarında benzer yapılardan dolayı spesifik bir pik gözlemlenmemiş ve yeni bir pik meydana gelmemiştir (Şekil 4.5) [10].

4.2. Kriyojelin Termal Analizleri

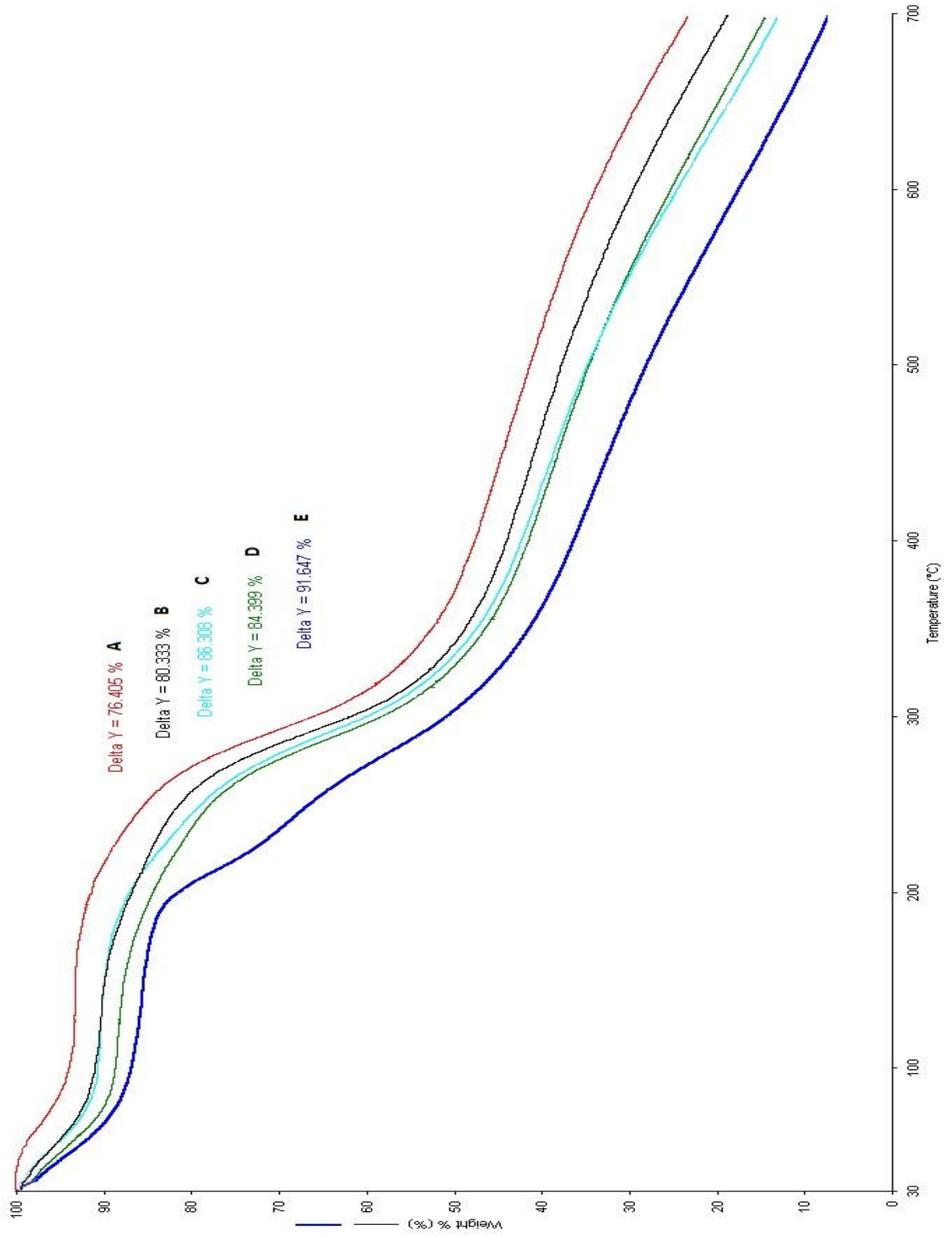
4.2.1. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

Sentezlenen kitosan kriyojellerin ve kopolimerlerinin termal kararlılıkları, termogravimetrik analiz yöntemiyle incelendi. Bu kriyojeller analiz öncesinde yaklaşık bir gün boyunca -76°C ' de liyofilize edildi ve daha sonra TGA analizleri yapıldı. Analiz 30°C ile 700°C aralığında $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla ve azot ortamında yapıldı.

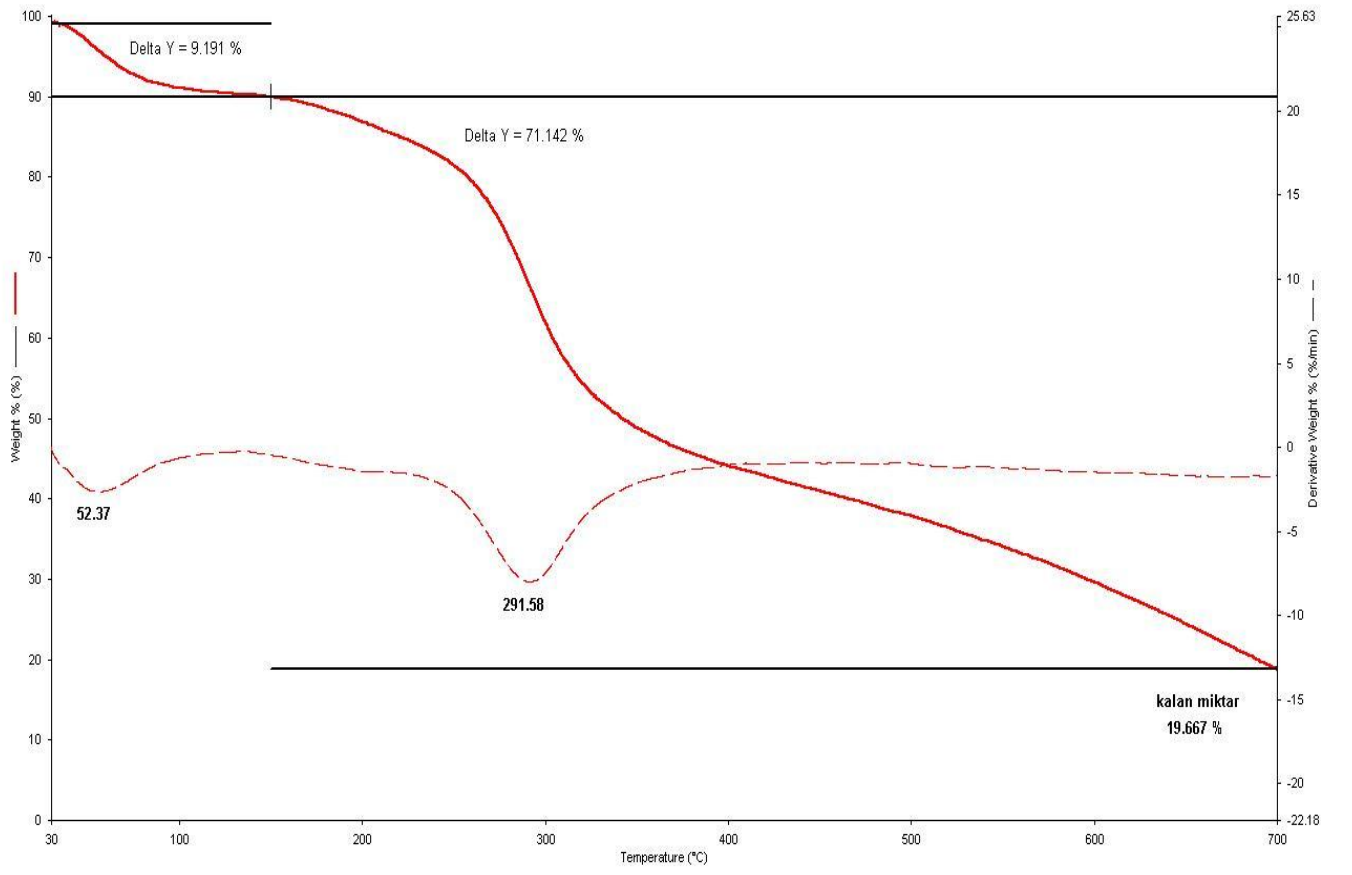
Analizler sonucunda ilk kütle kaybı yaklaşık %5 civarında ve $50-100^{\circ}\text{C}$ aralığında gözlemlenmiş ve bu sonucun nedeni jellere hapsolan suyun kaybı olarak düşünülmektedir. Bu da suyun jellere fiziksel olarak bağlandığı ve/veya kitosana zayıf hidrojen bağıyla bağlı olduğu anlamına gelebilir. Suyun daha kuvvetli hidrojen bağları ile bağlı olması durumunda yaklaşık $100-150^{\circ}\text{C}$ aralığında da bir kütle kaybı gözlenebilir [45, 47, 57, 58, 59]. Polisakkaritlerin genellikle suya yüksek oranda

ilgilileri vardır ve makromoleküllerindeki düzensiz yapıları nedeniyle çabuk hidrate olabilirler. Bu sebepten dolayı çapraz bağlı veya hyaluronik asit eklenmiş durumlarda suya ilgilerinin farklı olmasından dolayı değişik pozisyonlarda bozulma piki verirler. Kitosanın yapısı göz önünde bulundurulduğunda su molekülü hidroksil ve amin gibi iki polar grup tarafından bağ yapabilir.

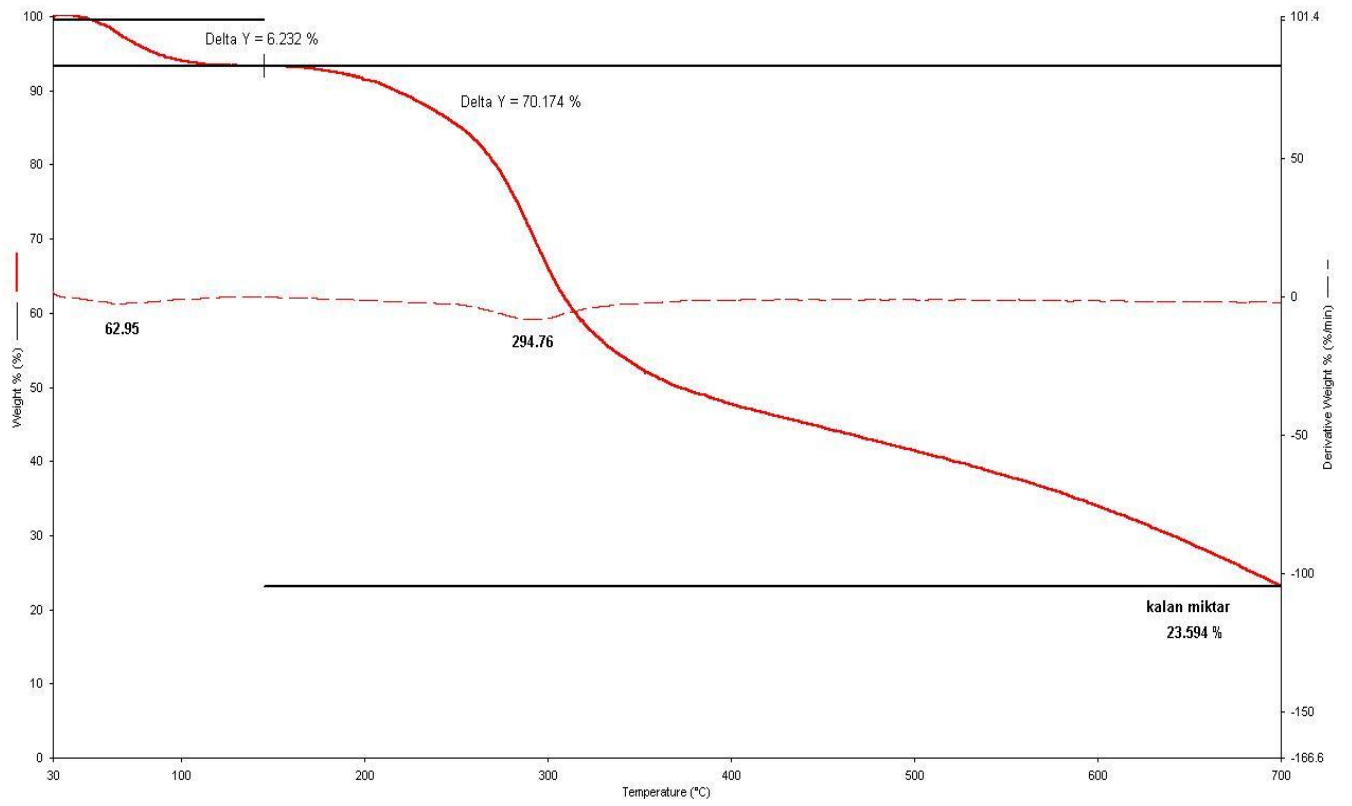
Kitosan ve kopolimerlerinde gözlenen termal degradasyonda ikinci ve ana kütle kaybı 200-300°C aralığında gerçekleşti. Bunun nedeni kitosan ve hyaluronik asit zincirlerinin depolimerizasyonu, piranoz halkasının dehidrasyon ve deaminasyon sonucu açılması olduğu düşünülmektedir.



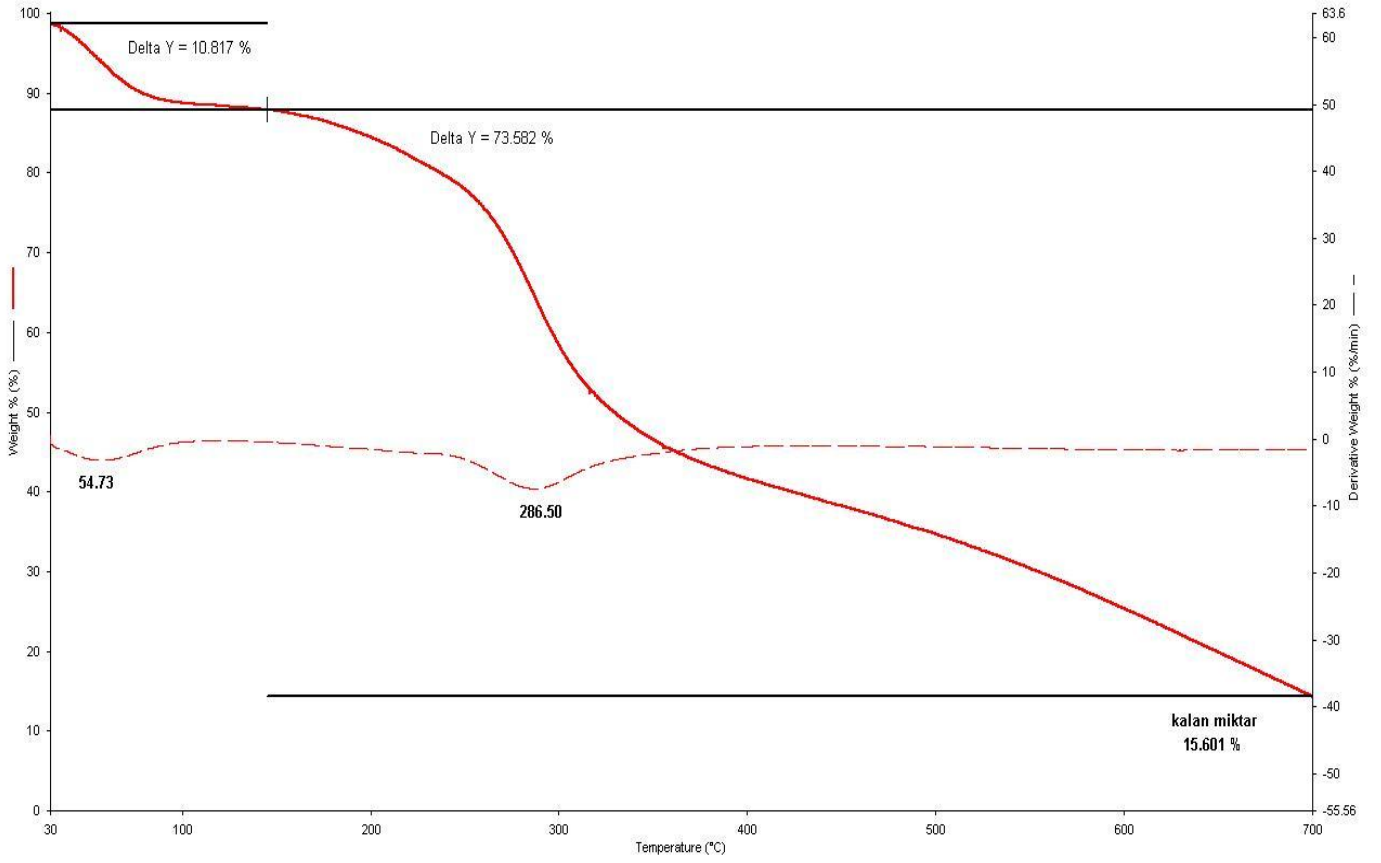
Şekil 4.6. (A) 4G2C10HY (B) 4G2C (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY (E) 4G2C50HY TGA eğrileri



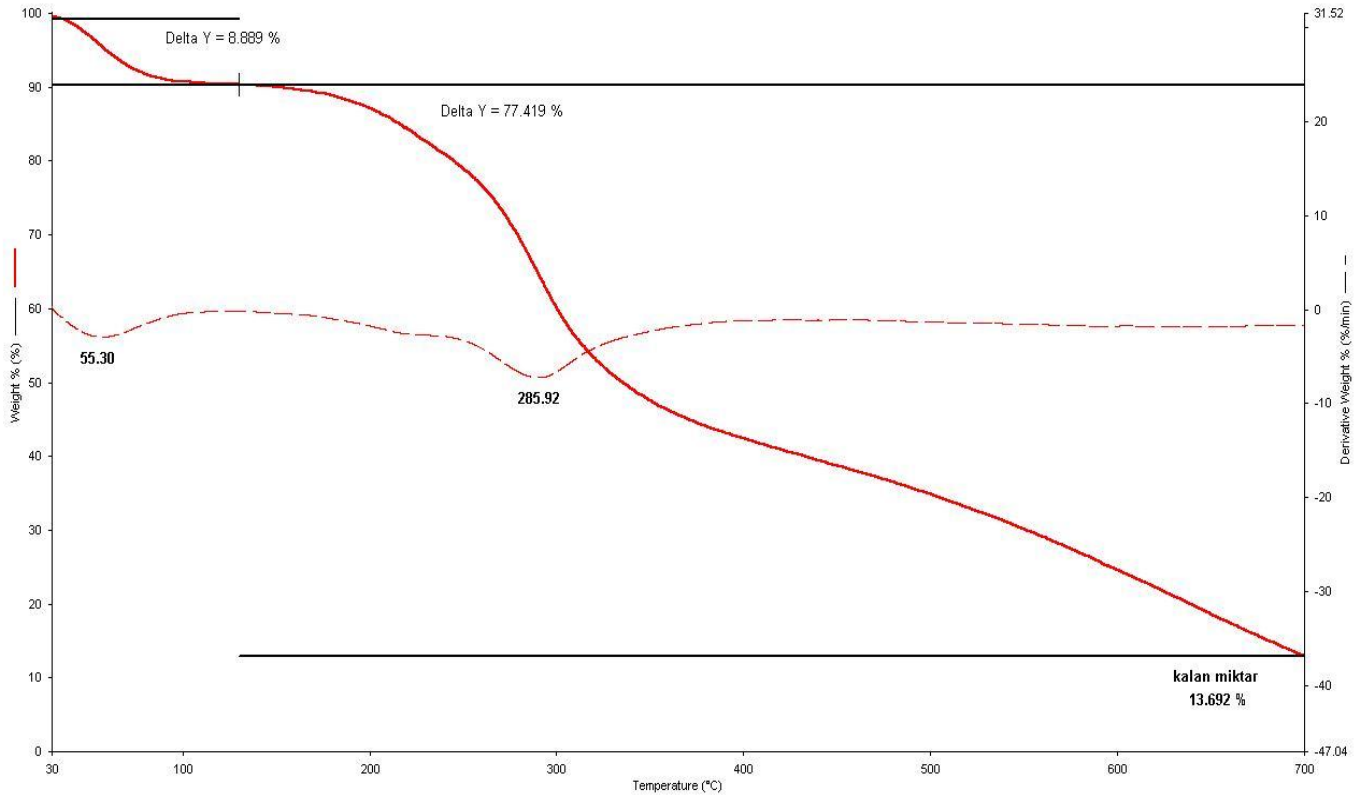
Şekil 4.7. 4G2C TGA ve DTG eğrisi



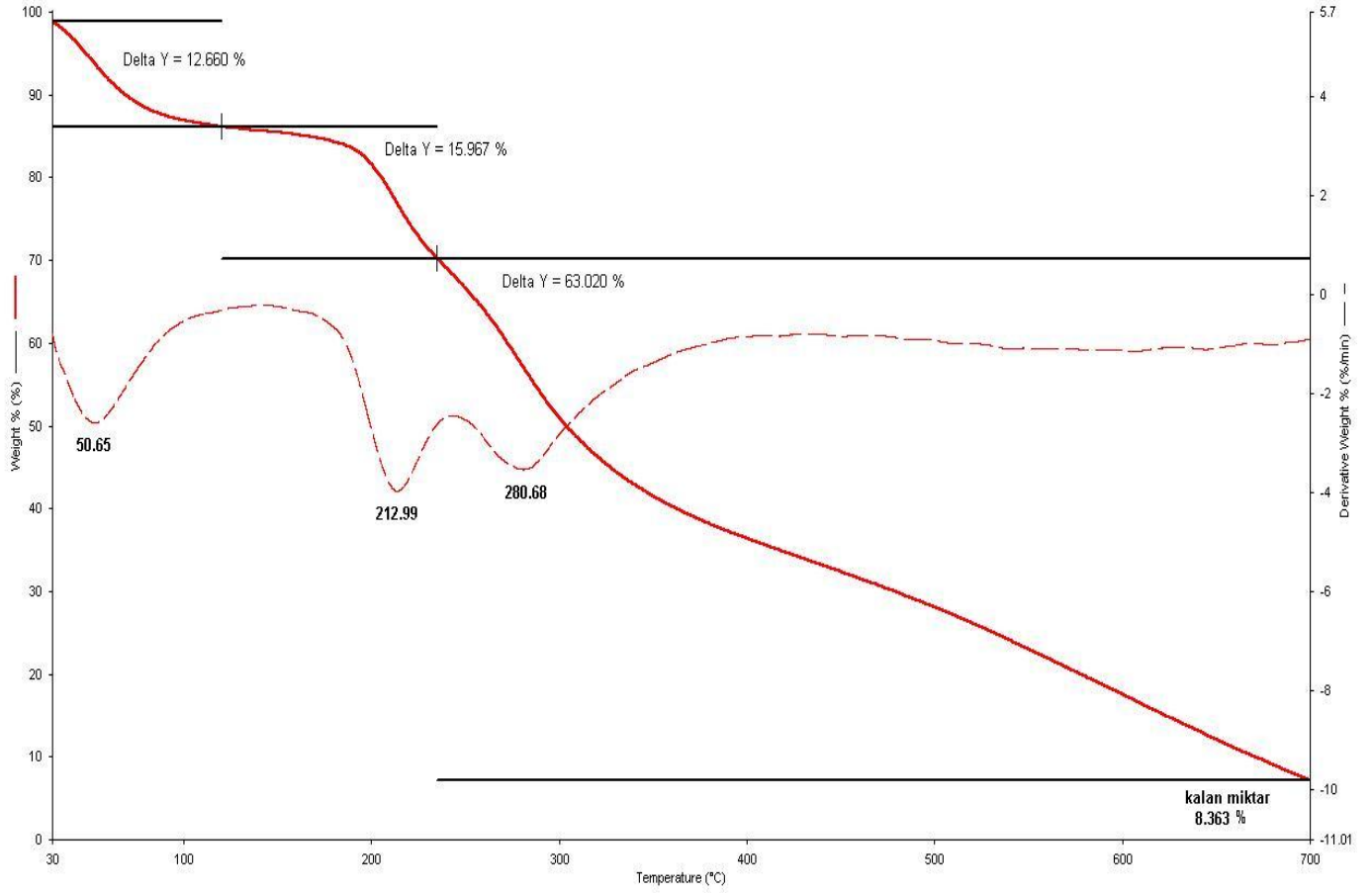
Şekil 4.8. 4G2C10HY TGA ve DTG eğrisi



Şekil 4.9. 4G2C20HY TGA ve DTG eğrisi



Şekil 4.10. 4G2C30HY TGA ve DTG eğrisi



Şekil 4.11. 4G2C50HY TGA ve DTG eğrisi

Tablo 4.1. Kitosan ve kopolimerlerinin ilk kısımdaki su kaybını, maksimum hangi derecede bozunduğunu ve kül miktarını gösteren tablo

İLK BOZUNMA (Su kaybı)			ANA BOZUNMA (max bozunma)		
Örnekler	T (°C)	Kayıp miktar (%)	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	Kül miktarı (%)
4G2C	52,37	9,191	291,58	-	19,67
4G2C10HY	62,95	6,232	294,76	-	23,60
4G2C20HY	54,73	10,817	286,50	-	15,60
4G2C30HY	55,30	8,889	285,92	-	13,69
4G2C50HY	50,65	12,660	212,99	280,68	8,36

Tabloda 4.1 deki sonuca göre % 4' lük glutaraldehit çapraz bağlayıcısının kullanıldığı kitosanın % 10' luk hyaluronik asit kopolimeri ile sentezlenen kriyojelin maksimum 294,76 °C' de bozunma gösterdiği kaydedilmiştir. Elde edilen sonuç ile %10

hyaluronik asit içeren kriyojel en yüksek termal kararlılığa sahiptir. Bu kompozisyonda hem glutaraldehit çapraz bağ yoğunluğu en yüksek hem de kitosan hyaluronik asit fiziksel etkileşimleri en yüksek durumda olduğu düşünülmektedir. Hyaluronik asit miktarı arttıkça termal stabilitesi azaldığı ve kül miktarının da azaldığı görülmektedir. %50 oranında hyaluronik asit kullanıldığında 212,99°C gibi bir sıcaklıkta bozunma başlamış ve ana bozunmanın iki basamakta gerçekleştiği görülmüştür. Bu yapı ise diğerleri ile karşılaştırıldığında termal dayanıklılığı en azdır. Hyaluronik asit arttıkça glutaraldehit ile çapraz bağlanma azalmaktadır. %4' lük çapraz bağlı kitosan ile içerisine %10 hyaluronik asit eklenmiş kopolimer karşılaştırıldığında hyaluronik asit eklenmiş yapı daha karardır. Bu durum hyaluronik asit eklenmiş yapıda çapraz bağlanmanın daha iyi bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesi olabilmektedir. Fakat artan hyaluronik asit konsantrasyonuyla hyaluronik asitin yapısı gereği yapıda esneklik artmış, çapraz bağ oranının düşmesinden dolayı ağ yapıdaki zincirlerin araları genişlemiş ve yapıdaki kararlılık da o oranda azalmıştır [9,47].

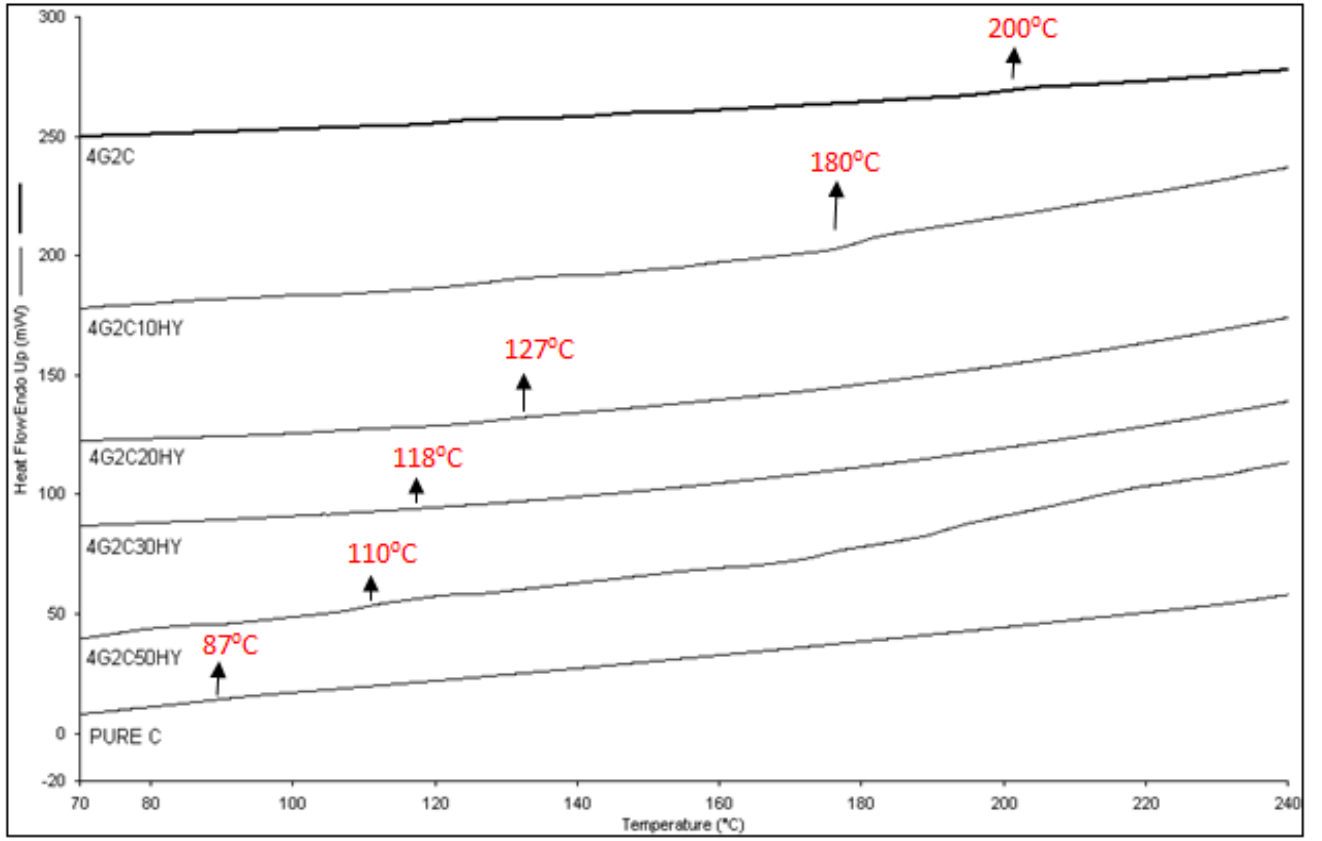
4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Sentezlenen kriyojellerin DSC analizi yapılırken öncelikle hidrojellerin su tutma özelliklerinden dolayı 0°C' den 100°C' ye 10°C/dk hızla bir ısıtma işlemi uygulandı. Hızlı bir şekilde 100°C/dk hızla soğutma yapıldı ve ardından soğutulan materyal 250°C' ye 10°C/dk hız ile ısıtma, bu sıcaklıkta 1 dk bekletme, ardından 100°C/dk hızla ani bir soğutma uygulandı. Son olarak 300°C' ye 10°C/dk hızla ısıtma yapıp 100°C/dk ile ani soğutma işlemi uygulandı. Yapıda kalan su miktarı plastifiyan etki yaparak Tg değerinin net gözlemlenmesine engel olabilmektedir.

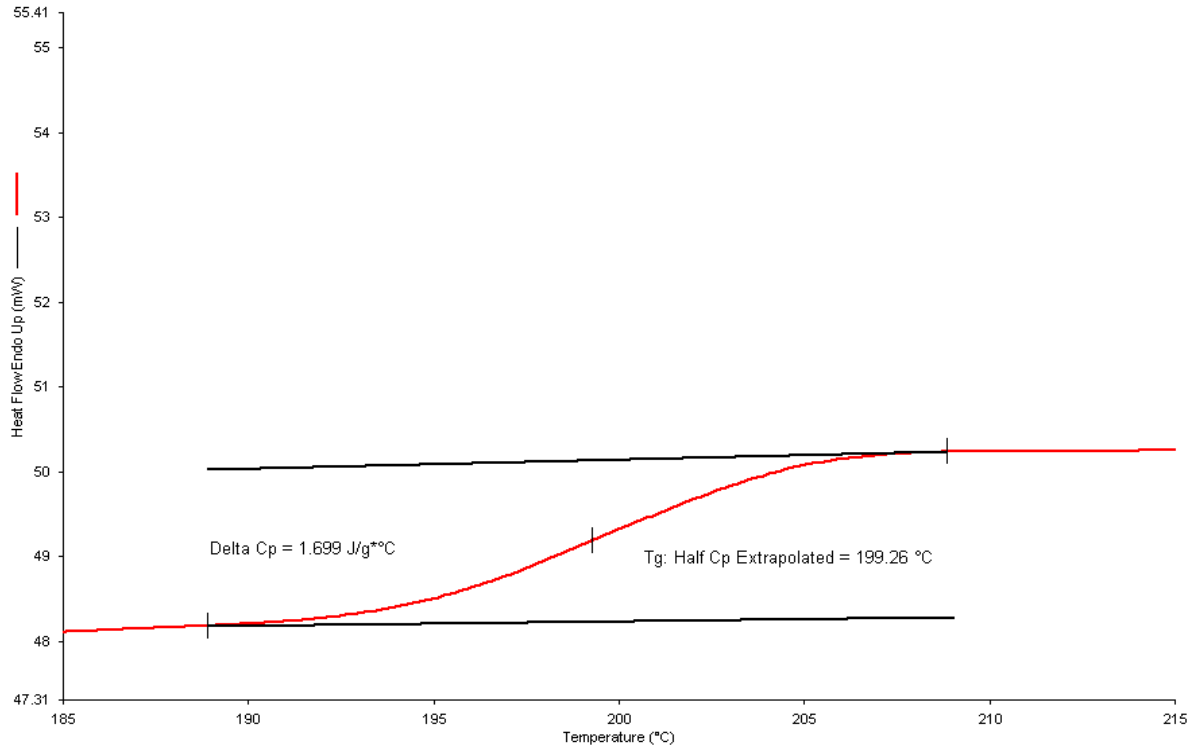
Literatür incelendiğinde kitosanın Tg değeri yapıdaki su miktarı ile veya kopolimer olarak eklenen yapıdan kaynaklı olarak değişkenlik göstermiştir. Sakurai ve arkadaşlarının yaptığı analiz sonucunda saf kitosanın Tg değeri ikinci ısıl döngüde ve 203°C olarak kaydedilmiştir [59]. Miyashita ve arkadaşları kitinin Tg değerinin 200°C' den yukarıda olacağını önermiştir [60]. Kim ve arkadaşları ise kitinin Tg değerinin 236°C civarı olduğunu önermiştir [61]. Kitosanın kitinden daha düşük bir Tg değerinde olduğu düşünülmektedir, çünkü kitosan amorf bölgelerde daha esnektir. Bununla beraber Tg değeri artan plastifiyan miktarıyla orantılı olarak düşer, bu demek oluyor ki eğer içerisinde su absobladıysa kitosanın Tg değerinde bir düşme gözlemlenecektir.

Farklı oranlarda yumuşatıcı bir madde eklendiğinde artan plastifiyan etkisiyle azalan bir Tg skalası gözlemlenmiştir. Ratto ve arkadaşları da kitosanın içerisindeki su varlığının Tg'ye etkisini araştırmıştır. Kitosanın içerisinde %8-30 arasında değişen su miktarına bağlı olarak Tg değerini 30°C olarak bulmuşlardır [62]. Lazaridou ve Biliaderis ise kitosan için Tg değerini su varlığında -23 ile 67°C' ye değişen oranlarda kaydetmişlerdir. Bu sonuçlar ile suyun plastifiyan etki yaptığı gösterilmiştir [63]. Kittur ve arkadaşları ise bir Tg değeri gözlemleyememiştir, bunun nedenini olarak da kitosanın yüksek sıcaklıkta bir Tg değeri vermesi olduğu düşünmüşler ve degradasyon sebebiyle de bu değer gözlemlenememesinden kaynaklandığını öne sürmüştür [64]. Perna Dhawade ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada kuru halde 118°C' de bir Tg değeri kaydetmişler, fakat su varlığında bu değer değiştiği ve 61°C olduğu gözlemlemişlerdir [45]. Bu çalışmada da suyun plastifiyan etki yaptığını kanıtlamışlardır. Netoa ve arkadaşları ise literatür doğrultusunda 100°C civarında bir değer olduğunu düşünmüşler ve gözlemleyemedikleri Tg değeri için ise suyun 100°C civarında buharlaşması sebebiyle Tg değerinin üzerini kapatmış olabileceğini öne sürmüştür. Kitosanın Tg'si doğal polimer olması, kristalite, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi gibi bazı özelliklerinden dolayı halen tartışma konusudur [58].

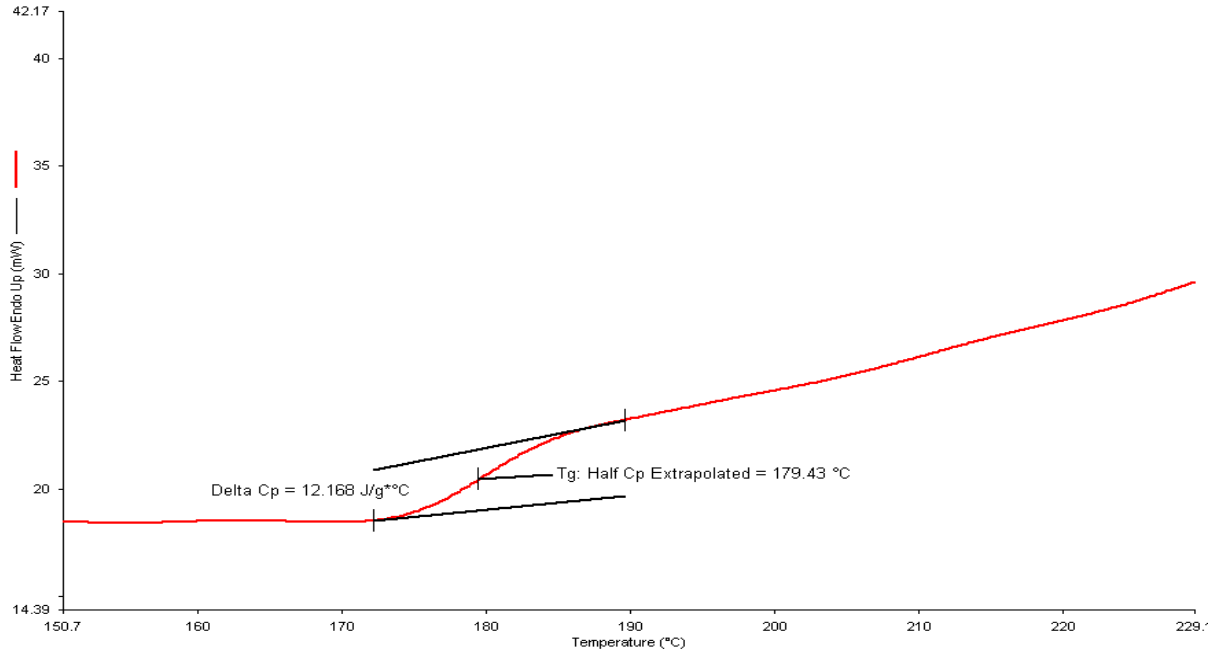
Bizim çalışmamızda ise kitosan polimerine farklı konsantrasyonlarda hyaluronik asit eklenmesi ve çapraz bağlayıcı kullanılması ile sentezlenen kriyojellerin Tg değeri değişimi gözlemlendi. Hyaluronik asitin yüksek oranda su tutması ve yumuşatıcı özelliği sebebiyle çapraz bağlı kitosan ile karşılaştırıldığında Tg değerinde bir düşüş olması beklenmiş ve yapılan DSC analizi doğrultusunda da sonuçlar buna uygun olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.12). Artan hyaluronik asit etkisiyle çapraz bağlı kitosan kriyojellerde azalan bir Tg diyagramı elde edilmiştir. Hyaluronik asit her ne kadar plastifiyan etkiye sahip olsa da çapraz bağlı yapıdan dolayı saf kitosana göre daha yüksek bir Tg değeri kaydedilmiştir. Literatürde araştırmasında da görüldüğü üzere saf kitosanın Tg değeri içerisinde absorplanmış su miktarından kaynaklı değişiklik gözlemlenebilmektedir. Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18 de ayrıntılı DSC termogramları da görülmektedir.



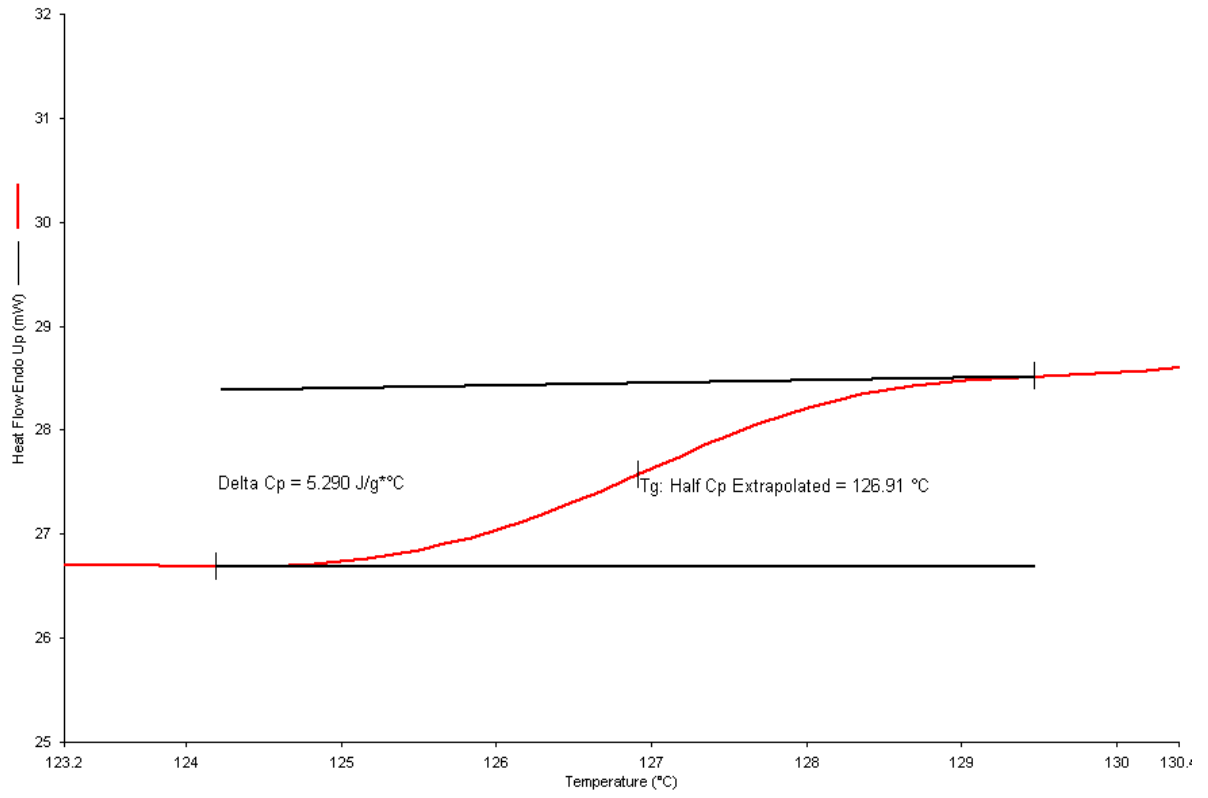
Şekil 4.12. (A) 4G2C (B) 4G2C10HY (C) 4G2C20HY (D) 4G2C30HY (E) 4G2C50HY (F) Saf kitosan Tg değerleri



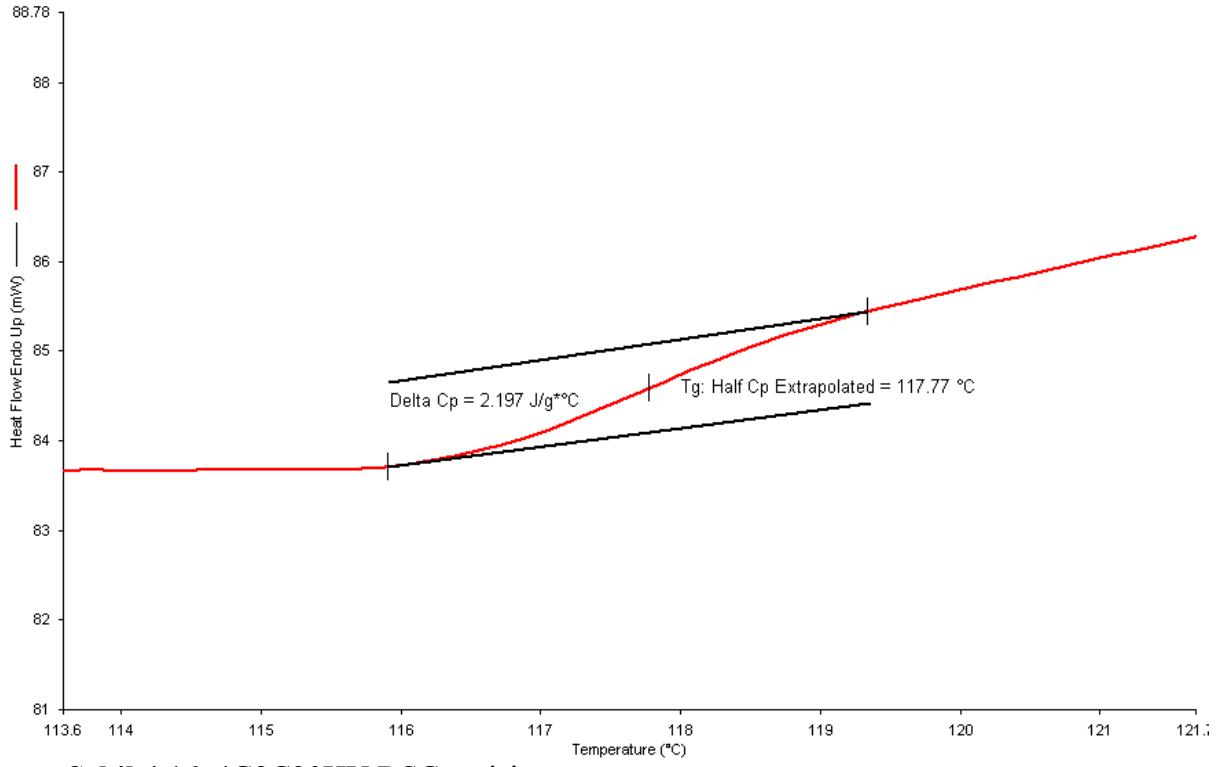
Şekil 4.13. 4G2C DSC eğrisi



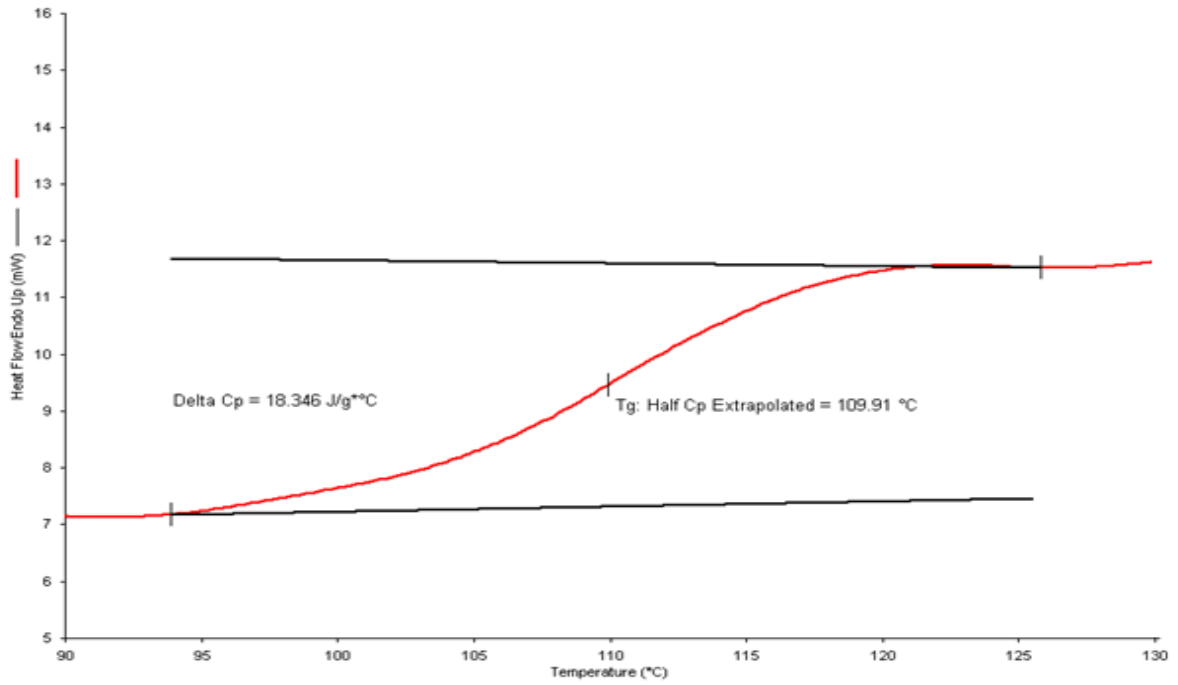
Şekil 4.14. 4G2C10HY DSC eğrisi



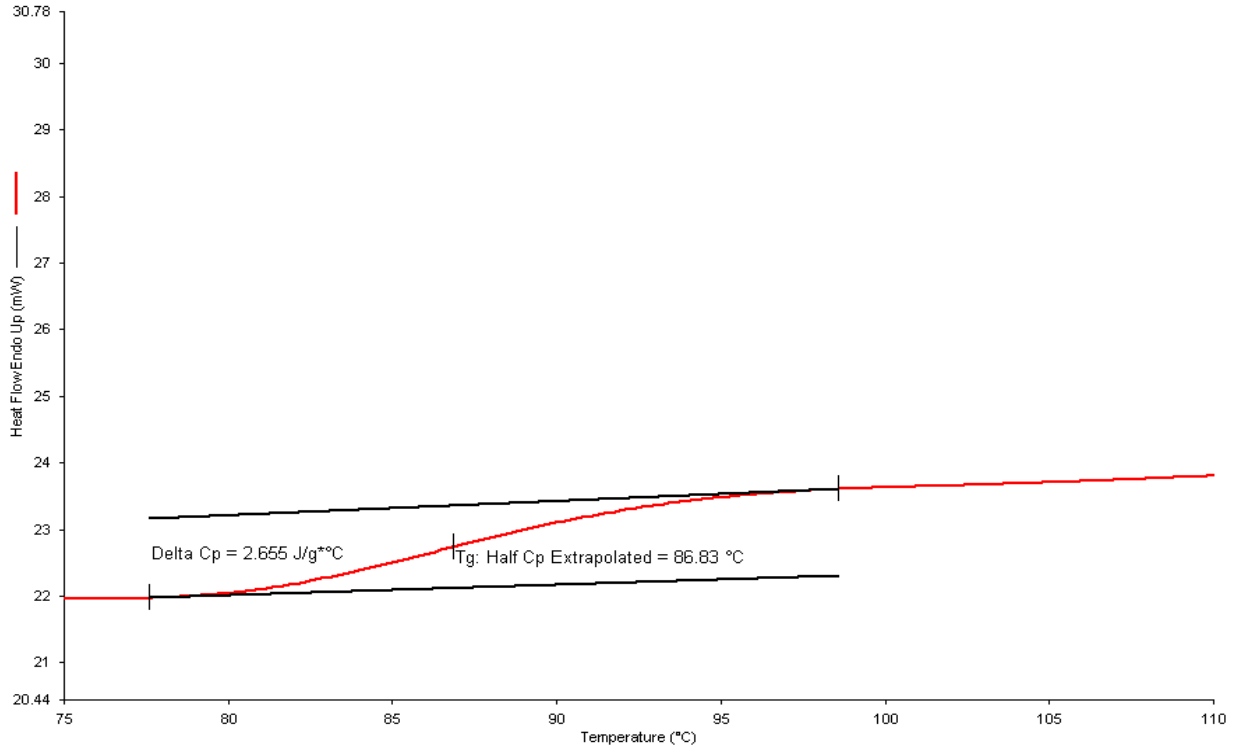
Şekil 4.15. 4G2C20HY DSC eğrisi



Şekil 4.16. 4G2C30HY DSC eğrisi



Şekil 4.17. 4G2C50HY DSC eğrisi



Şekil 4.18. Saf kitosanın DSC eğrisi

Tablo 4.2. Kitosan ve kopolimerleri olan kriyojellerin Tg değerleri

örnekler	Saf kitosan	4G2C	4G2C10HY	4G2C20HY	4G2C30HY	4G2C50HY
Tg (°C)	87	200	180	127	118	110

4.3. Kriyojellerin Şişme Davranışları

Hidrojellerin su içerisinde şişmeleri için gereken zaman uzundur. Bu yavaş şişme hızı hidrojellerin biyoteknolojik alanda kullanımlarını kısıtlamaktadır [11]. Bu durumun en büyük sebebi olarak yoğun polimer zincirlerinin içerisinde suyun yavaş bir şekilde difüzyonu olduğu görülmüştür. Biyoteknolojik alanda bazı uygulamalar için yavaş şişme özelliğine sahip hidrojellerin kullanımının avantaj sağlamasına karşın kuru hidrojellerin çok hızlı bir şekilde şişmesinin istendiği uygulama alanları da mevcuttur. Süper makro gözenekli yapıya sahip kriyojellerde şişmenin gerçekleşmesi saatler yerine dakikalar gibi kısa bir süre zarfında gerçekleşir. Hızlı şişebilme özelliği kriyojeller için önemli bir özelliktir. Özellikle doku mühendisliği alanında kullanılacak kriyojeller vücut içerisinde hücre yaşamına ve çoğalmasına olanak sağlayacak ortamı hızlı bir

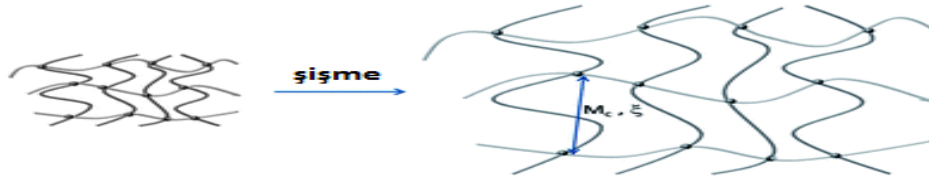
şekilde oluşturması gerekmektedir. Aksi takdirde biyomateryalin canlı ile biyoyumluluk özelliği azalmaktadır [28,30].

Çalışmamızda kitosan ve kitosanın hyaluronik asit kopolimerlerinden kriyojeller sentezlenmiştir. Sentezlenen kriyojeller yaklaşık bir gün boyunca -76°C ' de liyofilize edilmişler. Kurutulmuş kriyojellerden belirli boyutlarda kesit alınıp tartılarak her biri ayrı şişelere konulup üzerine daha önceden hazırlanmış olan PBS (pH: 7,4) çözelti eklenmiştir. Hazırlanan şişeler 37°C sabit sıcaklıkta olan inkübatöre yerleştirilmişlerdir. Daha sonra 15 dk aralıklarla tartımı alınıp farklı kompozisyonların şişme oranları karşılaştırılmıştır.

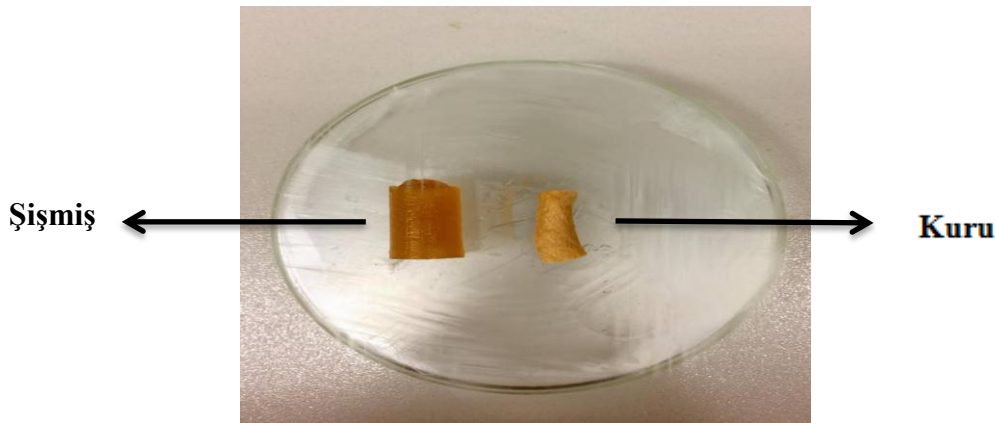
$$\text{Şişme Oranı (\%)}: [(W_{\text{ş}} - W_{\text{k}}) / W_{\text{k}} \times 100]$$

($W_{\text{ş}}$: şişmiş kriyojelin ağırlığı, W_{k} : kuru kriyojelin ağırlığı)

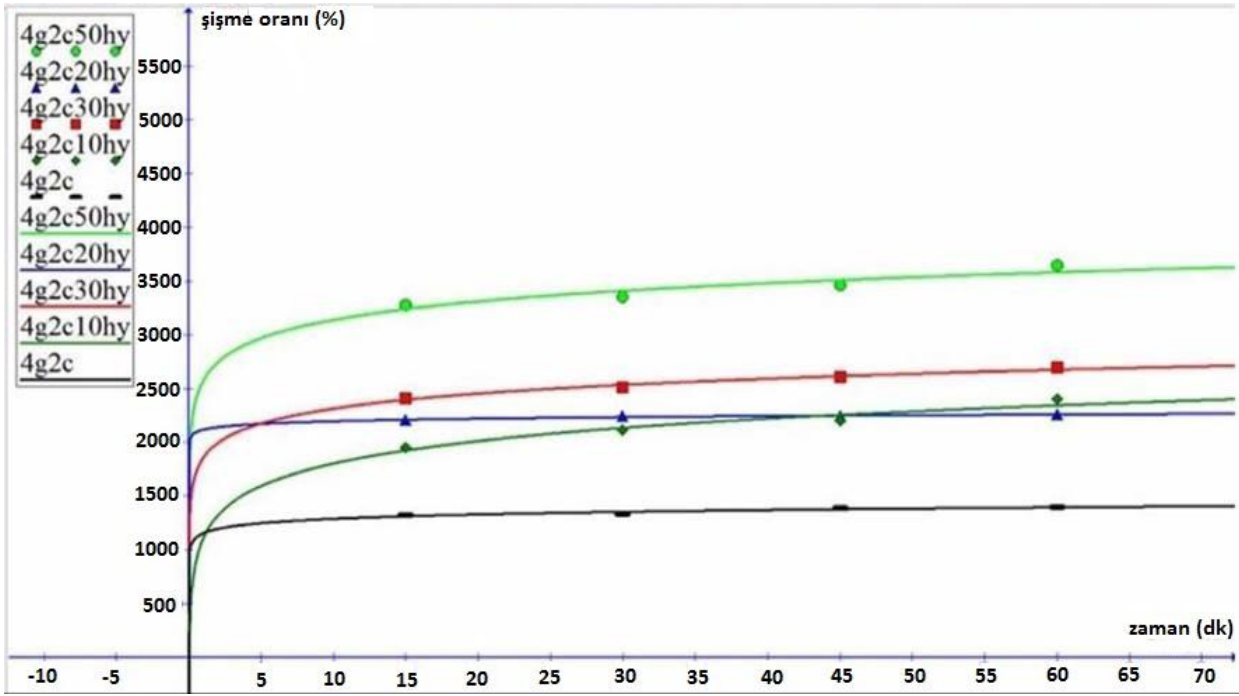
Yukarıda verilen eşitlik ile kriyojellerin şişme oranı hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. Çapraz bağlı yapıdaki polimerlerin şişme davranışının sembolik gösterimi



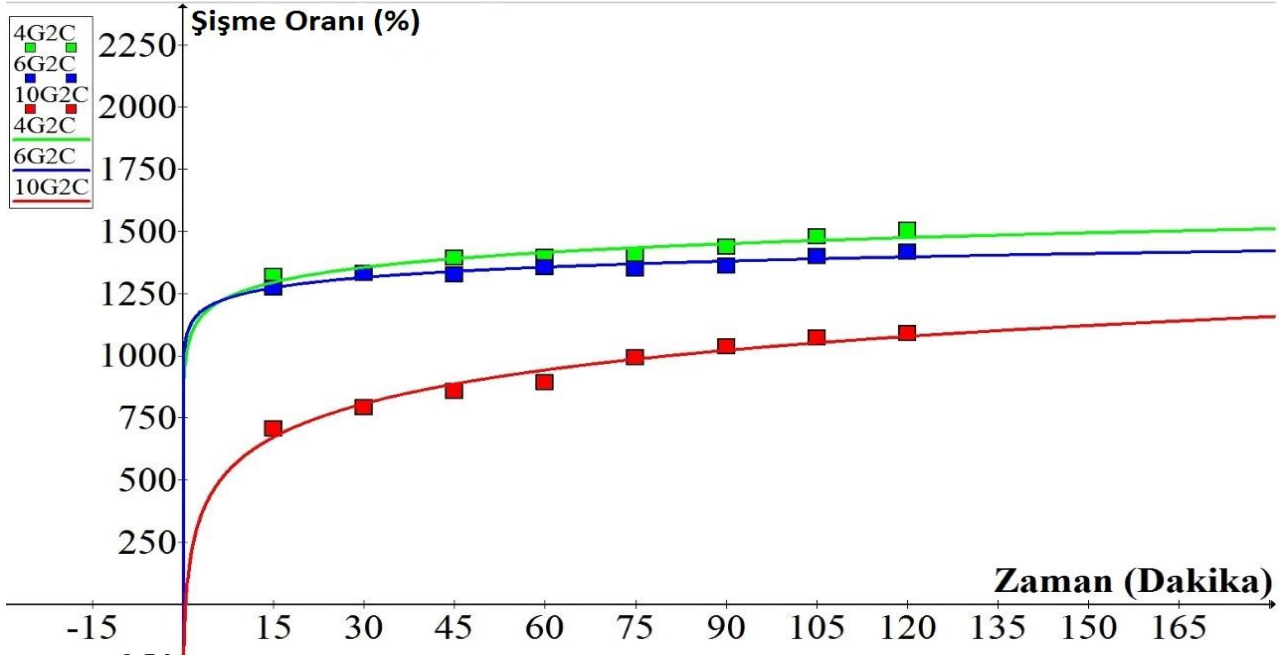
Şekil 4.20. Şişmiş ve kuru kriyojellerin görüntüleri



Şekil 4.21. Kitosan ve kitosanın hyaluronik asit kopolimeri ile sentezlenen kriyojellerin zamana karşı şişme grafiği

Sentezlenen kriyojellerde kitosan ve hyaluronik asit kopolimerlerinin sahip oldukları yapılardan ötürü yüksek miktarda su tutma kapasitelerine sahiptirler. Kitosan ve hyaluronik asitin yapısında amin ve hidroksil grupları bulunmaktadır ve bu gruplar yüksek kabiliyette hidrojen bağı yapma özelliğine sahiptirler. Bunun bir sonucu olarak da su tutma kabiliyetleri yüksektir. %0,4 glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan kriyojel kuru halde çözeltinin içerisine bırakıldığında kriyojellerin hızlı cevap verme özelliğinden ötürü saniyeler içerisinde şişme gerçekleşmiş ve yaklaşık 5 dakika içerisinde %1200 civarında şişme gerçekleşerek maksimum şişme derecesine ulaşır denge durumuna gelmiştir. Kitosan kriyojellere eklenen hyaluronik asit miktarıyla şişme oranında gözle görülür bir artma meydana gelmiştir. %10, %20 ve %30 oranlarında hyaluronik asit eklenmiş kriyojellerde şişme %1500 ile 2500 arasında iken %50 gibi yüksek miktarda hyaluronik asit eklenmesiyle % 3000 oranında şişme gözlemlenmiştir (Tablo 4.3). Bu sonucun nedeni olarak hyaluronik asit eklenmesiyle gözenek boyutlarının genişlemesi, gözenekli yapının esneklik kazanması ve hyaluronik asitin yüksek miktarda su tutabilme kapasitesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Yaklaşık ilk 10 dakika içerisinde tüm kriyojeller maksimum şişme derecesine ulaşmışlar, daha

sonraki süre zarfında şişme oranında önemli bir değişim gözlemlenmemiş ve denge değerine ulaşmışlardır [17].



Şekil 4.22. Farklı konsantrasyondaki çapraz bağlayıcı ile kitosan kriyojellerin zamana karşı şişme grafiği

Kriyojeller üzerindeki çapraz bağlayıcı konsantrasyonun etkisi Şekil 4.22 de verilmiştir. Yakın miktarlar olan %0,4 ile %0,6' lük glutaraldehit miktarı için şişme oranı yakın değerlerde kaydedilmiş fakat gözenekleri daralıp esnekliği azalan %1,0' lik konsantrasyonda şişme oranında azalma gözlenmiştir.

Tablo 4.3. Kriyojellerin denge durumunda şişme oranları

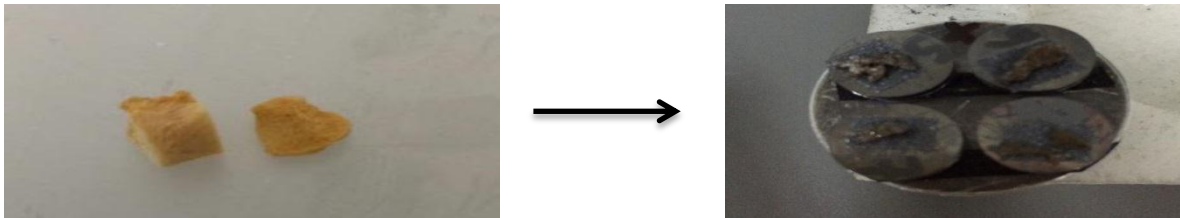
örnekler	4G2C	6G2C	10G2C	4G2C10HY	4G2C20HY	4G2C30HY	4G2C50HY
Denge şişme oranları (%)	1250	1200	850	1900	2000	2400	3450

4.4. Kriyojellerin Gözenek Yapıları

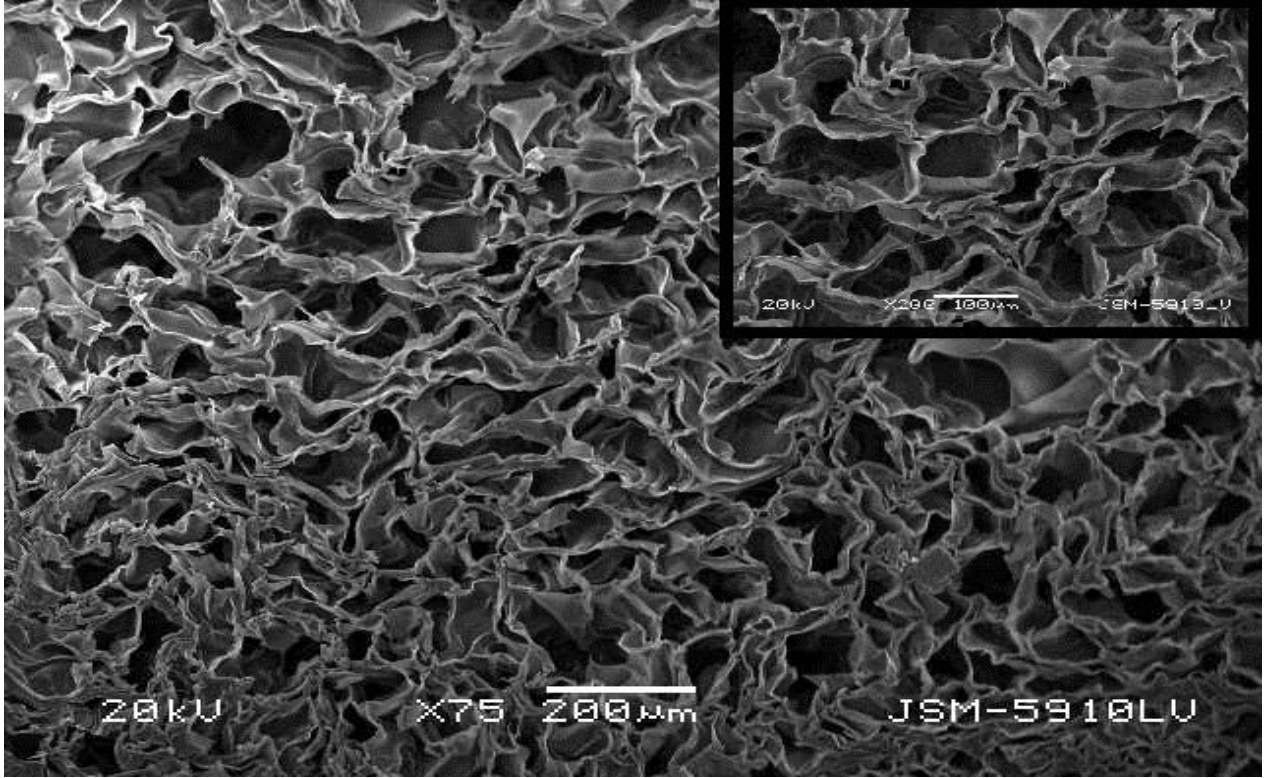
Doku mühendisliği alanında kullanılmak istenen üç boyutlu doku iskeleleri (scaffold), hücre büyümesine, çoğalmasına ve dolayısıyla da hasarlı dokunun onarılmasına ve yenilenmesine ortam sağlayan, birbiriyle bağlantılı ve yüksek gözenekli yapıda, kabul edilebilir gözenek boyutlarına sahip materyaller olması gerekmektedir [65]. İskeleler yüksek gözenekliliğe ve birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olmalıdırlar ki hücrelerin matrise girmesine ve yapı içerisindeki hücrelere yeterli miktarda besleyici maddenin difüzyonuna olanak sağlayabilsinler. Dahası birbirine bağlı gözenekli yapı, iskele içinde oluşan atıkların dışarı difüzyonuna olanak sağlamalıdır ve degrede olan iskele, organlarla etkileşime girmeden dışarı atılmalıdır. Gözenekler hücrelerin hareketine olanak tanıyacak kadar büyük olmalıdır [25].

Bu sebeple çalışmamızda, kriyojelasyon yöntemini kullanarak, süper makro gözeneklere ve birbiriyle bağlantılı gözenek yapısıyla yüksek gözenekliliğe sahip yapılar sentezlenmek istenmiştir [3]. Kriyojelasyon işlemi sırasında sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurulan çözücü gözenek yapıcı olarak rol almaktadır. Polimerizasyon işlemi tamamlanıp sistem oda sıcaklığına getirildiğinde yapıda birbiri ile bağlantılı gözeneklere sahip olan matriks elde edilmiş olur [66,67].

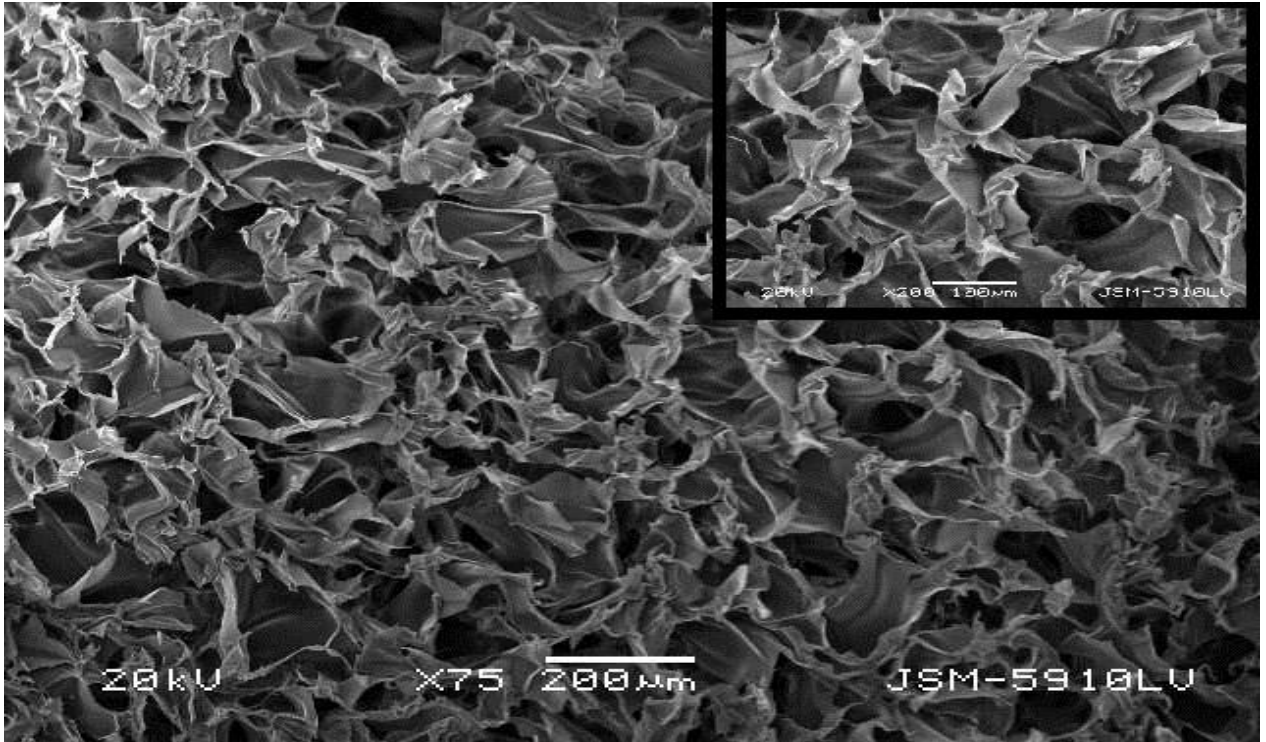
Sentezlediğimiz kitosan ve kitosan-hyaluronik asit kopolimer kriyojelleri SEM analiziyle gözenekliliği ve gözenek boyutları gibi morfolojik özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.24-4.30 da Sem mikrogramları görülmektedir. SEM analizi öncesinde tüm kriyojeller -76°C ' de liyofilize edilmiş ardından altın kaplama yapılarak 20 kV ile çalışılarak çeşitli büyütme oranlarındaki mikroskop görüntüleri incelenmiştir (Şekil 4.23).



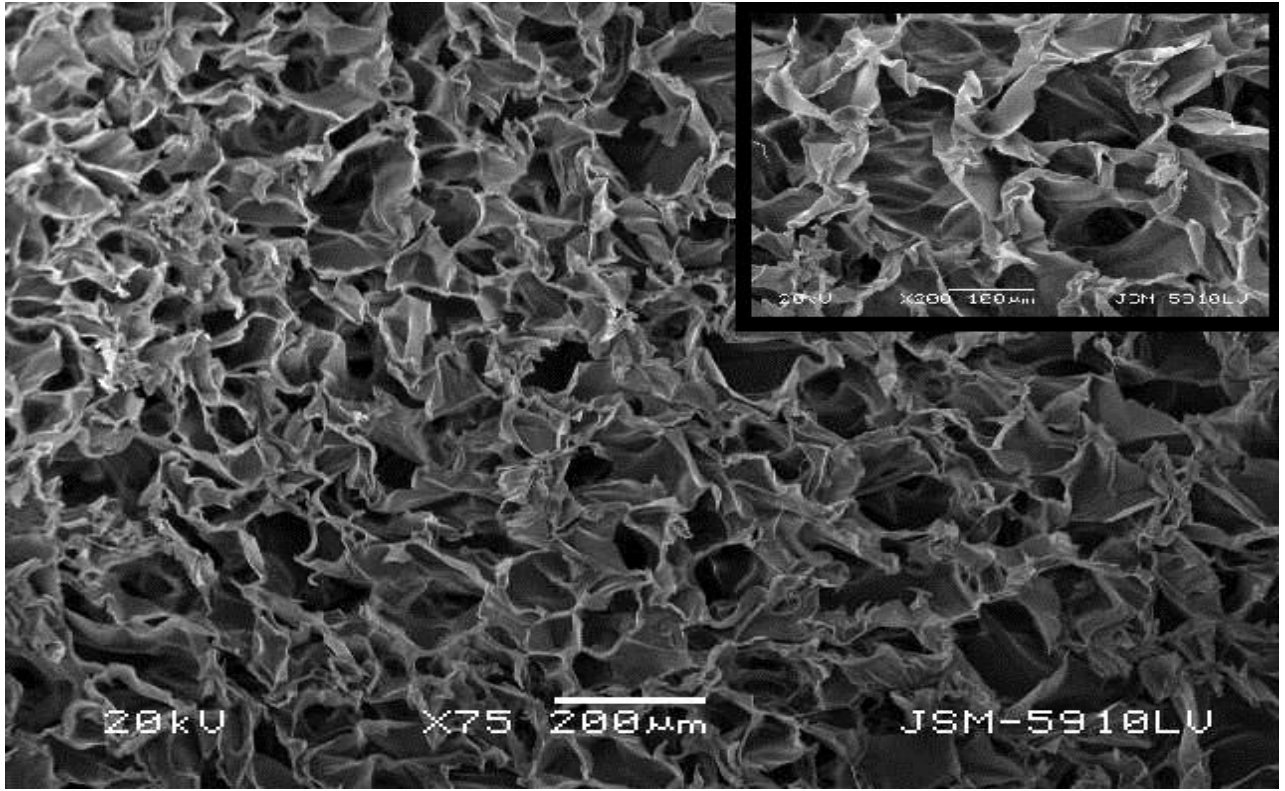
Şekil 4.23. Kriyojellerin altın kaplanma öncesi ve sonrası



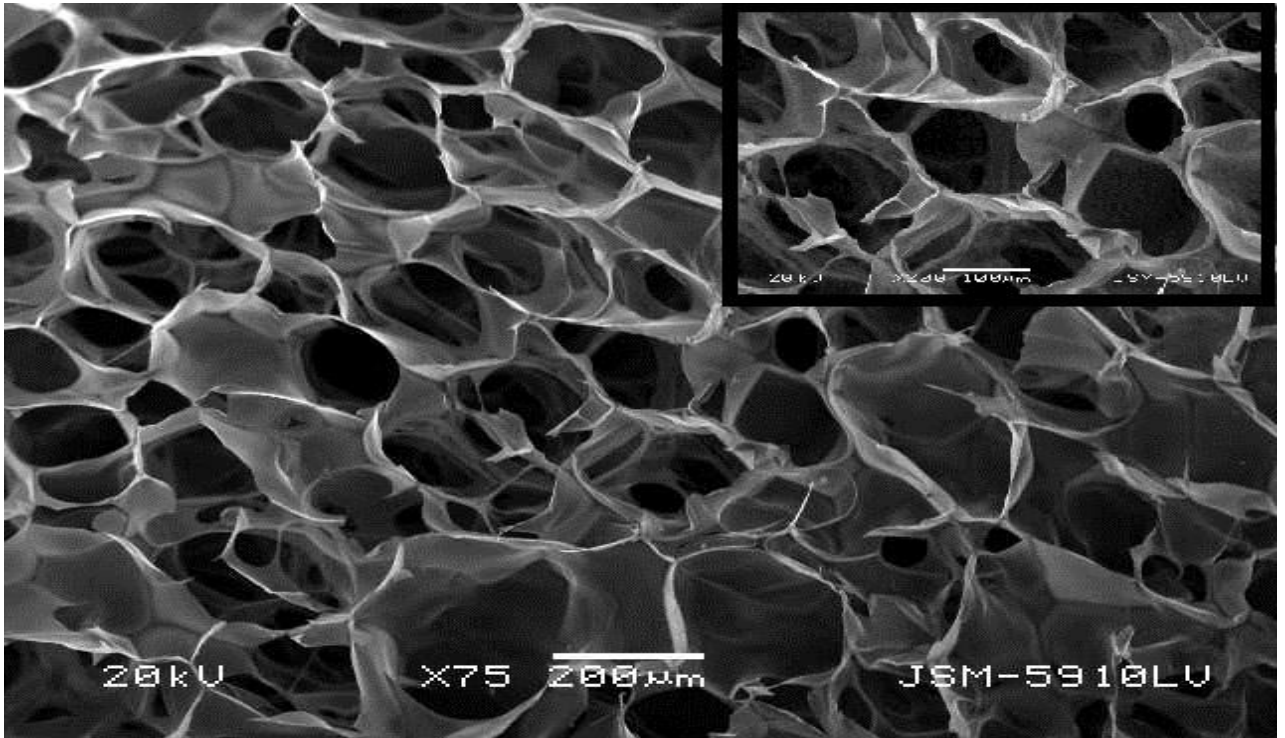
Şekil 4.24. 4G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



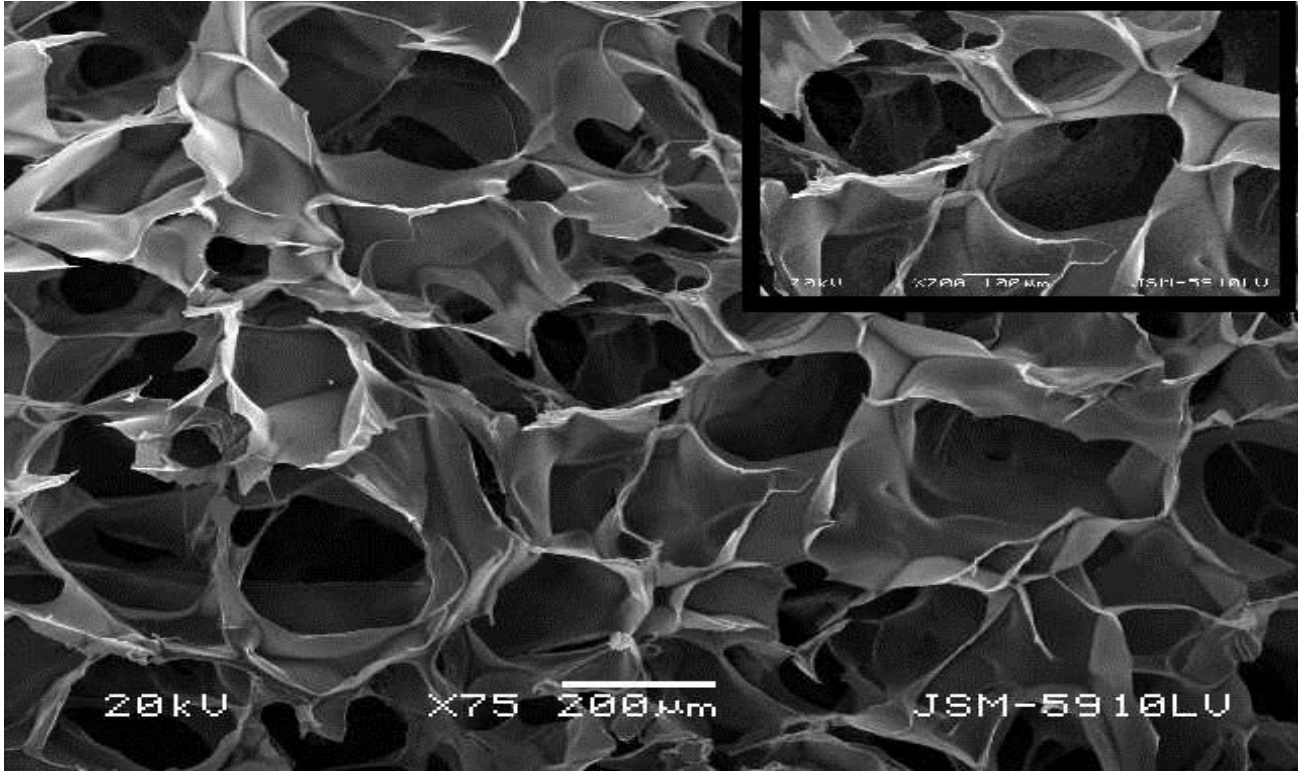
Şekil 4.25. 6G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



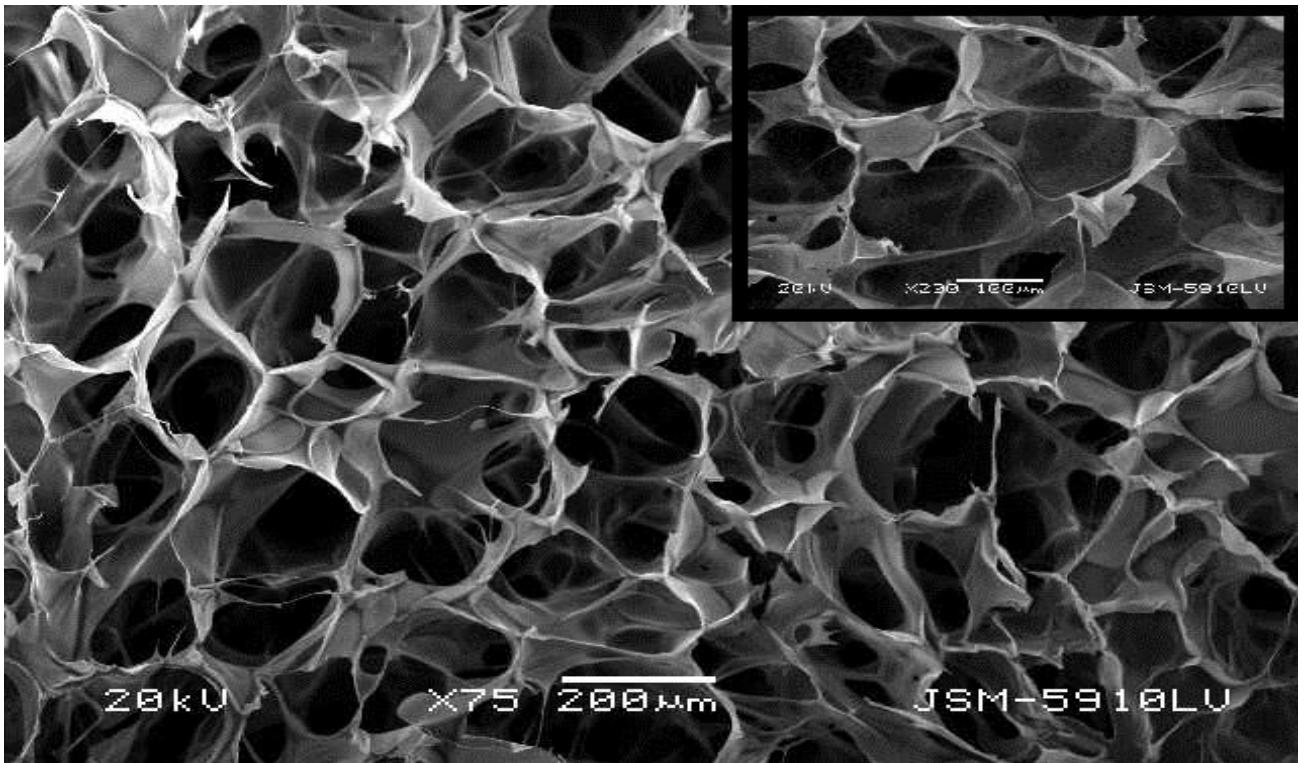
Şekil 4.26. 10G2C kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



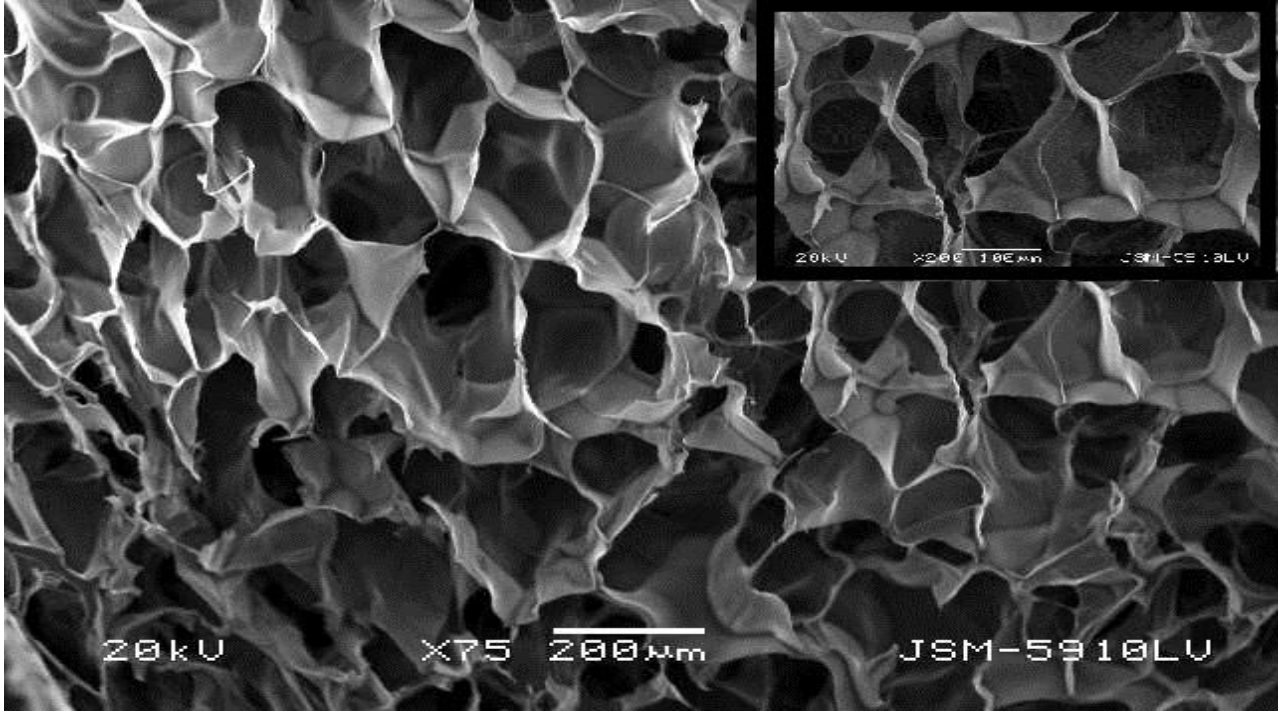
Şekil 4.27. 4G2C10HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



Şekil 4.28. 4G2C20HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



Şekil 4.29. 4G2C30HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)



Şekil 4.30. 4G2C50HY kodlu kriyojelin SEM görüntüsü (x75, x200 büyütme ile)

75 ve 200 büyütme oranlarında incelenen SEM görüntülerinden anlaşıldığı gibi sentezlenen tüm kriyojeller birbirleri ile bağlantılı ve yüksek gözenekliliğe sahiptir. 4G2C, 6G2C, 10G2C kodlu görüntüler kitosanın farklı çapraz bağ oranına ait yapıları göstermektedir. Kendi aralarında gözenek boyutları açısından gözle görülür bir fark olmasa da kitosanın hyaluronik asitle kopolimerinden sentezlenen kriyojellerde (4G2C10HY, 4G2C20HY, 4G2C30HY, 4G2C50HY kodlu görüntülerde olduğu gibi) gözenek çaplarının boyutları genişlemiştir. Şişme oranları karşılaştırıldığında da elde edilen sonuçlar gibi burada da hyaluronik asit eklenmesiyle yapıya esneklik kazandırılarak kırılğan olan yapıda iyileştirme yapılmış ve gözenek çaplarında da büyüme gözlenmiştir. Hyaluronik asit eklendiğinde uzun zincirler olmasıyla beraber gözenek duvarlarında da incelmeye olduğu düşünülmektedir. Martin Rodríguez-Vázquez ve arkadaşlarının hazırladıkları derlemede doku iskelesi için gözenek çapları en uygun 100-200 µm olarak kaydetmişlerdir [68]. Çapraz bağlı kitosan kriyojellerde gözenek çapları ortalama 90-150 µm arasında değişirken hyaluronik eklenmiş kopolimerlerinde bu gözenek çapı ortalama 150-200 µm aralığında kaydedilmiştir. Bu çaptaki kopolimerlerle doku mühendisliği için uygun gözenekler elde edilebilir. Literatürde kriyojellerdeki gözenek çaplarını $dnano < 0,1 \mu m$, $0,1 < dmikro < 100 \mu m$, ve $dmakro > 100 \mu m$ olarak sınıflandırmışlardır [11]. Bu sınıflandırmaya göre bizim sentezlediğimiz kriyojellerin gözeneklerinin ölçülen çapları makro gözenekli yapı sınıfına girmektedirler.

4.5. Kriyojellerin Gözenekliliği

SEM analizi ile gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülen kriyojellerin gözeneklilik yüzdesini bulmak için Arşimet prensibine dayanan etanol testi uygulanır.

Bu eşitlik;

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = \frac{(W_2 - W_3 - W_S) / \rho_e}{(W_1 - W_3) / \rho_e}$$

W_1 : etanol dolu şişenin ağırlığı

W_2 : içerisinde etanol ve kriyojel olan şişenin ağırlığı

W_3 : etanol ile doyurulmuş kriyojel alındıktan sonra etanolün ağırlığı

W_S : etanol ile doyurulmuş kriyojelin ağırlığı

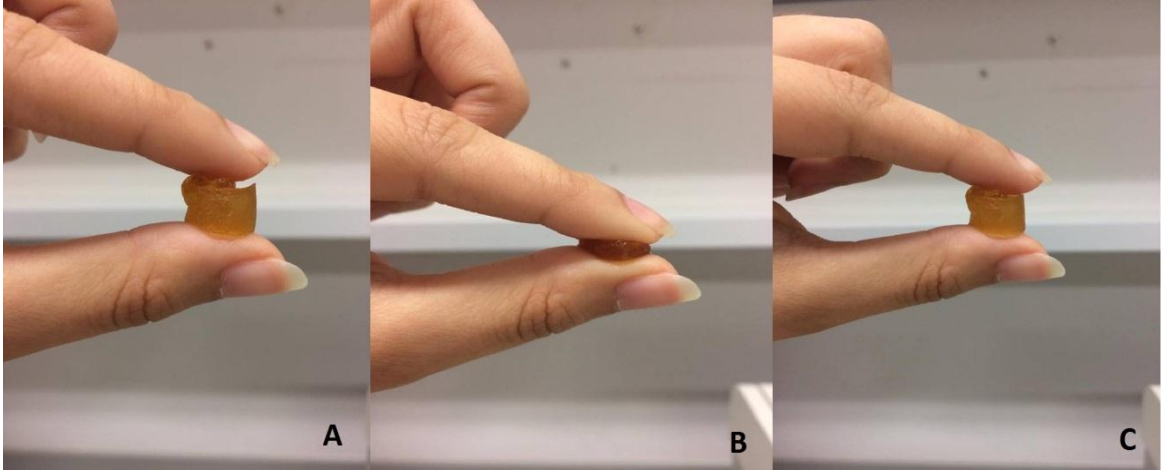
ρ_e : etanolün yoğunluğu (0,79 g/ cm³)

Bu eşitlik ile gözeneklilik yüzdeleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.4. Kriyojellerin gözenekliliği ve ortalama gözenek çapları

Kriyojellerin Kodu	Gözenekliliği (%)	Gözenek Çapı (µm)
4G2C	94	90-150
6G2C	95	90-150
10G2C	97	90-150
4G2C10HY	94	150-200
4G2C20HY	92	150-200
4G2C30HY	91	150-200
4G2C50HY	90	150-200

Tablo 4.4 de verilen gözenek özellikleri incelendiğinde çapraz bağ yoğunluğu çok olan yapılarda gözenek çapları daha dar ve gözenekliliğin yüksek olduğu görüldü. Hyaluronik asitin yapıya eklenmesiyle artan zincirler arası mesafe ile gözeneklilikte düşme gözlenip gözenek çaplarında ise büyüme gözlemlenmiştir. % 90 ve üzerinde bulunan gözeneklilik literatürde daha önce sentezlenen kriyojeller ile benzerlik göstermektedir [17]. Bu yüksek oran kriyojel özelliğine uygun olup doku mühendisliği alanında iskele kullanımı için uygun olduğu görülmüştür. Bununla beraber yapıların gözeneklilikleri arasındaki oluşan farklılıklar, çözücünün donmasıyla meydana gelen buz kristallerinin şeklinden ve boyutundan kaynaklanmaktadır. Bu da kriyojelasyon yönteminin dezavantajları arasında görülmektedir [3,23].



Şekil 4.31 (A) Su ile şişen kriyojeller **(B)** Baskı uygulandığında suyun bırakılması **(C)** Tekrar eski haline gelmesi

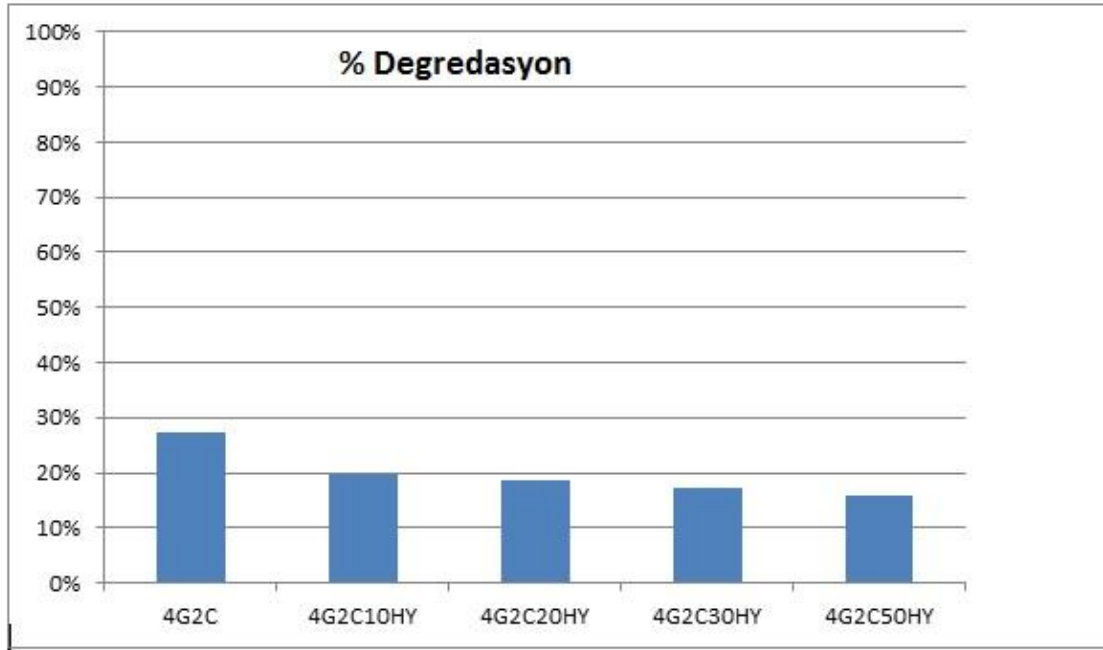
Gözenekli yapıya sahip ve su ile şişirilmiş kriyojel baskı uygulandığı zaman yapısındaki suyu bırakır. Elastik özellikte olan kriyojeller suyu vermesiyle eski formuna geri dönmektedir. Baskı ile suyun atılmasından sonra tekrar su dolu bir behere bırakılan kriyojel saniyeler içerisinde şişme göstermektedir. Bu durum da kriyojelasyon tekniğiyle elde edilen jellerin hızlı cevap verme özelliğinden kaynaklanmaktadır [27].

4.6. Kriyojellerin in Vitro Degredasyonu

Kriyojellerin degradasyonu, içerisinde PBS (pH 7,4) olan şişelerde ve 37°C' de izlenmiştir. Kriyojel örnekleri (13 mm çaplı 5 mm yükseklikte) liyofilizatörde sabit ağırlıkta olana kadar kurutulmuştur. 10 mL PBS ayrı ayrı her örnek için kaplara koyulmuştur. Kuru örneklerin tartımları kaydedilmiş ve kriyojeller PBS içeren kaplara koyularak inkübatöre yerleştirilmiştir. Belirli zaman periyotlarında örneklerin tartımı alınıp beklemeye bırakılmıştır.



Şekil 4.32. PBS içerisinde inkübatörde degradasyon için bekletilen kriyojeller



Şekil 4.33. Kriyojellerin yüzde degradasyon grafiği

Kriyojellerin yüzde bozunma grafikleri Şekil 4.33 deki gibi kaydedilmiştir. 45 gün boyunca haftada bir tartım yapılarak elde edilen değerler doğrultusunda yapılarında olan bozunmalar incelenmiş ve sonuçlar doğrultusunda en yüksek miktarda bozunmanın kitosan kriyojelde %28 olduğu görülmüştür. Kitosanın %10, %20, %30 ve %50 hyaluronik asit ile elde edilen kopolimerleri, kitosan kriyojel ile karşılaştırıldığında özellikle esnek yapıları ve mekanik kararlılıkları nedeniyle daha düşük bir bozunma gösterdiği görülmüştür (bozunmalar sırasıyla %20, %19, %17 ve 16,5 olarak verilmiştir). Kitosan kriyojelin mekanik kararsızlığı ve kırılgan yapısı nedeniyle daha yüksek oranda bozunması beklenen bir sonuçtur [17].

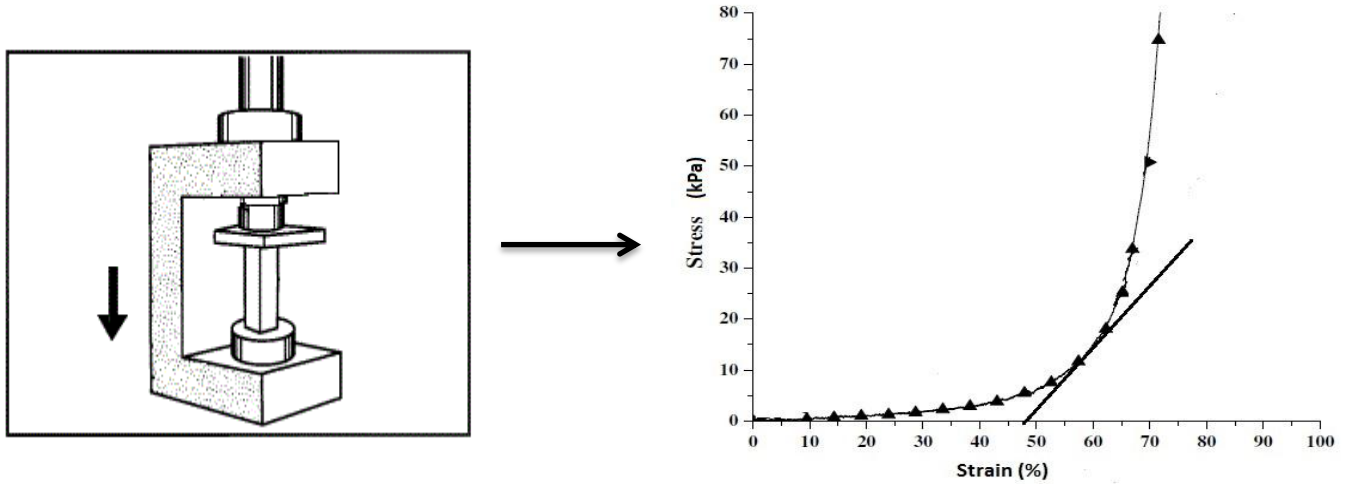
4.7. Kriyojellerin Mekanik Özellikleri

Doku mühendisliği alanında biyomateryal olarak kullanılan iskeleler, implant olarak kullanıldıklarında (in vivo veya in vitro ortamda) doku özelliğine göre belirli gerilimlere maruz kalırlar. Bu da iskele olarak kullanılmış bir biyomalzemenin mekanik özelliklerinin, planlanan dokudaki hücrelerin biyolojik işleyişleri ve fonksiyonlarıyla uyumlu olması gerektiği anlamına gelmektedir.

Hazırlanan kriyojellerin mekanik dayanımları basma testi ile incelenmiştir. Basma testi Zwick Roell marka cihaz ile yapılmıştır. Bu test için için şişmiş yapıdaki kriyojellerden 13 mm çapta ve 10 mm yükseklikte kesitler alınmıştır. 0,1N' luk bir ön yükte 1 mm/dk sabit hızla kuvvet uygulanıp kriyojellerin gerilim-gerinim (stress/strain)

eğrileri elde edilmiştir. Eğrilerin eğimi kullanılarak kriyojellerin elastik modülleri hesaplanır.

Gerilim (stress); kuvvetin (F) orijinal kesit alanına (A) bölünmesiyle ifade edilir. Gerinim (strain); ise kuvvet uygulaması esnasında oluşan boy değişiminin, kuvvet uygulamadan önceki ilk boyuna bölünmesiyle (dL/L) elde edilir.



Şekil 4.34. (A) Basma Testi Şeması (B) Gerilim-Gerinim eğrisinin grafik gösterimi
(kitosan-hyaluronik asit kriyojellere ait genel bir grafik)

$$\text{Gerilim (kPa)} = \text{Kuvvet (F)} / \text{Alan (A)}$$

F: Kuvvet (N)

A: Birim Alan (mm^2)

$$\text{Gerinim (\%)} = dL/L$$

dL: Kuvvet uygulaması esnasında oluşan boy değişimi

L: Kuvvet uygulanmadan önce olan boyu

$$\text{Elastik Modül (N/mm}^2\text{)} = \text{Gerilim/Gerinim} = \frac{F/A}{dL/L}$$

Eşitlikleri ile elastik modülleri hesaplanmıştır.

Aşağıdaki tabloda örneklerin elastik modülleri verilmiştir.

Tablo 4.5. Kitosan ve kopolimerlerinden elde edilen kriyojellerin elastik modülleri

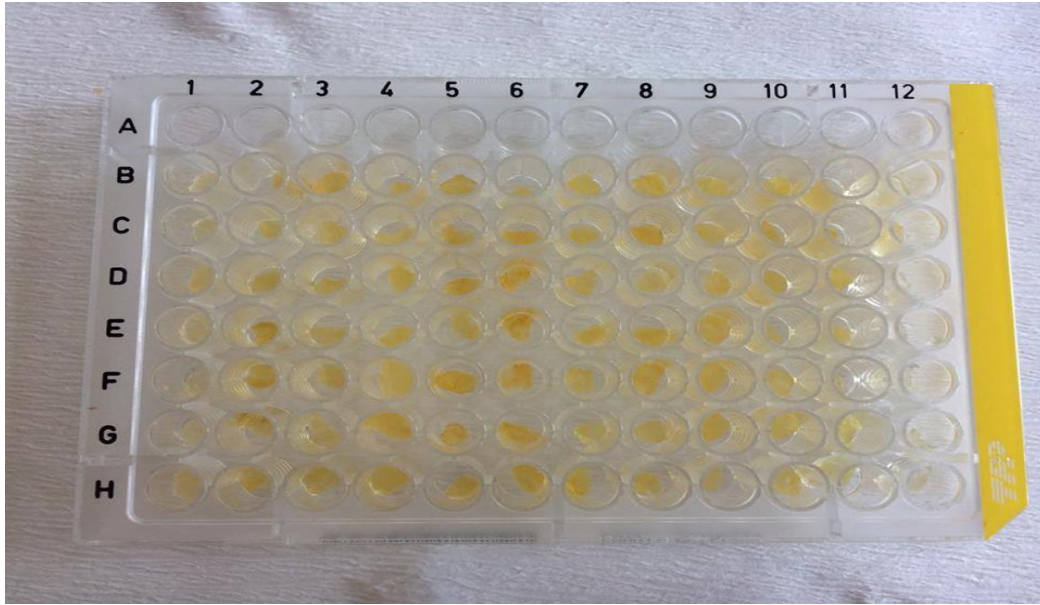
ÖRNEKLER	ELASTİK MODÜL (E; kPa)
4G2C	90
4G2C10HY	32
4G2C20HY	34
4G2C30HY	37
4G2C50HY	40

Kitosan kriyojel %15 civarında bir deformasyon göstermiştir. Bu değer stress-strain grafiğinin eğiminden elde edilmiştir. Bu onun kırılğan yapısından kaynaklı bir durumdur. Kitosan kriyojel için elastik modül 90 kPa olarak bulunmuştur. Daha yüksek çapraz bağ oranı kitosan kriyojelin elastik modülünün yüksek olmasının nedeni olarak düşünülmektedir. Kopolimerlerin elastik modülleri ise 30 ile 40 kPa arasında elde edilmiştir. Bu sonuçlar kitosanın kopolimerlerinin, kitosana göre esnek bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Büyük gözenek yapısı, daha düşük Tg değeri, yüksek şişme oranı ile elde edilen elastik modüller uyumludur. Yüzde deformasyonlarına bakıldığında ise kopolimerlerin yaklaşık % 60-70' e kadar orijinal şekillerini koruduğu gözlenmiştir.

4.8. Hücre Çalışmaları

4.8.1. Hücre Ekimi Sonrası SEM Görüntüleri

Hazırlanan kitosan ve hyaluronik asit kopolimer kriyojel doku iskeleleri hücre çoğalması ve gelişmesi için kullanılmıştır. SEM analizi ile hücrelerin ekim sonrasında 72 saat sonraki görüntüleri alınmıştır. Kullanılan 3T3 fare fibroblast hücresi ile SAOS-2 kemik kanseri (osteosarkom) hücreleri incelenmiş. Hücre ekimi bir takım işlemleri takip etmektedir. Bunlar; 96 kuyucuklu küçük plakalara kriyojel materyallerin koyulmasıyla, iskele materyalinin etanol ile yıkanıp sterilize edilmesi ardından UV' de bir gece sterilizasyon için bırakılması ve DMEM besi ortamında çoğaltılan hücrelerin ekilmesini takip eder. Ekilen hücreler 37°C' de ve %5 CO₂' li etüvde 10 gün inkübe edilmişlerdir.

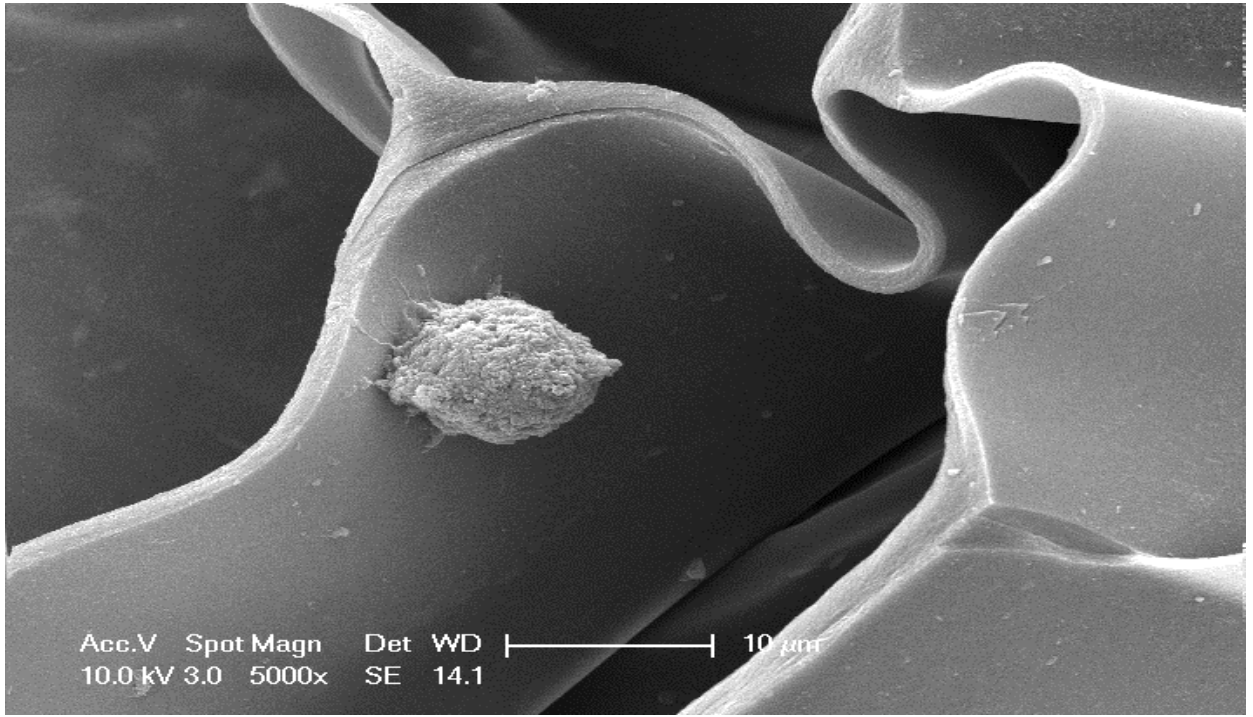


Şekil 4.35. Kuyulara iskele materyalinin yerleştirilmiş hali

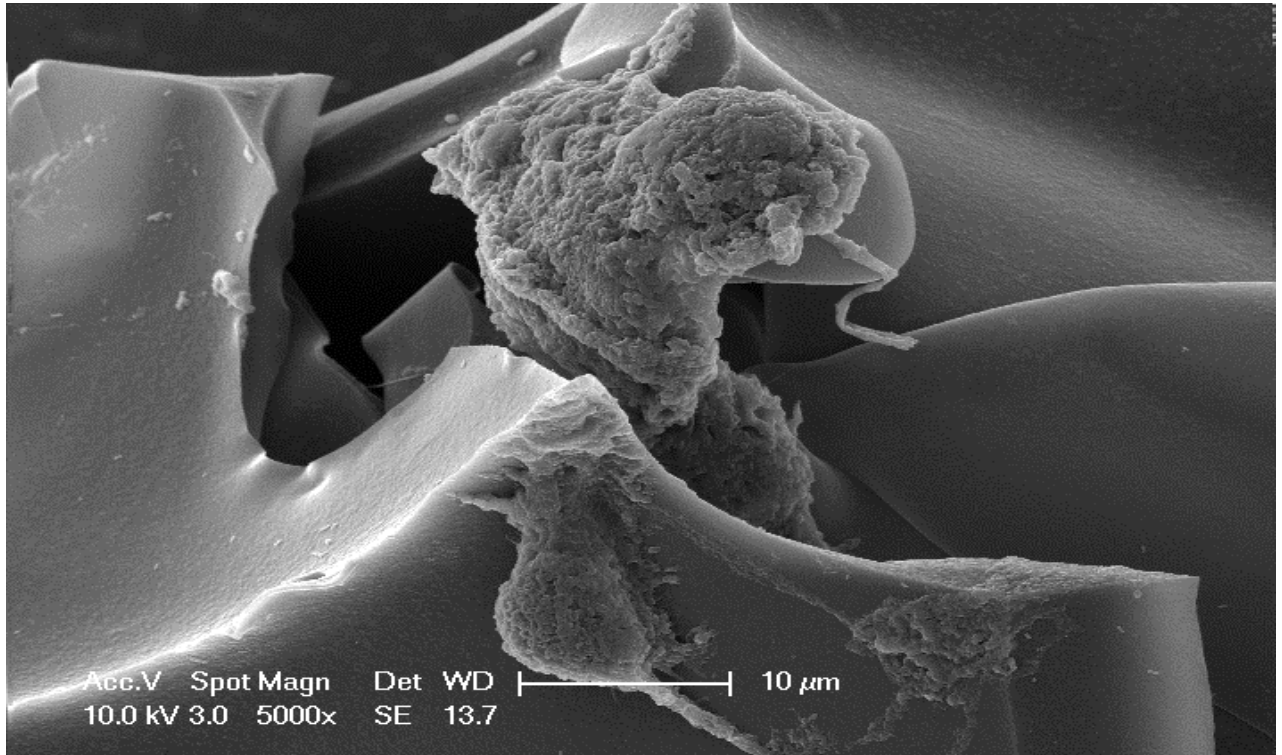
SEM’ de görüntülerinin incelenebilmesi için kademeli olarak farklı konsantrasyonlarda etil alkol ile etkileştirilerek hücrelerin sabitlenmesi sağlanmış (Örnekler %2.5 glutaraldehit fosfat tamponunda (pH: 7.2) 1-2 saat bekletilmiş; %30, %50, %70, %80, %90, %95 ve %100 konsantrasyonlardaki etanol çözeltisi ile dehidrate edilmişlerdir). Kuyulardan alınan ve etanolle dehidrate olan iskeleler altın kaplama yapılarak SEM görüntüleri alınmıştır.

Tablo 4.6. Hücrelerin fiksasyonu için kullanılan prosedür

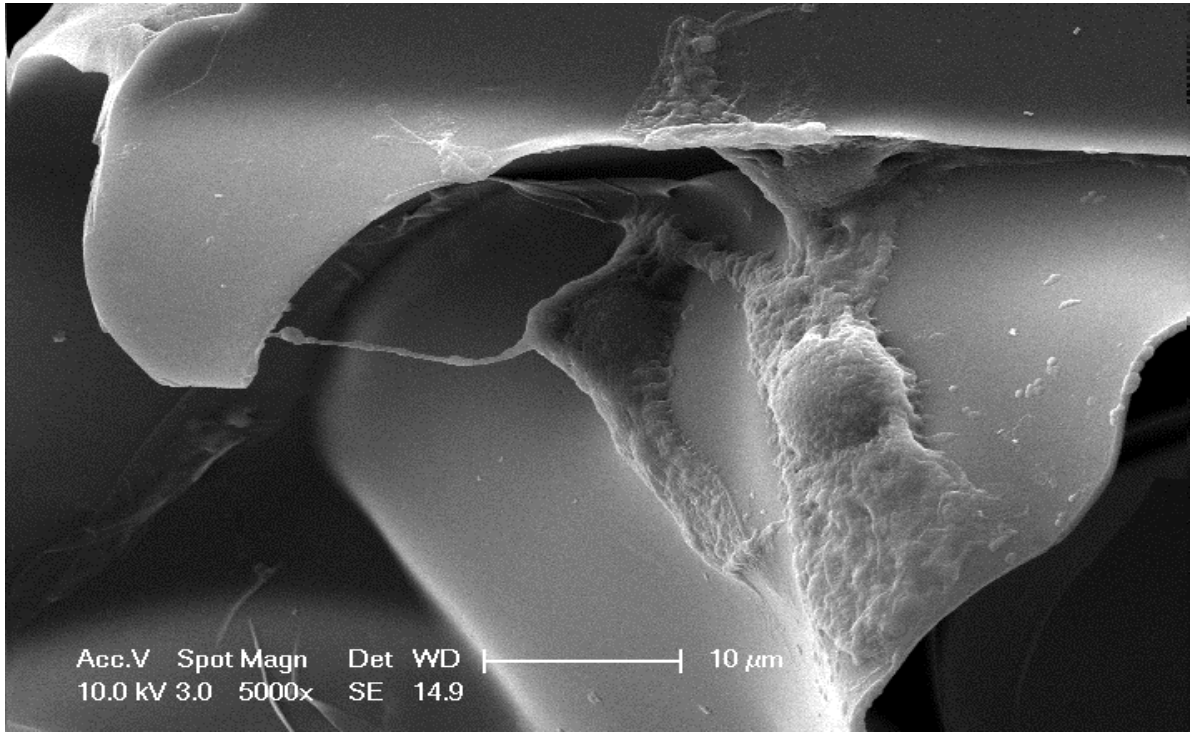
	Kimyasal	Sıcaklık	Zaman	Tekrar Sayısı
Fiksasyon	Suyun içerisinde %2,5-%3 Glutaraldehit	Oda sıcaklığı	1-2 saat	1
Yıkama	Destile su	Oda sıcaklığı	10-20 dakika	3-5
Dehidrasyon	%30 etanol	Oda sıcaklığı	10 dakika	1
	%50 etanol		10 dakika	1
	%70 etanol		10 dakika	1
	%80 etanol		10 dakika	1
	%90 etanol		10 dakika	1
	%95 etanol		10 dakika	1
	%100 etanol		10-30 dakika	2



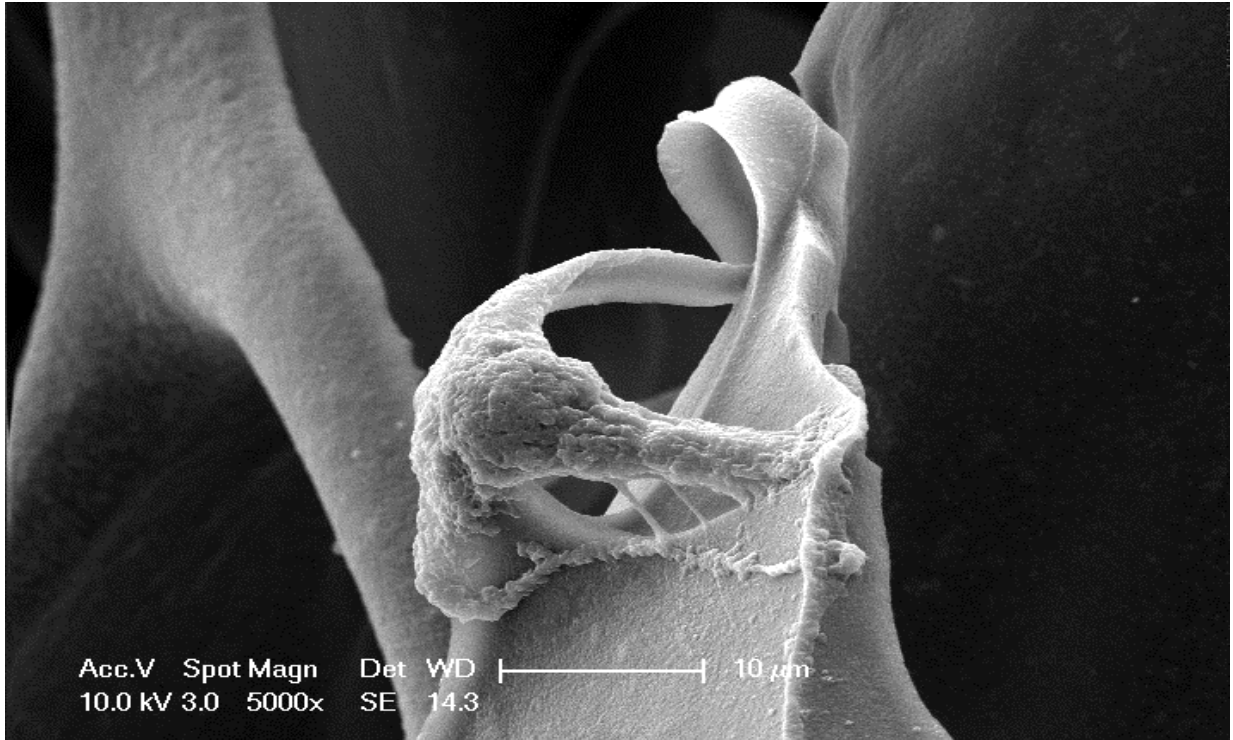
Şekil 4.36. 4G2C kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması



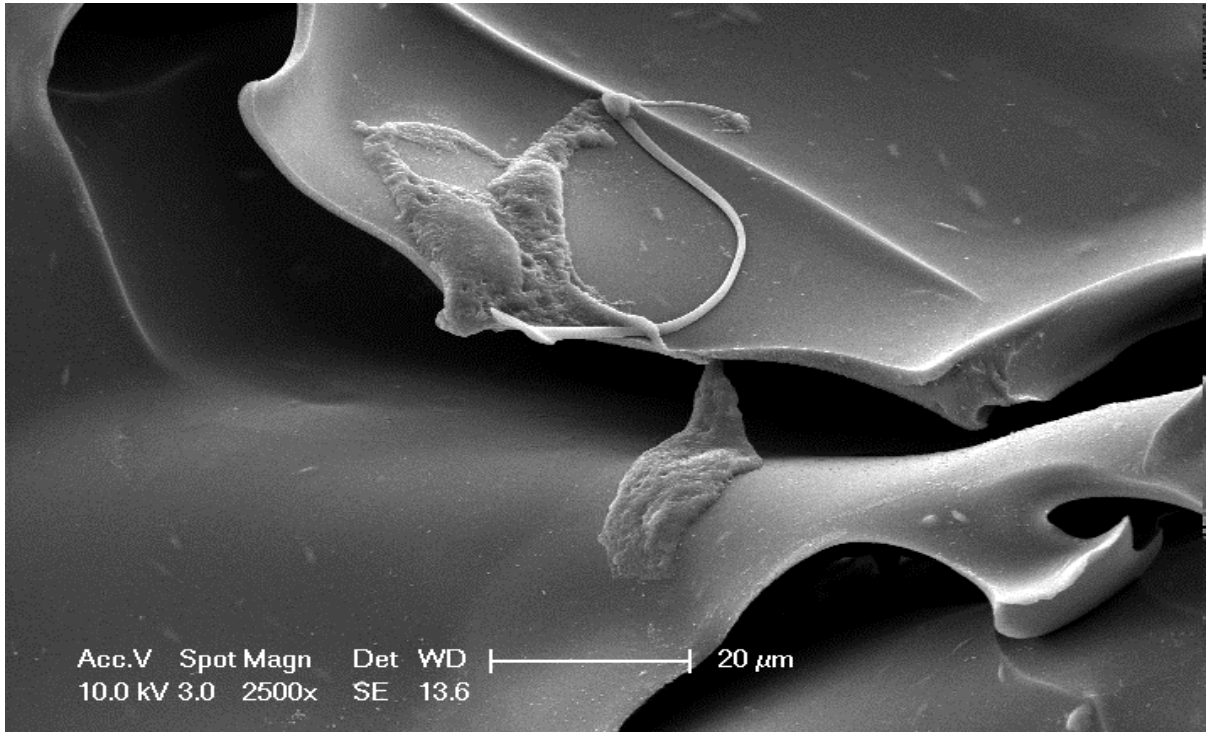
Şekil 4.37. 4G2C10HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması



Şekil 4.38. 4G2C20HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması

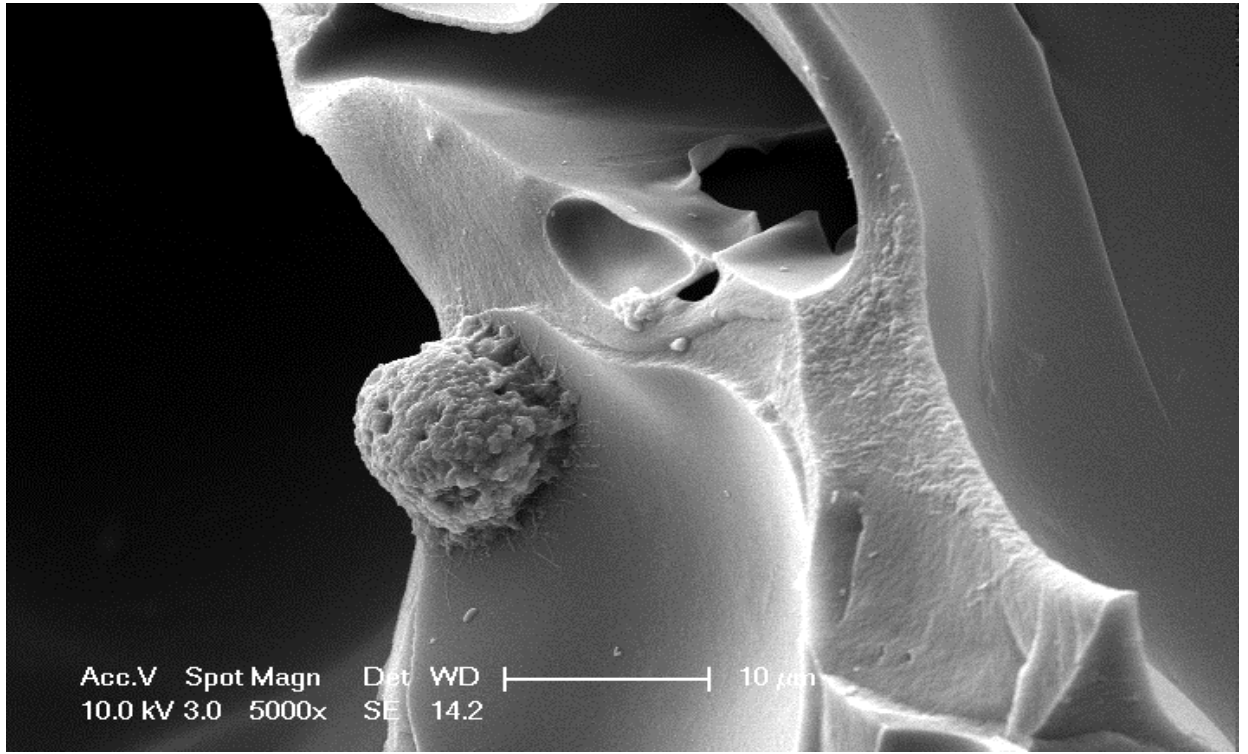


Şekil 4.39. 4G2C30HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması

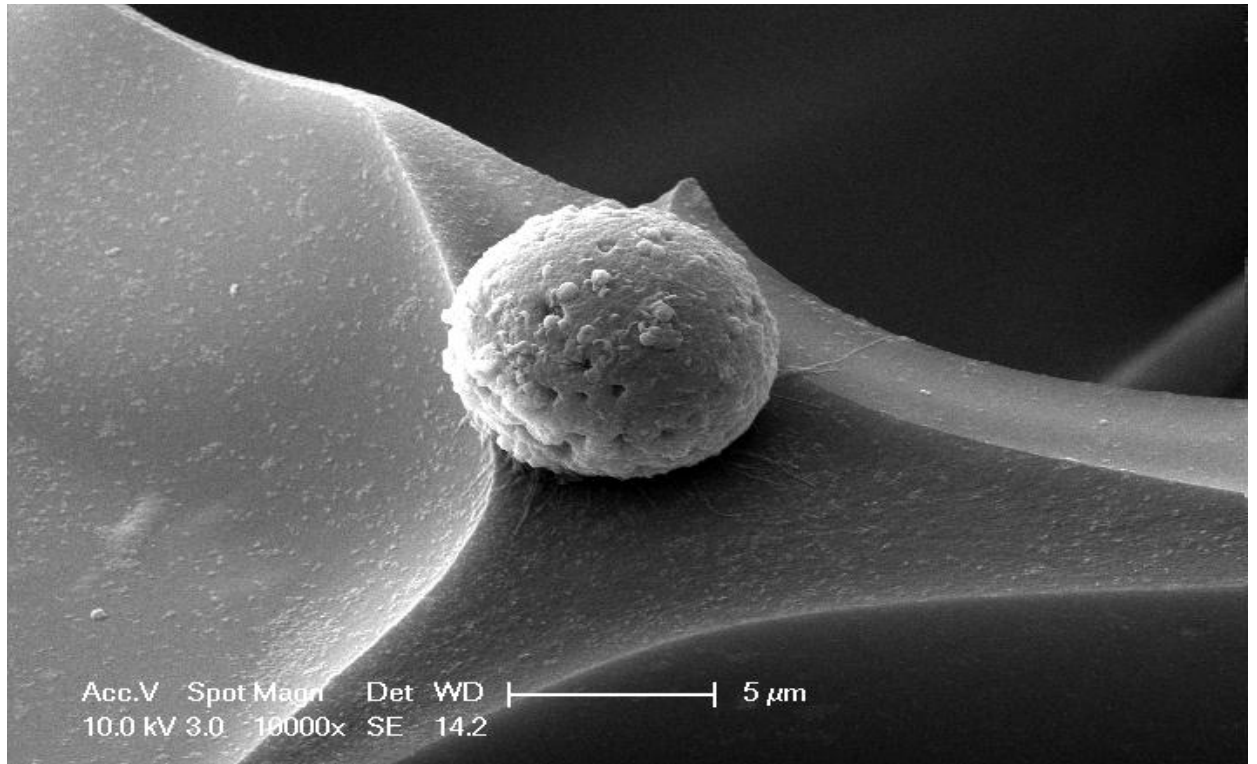


Şekil 4.40. 4G2C50HY kodlu kriyojele 3T3 fibroblast hücresinin yapışması

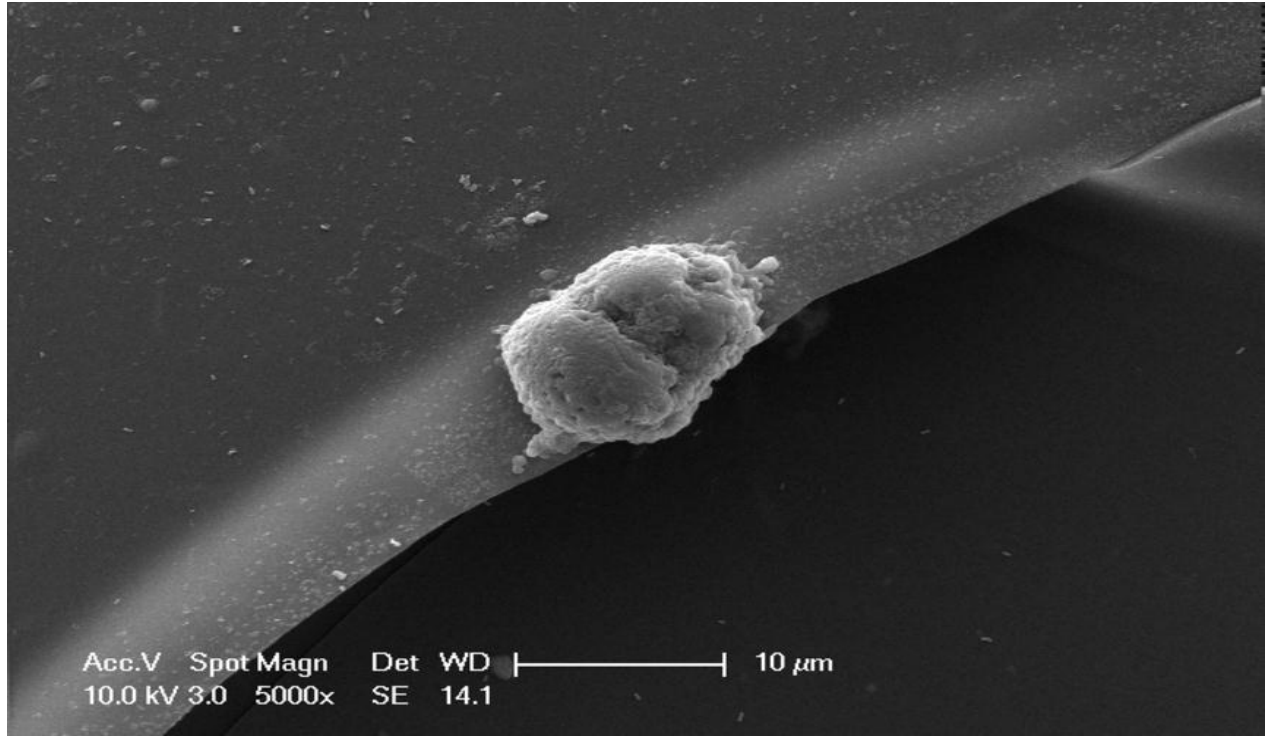
Ekilen 3T3 ve SAOS-2 hücrelerinin iskelelere yapışma aktivitelerini gözlemlemek için yapılan SEM analizi sonucunda hücre iskelesine yapıştıkları ve hücre yaşamının gerçekleştiği görülmektedir. Kitosanın sahip olduğu daha sert yapı özelliği ve daha dar gözeneklere sahip olmasından kaynaklı olarak hücrelerin yaşayıp yayılabilmesi için kitosanın kopolimerleri ile karşılaştırıldığında daha dar bir alan bulunmaktadır [69,70]. Hyaluronik asit bulunan kopolimerlerinde ise özellikle daha esnek yapısı ve geniş gözenekleri sayesinde hücreler kolayca yayılabilecek alan bulabilirler. Fakat hyaluronik asit oranının artmasıyla hücre yaşamının arttığını çok net olarak söylemek mümkün değildir [9,14].



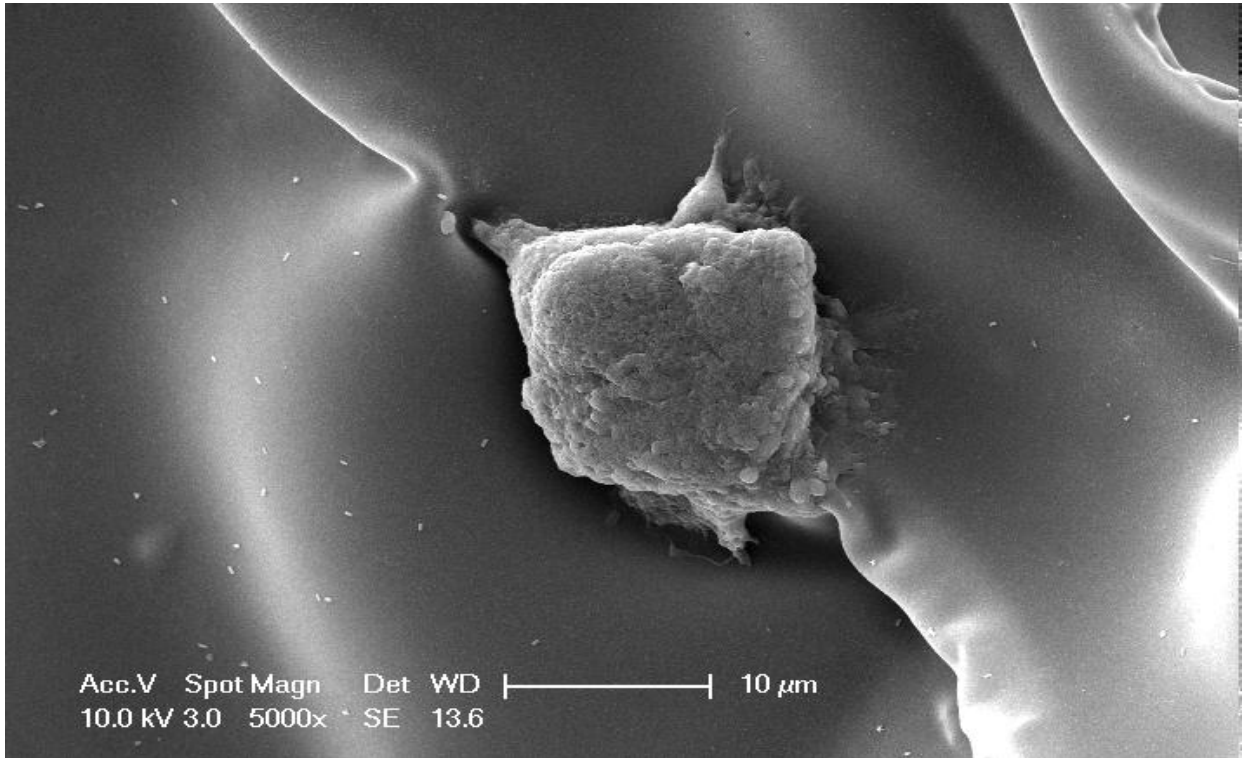
Şekil 4.41. 4G2C kodlu kriyojele SAOS-2 hücresinin yapışması



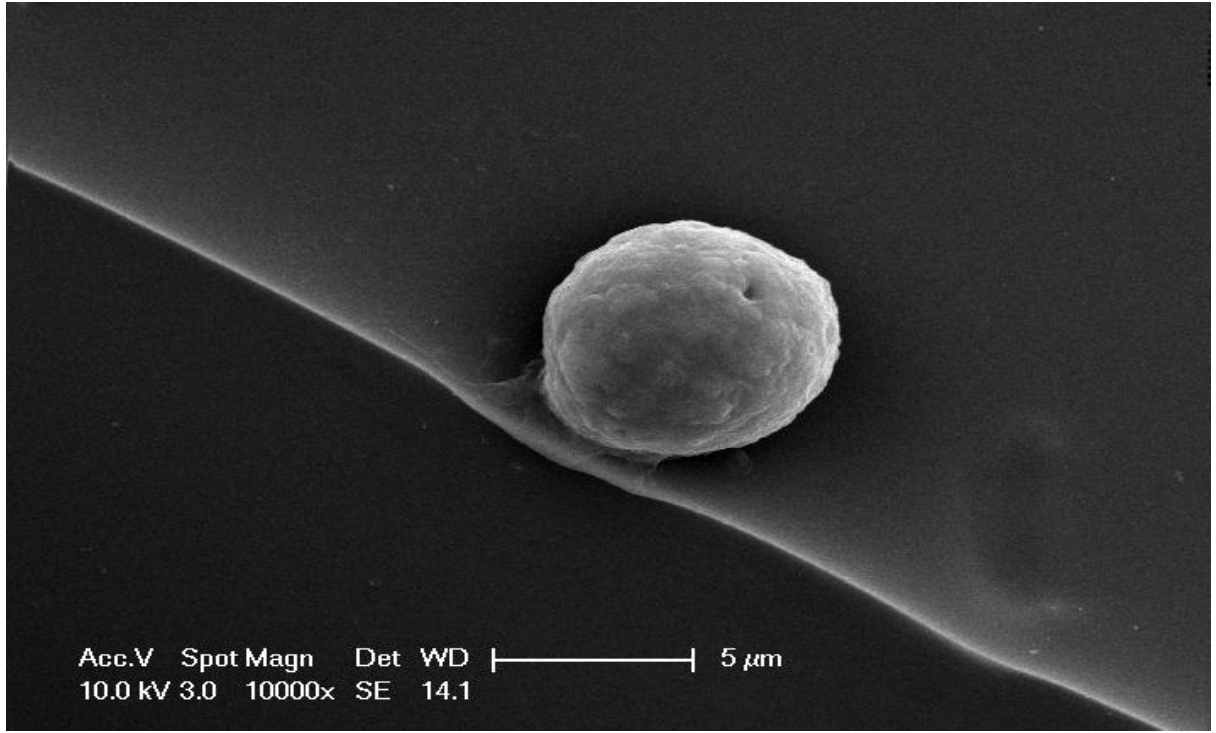
Şekil 4.42. 4G2C10HY kodlu kriyojele SAOS-2 hücresinin yapışması



Şekil 4.43. 4G2C20HY kodlu kriyojele SAOS-2 hücresinin yapışması



Şekil 4.44. 4G2C30HY kodlu kriyojele SAOS-2 hücresinin yapışması



Şekil 4.45. 4G2C50HY kodlu kriyojele SAOS-2 hücresinin yapışması

Kanser hücreleri canlı vücudunda en hızlı çoğalabilen hücrelerdir. SEM görüntülerinde hızlı çoğalma gösterdiği anlaşılmassa da yapılan kriyojelin üzerinde kanser hücresinin yaşaması kriyojelin biyolojik olarak yaşama uygun bir ortam oluşturduğunu gösterebilmektedir. [71].

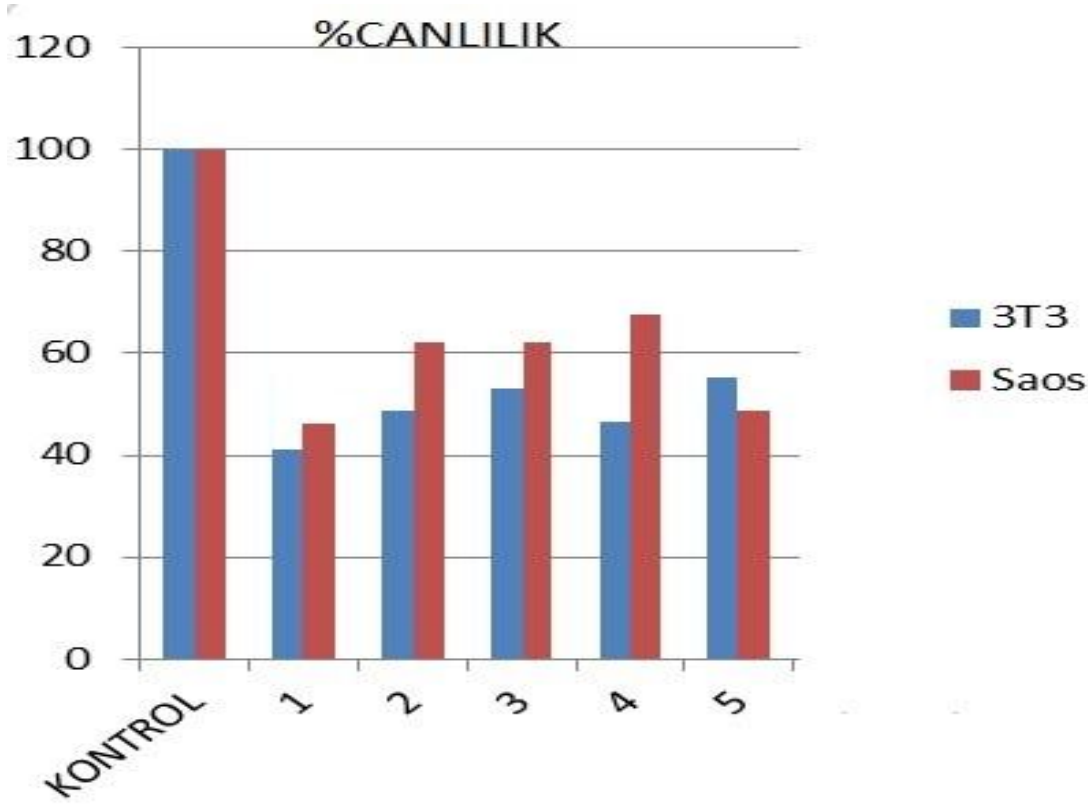
4.8.2. MTT Testi

MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-dipheniltetrazol bromid) testi, hücre ve malzeme arasındaki etkileşim sonucunda, üretilen malzemenin hücreler üzerinde toksik etkisinin incelenmesini sağlar. MTT testi için 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Plakların yatay kısmında 12 kuyucuk, düşey kısmında ise 8 kuyucuk bulunmaktadır. Kriyojeller eşit büyüklükte kesilip kuyulara yerleştirildi. En üst yatay bölme sadece hücrelerin eklendiği kuyucuklar olup bu kuyucuklardan alınan sonuçlar kontrol grubu olarak kullanıldı. Üzerlerine 100 μ L serumsuz DMEM eklendi. Bir gece UV' de sterilize edildiler.

MTT çalışması 3T3 fare fibroblast hücresi ve SAOS-2 (osteosarkom) hücreleri kullanılarak yapıldı. Hem 3T3 hem de SAOS-2 hücreleri %10 FBS (fetal bovine serum) içeren DMEM' de çoğaltıldı. Hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak tripan blue boyasıyla

sayım yapıldı. Polimerlerin üzerlerine mililitrede 100 bin hücre olacak şekilde 200 µL hacimde ekim yapıldı. 72 saat boyunca 37°C' de %5' lik CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. 72 saat sonunda MTT boyasından 20 µL eklendi. 3-4 saat 37 derecelik etüvde karanlıkta bekletildi

ELİSA Reader'da ölçüm yapılmadan önce polimerler tek tek çıkartılarak 100 µL DMSO' da formazan kristalleri çözdürüldü. 570 nm' de absorbanslar ölçüldü. Kontrol grubundaki ortalama absorbans değeri 100 kabul edilerek diğer etkileşim gruplarındaki canlılıkların hesaplanmasıyla 'yüzde canlılık değerleri' bulunmuştur.



Şekil 4.46. (1) 4G2C (2) 4G2C10HY (3) 4G2C20HY (4) 4G2C30HY (5) 4G2C50HY 3T3 ve SAOS-2 hücrelerinin canlılık oranları

MTT testinden görüldüğü üzere tüm kriyojel iskeleler biyoyumlu ve hücre yaşamına elverişli yapıdadır. Kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilmiştir. SAOS-2 kanser hücresi olmasından dolayı daha hızlı bir çoğalma ve yüksek bir canlılık oranına sahiptir. Fakat 3T3 hücreleri ile aralarında çok büyük bir oran farkları yoktur. Hyaluronik asit katkısıyla canlı yüzdesinde bir artış gözlenmiş fakat bu artış önemli

derece bir canlılık yüzdesine karşılık değildir. Literatür ile karşılaştırıldığında canlılık oranları beklenenden az (yaklaşık yarısı kadar az) değerlerde gözlenmiştir. Bunun en büyük sebebi UV’ de absorbans ölçümü yapılacağı sırada kuyulardan çıkarma işlemi olmasıdır. Bu sırada bazı hücrelerin dağıldığı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda bu sorunun giderilmesi önerilmektedir [14,17].

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kriyojelasyon yöntemi doku iskelesi uygulamalarında sıkça kullanılan bir tekniktir. Kriyojelasyon yönteminin bu alanda seçilmesinin en büyük nedenleri arasında diğer yöntemlere göre uygulanış bakımından kolay olduğunun düşünülmesidir. Bunun nedeni ise polimerizasyon sonunda safsızlıkların giderilmesi için uygulanan zahmetli ve zaman gerektiren bir takım uzun yıkama işlemlerinin olmamasıdır. Bunun dışında porojen olarak ekstra bir kimyasal kullanılmamasıdır. Porojen görevini çözücünün donmuş buz kristalleri görmektedir. Bizim çalışmamızda kitosan ve hyaluronik asit gibi doğal olan polimerlerle kriyojelasyon yöntemi kullanılmıştır. Kitosan ve hyaluronik asitin insan vücudu için biyouyumlu özellikte ve toksik etki göstermemeleri hücre büyümesi için önemli unsurlardır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda ekilen 3T3 ve SAOS-2 hücreleri iskele yapısına tutunmuş ve çoğalma gözlenmiştir. Fakat MTT testinde iskele yapının kuyulardan çıkarılması sırasında oluşan hücre kayıplarından dolayı canlılığın beklenenden az olduğu düşünülmüştür. Ağ yapının oluşması için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmış ve konsantrasyon olarak da yapılan çalışmalar sonucunda hareketle %0,4 oranı en uygun çapraz bağlayıcı oranı olarak bulunmuştur. Çapraz bağlanma gerçekleşirken C=N imin yapısı meydana gelmektedir ve FTIR da incelendiğinde 1630 cm^{-1} civarındaki pik spesifik olarak kaydedilmiştir. Bu yapıya literatürde Schiff Base formu denilmektedir. Rezonans yapıdan dolayı FTIR’ da C=C bağı 1540 cm^{-1} civarında pik vermiştir. 1150 cm^{-1} civarında da her iki kimyasalın yapısından kaynaklı eter köprüleri için bant gözlenmiştir. Bunun dışında ikincil bağlar olarak kitosanın katyonik özelliği ve hyaluronik asitin anyonik özelliğinden dolayı iyonik bağlar da yapıda bulunabilmektedir. Bununla beraber zayıf hidrojen bağları da oluşabilmektedir. Hyaluronik asit ile kitosan direk olarak da bağlanabilmektedir fakat çapraz bağlayıcı ile elde edilen bağlar kadar baskın olmadığı düşünülmektedir. Kriyojellerin termal kararlılıkları incelendiğinde kitosana hyaluronik asit eklendiğinde ilk olarak en kararlı yapının gözlemlendiği daha sonra ise artan hyaluronik asitin eklenmesiyle termal kararlılığın azaldığı gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak çapraz bağlanmanın en yüksek %10’ luk hyaluronik asit eklendiğinde olduğu düşünülmektedir. Tg değerleri karşılaştırıldığında ise çapraz bağlı kitosanın en yüksek Tg (200°C)’ ye

sahip olduğu görölür. Artan hyaluronik asit miktarıyla Tg değeri düşmüştür. Şişme davranışları incelendiğinde kitosanın farklı konsantrasyonda çapraz bağlayıcı ile elde edilen kriyojellerde en yüksek oranda şişme %0,4 konsantrasyondaki çapraz bağlayıcı kullanıldığında elde edilmiştir. %0,4 konsantrasyon kullanılıp elde edilen kopolimerlerde ise hyaluronik asitin yüksek orandaki su tutma kapasitesinden ötürü artan hyaluronik asit ile şişme yüzdesi de artmıştır. Kriyojellerin en önemli özelliklerinden biri ise çok hızlı şişme özelliğine sahip olmasıdır. Yapılan deneylerdeki sonuçlarda da birkaç saniyede şişme gerçekleşmiş ve ilk 10 dakika için tüm kriyojeller denge şişme değerlerine ulaşmışlardır. SEM görüntüleri incelendiğinde ise çapraz bağlayıcı konsantrasyonu artmasıyla daha dar gözenekler elde edilmiş. Çapraz bağlayıcı sabit tutulup hyaluronik asitin artan miktarı ile ise zincirlerde esnemeye neden olmakta ve geniş gözenek yapısı oluşmaktadır. Kitosanın gözenek yapısı 90-150 µm arasında değişirken kopolimerlerde 150-200 µm arasında değişen gözenek çapları ölçülmüştür. Gözenekliliğe bakıldığında ise %90 ve üzerinde kaydedilmiştir. Yapıların in vitro ortamda degradesyonları incelendiğinde en yüksek yapıdaki bozunma kitosan kriyojelde daha sonra ise daha elastik yapıda olan kopolimerlerinde gerçekleşmiştir. Mekanik test sonucunda da kitosanın kırılğan bir yapıya sahip olduğu gözlenmiş, elde edilen kopolimerleri ise %60-70 civarında deformasyona kadar orijinal şekillerini koruduğu gözlenmiştir. Bu elde edilen sonuçlar doğrultusunda kitosanın hyaluronik asit ile sentezlenen kriyojelasyon yöntemi kullanılan doku iskeleleri doku mühendisliği alanında kullanım için uygun kriterlere sahiptir.

KAYNAKÇA

1. A. Sivashanmugam, R. Arun Kumar, M. Vishnu Priya, Shantikumar V. Nair, R. Jayakumar ‘An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering’ *European Polymer Journal* 72 (2015) 543–565
2. Jeanie L. Drury, David J. Mooney ‘Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications’ *Biomaterials* 24 (2003) 4337–4351
3. Hakan Ayhan, Fatma Ayhan ‘Photocrosslinked poly(ethylen glycol) hydrogels for controlled drug delivery’ *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem)* 2014; 39(4):403–415
4. Enrica Caló, Vitaliy V. Khutoryanskiy ‘Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products’ *European Polymer Journal* 65 (2015) 252–267
5. Ashok Kumara, Ruchi Mishraa, Yvonne Reinwaldb, Sumrita Bhata ‘Cryogels: Freezing unveiled by thawing’ ISSN:1369 7021 © Elsevier Ltd 2010
6. Vladimir I. Lozinsky, Igor Yu. Galaev, Fatima M. Plieva, Irina N. Savina¹, Hans Jungvid ve Bo Mattiasson ‘Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest’ *TRENDS in Biotechnology* Vol.21 No.10 October 2003
7. J.-K. Francis Suh, Howard W.T. Matthew ‘Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review’ *Biomaterials* 21 (2000) 2589-2598
8. Florence Croisier, Christine Jérôme ‘Chitosan-based biomaterials for tissue engineering’ *European Polymer Journal* 49 (2013) 780–792
9. Maurice N. Collins, Colin Birkinshaw ‘Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review’ *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 1262– 1279
10. Subrata Deb Nath, Celine Abueva, Boram Kim, Byong Taek Lee, ‘Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2’ *Carbohydrate Polymers* 115 (2015) 160–169
11. Vladimir M. Gun'ko, Irina N. Savina, Sergey V. Mikhlovsky, ‘Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation.’ *Advances in Colloid and Interface Science* 187–188 (2013) 1–46

12. B.S. Anisha, Raja Biswas, K.P. Chennazhi, R. Jayakumar 'Chitosan–hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds' *International Journal of Biological Macromolecules* 62 (2013) 310–320
13. Seon Jeong Kima, Seoung Gil Yoona, Kyu Back Leeb, Yong Doo Parkb, Sun I. Kima, 'Electrical sensitive behavior of a polyelectrolyte complex composed of chitosan/hyaluronic acid' *Solid State Ionics* 164 (2003) 199–204
14. Kun-Hung Chang, Han-Tsung Liao, Jyh-Ping Chen 'Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies' *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 9012–9026
15. Hyejin Park, Bogyu Choi, Junli Hu, Min Lee 'Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering' *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 4779–4786
16. Junli Hu, Yaping Hou, Hyejin Park, Bogyu Choi, Siying Hou, Amy Chung, Min Lee 'Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering' *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 1730–1738
17. Neeraj Kathuria, Anuj Tripathi, Kamal K Kar, Ashok Kumar 'Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering' *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 406–418
18. Sytze J. Buwalda, Kristel W.M. Boere, Pieter J. Dijkstra, Jan Feijen, Tina Vermonden, Wim E. Hennink 'Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials' *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 254–273
19. Naziha Chirani, L'Hocine Yahia, Lukas Gritsch, Federico Leonardo Motta, Soumia Chirani, Silvia Faré 'History and Applications of Hydrogels' *Journal of Biomedical Sciences* ISSN 2254-609X
20. Allan S. Hoffman 'Hydrogels for biomedical applications' *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 18–23
21. Enas M. Ahmed 'Hydrogel: Preparation, characterization and applications: A review' *Journal of Advanced Research* (2015) 6, 105–121

22. K. Pal, K. Banthia ve K.majumdar ‘Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications’ *Designed Monomers and Polymers* 12 (2009), Pages 197-220.
23. Fatima M. Plieva¹, Igor Yu. Galaev², Wim Noppe³ and Bo Mattiasson ‘Cryogel applications in microbiology’ 2008 Elsevier Ltd
24. Kemal çetin ‘Moleküler baskılanmış kriyojel disklerden florourasil salınımı’ (2013)
25. Fergal J. O’Brien ‘Biomaterials & scaffolds for tissue engineering’ ISSN:1369 7021 © Elsevier Ltd 2011
26. Fatema Tuj Zohora ‘Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: a review’ ISSN: 1857 – 7881
27. Elif Vardar ‘Investigation of cell migration and proliferation in agarose based hydrogels for tissue engineering applications’ (2010)
28. J.-K. Francis Suh’, Howard W.T. Matthew ‘Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review’ *Biomaterials* 21 (2000) 2589-2598
29. Vassilis Karageorgiou, David Kaplan ‘Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis’ *Biomaterials* 26 (2005) 5474–5491
30. A Vats, N.S. Tolley, J.M. Polak, J.E. Gough ‘Scaffold and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications’ *Clinical Otolaryngology* 28(3):165-72 · July 2003
31. Emine AKAR ‘Aktif polimerlerin hazırlanması ve karakterizasyonu’
32. Seon Jeong Kim ; Seoung Gil Yoon ; Kyu Back Lee ; Yong Doo Park ; Sun I. Kim ‘Electrical sensitive behavior of a polyelectrolyte complex composed of chitosan/hyaluronic acid’ *Solid State Ionics* 164 (2003) 199 – 204
33. Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. ‘Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering’ *Biomaterials*. 2009 May;30(13):2499-506.
34. Majeti N.V. Ravi Kumar ‘A review of chitin and chitosan applications’ *Reactive & Functional Polymers* 46 (2000) 1–27
35. Rinaudo M. ‘Chitin and chitosan: properties and applications’ *Prog Polym Sci* 2006;31:603–32.

36. Craveiro AA, Craveiro AC, Pontes DF, Brasil IM, Cesar LT, Cabral MdF et al. 'Use of chitosan in clarification of beverages.' 2012; BR 2010001795 A2: 11p.
37. Pavinatto FJ, Caseli L, Oliveira Jr ON. 'Chitosan in nanostructured thin films. Biomacromolecules' 2010;11:1897–908
38. He P, Davis SS, Illum L. 'In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres'. Int J Pharm 1998;166: 75–88.
39. Funkhouser JD, Aronson Jr NN. 'Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family.' BMC Evol Biol. 2007; 7:96:16 pp.
40. Dutta P, Rinki K, Dutta J. 'Chitosan: a promising biomaterial for tissue engineering scaffolds. Chitosan for biomaterials'. Advances in polymer science. Heidelberg: Springer Berlin; 2011. p. 45–79
41. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. 'Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications' Prog Polym Sci 2011;36:981–1014.
42. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. 'Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications' Eur J Pharm Biopharm 2004;57:35–52.
43. S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and E. Schacht 'Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review' Biomacromolecules, 2011, 12 (5), pp 1387–1408
44. Kenji Tomihata, Yoshito Ikada 'Crosslinking of Hyaluronic Acid with Glutaraldehyde' Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 35, 3553–3559 (1997)
45. Prerna P. Dhawade* and Ramanand N. Jagtap 'Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry' Advances in Applied Science Research, 2012, 3 (3):1372-1382
46. Chun-Yan Oua, Chao-Hua Zhangb, Si-Dong Li, Lei Yanga, Jing-Jing Donga, Xue-Liu Moa, Mu-Ting Zenga 'Thermal degradation kinetics of chitosan–cobalt complex as studied by thermogravimetric analysis' Carbohydrate Polymers 82 (2010) 1284–1289

47. Jerzy Zawadzki, Halina Kaczmarek ‘Thermal treatment of chitosan in various conditions’ *Carbohydrate Polymers* 80 (2010) 394–400
48. A. Pawlak, M. Mucha* ‘Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends’ *Thermochimica Acta* 396 (2003) 153–166
49. Bin Li, Chang-Lin Shan, Qing Zhou, Yuan Fang, Yang-Li Wang, Fei Xu, Li-Rong Han, Muhammad Ibrahim, Long-Biao Guo, Guan-Lin Xie 1 and Guo-Chang Sun, ‘Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde’ *Mar. Drugs* 2013, 11, 1534-1552; doi:10.3390/md11051534
50. Behiye Öztürk ‘Preparation and characterization of crosslinked chitosan based hydrogels’ (2011)
51. Emel Gür ‘Preparation, characterization and utilizations of chitosan-sepiolite biocomposites’ (2010)
52. Refika YILDIZ ‘Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)-borate/chitosan films’ (2013)
53. Burcu Yolaçan ‘Sodyum aljinat/kitosan sulu çözeltilerinde polielektrolit kompleks oluşumunu etkileyen faktörler’
54. İlker KARACA ‘poli (vinil alkol) / sodyum aljinat ve poli (vinil alkol) / kitosan mikrokürelerden salisilik asitin kontrollü salımı’ (2006)
55. O A Monteiro, C Airoidi ‘Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system’ *International Journal of Biological Macromolecules* 26 (1999) 119–128
56. Guogen Liu ; Lei Shao ; Fei Ge ; Jianfeng Chen ‘Preparation of ultrafine chitosan particles by reverse microemulsion’ *China Particuology* 5 (2007) 384–390
57. Peng-Zhi Hong, Si-Dong Li, Chun-Yan Ou, Cheng-Peng Li, Lei Yang, Chao-Hua Zhang ‘Thermogravimetric Analysis of Chitosan’ *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 105, 547–551 (2007)
58. C.G.T. Neto, J.A. Giacomettib, A.E. Jobb, F.C. Ferreirab, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira, ‘Thermal Analysis of Chitosan Based Networks’ *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 105, 547–551 (2007)

59. K. Sakurai, T. Maegawa, T. Takahash ‘Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends’ *Polymer* 41 (2000) 7051–7056
60. Miyashita Y, Yamada Y, Kimura N, Nishio Y, Suzuki H. SEN-I GAKKAISHI. ‘Designing and Characterization of New Types of Polymer Blends and Composites with Cellulose and Chitin’
61. Kim SS, Kim SJ, Moon YD, Lee YM. *Polymer* 1994;35:3212 ‘Preparation, characterization and properties of β -chitin and N-acetylated β -chitin’ *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, Vol. 34,2367-2374 (1996)
62. Ratto J, Hatakeyama T. *Polym*; 1995, 36, 2915-2919. ‘Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol’ *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 31(2): 450-455, abr.-jun. 2011
63. Lazaridou A, Biliaderis C. *Carbohy. Polym*; 2002, 48, 179-190. ‘Thermophysical properties of chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition’ *Carbohydrate Polymers* 48 (2002) 179-190
64. Kittur F, Prashanth K, Uday Sanka K, Tharanathan R. ‘Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry’ *Carbohy. Polymer*, 49, 185-193 (2002)
65. Hollister SJ ‘Porous scaffold design for tissue engineering’ *Nature Materials* 4, 518 - 524 (2005)
66. Plieva FM1, Andersson J, Galaev IY, Mattiasson B. ‘Characterization of polyacrylamide based monolithic columns’ *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 828 – 836
67. Plieva FM1, Savina IN, Deraz S, Andersson J, Galaev IY, Mattiasson B. ‘Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles’ *Journal of Chromatography B*, 807 (2004) 129–137
68. Martin Rodríguez-Vázquez, Brenda Vega-Ruiz, Rodrigo Ramos-Zúñiga, Daniel Alexander Saldaña-Koppel, and Luis Fernando Quiñones-Olvera ‘Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine’ *BioMed Research International Volume* 2015 (2015)

69. Selva Burçin Hizmetli ‘Doku mühendisliği için kitosan içeren doku iskelesi geliştirilmesi: formülasyon ve in vitro değerlendirmeler’ (2012)
70. Nimet Bölgen, ‘Hema-laktat-dekstran kriyojellerin üretimi ve doku mühendisliğinde uygulamaları’
71. İlyas İnci, ‘Kalvaryal defektlerin onarımında jelatin/hidroksiapatit esaslı kriyojel doku iskelelerinin etkisi’

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğçe KUTLUSOY

Doğum yeri ve tarihi: İzmir, 09/02/1991

Yabancı dili: İngilizce

E-posta: tugce_kutlusoy@hotmail.com

Öğrenim durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Sayısal	Bandırma Anadolu Lisesi	2009
Üniversite	Kimya	Marmara Üniversitesi	2013

İş Deneyimi

Yıl	Firma/ Kurum	Görevi
2011	Eti Maden İşletmeleri	Stajyer